

T.C.

F.Ü. TIP FAKÜLTESİ

BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARDİYAK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA
NİTRİK OKSİT VE SERBEST RADİKALLERİN ROLÜ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

UZMANLIK TEZİ

T 107688

Dr. Şemsettin ŞAHİN

107688

ELAZIĞ 2001

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. S. Serra Kılıç.....

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur

S. Serra Kılıç

Doç. Dr. M. Ferit GÜRSU
Biyokimya A.B.D. Bşk.

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Necip İHAN.....

Danışman

Necip İhan

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ali DEMİR.....

Doç. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ.....

Y. Doç. Dr. Saadet AKARSAH.....

Doç. Dr. M. Ferit GÜRSU.....

Doç. Dr. Necip İHAN.....

Ali Demir
Bilal Üstündağ
Saadet Akarsah
M. Ferit Gürsu
Necip İhan

*Onlar'la hayatın güzelliklerini yakaladığım
eşim Eda, gözbebeklerim Nureddin ve Sare'ye*



TEŐEKKÜR

Tez konumun seçiminde, tez çalıőmalarım sırasında ve ihtisas dönemim boyunca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Doç Dr Necip İLHAN 'a teőekkürü bir borç bilirim.

Çalıőmalarım sırasında ve ihtisas süresince yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr Ferit GÜRSU ve Anabilim Dalımızın değerli ğretim üyeleri; Doç. Dr Bilal ÜSTÜNDAĞ, Doç. Dr Halit CANATAN, Y. Doç. Dr İhsan HALİFEOĞLU, Y. Doç. Dr Nevin İLHAN, Y. Doç. Dr Süleyman AYDIN, ğretim Görevlisi Nermin KILIÇ ve histopatolojik incelemelerde büyük emeği geçen Y. Doç. Dr Nusret AKPOLAT'a saygılarımı sunarım. Ayrıca tez çalıőmalarım sırasında yardımcı olan Dr Mustafa AĞKADİR, Dr Dilara SEÇKİN ve asistan arkadaşlarım ile biyokimyada görevli bütün personele teőekkür ederim.

Bu çalıőmayı 499 no'lu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Araştırma Fonuna da teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1.ÖZET	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ	3
3.1 Nitrik Oksit (NO')	4
3.1.1 Nitrik Oksitin Fizikokimyasal Özellikleri	5
3.1.2 Nitrik Oksit Biyosentezi ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS) İzoenzimleri	7
3.1.2.1 Yapısal Nitrik Oksit Sentaz	8
3.1.2.2.İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz	9
3.1.3.Nitrik Oksitin Moleküler Etkileri	12
3.1.4.Nitrik Oksitin Biyokimyasal Fonksiyonları	13
3.1.4.Nitrik Oksit'in Biyolojik Etkileri	14
3.1.5 Nitrik Oksit Ölçümü	15
3.2.Nitrik Oksitin Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	15
3.2.1. Nitrik Oksitin Kardiyovasküler Hastalıklardaki Rolü	16
3.2.2. Nitrik Oksitin Sinir Sistemindeki Rolü	18
3.2.3. Nitrik Oksitin Diyabetdeki Rolü	19
3.2.4. Nitrik Oksitin Sindirim ve Solunum Sistemindeki Rolü	20
3.2.5.Nitrik Oksitin İmmun Sistemdeki Rolü	21
3.2.6. Nitrik Oksitin İskemi-Reperfüzyondaki Rolü	22
3.2.7. Nitrik Oksit ve Türevlerinin Farmakolojik Özellikleri	23
3.2.8. Aminoguanidin ve Nitrik Oksit Sentaz Aktivitesindeki Rolü	25
3.3. Serbest Radikaller	27
3.3.1. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları	28
3.3.2. Serbest oksijen radikal türleri	30
3.3.3. Serbest radikallerin hücrel yapıları etkileri	31
3.3.4. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	32
3.3.5. Proteinlerde ve Nükleik Asitlerde Oluşan Yapısal Değişiklikler	33
3.4. Antioksidan Sistem	33

3.5. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Serbest Radikallerin Rolü	37
3.5.1. Kardiyak İskemi-Reperfüzyon	38
3.5.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Oksidan ve Antioksidanların Rolü	42
4. GEREÇ VE YÖNTEM	44
4.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Cerrahi Uygulama	44
4.2. Örneklerin Alınması ve Hemodinamik Parametrelerin Ölçülmesi	46
4.3. Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi	46
4.4. Ölçüm Yöntemleri	48
4.4.1. Doku ve Plazma Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Ölçümü	48
4.4.2. Doku Lipid Peroksit (LPO) Düzeylerinin Ölçümü	50
4.4.3. Plazma Lipid Peroksit (LPO) Düzeylerinin Ölçümü	50
4.4.4. Doku ve Plazma Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi	52
4.4.5. Doku ve Plazma (GSH-Px) Aktivitesinin Ölçümü	53
4.4.6. Doku ve Plazma Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü	54
4.4.7. Protein Düzeylerinin Ölçümü	55
4.4.8. Dokuların Histopatolojik İncelenmesi	56
4.4.9. İstatistiksel Analizler	56
5. BULGULAR	57
5.1. Doku ve Plazma NO Düzeylerinin Değişimi	57
5.2. Doku ve Plazma MDA Düzeylerinin Değişimi	58
5.3. Doku ve Plazma SOD Aktivitelerinin Değişimi	60
5.4. Doku ve Plazma GSH-Px Aktivitelerinin Değişimi	61
5.5. Doku ve Plazma Katalaz Aktivitelerinin Değişimi	62
5.6. Histopatolojik Bulgular	64
6. TARTIŞMA	67
7. KAYNAKLAR	78
8. ÖZGEÇMİŞ	88

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1 Nitrojenin okside metabolitleri	6
Tablo 2 Nitrik Oksit Sentaz'ın özellikleri	8
Tablo 3 NOS'ların hücresele dağılımı	11
Tablo 4 NO'nun moleküler hedefleri	12
Tablo 5 Doku ve plazma NO düzeylerinin değışimi	57
Tablo 6 Doku ve plazma MDA düzeylerinin değışimi	59
Tablo 7 Doku ve plazma SOD aktivitesinin değışimi	60
Tablo 8 Doku ve plazma GSH-Px aktivitelerinin değışimi	61
Tablo 9 Doku ve plazma katalaz aktivitelerinin değışimi	63
Tablo 10 Miyokard iskemi-reperfüzyonunda histopatolojik skortama	64

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1 L-Arjininden nitrik oksit üretimi	7
Şekil 2 Nitrik oksidin hücre düzeyindeki aktivasyonu ve etkileri	10
Şekil 3 Damarda nitrik oksit-süperoksid etkileşimi	18
Şekil 4 Aminoguanidin molekülünün ve hemisülfat tuzunun kimyasal yapısı	26
Şekil 5 Oksijen Radikallerinin hücre metabolik fonksiyonlarını bozma yolları	32
Şekil 6 İskemi-reperfüzyon hasarında endotelial hücrelerin rolü	39
Şekil 7 Ksantin oksidaz enzimi ile oksidan maddelerin üretilmesi	41
Şekil 8 Kalbin ve koroner arterlerin anatomik olarak görünüşü	45
Şekil 9 İskemi sırasındaki EKG,kalp atım hızı ve kan basıncı değişiklikleri	47
Şekil 10 Reperfüzyon sırasındaki EKG,kalp atım hızı ve kan basıncı değişiklikleri	47
Şekil 11 NO standart grafiği	49
Şekil 12 MDA standart grafiği	52
Şekil 13 Protein standart grafiği	55
Şekil 14 Doku NO düzeylerinin değişimi	58
Şekil 15 Plazma NO düzeylerinin değişimi	58
Şekil 16 Doku MDA düzeylerinin değişimi	59
Şekil 17 Plazma MDA düzeylerinin değişimi	59
Şekil 18 Doku SOD aktivitelerinin değişimi	60
Şekil 19 Plazma SOD aktivitelerinin değişimi	61
Şekil 20 Doku GSH-Px aktivitelerinin değişimi	62
Şekil 21 Plazma GSH-Px aktivitelerinin değişimi	62
Şekil 22 Doku Katalaz aktivitelerinin değişimi	63
Şekil 23 Plazma Katalaz aktivitelerinin değişimi	63
Şekil 24 Normal miyokardın (Sham) ışık mikroskopik görünümü	65
Şekil 25 Hasara uğramış miyokardın (İ/R) ışık mikroskopik görünümü	65
Şekil 26 İskemi öncesi AG uygulanan miyokardın ışık mikroskopik görünümü	66
Şekil 27 Reperfüzyon öncesi AG uygulanan miyokardın ışık mikroskopik görünümü	66

KISALTMALAR

- AG : Aminoguanidin
CAT : Katalaz
cNOS: Yapısal nitrik oksit sentaz
EDRF: Endotel kökenli damar gevşetici madde
FAD: Flavin amid adenin dinükleotid
GSH-Px: Glutasyon peroksidaz
HO₂[·] : Perhidroksil radikali
HOCl: Hipoklorik asit
H₂O₂ : Hidrojen peroksit
iNOS: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
IL: İnterlökin
IR: İskemi-Reperfüzyon
LPO: Lipid peroksidasyonu
LTP: Uzun süreli potansiyasyon
NADP:Nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (Okside formu)
NADPH:Nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (Redükte formu)
NO[·]: Nitrik oksit
NOS: Nitrik oksit sentaz
MDA: Malondialdehit
ONOO⁻: Peroksinitrit
¹O₂ : Singlet Oksijen
O₂⁻: Süper oksit radikali
[·]OH : Hidroksil radikali
PTA: Fosfo tungustik asit
PUFA: Poliansatüre yağ asidi
ROO[·]: Peroksi radikali
SOD: Süper oksit dismutaz
SOR: Serbest oksijen radikalleri
TBA:Tiyobarbiturik asit
TNF: Tümör nekroze edici faktör
XDH:Ksantin dehidrogenaz
XO: Ksantin oksidaz

1.ÖZET

Nitrik oksit ve serbest radikaller; iskemi-reperfüzyon esnasında hücrel yapılar da morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olur. Bu çalışmada deneysel olarak iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan ratların doku ve plazma örneklerinde nitrik oksit (NO*) ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyleri ile antioksidan enzimlerden (süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT)) aktivitelerinin değişimi incelenmiştir. Ayrıca bir antioksidan ve nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olan aminoguanidinin (AG) iskemi reperfüzyon hasarını önlemedeki rolü araştırılmıştır.

Çalışmada toplam 36 adet rat kullanılmış olup ve bu ratlar 4 eşit gruba bölünmüştür. Gruplar sham, iskemi-reperfüzyon (İ/R), iskemi öncesi aminoguanidin (İ/AG) ve reperfüzyon öncesi aminoguanidin (R/AG) grupları olarak belirlenmiştir. Gruplardan İ/R grubuna %0.9 NaCl, İ/AG ve R/AG gruplarına ise 10mg/kg dozda AG intravenöz olarak jüğüler venden iskemi ve reperfüzyon öncesi verilmiştir.

İskemi-reperfüzyon grubunda sham grubuna göre NO* ve MDA düzeyleri bakımından doku ve plazmada anlamlı bir artış görülmüştür (p<0.001). Aminoguanidin uygulanan gruplarda ; özellikle İ/AG grubunda daha fazla olmak üzere R/AG grubunda da İ/R grubuna göre NO* ve MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır. (İ/AG'de p<0.001 ve R/AG' de p<0.05).

Antioksidan aktivite incelendiğinde; doku ve plazma SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri, İ/R grubunda sham grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (p<0.001). Aminoguanidin uygulanan gruplarda; İ/AG grubunda İ/R grubuna göre enzimlerin doku ve plazma aktiviteleri anlamlı bir şekilde artmıştır. (Doku CAT ve plazma GSH-Px için p<0.05; doku ve plazma SOD ve doku GSH-Px için p<0.001 olarak bulunmuştur). R/AG grubunda ise İ/R grubuna göre doku ve plazma SOD aktivitelerinde (p<0.05) ve doku GSH-Px aktivitesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0.001).

Sonuç olarak ; aminoguanidinin kardiyak iskemi reperfüzyon hasarını önlemede etkili bir antioksidan ve NOS inhibitörü olduğu , antioksidan aktiviteyi arttırdığı ve kardiyoprotektif etki gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Nitrik oksit, İskemi- Reperfüzyon, Aminoguanidin, Antioksidan Enzimler.

2.ABSTRACT

Nitric oxide and free radicals may cause morphological and functional changes within the cellular structures during ischemia-reperfusion. In the present study, the plasma and tissue levels of nitric oxide (NO^{*}), malondialdehyde (MDA) which is the end product of lipid peroxidation was assessed and the activity of antioxidant enzymes, SOD, GSH-Px, Catalase was determined in rats with experimentally induced ischemia- reperfusion. Additionally, the effect of the aminoguanidin (AG), an antioxidant and nitric oxide synthase inhibitor, was assessed in the prevention of ischemia-reperfusion.

A total of 36 rats divided equally into 4 groups were used in the study. Groups were defined as sham, ischemia-reperfusion (I/R), aminoguanidin treated group before the ischemia and aminoguanidin treated group before reperfusion. Before the ischemia-reperfusion, intravenously %0.9 NaCl was applied to I/R group and 10 mg/kg AG was applied to R/AG via jugular vein.

There was a significant increase in the plasma and tissue levels of MDA and NO^{*} in ischemia-reperfusion group when compared to sham group($p<0.001$). Aminoguanidin groups, especially I/AG group rather than R/AG group showed significant decrease in the level of NO^{*} and MDA in respect to I/R group(I/AG; $p<0.001$ and R/AG; $p<0.05$).

In the examination of antioxidant activities of plasma and tissue SOD, GSH-Px and CAT, overall activities were significantly decreased in I/R group compared to sham group ($p<0.001$). In aminoguanidin receiving groups, I/AG group revealed increased tissue and plasma levels of antioxidants when compared to I/R group (for tissue CAT and plasma GSH-Px. $P<0.05$, for tissue and plasma SOD and tissue GSH-Px, $p<0.001$). A significant increase in tissue and plasma levels of SOD activity ($p<0.05$) and tissue GSH-Px activity ($p<0.001$) in R/A group was observed in comparison to I/R group.

In conclusion, aminoguanidin was found to increase antioxidant activity and had cardioprotective effects and determined to be an effective antioxidant and NOS inhibitor in the prevention of cardiac ischemia-reperfusion injury.

Key Words: Nitrik oxide, İschemia- Reperfüsiyon, Aminoguanidin, Antioxidant Enzymes.

3.GİRİŞ

İskemi , organa gelen kan akımının yetersizliği veya dokunun bozulmuş perfüzyonu olarak ifade edilir. Kardiyak dokudaki bozuk perfüzyon enerji yetersizliğine ve oksijenden yoksun miyokard dokusunun kontraktil aktivitesinin kaybına yol açar. Etkilenen hücrelerde kardiyak metabolizma artıklarının birikmesi yanında sarkolemma boyunca iyon dengesi de bozulur. Kardiyak hücrelerde iskeminin uzamasına bağlı olarak hücre bütünlüğü kaybolur ve hücre ölümü gerçekleşir. Sitoplazmik proteinlerin aşırı salınımı hücre membranının geçirgenliğini kaybettiğini gösterir ve iskemik atak esnasında internal membranlarda ultra strüktürel değişiklikler görülür (160). Koroner arter akımının zaman içinde yeniden sağlanması yani reperfüzyon olayı kardiyak hasarın önlenmesi için temel bir yoldur. Deneysel çalışmalar reperfüzyonun akut fazı esnasında bir miktar daha doku hasarının oluştuğunu göstermiştir. Reperfüzyon hasarı olarak bilinen bu olay, mikrosirkülasyondaki endotel hücrelere nötrofil adhezyonunu, intrasellüler enzimlerin salınımını, kalsiyum iyonlarının hücre içine girişini, sarkolemma fosfolipidlerinin bozunmasını ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumunu artırır. Serbest oksijen radikallerinin düzeylerinin artması açıl zincirlerinin peroksidasyonuna neden olur ki bunun sonucunda hücre ölümü gerçekleşir (52,104). Bu görülen etkilere karşı koruyucu sistem vücutda oluşan reaktif oksijen bileşiklerini etkisizleştirmeyi hedef alan, antioksidan defans sistemidir. Antioksidan defans sisteminde Vitamin E, Vitamin C, Glutasyon gibi bazı maddeler ile Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Katalaz (CAT) gibi hücre içi enzimler de yer almaktadır (65). Miyokardiyal iskemi- reperfüzyon hasarı endotel fonksiyonlarının bozulmasına da neden olur. Endotel hücreleri, diğer kardiyovasküler etkileri düzeltmek ve damar tonüsünü düzenlemek için çeşitli vazodilatatör ve vazokonstrüktör maddeler üretir. Endotel hücreleri tarafından üretilen iki önemli madde var olup bunlar endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ve endotelin -I adı verilen maddedir. Endotel kaynaklı gevşetici faktör, Nitrik oksit (NO[•]) olarak da bilinir. Nitrik oksit temel olarak kalpde bulunan bütün hücreler tarafından üretilir ve kardiyak fonksiyonlar üzerine önemli bir etkisi vardır.

3.1 Nitrik Oksit (NO^{*})

Nitrik oksit atmosferik bir gaz olup yaşadığımız ortamda bulunmakla birlikte, ayrıca kirli havada, eksoz gazında ve sigara dumanında yoğun olarak bulunmaktadır (85). Reaktif nitrojen oksitleri çevre kirliliğine neden olmasının yanında karsinojenik etkiye de sahiptir ve nitratlar, uzun yıllardan beri terapötik kullanımda olan önemli bir ilaç grubunu oluşturmaktadır (56,109). NO^{*}, suda çok az düzeyde çözünebilen renksiz, kokusuz gaz özelliğinde bir maddedir. NO^{*}, yanan havadaki nitrojen moleküllerinin yüksek ısıdaki oksidasyonundan ya da maden kömürü ve ağır yağlar gibi önemli yakıtlarda mevcut olan nitrojen bileşiklerinin oksidasyonu sonucu yanma olaylarının bir ürünü olarak açığa çıkmaktadır (18). NO^{*}, vücutta biyolojik olayların düzenlenmesinden sorumlu olan, gizemli bir şekilde aynı anda her yerde bulunabilen bir moleküldür (145). Ayrıca NO^{*}'in striatum ve retinada dopamin salınımını baskıladığı gösterilmiştir (145).

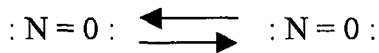
Nitrik oksit'e, 1998 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü kazandıran ilk gözlemler, sinirsel bir iletişim aracı olan asetilkolin ile ilgilidir. Asetilkolin, hayvan deneylerinde ve dolaşımı sağlam doku modellerinde damarlarda belirgin bir gevşemeye yol açar (35). 1950'lerde Robert Furchgott, değişik kimyasal maddelerin damar duvarındaki etkilerini değerlendirirken, ilk olarak tavşan aortasından bir şerit çıkarıp, değişik sıvı ortamlarda bu düzeneğin kasılma derecelerini ölçerken ilginç bir gözlemle karşılaşmıştır. O zamana kadar damarları gevşettiği bilinen asetilkolinin, tavşan aortasının kasılmasına neden olduğu saptanmıştır. Bundan 25 yıl sonra, 1978'de aynı modeli başka amaçlarla denerken, laboratuvar teknisyeninin bir yanlışlığı sonucunda, şaşırtıcı bir şekilde asetilkolin ve benzeri maddelerin bu kez damarı gevşettiğini görmüştür. Denemelerin sonunda gözlemler arasındaki farkın, damarların iç yüzeyini oluşturan endotel denilen hücrelerin varlığına bağlı olduğu anlaşılmıştır. Eski, orjinal deney modellerinde, damar duvarını kesip yayarken iç yüzey ve onunla birlikte endotel hücreleri de sıyrılıp gidiyordu. Endotelli ve endotelsiz damarların birbirine eklendiği çalışmalarla, gerçekten hem asetilkolinin etkisi, hem de değişik uyarılarla endotelden çok kısa ömürlü bir maddenin salgılandığı ve bu madde ile damar kaslarının gevşemek üzere uyarıldığı anlaşılmıştır. Bu bulgular Furchgott ve Zawadzki tarafından ilk kez 1980'de bilim dünyasının öncü dergilerinden Nature'de yayımlanan bir yazıda araştırmacılara sunulmuş ve endotele bağımlı damar gevşemesi terimi ortaya atılmıştır (35). Bir

başka araştırmacı olan Ferid Murad; 1979 yılında, damar duvarından elde edilmiş düz kas hücrelerinin, nitroprussid ya da gliseril nitrat gibi nitrodilatatörlerce gevşetilmesi sırasında, hücre içindeki siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyinin arttığını göstermiştir. Furchgott, bu bilgilere dayanarak endotelden kaynaklanan bu aracı maddenin kas hücresindeki etkisini buradaki "guanil siklaz" adlı bir enzim aracılığıyla cGMP düzeyini yükselterek yapabileceği hipotezini ortaya atmıştır. Bu hipotez 1983 yılında Murad ve çalışma arkadaşları tarafından deneysel modellerle doğrulanmış ve bu moleküle *endotel kökenli damar gevşetici madde (EDRF)* adı verilmiştir (85).

1988'de Moncada nitrik oksit'in damar endotel hücrelerinde L-arjinin'den sentezlendiğini göstermiştir. Aynı araştırmacı, süperoksit dismutaz enzimini (SOD) kullanarak, EDRF'nin, SOD ile ilişkisini ortaya koymuştur. Bu bulgu aynı zamanda, nitrik oksit ile EDRF'nin benzer maddeler olarak düşünülmesine yol açmıştır (85). Daha sonra yapılan çalışmalarda nitrik oksit'i sentezleyen farklı izoenzim çeşitleri tanımlanmıştır. Buna ek olarak, nitrik oksit'in başka dokularda da sentezlendiği ve farklı etkileri olduğu gösterilmiştir (35). Nitrik oksit; sinir, sindirim, immün, kardiyovasküler ve ürogenital sistemlerde bulunan çok önemli bir düzenleyici molekül, ikinci haberci ve bir transmittedir. Normal fizyolojik fonksiyonlar yanında septik şok, hipertansiyon, inme, epilepsi ve diğer nörodejeneratif hastalıklar gibi fizyopatolojik durumlarla da yakından ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda, nitrik oksit'in kan basıncının ve sindirim sisteminin düzenlenmesinden, bakterilere karşı özgül olmayan dirence; zehirli radikallerden, karaciğerin korunmasına değin bir çok alanda vazgeçilmez işlevlerinin bulunduğu saptanmıştır (35).

3.1.1 Nitrik Oksit'in Fizikokimyasal Özellikleri

Nitrik oksit (NO^*) azot monoksit olarak da tanımlanmaktadır. NO^* tek sayıda elektron içeren renksiz gaz şeklinde bulunan inorganik bir serbest radikaldir (7,78). Eşlenmemiş elektron nitrojen ve oksijen atomu üzerinde yer değiştirerek rezonans stabilitesini sağlar.



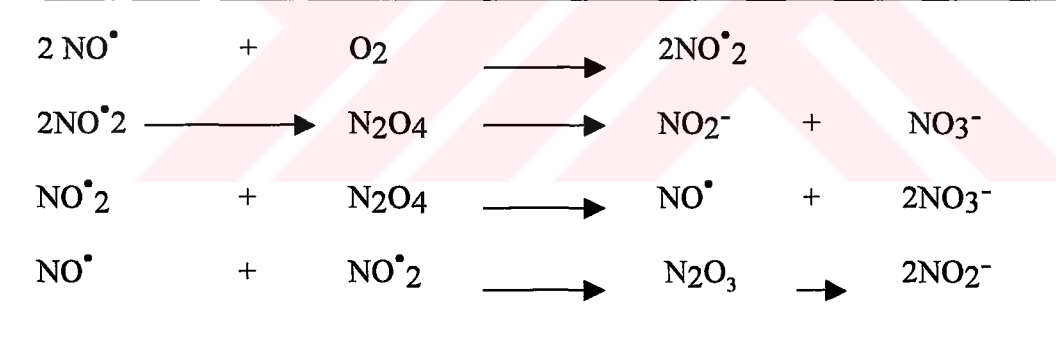
NO^* , lipofilik, kimyasal olarak stabilitesi olmayan reseptör bağımsız kolayca diffüze olabilen ve bilinen en düşük moleküler ağırlıklı bir bileşiktir (7,109). Nitrik

oksitin reaksiyonları arasında moleküler O₂ ile birleşerek *azot dioksit* ve süperoksit radikali ile *peroksinitrit* oluşturması bilinen en önemli reaksiyonlarıdır (48).

Tablo 1. Nitrojenin okside metabolitleri (62).

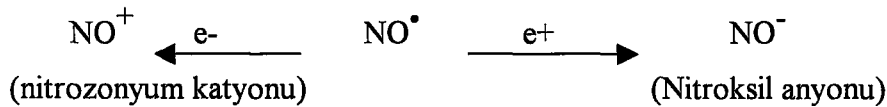
Sembol	İsim	Etki
NO [•]	nitrik oksid	serbest radikal (S-R)
NO [•] ₂	nitrojen dioksit	S-R, nitroze edici etken ajan
N ₂ O	nitroz oksid	anestetik
N ₂ O ₃	dinitrojen trioksit	nitroze edici etken ajan
N ₂ O ₄	dinitrojen tetroksit	dimerik NO [•] ₂ , nitroze edici ajan
NO ₂ ⁻	nitrit	asidik ortamda NO [•] oluşturur
NO ₃ ⁻	nitrat	stabil anyon

NO[•] 3-5 saniye gibi çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Su ve oksijen varlığında aşağıda belirtilen bir dizi nitrojen oksitleri oluşabilir (Tablo1).



NO₂, N₂O₃ ve N₂O₄ gibi bileşikler (NO_x) güçlü nitroze edici ajanlardır (62).

NO[•]elektron kaybetmesiyle NO⁺ (nitrozonyum katyonunu) ve elektron alması ile NO⁻ (nitroksil anyonunu) oluşturabilir (157).

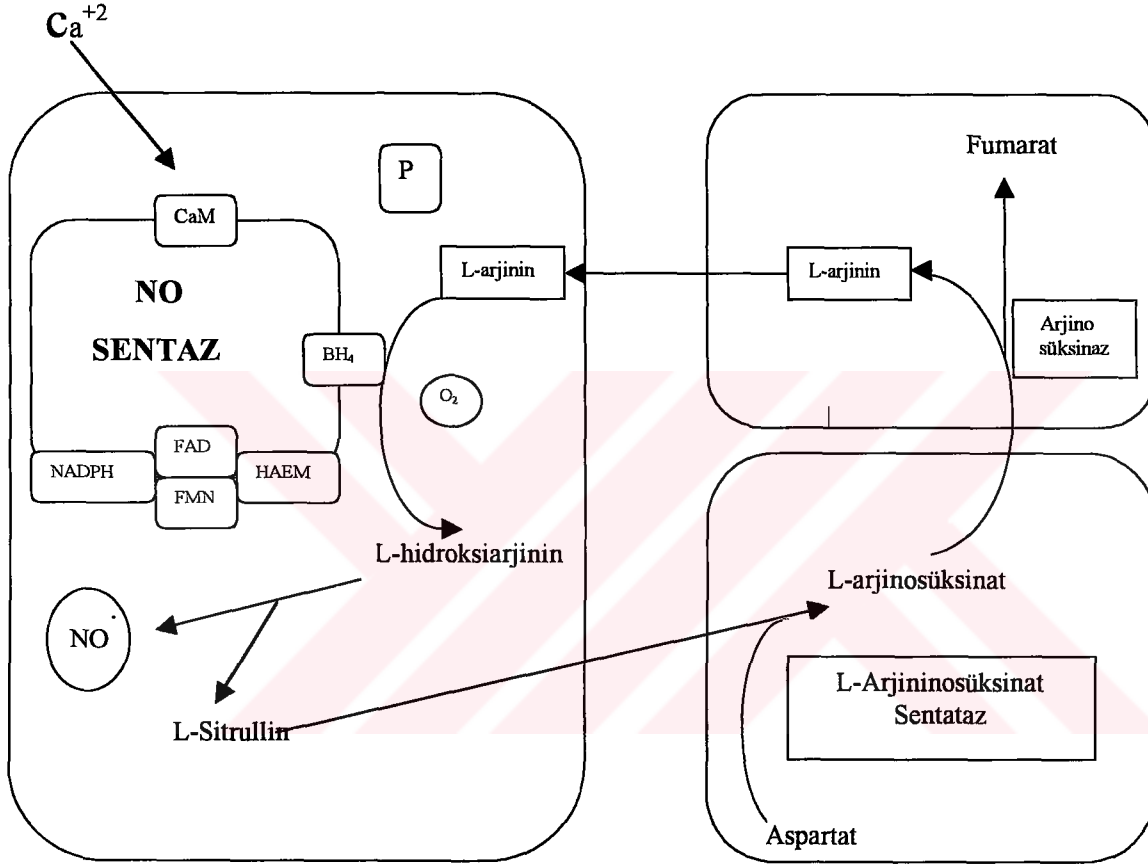


Nötral NO[•] 2p-π karşılıklı bağ orbitalinde tek elektron içerir. Nötral fizyolojik ortamda bu elektronun uzaklaştırılması ile NO⁺, bunun zıttı olarak bu orbitale bir elektron ilavesi ile NO⁻ oluşur. NO⁺ 'nun NO⁻ 'e dönüşümü sırasında her elektron

ilavesi bağ dizisini azaltır ve bu da bağ uzunluklarının artması ve titreşim enerjisinin azalmasına neden olur. Bu özellik infrared spektroskopisi ile NO^* içeren yapılarda nitrozil gruplarının tayin edilmesinde önemlidir (157).

3.1.2 Nitrik Oksit Biyosentezi ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS) İzoenzimleri

Paramanyetik serbest radikal olan NO^* vertebralılarda sitokrom p-450 redüktaz homologu olan ve *nitrik oksit sentaz* (NOS) olarak bilinen enzimler tarafından oluşturulur (35).



Şekil 1. L-Arjininden NO^* Üretimi (99).

CaM: Kalmodulin, NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat,
 FMN: Flavin mononükleotid, FAD: Flavin adenin dinükleotid,
 BH₄: Tetrahidrobiopterin, HAEM: hem, P: Enzim fosforilasyon bölgesi

Memelilerde, sitozolik bir enzim olan NOS, L-arginin ' den NO^* ve sitrüllin oluşumunu katalize eder. L-argininden NO^* sentezinde NADPH, NOS, kalmodulin, oksijen ve dört kafaktöre (HAEM, FMN, FAD ve tetrahidrobiopterin), gereksinim duyulduğu anlaşılmıştır. NOS'lardaki hem merkezi sitokrom p-450'nin spektral özelliklerine sahiptir ve sonuçta bunlar sitokrom p-450 redüktazların bazı

tepkimelerini verebilirler. L-arginin ve oksijenden NO^{*} ve sitrüllin sentezi, hidroksi arginin yolu ile oksijenin her iki ürüne de bağlı olduğu iki basamaklı ve oldukça karmaşık bir tepkimedir (Şekil 2). NOS'un üç farklı izoenzimi olup bunlar; nöronal (n), endotelial (e) ve indüklenebilen (i) NOS olarak adlandırılır.

nNOS (NOS I): İlk olarak sinir dokularında bulunmuştur. Yapısal olarak açığa çıkarılmıştır ve kalsiyum bağımlıdır.

iNOS (NOS II): İlk olarak endotoksinler ve sitokinler aracılığı ile karaciğer hücreleri ve makrofajlarda uyarılan bir enzim olarak tanımlanmıştır. Bu izoform fizyolojik sınırlar içinde kalsiyum bağımlı değildir. Bunun nedeni kalmoduline çok sıkı bağlanmış olmasıdır. Ayrıca n NOS ve e NOS *yapısal (c) NOS* olarakta adlandırılır.

eNOS (NOS III): İlk olarak vasküler endotel hücrelerinde yapısal olarak tanımlanmıştır ve nNOS gibi kalsiyum bağımlıdır.

3.1.2.1 Yapısal Nitrik Oksit Sentaz

Yapısal Nitrik Oksit Sentaz (cNOS) sürekli olarak oluşturulan bir enzim olup damar direnci ile sinir iletimi gibi fonksiyonlar için üretilir. Nitrik oksit sentaz (NOS), kofaktör olarak Ca⁺² kalmoduline bağımlıdır ve hücre içi kalsiyum düzeyini yükselten agonistlere iyi cevap verir.

Tablo 2. Nitrik Oksit Sentaz'ın özellikleri (35).

	Yapısal (cNOS)	Uyarılabilir (i.NOS)
Ca ⁺²	+	-
NO [*] oluşum düzeyi	pmol	nmol
Yanıt	ani	gecikmiş
Üretim süresi	kısa	uzun
Glukokortikoid ile etkileşme	etkilenmez	uyarılması inhibe edilir

Endotelial NOS ve nöronal NOS aktivasyonu Ca⁺² / kalmodulin bağımlıdır, indüklenebilir NOS aktivasyonu ise transkripsiyonel indüksiyon yolu ile aktive olur (109). Hücre içindeki kalsiyum düzeylerinin yükselmesi kalmodulinin cNOS'a bağlanmasını uyarır ve anında pikomol düzeylerinde nitrik oksit sentezlenir. Kalsiyum bağlayan maddeler ve kalmodulin inhibitörleri ile kalsiyum bağımlı nitrik oksit sentezi önlenir. Sentezlenen nitrik oksit , esas olarak hücreler arası ve hücre

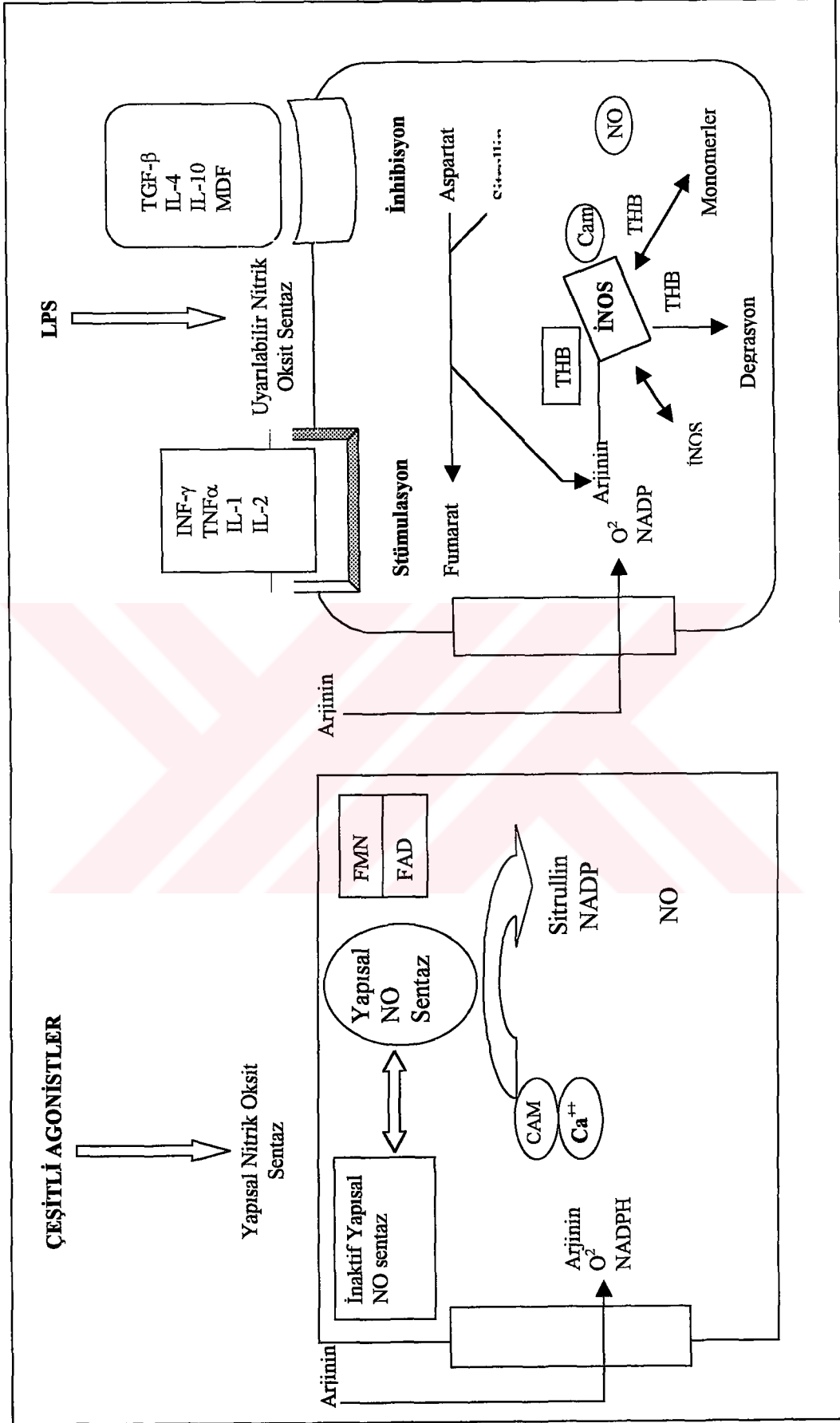
içi iletişimin fizyolojik aracısıdır (35). Yapısal NOS'un merkezi sinir sistemine özgü tipi, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) olarak adlandırılır (Tablo2). Yapısal NOS (cNOS) aktivasyonunda hücre cevabına bağlı olarak rol oynayan hızlı etkili bazı aktivatörler şunlardır: Kalsiyum iyonofor , eksitatör aminoasitler , elektriksel uyarı, asetilkolin, bradikinin, trombin, ADP, lipopolisakkarid (LPS), lökotrienler, trombosit aktive edici faktör (PAF), tromboksan A₂ ve endotelin (144,102).

3.1.2.2.İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz

Bu enzim aynı zamanda NOS II olarak da adlandırılmaktadır. İndüklenebilir NOS sistemi, başka hücrel araçlar tarafından, transkripsiyon düzeyinde ve daha uzun süreli uyarılıp, büyük miktarlarda nitrik oksit üreten, fizyolojik şartlarda kalsiyumdan bağımsız bir sistemdir. Endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, makrofaj, nötrofil, kalp kası ve endokard hücrelerinde iNOS'un varlığı gösterilmiştir. Ancak bu hücrelerin prototipi makrofajlardır. Burada sitokin uyarısı sonucunda, birkaç saat sonra başlayan ve günler süresince nanomol düzeylerinde süren NO sentezi söz konusudur. Sitokinler tarafından aktive edilmiş makrofajların tükettiği L-arjinin'in 1/3'ü NO üretmek için kullanılmaktadır. iNOS aktivasyonu, esas olarak endotoksin ve sitokinler (IL-1, TNF, IF- γ) tarafından yapılmaktadır (Şekil 2). Bazı hücrelerde sentez IL-8, IL-10, TGF- β gibi maddelerce yavaşlatılabilir, ayrıca glukokortikoidlerle bu enzimin uyarılması önlenir (35). İndüklenebilen NOS toksik düzeylerde NO^{*} üretebilen bir enzimdir (63). Beyinde iNOS enzimi; tümörler, travma, demiyelinizasyon, AIDS demansı, Alzheimer hastalığı ve serebral iskemi gibi değişik patolojik durumlarda tanımlanmıştır (47). Bununla birlikte bu beyin hastalıklarının oluşum mekanizmasında iNOS tarafından üretilen NO^{*} in oynadığı rol henüz bilinmemektedir.

Akut miyokard iskemisi gibi kalbin değişik şekillerde iskemiyeye uğradığı durumlarda NO^{*} ve reaktif ürünleri önemli fonksiyonlar üstlenir. Her iki enzimatik sistem N-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) ya da N-nitro-L-arjinin (L-NNA) gibi L-arjinin analogları tarafından yarışmalı olarak inhibe edilebilir. Bu enzimin izoformları aynı hücrede birlikte de bulunabilirler. Örneğin; endotel hücreleri nitrik oksit üretimi açısından TNF- α ile uzun süreli uyarılırken bir kalsiyum agonisti olan bradikinin ile de kısa süreli uyarılabilir, veya sinir hücreleri ve makrofajlar TNF- α ya da LPS ile uyarılırsa, indüklenebilen NOS

Şekil 2. Nitrik Oksit'in Hücre Düzeyindeki Aktivasyonu ve Etkileri. **INF- γ** :interferon TNF: Tümör nekroz faktör IL:İnterlökin LPS:Lipopolisakkarit-endotoksin MDF: Makrofaj diferansiyasyon faktörü THB:Tetrahidrobiopterin TGF- β :Tümör growth faktör Cam:Kalmodülin (165).



aktif hale gelirken yapısal NOS'un mesajcı RNA'sı baskılanır. Transkripsiyon denetlemesi sırasında ters işleyen bir kontrol mekanizması gösterilmiştir (35). iNOS enzimi, immunolojik ya da inflamatuvar bir uyarı ile karşılaştıktan sonra birkaç gün boyunca yüksek miktarlarda NO[•] üretebilmekte ve sonuçta vücut için zararlı olabilmektedir. Farklı bazal aktivite düzeyleri ve kofaktör ihtiyaçları olan birden çok nitrik oksit sentazın (NOS) olduğu bulunmuştur (35). Son zamanlarda her üç izoenzimin değişik hücrelerde bulunabildiği ve uyarılabildiği gösterilmiştir. Örneğin; eNOS endotel hücreleri, nöronlar ve barsak intertisyel hücrelerinde bulunabilir. iNOS genel yapıda mevcut değildir. Ancak bakteriyel ürünler ve sitokinler ile teması birçok doku ve hücre tipinde uyarılmaktadır. Üç NOS tipi için kodlayıcı cDNA'ların kodlanması sonucunda insan nNOS, eNOS ve iNOS izoenzimlerinin sırası ile 1433, 1203 ve 1153 amino asid içerdiği gösterilmiştir. Enzimlerin tümü NADPH, FAD, FMN , kalmodulin ve protein kinaz A fosforilasyonu için ortak dizilere sahiptir.

Tablo 3. NOS'ların hücresel dağılımı

c.NOS	i.NOs
Endotel hücresi*	Makrofaj, hepatosit*
Santral nöron	Kupffer hücresi
NANC nöron**	Vasküler düz kas hücresi
Notrofil, Mast hücresi	Fibroblast, mezenşial hücre
Trombosit, Astrosit	Astrosit*, kondrosit
β hücresi*	Sinovyosit
Renal makula hücresi*	İnflamatuvar nötrofil*
Adrenal meduller hücre	Karsinoma hücresi*
Adrenal korteks hücresi	
Fare nöroblast	

* Selektif antikor sınıflamasına dayanır, diğerlerinin sınıflanması spekülatifdir (21).

** Nonadrenerjik nonkolienerjik nöron

Sitokinler ile uyarılabilen NOS şekli (iNOS) bir çok hücrede tanımlanmıştır (Tablo 3). Nitrik oksit sentaz izoenzimleri sadece % 51-57 oranında bir dizilim özdeşliği gösterirler.

3.1.3.Nitrik Oksitin Moleküler Etkileri

Nitrik oksitin aktiflediği enzimler arasında çözümler guanilat siklaz (sGC) ve ADP-ribozil transferaz yer alır. Makrofajlardaki NO[•] tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak antimikrobiyal antitümöral sitotoksik etki gösterir. NO[•] ferritinle reaksiyona girerek serbest demir salınımına yol açar, bu serbest demir de lipid peroksidasyonuna neden olabilir. Makrofaj kökenli NO[•] tümör hücresinin DNA sentezini engeller. Bunu ribonükleotid redüktazı inhibe ederek yapar (85).

Tablo 4. Nitrik oksitin moleküler hedefleri (85).

Moleküler sınıf	Aktivite artışı	Aktivite azalışı
Hem proteinler	sGC	Hemoglobin, myoglobin
Fe-S proteinler	-	MET* zinciri enzimleri,
Akonitaz	-	
Diğer nonhem redüktaz	-	Ferritin, ribonükleotid
Fe proteinleri	-	
Tirozil radikal Protein	-	Ribonükleotid redüktaz
Protein tiyoller	EDRP, tPA**	Dehidrogenaz
DNA	Mutasyon oluşumu	Mutasyon kaybı
Süperoksit anyon radikali	Hidroksil radikali oluşu	Süperoksit anyon radikali azalışı

* Mitokondri elektron transport zinciri, ** Doku plazminojen aktivatörü

NO[•] 'nun diğer bir etkisi de süperoksit anyon radikali üzerine olup (O₂⁻), bu ikisinin tepkimesinden oluşan peroksinitritten nitrojen dioksit ve hidroksil radikali oluşur. NO[•] 'nun sülfidril ile reaksiyonu ve S- nitrozilasyon, plazminojen aktivatör gibi bazı enzimlerin katalitik fonksiyonlarını arttırabilir (Tablo 4). NO[•] oluşturan bileşikler güçlü nitroze edici ajanlardır. Bunlar primer ve sekonder aminlerin nitrozilasyonuna öncülük ederek karsinojenik etki gösterirler. Bu bileşikler DNA'da nitrozilasyon ile deminasyona ve alkil nükleofillerin oluşumuna neden olurlar ve bu şekilde oluşan mutasyonlar onkojenleri aktifleyerek malign hücre dönüşümüne yol açarlar (61).

3.1.4.Nitrik Oksitin Biyokimyasal Fonksiyonları

NO[•], nitrojen gazından açığa çıkan, tek değerlikli elektronlardan oluşan (.N=O), kararlı olmayan gaz halinde bir maddedir. NO[•], diğer serbest radikal bileşiklere göre daha az reaktif olmasma rağmen bazı durumlarda toksik olabilir. NO[•] sulu çözeltilerde oksijen ve su ile çok hızlı tepkimeye uğrayarak nitrit ve nitrat bileşiklerine dönüştüğü için hücre içinde sadece birkaç saniye süresince oluşur ve hemen gözden kaybolur (154).Salındıktan sonra NO[•] oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarına uğrayabilir (22). Endotel tabakasında yapılmış olan NO[•] hızla plazmaya geçer ve plazmada iki tür değişime uğrar: Ya eritrosit içine girer okside formu ile birleşerek methemoglobin, *nitrit* ve nitrozotioller oluşur veya okside olmayan NO[•] ile birleşir ve *nitrat*'a dönüşür.Nitritler ve nitratlar, NO[•] dönüşümünün son ürünleri olup vücuttaki NO[•] üretim düzeyinin göstergesidir (61).

NO[•], bakteriye karşı direnç, kan damarlarının dilatasyonu ve bir nörotransmitter olarak glutamat'ın aktivasyonunu içeren bir çok farklı fizyolojik fonksiyonlarda rol almak üzere bir mesajcı molekül gibi diffüzyona uğrayarak salınmaktadır (40). Beyaz kan hücrelerinin bir tipi olan makrofajlar bakteriyel hücre duvarı lipopolisakkaridi gibi bir takım uyarıcılar ile nitrik oksit üretimine yol açarlar. Kısa süreli nitrik oksit serbest radikalinin varlığı makrofajların bakteri ve tümör hücrelerini öldürmelerine imkan sağlar. NO[•]'in etkisi, süperoksit anyonları (O₂⁻) ile hücre öldürücü etkisini açıklayan daha toksik reaktanlara dönüşümü arasında karşılıklı etkileşimle ilgili olabilir (40). NO[•], serbest bir radikaldir ve oksijen süperoksit (O₂⁻) ile reaksiyona girerek peroksinitrit anyonları (ONOO⁻) oluşturabilirler. Peroksinitrit, güçlü ve sitotoksik oksidan formlarına (hidroksil radikali ve nitrojen dioksit) ayrışmadan evvel birkaç µm kalınlıktaki porlardan rahatlıkla diffüze olabilmektedir. NO[•]'in en önemli fonksiyonu cGMP üretimine yol açan guanilat siklazı'nın aktivasyonudur (81). Böylece, cGMP konsantrasyonunun ölçümü NO[•] üretiminin indirekt olarak ölçümünde kullanılabilir (118). İskemi süresince ve iskemiye takiben doku cGMP düzeylerindeki değişiklikler daha önceki çalışmalarda tanımlanmıştır ve bu değerlerin oldukça değişiklik gösterdiği izlenmiştir (96). Reperfüzyon süresince yükselen guanilat siklazın endojen aktivatörü hidroksil radikaldir. İskemi sonrası reperfüzyon da non-enzimatik ve enzimatik yollarla hidroksil radikal sentezinde yükselme gözlenir (100). Bu hidroksil

radikalinin guanilat siklazı aktive etmesi neden ile iskemi süresince cGMP düzeyleri artar bunun nedeni hidroksil radikalidir (143). NO[•]'in biyokimyasını ve biyolojik fonksiyonunu anlamak için ilk reaksiyon ürünleri olan NO⁺ (nitrozonyum iyonu) ve NO⁻ (nitroksil anyonu) oluşumunu ve esas olan sekonder hedef etkilerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Biyolojik sistemlerde NO[•] oksijen, süperoksit ve ara ürünler ile reaksiyona girer. Oluşan reaksiyon ürünleri sırasıyla NO_x, peroksinitrit ve metal-NO bileşikler olup indirgenme ve yükseltgenme yoluyla hedef dokularla ilişkiye girerek sonradan gelecek reaksiyonlar desteklenir. Thiollerin (RSH/RS⁻) hücre içi reaktivitesi ve etkisi nükleofillerin desteklediği nitrozatif reaksiyonlar ile gerçekleşir ve sonuçta S-nitrozotioller oluşur. Böylece reseptörler, iyon kanalları, enzimler ve transkripsiyon faktörlerinin yanında geçiş metalleri ve tioller de içeren aktif ya da allosterik alanlar NO[•] ileti sisteminin esas komponentini oluştururlar (22). Ayrıca, NO[•] varlığında ferritin mRNA'sı demir düzenleyici protein-1 (IRP-1) tarafından baskılanmaktadır (41). NO[•], eritrositlerdeki oksihemoglobin ile ve ayrıca redükte hemoglobin ile nitrozohemoglobin (HbNO) üzerinden methemoglobin ve nitrat'a (NO₃⁻) dönüşerek metabolize edilir. Methemoglobin, methemoglobin redüktaz ile tekrar hemoglobine dönüşür. NO₃⁻ ise idrarla atılıma uğrar (163).

3.1.4. Nitrik Oksit'in Biyolojik Etkileri:

Çok kısa bir yarı ömre sahip olan NO[•], insan fizyolojisi ve fizyopatolojisinde önemli bir rol oynar (56, 98). Nitrik oksit'in biyolojik etkileri aşağıda verilmiştir.

- *Vasküler düz kas relaksasyonu ile vazodilatasyon
- *Nörotransmitter (santral sinir sisteminde ve periferde NANC sinirlerde)
- *Antiproliferatif etki; DNA sentezini baskılayarak.(endotel hücresi ve vasküler düz kas hücresinde)
- *Trombosit adezyon ve agregasyonunun inhibisyonu, t-PA artışı, fibrinoliz
- *Düşük konsantrasyonda eritrosit deformasyonunda artış
- *İmmünomodülatör etki
- *Lökosit adezyonunun inhibisyonu, antiinflamatuvar etki (NADPH oksidaz inhibisyonu)
- *Makrofaj aracılıklı nonspesifik immün yanıt (astım, ülseratif kolit, artrit, MS)
- *Antimikrobial (sitotoksik)
- *Antitümör (sitostatik)

*Lipid peroksid radikali ile etkileşip antioksidan ve antiaterosklerotik etki oluşturur.

*Süperoksid radikalleri ile etkileşip onları temizler veya toksik peroksinitrit oluşumuna neden olur (163).

*Sinyal ileti için gereken fosforilasyonu bloke eder (Fe^{+3} ile $2e^-$ alıp, demir nitrozonyum kationunu oluşu, ve proteinlerde 3 nitro tirozin meydana getirir) (11).

3.1.5 Nitrik Oksit Ölçümü

NO^* , in vivo olarak az miktarda sentezlendiğinden ve oksijen ile hızla reaksiyona girdiğinden ölçümü zordur. NO^* , aşağıdaki yöntemlerle ölçülebilir (7,98,11,78,80,139)

Kemilüminesans (NO^ , nitrit, nitrat)

*U.V.-Vis spektrofometrik yöntem (Griess, Met Hb)

*ESR (EPR)-spektroskopisi

*Elektronik

*Gaz kromatografisi

*Flow sitometre

*İnfrared spektroskopisi

3.2.Nitrik Oksitin Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

NO^* , trombositler, makrofajlar ve düz kas hücrelerinde de üretilmekle beraber lokal olarak başlıca endotelyumda ve sinir hücrelerinde üretilmektedir. NO^* 'nun hastalıklardaki rolünü tam olarak kavrayabilmek için endotelyumu iyi tanımak gereklidir. Ortalama 70 kg ağırlığındaki bir erişkinde tek bir hücre tabakasının oluşturduğu bir örtü şeklinde yerleşik olan ve tüm kardiyovasküler sistemi örten yassı endotel hücrelerinin sayısı 6×10^{23} 'tür. Bu kadar hücrenin toplam ağırlığı 1.5 kg olup yaklaşık olarak karaciğerin ağırlığına eşittir. Endotelyum, özellikle kapillerde, vasküler permeabilite düzenleyicisi olarak önemli bir rol oynar. Endotel hücreleri, buna ek olarak, dolaşımdaki hormonları aktive ve deaktive ederler. Angiotensin dönüştürücü enzim, endotel hücresi membranın bir enzimidir ve angiotensin I'i angiotensin II'ye dönüştürür, bradikininini ise inaktif ürünlere parçalar. Öte yandan monoaminoksidaz (MAO) enzimi norepinefrin ve serotonin gibi monoaminleri inaktive eder. Endotel hücreleri t-PA ve doku plazminojen inhibitörü

bakımından zengin olup nitrik oksit, prostaglandinler ve endotelin I gibi vazoaaktif maddeler salgırlarlar.

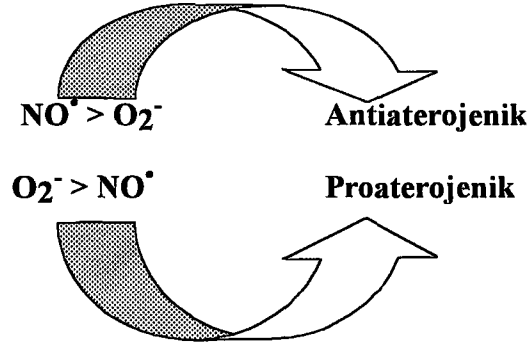
Bundan dolayı, endotelyumun biyolojik fonksiyonu, vasküler düz kas hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunun regülasyonu olduğu kadar, vasküler tonus, trombosit fonksiyonu ve koagülasyonun regülasyonunu da kapsar (30). Normal koşullar altında, vasküler tonus, trombosit fonksiyonu, koagülasyon ve proliferatif yanıtlar üzerinde endotelin inhibe edici etkileri fazla olup bu da, bu anatomik yapının fizyolojik koşullardaki devamlılığını sağlar. (134,135). Öte yandan, endotelyumun fonksiyonel özelliklerini değiştiren hastalıklar vasküler tonus, koagülasyon ve büyüme üzerindeki lokal kontrolde büyük değişiklere yol açabilir ki bu fenomenlerin tümü koroner arter hastalığının patogenezinde önemli ölçüde katkıda bulunur (134).

Endotelyumun, yalnızca kan ile dokular arasında madde alışverişinin yapıldığı bir bariyer olmayıp aynı zamanda güçlü vazoaaktif, antikoagülan ve fibrinolitik maddeler üreten, vücudun en büyük en aktif parakrin organı olduğu anlaşılmıştır. Bugün, endotelyumun yapısal ve işlevsel bozukluklarının koroner damar hastalıklarını da içeren bir çok vasküler hastalığın patogenezinde önemli rol oynadığına inanılmaktadır.

3.2.1. Nitrik Oksitin Kardiyovasküler Hastalıklardaki Rolü

NO[•]'in kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesinde çok önemli rolü vardır. Asetilkolin, bradikinin, histamin ve adenin nükleotidleri gibi maddeler endotel hücreesindeki bir reseptörü etkileyerek NO[•] salınımına neden olur. Bu da düz kas hücreesindeki cGMP düzeyini artırarak hücrenin gevşemesini ve sonuçta damarın genişlemesini sağlar. Endotel hücrelerinden NO[•] salınımı, GTP-ilişkili proteinler (reseptör-NOS ilişkisi kurularak) aracılığı ile olur. 1856 yılından bugüne kadar, angina pectoris ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan nitratlar, cGMP düzeylerini yükselterek etki gösterir (35). Normal damar direnci, endotel kökenli gevşeticilerin (NO[•]) ve damar daraltıcı etkenlerin (endotelin) ortak etkisiyle oluşur. Fizyolojik ortamda esas belirleyici olan, NO[•] etkisindeki gevşemedir. Yüksek tansiyon, vazospazm ve hatta damar sertliği oluşumunda NO[•] ile ilişkili mekanizmaların rolü bilinmektedir ve yüksek kolesterol düzeylerinin neden olduğu ateroskleroz da arter duvarına salınan nitrik oksit düzeyi, sentez azlığından ya da yıkım fazlalığından dolayı azalmıştır. Bu durumda, kalbi besleyen damarlardaki daralma ya da egzersiz

ve stres durumlarında damarların genişleyememesi sonucunda, koroner kalp hastalığı ve miyokard infarktüsü gelişebilir (35). Hasara uğramış endotel hücrelerinin bulunduğu alanda, koroner damarlarının düz kas hücreleriyle güçlü vazokonstriktör maddeler direkt olarak temasa geçer ve bu maddelerin bu alanlardan üretimi ve salınması artar. Bu durum vazokonstriktör yanıtların artmasında ve sonuçta koroner arterlerin spazmında rolü olabilir (146). Koroner spazmı ya spontan olarak ortaya çıkabilir (özellikle Prinzmetal anjinalı hastalarda) veya aterosklerotik koroner arter hastalığının seyrine bağlı olarak ortaya çıkabilir (113). Gerçekten, koroner spazmı anstabil anjinada, gelişmekte olan miyokard infarktüsünde, koroner iskemi ve infarktüsün oluşmasında önemli bir pay sahibidir. Koroner vazokonstriksiyon, stabil koroner arter hastalığı olan hastaların anjina eşiğini de değiştirebilir. Bu klinik olaylara NO[•] yetmezliğinin önemli bir katkısı bulunmaktadır. Ateroskleroz varlığında endotele bağımlı relaksasyon hem deney hayvanlarında hem de hastalarda belirgin biçimde azalır. Her ne kadar, gerçek endotel soyulması görülebilse de (özellikle plak yırtık alanlarında), normal olarak endotel tabakası morfolojik olarak varlığını sürdürür, fakat endotel hücrelerinin biçim ve büyüklüğünde belirgin değişiklikler görülür (37). Hiperlipidemide olduğu gibi, endotel disfonksiyonunun mekanizmaları arasında, NO[•]'in süperoksit anyonları tarafından yıkımının artması kadar, reseptör fonksiyonunun bozulması, endotel hücrelerinin NO[•] prekürsörü olan L-arginini alma veya metabolize etme kapasitesindeki azalma sayılabilir. Gerçekten hiperkolesterolemik tavşanlarda endotel hücrelerinin süperoksit üretimi artmıştır. Aterosklerotik koroner arterlerde bozulmuş olan endotelyuma bağımlı yanıtlar vazokonstriktör yanıtları arttırabilir, lokal kan akımını azaltabilir ve dolaşımdaki trombositlerin preaktivasyonuna yola açabilir (94). NO[•] 'in ileri safhalarda yıkımının azalması veya durması vasküler düz kas hücrelerinin media tabakasından intima tabakasına migrasyonunda artışa neden olur ve aterosklerotik plakların oluşumuna yol açabilir. NO[•] dolaylı olarak aterosklerozun ilerlemesini de etkileyebilir. NO[•] fazlalığında ONOO⁻ (peroksinitritin) prooksidan etkisi NO[•]'in antioksidan etkisi ile baskılanır ve bu yolla antiaterojenik etkisi sağlanır (Şekil 3). Süperoksit (O₂⁻) fazlalığında ise peroksinitrite bağlı olarak proaterojenik etki oluşur (36).



Şekil 3. Damarda Nitrik Oksit- Süperoksit Etkileşimi(36).

NO[•] ve olasılıkla diğer endotel kökenli mediyatörler mikrovasküler yatağın her yanında kan damarlarının davranışını koordine edici bir etki gösterirler. Bundan dolayı, endotelyuma bağımlı kan akımının regülasyonunda ve olasılıkla aynı zamanda arteriyel kan basıncının ayarlanmasında önem taşır. İlginç olarak, mikrosirkülasyondaki endotelyuma bağımlı vazodilatasyon hipertansiyon, diyabet ve özellikle de hiperlipidemide bozulmuştur (74). Özellikle koroner dolaşımında, büyük epikardiyal koroner arterlerin önemli özelliği, kan iletme yeteneğini arttırmak ve miyokarda ulaşan kan volümünü yükseltmek için, egzersiz sırasında dilate olma kapasitesine sahip olmalarıdır. Bu akıma-bağımlı vazodilatasyon, endotelyuma bağımlı olup NO[•]'in aracılık ettiği bir olaydır (95). Oksijen eksikliği NO[•] salgılanmasını daha az belirgin bir şekilde tetikler. Böylece, miyokardiyal oksijen açığı yalnızca ikaz edici bir klinik sinyal olarak anjinal ağrıya yol açmakla kalmaz; aynı zamanda koroner arterlerde NO[•] salgılanmasını da indükler.

3.2.2. Nitrik Oksitin Sinir Sistemindeki Rolü

Nitrik oksitin nörokimyasal sistemimizin önemli bir parçası olduğu bilinmektedir. Beyinde, öğrenme ve hafıza konusunda belki de uzun süredir aranan maddenin NO[•] olduğu düşünülmektedir. Öğrenmenin ve belleğin hücrel temellerini açıklayan kuramlardan birisi, uyarıcı ve uyarılan sinir hücrelerinin, yani presinaptik ve postsinaptik hücrelerin arasındaki bağlantının güçlendirilmesidir. Bunu yerine getirmenin bir yolu, uzun süreli güçlendirme (LTP) denilen süreçtir. Böylece, tekrarlayan uyarılar halinde post-sinaptik hücreler ikinci ve üçüncü kez aynı uyarıyı aldıklarında, her defasında daha güçlü olarak cevap vermektedirler. Bu mekanizmanın çalışması için kural olarak bir geri beslemeli aracının işin içinde olması ve sinir birleşiminden geriye doğru yönelerek, birinci hücreden nörotransmitter salınımını kolaylaştırması ve güçlendirmesi gerekmektedir. Böyle bir

aracı maddenin hücreden hücreye, ne bir salınım sistemine ne de reseptör mekanizmasına bağımlı olmadan, kolayca geçip etki göstermesi gerekiyordu. Bu mekanizma yapılan çalışmalarda, hem fare beynindeki hipokampus bölgesindeki sinir hücrelerinde NO[•] sentezi inhibe edilerek uzun süreli potansiyasyon (LTP)'nun önlenmesiyle, hem de canlı sıçanlarda beyin içine NO[•] inhibitörleri verilerek öğrenme işlevinin önlenmesi gösterilerek ispatlanmıştır (35).

NO[•], bugüne kadar bilinen en farklı bir sinirsel iletim aracıdır. Normalde, bir sinir hücresinin aktif hale gelmesiyle özel depo veziküllerinden bir aracı madde sinaptik aralığa dökülür ve bu da postsinaptik hücrede bir uyarıya neden olur.NO[•]'in ise bu anlamda ne özel bir depolanma imkanı ve özel bir salınım mekanizması olmadığı gösterilmiştir.NO[•] gerektiği zaman ve yerde sentezlenip, üretildiği hücreden basit difüzyon yoluyla dışarıya çıkabilmektedir.Sinir iletimindeki aracı maddelerin çoğu, aminoasitler veya bir takım peptitlerden oluşmuş olup bunlar alıcı hücre yüzeyindeki özel reseptörler ile ilişkilidir.NO[•] ise bu aracı moleküllerden farklı olarak özel reseptör içermez.Görünmez bir hayalet gibi hücre zarlarından geçer ve çevrede bulunan, ulaşabileceği her türlü hücreye girerek sitoplazmanın derinliklerindeki enzimleri uyatarak mesajını iletir. Bu sinirsel aracı mekanizmaların bir örneği, erkekte cinsel uyarı ile penis ereksiyonunun sağlanması arasındaki ilişkidir. Bu olayda rolü olan kasık bölgesindeki sinirler, beyinden aldıkları uyarının sonucunda, buna cevap olarak nitrik oksit sentezlerler.NO[•]'da gerekli bölgelerde damar gevşemesini sağlayarak ereksiyona neden olur.NO[•], sentezinin bloke edilmesiyle de ereksiyon önlenir (35).

3.2.3. Nitrik Oksitin Diyabetdeki Rolü

Diyabetin her tipinde, NO[•]'in gecikmiş vasküler lezyonların gelişmesinden NO[•] yetersizliğinin sorumlu olduğu artık bilinmektedir. Mikroanjyopatilerde patolojik olarak azalmış EDRF konsantrasyonlarına bağlı olarak endotelyuma bağımlı arter gevşemesinin azaldığı gösterilmiştir. Başlangıçta, yetersiz NO[•] üretiminin bundan sorumlu olduğu düşünülmüş ise de yeni kanıtlar diyabetli hastalarda süperoksit radikallerinin üretiminin arttığını göstermektedir. Açıkçası, bu süperoksit radikalleri ortamda hazır bulunan NO[•]'in büyük bir miktarını yakalayarak dolaylı olarak bir NO[•] yetersizliğine yol açarlar (70). Pankreasın adacık hücrelerinden insülin salgılanmasında L-arginin ve NO[•]'in rolü konusunda hala bir

belirsizlik vardır. Bir yandan L-arginin, NO^{*}in lokal sentezi yoluyla, insülin sekresyonunu stimüle eder. Diğer taraftan L-argininin stimulan etkilerine NO^{*}in eş zamanlı üretimiyle kısmen karşı konulabilir. Bu gözlemlerin ışığında L-argininin insülin salgılanmasında ikili bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (119). Son olarak, Tip 1 diyabetin etyolojisine karışan farklı bir NO^{*} mekanizması ortaya çıkarılmıştır. Aktive olmuş makrofajlardan büyük miktarlarda NO^{*} salgılanması pankreasın adacık hücrelerinin otoimmün yıkımından sorumlu gibi görünmektedir. Aşırı derecede fazla miktarda NO^{*} salgısının sitotoksik bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Hayvanlarda, deneysel olarak oluşturulan diyabetin gelişmesini NOS inhibitörleri uygulayarak durdurmak olanaklı olmuştur. Böylece NOS inhibitörleri, aktive olmuş makrofajlar aracılığıyla adacık hücrelerinin yıkımını önlemektedir. (119)

3.2.4. Nitrik Oksitin Sindirim ve Solunum Sistemindeki Rolü

NO^{*} akciğerler ve bağırsaklarda da nörotransmitter olarak görev yapar. Mide-bağırsak kanalının dalga şeklindeki kasılması ve gevşemesi işlevinin gevşeme aşamasında NO^{*}in rol aldığı gösterilmiştir (35). Sağlıklı bir mide mukozasının irritasyona (örneğin etanol, asit veya gastrin sekresyonuna bağlı) karşı yanıtı, kan akımında artış ve bir mukoza bariyerinin oluşmasıdır. Bu koruyucu mekanizma NO^{*}e bağımlı olarak çalışır. Bu bakımdan, prostaglandin türevleri ve diğer koruyucu faktörlerle birlikte, NO^{*}in mukoza ülserlerini önlemeden sorumlu olduğu düşünülmektedir (132). Halen, sukralfat ve karbenoksolon gibi iyi bilinen bazı antiülser ilaçların NO^{*} metabolizmasını modifiye ederek etkili olduklarını düşündüren kanıtlar da vardır. Bu NO^{*}e bağımlı modellerde, karbenoksolonun damar gevşetici bir etkiye sahip olduğu ve trombosit agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bebeklerde görülen infantil hipertrofik pilor stenozu denilen, mide boşalmasını engelleyen ve kusmalara yol açan kasılmaların NO^{*} eksikliği sonucunda olduğu gösterilmiştir (35).

Solunan havada NO^{*}in düzeylerinin belirlenmesi bu konuda çok sayıda araştırma yapılmasına neden olmuştur. NO^{*} pulmoner damarların tonusunu modüle etmektedir, yani NO^{*} pulmoner EDRF (Endotel kökenli damar gevşetici madde) dir ve inhalasyonla NO gazı uygulayarak pulmoner hipertansiyonu düşürmek mümkündür. NO^{*} gazı, deneysel koşullar altında bronkospazmı yok etmek için başarıyla kullanılmıştır. Hayvanlarda önemli bir tolerans olmaksızın, 30 saniye

içinde dilatasyon görülmüştür (45). İnhalasyonla NO[•] gazı almakta olan hayvanlarda pulmoner dirençte kesin bir azalmayı göstermek olanaklı olmuştur. NO[•] inhalasyonunu bir vazodilatör olan terbutalin aerosolü ile kombine ederek yanıtı anlamlı biçimde güçlendirmek olanaklıdır. NO[•] gazının ek inhalasyonu da terbutaline yanıtı artırır. ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome) yi tedavi etmek için NO[•] gazı kullanılarak elde edilen klinik sonuçlar özellikle ümit vericidir. ARDS'deki cesaret verici sonuçlar araştırmacıları ağır akut pnömonide NO[•] gazının etkilerini araştırmaya yönlendirmiştir (138).

3.2.5.Nitrik Oksitin İmmün Sistemdeki Rolü

Makrofajlar, immün stimullara ve yangısal mediyatörlere NO[•] salgılayarak yanıt verir. Endotelyum, lökositler ve karaciğerde etkisini bu şekilde gösterir. İmmün aktiviteli NO[•] indüklenebilen NOS aracılığıyla üretilir. Sitotoksik tümör nekroz faktörünün (TNF) kanser hücresi inhibisyonundan sorumlu olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, NO[•] aynı zamanda vücudun kansere karşı savunmasında sitotoksik bir efektör olarak santral bir role sahip gibi görünmektedir (35). Aynı zamanda NO[•] 'in malarya, leishmaniasis ve tüberkülozdan sorumlu ajanlar gibi, hücrel parazitlere karşı savunmaya da karıştığına ilişkin kanıtlar vardır. NO[•]'in Legionella pneumophila ile infekte olmuş makrofajlar üzerinde direkt bir bakterisidal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (158). Bunlar yararlı immün yanıt örnekleridir. Bununla birlikte, aşırı bir NO[•] immün yanıtı konağa zarar verebilir. Böyle durumlarda, aminoguanidin gibi NOS inhibitörünün uygulanması daha yararlı olabilir. Halen, çoğunlukla deneysel olan sonuçların nasıl klinik aksiyonlara dönüştürülebileceğini söylemek güçtür. Hastalarda elde edilmiş daha çok veriye gereksinim vardır. NO[•]'in kanser kemoterapisindeki ek etkilerini veya antibiyotiklerle kombinasyonundaki etkisini test etmek uygun olabilir.

NO[•], daha önce de belirtildiği gibi, Tip 1 diyabetin patogenezinde karışır. Organ transplantasyonundan sonraki red reaksiyonuna da karışır. NO[•] 'in her iki duruma da karışması NO[•] salgılayan makrofajların aktivasyonu ile olur. Bu red reaksiyonu sırasında o kadar çok NO[•] bulunur ki, serumda NO[•] parçalanma ürünlerini (nitrit ve nitrat) saptamakla erken bir reddi belirlemek olanağı bulunabilir. Spesifik NOS inhibitörleri de red reaksiyonların önlemede, siklosporin gibi konvansiyonel immünosüpresiflere bir alternatif olabilir. Kan damarlarının immün bir

yanıtı, yani NO[•] oluşturan enzim ekspresyonunun artışı, şokta görülen büyük çaptaki vazodilatasyondan sorumludur (110). Endotoksik şokta son yıllarda gerçekten çok güzel klinik sonuçlar elde edilmiştir. NOS inhibitörlerinin (L-NMMA) uygulanması hemodinamik parametreler ve ortalama arter basıncı üzerinde yararlı etkiler yapmıştır. Az sayıdaki hastada L-NMMA ile elde edilen klinik deneyimler, bu terapötik rejimin yaşam kurtarıcı olabileceği ümidini vermektedir. Kan basıncını regüle etmek için, nitratların kontrollü intravenöz uygulamasıyla, NO[•] sentezinin istenmeyen total blokajına karşı konulabilir.

3.2.6. Nitrik Oksitin İskemi-Reperfüzyondaki Rolü

İskemi-reperfüzyondan sonra koronerlere veya kan damarlarına gerekli olan kan akımı yeniden sağlandığında “oksijen paradoksu” adı verilen bir durum ortaya çıkar; beklenen bir iyileşme yerine fonksiyon kaybı, kalp kontraktilesinde bir azalma kan damarlarında kontraksiyon ve belli durumlarda, tutulan dokuda nekroz ortaya çıkar. Bu reperfüzyon hasarının nedeni tam olarak anlaşılmamıştır. Bu doku hasarına radikallerin, özellikle de oksijen radikallerinin neden olduğu düşünülmektedir.

Bazı araştırmacılar, NO[•] donörleri veya nitratların uygulanması ile, radikallerin süpürülmesi sağlanarak reperfüzyon hasarının önlenebileceğini açıklamışlardır(123). Miyokard infarktüsünden sonra NO[•], agresif radikallerin nötralize edilmesinde özel bir rol oynamaktadır. İntrakoroner lizis sırasında ortaya çıkan radikaller NO[•] tarafından süpürülebilir. Bu durum miyokardın korunmasına ve iyileşmesine yardım eder (72). Fakat iskemi-reperfüzyon ile artan NO[•] 'in zararlı etkilerinin daha çok olduğunu gösteren çalışmalarda bulunmaktadır Kalp kası, karaciğer veya böbrek gibi organların korunmasında ve iskemi, karaciğer sirozu veya böbrek yetmezliği gibi agresif metabolik durumların tedavisinde NO[•] 'in bu etkilerinden yararlanmanın mümkün olduğu düşünülmektedir. Siklik GMP nin iskemideki rolü tam olarak bilinmemekle beraber iskemide glutamatın toksisiteyi artırıcı bir rolü olduğunu destekleyen kuvvetli deliller mevcuttur(103). Glutamat reseptör aktivasyonu NO[•] aracılı mekanizmalar yoluyla cGMP oluşumuna bağlıdır (21). Bir transmitter olarak kendi rolü içinde NO[•], sinir uyarılarının düzenli iletiminden sorumludur. Bununla birlikte, NO[•] ile aşırı stimülasyon sinir hücrelerinin tahribine yol açabilir. NO[•] in paradoksik doğasına örnek kan basıncının kontrolüdür. Kan basıncı sabit bir biçimde, NO[•] konsantrasyonundaki fizyolojik değişimler ile ayarlanmaktadır.

Bununla birlikte, örneğin endotoksik şokta görülebildiği gibi, çok büyük miktarda artan bir NO^{*} salgısı ölümcül bir dolaşım yetersizliği sendromuna yol açabilir. Eğer hastada NO^{*} yetmezliği varsa hastaya nitratlar verilmeli veya doğal substrat olan L-arginin uygulanarak, NO^{*} üretimi için stimüle edilmelidir. NO^{*} 'in aşırı üretimi durumunda hastaya, L-NMMA veya aminoguanidin gibi NOS enzim inhibitörleri verilebilir. Sonuç olarak , NO^{*} düzeyi farmakolojik olarak kontrol edilebilir.

Koroner kalp hastalığının tedavisinde nitratların kullanımı klasik bir uygulamadır; koroner kalp hastalarında hasara uğramış endotelyum yeterince EDRF üretemez ve ortaya çıkan EDRF açığı sıklıkla koroner spazmlara yol açar. Ekzojen olarak uygulanan nitratlar, damarların hastalıktan etkilenmiş segmentlerinde endojen NO^{*} yokluğunu giderebilir. Bu şekilde nitrik oksitin düz kas hücreleri üzerindeki direkt etkisiyle koroner damarların kasılma/gevşeme dengesi eski normal durumuna dönmüş olur. Nitrik oksit geniş bir fizyolojik ve fizyopatolojik spektruma sahip, primer bir fizyolojik transmittir. Nitrik oksitin etkilerinin çoğu paradoksiktir. Geleceğe bakıldığında, nitrik oksit metabolizmasını modifiye eden ilaçların koroner hastalığı, erektil disfonksiyon, diabetes mellitus ve malarya gibi birbirinden çok ayrı hastalıkların korunma ve/veya tedavisinde kullanılabilmesi mümkündür.

3.2.7.Nitrik Oksit ve Türevlerinin Farmakolojik Özellikleri

Nitrik oksitin fonksiyonlarını değiştiren ve halen etkinliği araştırılmakta olan çeşitli farmakolojik ajanlar bilinmektedir. Nitrovazodilatörler ve benzerleri koroner kalp hastalığı, kalp yetmezliği ve hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır .Ayrıca akut anginal atakta, pulmoner ödem ve hipertansif kriz tedavisinde de değer taşırlar. İlk tanımlanan organik nitrat esteri olan gliseril trinitrat (trinitrogliserin) 1846'da sentezlenmiştir ve 1879'dan beri angina pectoris tedavisinde kullanılmaktadır. Organik nitratlar , esas olarak guanilat siklaz-siklik guanozin monofosfat (cGMP) sistemini aktive ederek etkilerini oluşturmaktadır (10).

L-arjinin, nitrik oksit dengesini değiştirebilen başka bir farmakolojik ajandır. Kardiyovasküler sistem hastalıklarında L-arjinin/ NO^{*} yolunda bozukluğun önemli rolü olduğu bilinmektedir çünkü bu koruyucu yolağın aktivitesindeki bir azalma, damar düz kasında gevşetici tonusta azalmaya ve buna sekonder olarak da vazokonstriksiyon ve lokal kan akımında azalmaya neden olur. L-arjinin'in terapötik amaçlı kullanımına ilişkin çalışmalar çelişkilidir. L-arjinin'in normal insanlarda hipotansif etki gösterdiği bildirilmiştir (85). Nitrik oksitin aşırı üretimi durumunda

hastaya L-NMMA veya aminoguanidin gibi nitrik oksit sentaz (NOS) enzim inhibitörleri verilebilir. Bu bakımdan, nitrik oksit düzeyinin kontrol edilmesi, spesifik farmakolojik girişimle hastanın nitrik oksit dengesinin eski normal durumuna döndürülmesi demektir.

Nitrik oksit sentaz enzim (NOS) inhibitörleri L-arginin/NO' yolağını araştırmada önemli araçlardır, ancak terapötik amaçla kullanımları sınırlıdır. Nitrik oksitin aşırı yapımının eşlik ettiği patolojilerde yararlı olup olmadıkları hala tartışmalıdır. Bu maddelere terapötik amaçla umut bağlanan en temel bozukluk doku perfüzyon yetersizliği ile karakterize olan septik şoktur. Bakteriyel endotoksinler ve TNF, IL-1, gama interferon gibi sitokinler makrofajlardaki indüklenbilir NOS'ı aktive eder ve mikrobik patojeni veya tümör hücrelerini parçalamak üzere fazla miktarda nitrik oksit salıverilir. Aynı uyarılar endotel hücresi ve vasküler düz kasda da NOS aktivitesini artırır ve bu olay aşırı bir nitrik oksit üretimine yol açar; hipotansiyon, vazokonstriktör ajanlara karşı hiporeaktiviten dolaşımında artmış olan NO'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Non-spesifik ya da kompetitif olarak NOS enzim inhibe eden bileşikler şunlardır;

- N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME)
- N-monometil-L-arginin (L-NMMA)
- N-nitro-L-arginin (L-NNA)
- N-amino-L-arginin (L-NAA)
- N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO)
- 1-(2-triflorometilfenil) imidazol (TRIM)
- N-N-dimetil-L-arginin (L-ADMA)
- S-metil- L-tiositrülin

Spesifik olarak NOS enzimini inhibe bileşikler aşağıda verilmiştir;

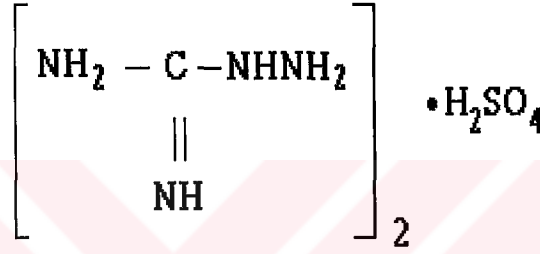
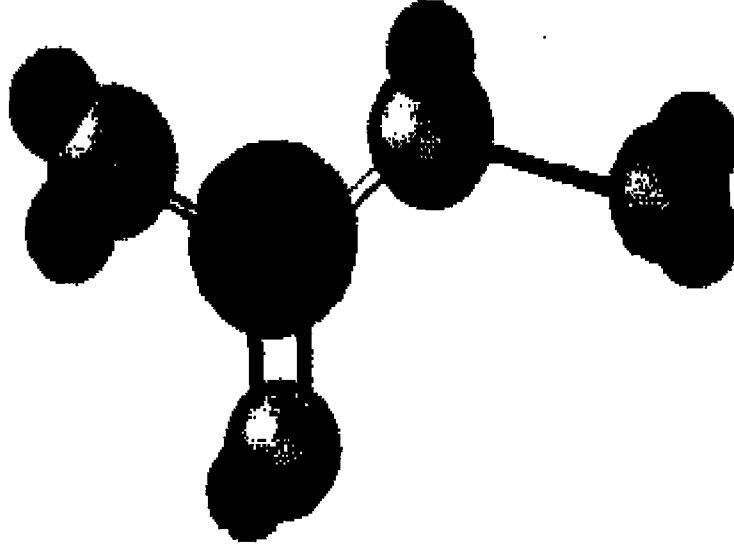
- Aminoguanidin (AG) → iNOS , cNOS
- S-(2-aminoetil) izotioüre → iNOS
- 2-amino-4-metilpiridin → iNOS
- 2-amino-5, 6-dihidro-6-metil-4H-1, 3-tiazin (AMT) → iNOS
- L-2-amino-4-(guanidooksi) bütirik asid (L-Canavanine) → iNOS
- S-etilizotioüre (EIT) → iNOS
- 2-iminopiperidin → iNOS

- S-izopropil izotioüre \longrightarrow iNOS
- S-metil izotioUre \longrightarrow iNOS
- N-(I-iminoetil)-L-lizin \longrightarrow iNOS
- 7-nitroindazol (7-NI) \longrightarrow nNOS
- Delta-S-metil izotioüreido-L-norvalin (L-MIN) \longrightarrow nNOS
- 3 -bromo- 7 -nitroindazol \longrightarrow nNOS
- 7-nitroindazol monosodyum tuzu (7-NINA) \longrightarrow nNOS
- 6-nitroindazol nNOS N-(I-iminoetil)-L-omitin \longrightarrow eNOS

3.2.8. Aminoguanidin ve Nitrik Oksit Sentaz Aktivitesindeki Rolü

Aminoguanidin (AG), yapısında hidrazin'e bağlı L-arjinin'in guanido gurubunu içerir (88). AG, uyarılabilen nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimini spesifik olarak inhibisyona uğratarak özellikle patolojik olaylarda aşırı üretilen nitrik oksit (NO[•]) düzeylerini azaltan önemli bir kimyasal ajandır(59). Bununla birlikte aminoguanidin değişik konsantrasyonlarda yapısal (cNOS) enzimlerinin üretimini baskılayabilmektedir (165).Şekil 4'de gösterildiği gibi aminoguanidin'in hemisülfat tuzu (CH₆N₄.1/2H₂SO₄) ve bikarbonat tuzu bulunmakta olup hemisülfat tuzu distile suda kolayca çözünebilmektedir (60).

Aminoguanidin'in yapısında bulunan *guanidin*, aslında proteinlerin kokuşması sonucu oluşan toksik nitelikte organik bir maddedir (82). Endotoksin ile uyarılan makrofaj kültürlerinde L-arjinin'in sitrülline dönüşümünde iNOS enziminin aktivitesi ölçüldüğünde aminoguanidin'in L-NMMA'ya göre yedi kat daha güçlü olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, izole sıçan beyinde cNOS 'ın inhibisyonunda L-NMMA'in, aminoguanidinden onbeş kat daha güçlü etki gösterdiği bilinmektedir (59).Aminoguanidin, anesteziye alınmış sıçanlarda ortalama arteriyel basınç artışında kırk kat ve domuzlarda izole dalak arterlerinin kasılmasında otuz kat daha az etkilidir. Bu bulgular, aminoguanidin'in cNOS ve nNOS'dan ziyade iNOS inhibisyonuna seçicilik gösterdiğini desteklemektedir (59). Bundan başka AG'nin, histamin'in in vivo olarak inaktivasyonuna katkıda bulunan *diamin oksidaz* (DAO) enzimini inhibe ettiği ve anjiotensin-II aracılı prostasiklin salınımını artırdığı saptanmıştır (59).



Şekil 4. Aminoguanidin molekülünün ve hemisülfat tuzunun kimyasal yapısı

Aminoguanidin'e ait koruyucu etkinin iNOS inhibisyonundan farklı olarak diaminooksidaz (DAO) enzim inhibisyonuna ve ileri glikolizasyon son ürünlerinin formasyonunda duraklamaya bağlı olabileceği şeklinde yayınlar da bulunmaktadır (16). AG'in ilaç tedavisi uygulanan sıçanlarda fenilefrin'e bağlı kasılma veya asetilkolin'e bağlı gevşeme üzerinde önemli bir etki göstermemesi nedeniyle sıçan ana pulmoner arterinde cNOS enzim inhibisyonunda etkili olmadığı anlaşılmıştır (59). Sorrentino ve arkadaşları aminoguanidin'e yapısal olarak benzeyen metilguanidin, guanidin ve onların prekürsörleri olan kreatin ve kreatinin'in nöronal yapısal ve akciğer indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimleri üzerinde çalışarak, metilguanidin ve guanidin (0.01-3 mM)'in bu her iki form NOS enzimini konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiğini bulmuşlardır. Gerçekten, kreatin ve kreatinin *guanidin* grubu içermesine rağmen 3 mM konsantrasyona ulaşıncaya kadar nNOS ve iNOS üzerinde etkisiz oldukları görülmüş

ve test edilen bileşikler için gözlenen sonuçlar enzim inhibisyonunda guanidin grubunun yan zincirlerinin daha etkin bir rol oynadığı anlaşılmıştır(155)

3.3.Serbest Radikaller

Canlılar moleküler oksijene olan gereksinimlerine göre aerobik, anaerobik ve fakültatif anaeroblar olmak üzere üç sınıfta toplanabilir. Yaşamları için oksijene devamlı olarak gereksinim duyan aerobik canlılarda oksijene gereksinim, oksijeni elektron transport zincirinde (ETZ) son elektron alıcısı olarak kullanmalarından ileri gelir. Anaerobik canlılar moleküler oksijenin varlığına tolerans göstermezler. Fakültatif anaeroblar ise oksijenli ortamda yaşayabilseler bile ya oksijeni hiç kullanmazlar veya oksijeni sınırlı bir düzeye kadar metabolize ederler. Fakat hiçbir zaman oksido-redüksiyon tepkimelerinde oksijeni son elektron alıcısı olarak kullanmazlar(79). Serbest radikaller, dış yörüngesinde en az bir çiftleşmemiş elektron taşıyan atom veya molekül anlamına gelir (77). Serbest radikaller diğer moleküllerle birleşerek dış yörüngelerindeki elektron sayısını çiftleştirmeye böylece kararlı bileşiklere dönüşmeye çalışmaktadırlar. Bir atom veya molekülün yapısındaki elektronlar çekirdeğin etrafında yer alan ve yörünge (orbit) denilen yapılarda bulunurlar. Her bir yörünge iki adet elektron içerir ki bunlara çiftlenmiş elektron denir. Eğer yörüngede bir elektron var ise bu elektron çiftlenme eğilimindedir. Çiftlenmemiş elektron molekül formülünün yanına ilave edilen bir nokta ile gösterilir (137). Aerobik metabolizmaya bağımlı olan organizmaların gelişebilmeleri için biyokimyasal bir savunma sistemine gerek vardır. Bu sistem; hücrelerdeki işlemler sırasında ortaya çıkabilecek aşırı oksidasyondan hücrenin ana elemanlarını ve dolayısıyla canlıyı korumaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Katalaz (CAT) gibi hücre içi enzimler bu koruyucu sistemde görev almaktadır (53,71). Aerobik canlılarda metabolik işlemler sırasında serbest oksijen radikalleri kaçınılmaz bir şekilde üretilmektedir. Bu nedenle normal metabolizma sırasındaki oksido-redüksiyon reaksiyonlarının ürünleri olan SOR (Serbest oksijen radikalleri) oluşması, biyolojik bir bozukluk olarak değerlendirilmemelidir(42). Ancak; iskemi, inflamasyon, radyasyon, antibiyotik tedavisi gibi bazı hücresel metabolik durumlarda büyük oranda üretilen SOR, membranlar, enzimler, nükleik asitler ve polisakkaritler üzerinde toksik etkiler yaparak çeşitli dokuların hasarına neden olmaktadır (23)

3.3.1. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Hücrelerin canlılığını sürdürmesinde membran bütünlüğünün ve fonksiyonunun büyük önemi vardır. Plazma membranı; membrana bağlı enzim destekleyicisi olan doymamış yağ asidinden zengin olduğu için serbest radikaller ile kolaylıkla reaksiyona girebilir ve peroksidasyona uğrayabilirler. Bu toksik maddeler plazma membranını bozarak hücrenin iç biyokimyasal yapısını etkileyebilir, hasara yol açabilir, membranın fonksiyonu ve akışkanlığını değiştirebilirler. Lipid peroksidasyonuna bağlı olarak organellerde fonksiyon bozukluğu oluşur, lizozomal frajilite artışı ile mikrozomal enzimlerde değişiklikler meydana gelir, hücre ölümü ve kollajen oluşumunda artış görülür. Normal metabolizma esnasında gelişen oksidasyon-redüksiyon olayları neticesinde oluşan serbest oksijen radikali (SOR) biyolojik bir bozukluğa neden olmamasına karşılık bazı hücrel metabolik bozukluklar nedeni ile (iskemi, inflamasyon, radyasyon, hiperoksi v.b.) çok daha büyük miktarlarda üretilir ve sonuçta membranlar, nükleik asitler, enzimler ve polisakkaritler üzerinde değişik derecelerde toksik etki yaparak çeşitli dokularda hasara yol açmaktadırlar (23). Moleküler oksijen bir atom veya molekül ile reaksiyona girerse ondan bir elektron alır ve böylece oksijenin indirgenmiş reaktif serbest radikalleri, peroksit, singlet oksijen, hipoklorik asit gibi molekülleri de içine alan ürünler oluşur.

Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı vardır ;

A) Eksojen kaynaklar

- Radyasyon etkisi
- Bağışıklık yapan maddeler: alkol, uyuşturucu vb
- Ksenobiyotikler: hava kirliliği, hiperoksi, pestisitler, solventler, anestezi maddeler, aromatik hidrokarbonlar, sigara dumanı vs
- Antineoplastik ajanlar
- Stres; katekolamin düzeylerinin artışına bağlı

B) Endojen kaynaklar

- Mitokondrial elektron transportu
- Peroksizomlar
- Enzimler ve proteinler; XO, triptofan dioksijenaz, hemoglobin vb
- Küçük moleküllerin otooksidasyonu; tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiyotikler vb

- Endoplazmik retikulum ve nükleus membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450 vs)
- Plazma membranı enzimleri; NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu vs.
- Oksidatif stres durumları
- Fagositlerin aktivasyonu (solunumsal patlama)

Oksidasyon tepkimeleri yaşam için gerekli olup, bu tepkimeler esnasında oksijen molekülünden türeyen toksik özellikteki ara ürünleri SOR olarak isimlendirilir (77,161). Serbest oksijen radikalleri inorganik veya organik olabilirler. Organik olan oksijen radikalleri, çoklu doymamış yağ asidi gibi moleküllerden türeyen peroksil (ROO) alkil (R) ve alkoksil (RO) radikali, inorganik olanlar ise süperoksit (O_2^-), hidroksil radikali (OH \cdot) ve nitrik oksit (NO \cdot)' dir (64). Hiperoksijenasyon, iskemi-reperfüzyon, inflamasyonlu hastalıklar, toksik doku yaralanmaları gibi durumlarda SOR'ların önemli bir rol oynadığı açıktır. Bununla birlikte SOR aracılığıyla nötrofiller; bakterileri öldürmekte, radyasyon; normal ve malign dokulara zarar vermekte, bir çok ilaç karsinojen, toksik ajan etkisi göstermektedir (24). Serbest oksijen radikalleri geniş bir hastalık grubunda etkindir. Bunlar kısaca aşağıda belirtilmiştir (24)

1-Normal biyolojik işlemler:

a-Oksijenli solunum

b-Katabolik ve anabolik işlemler

2-Oksidatif stres yapıcı durumlar

a-İskemi-reperfüzyon sendromları

*Miyokard infarktüsü

*Mide mukozasında stres ülseri

*Organ prezarasyonu ve transplantasyon

*Nekrozitan enterokolit

*Şok sonrası karaciğer yetmezliği

*Serebral iskemi

*Kol ve bacak iskemisi

*Akut renal tübüler nekroz

b-Toksik doku yaralanmaları

*Aspirasyon pnomonisi

*Özefajit

c-İltihabi hastalıklar

* Pankreatit

*Nötrofil fagozitozu

*Artrit

*İltihabi barsak hastalıkları

*Bağ dokusu hastalıkları

*İmmün yetmezlikler

d-Eksojen toksik ajanlar

*Radioaktivite

*Alloksan

*Karbon tetra klorür

*Kemoterapötik ajanlar

*Nitrofurantoin

*Paraquat

e-Ksenobiotiklerin etkisi

*İnhale edilenler

*İlaçlar

*Alışkanlık yapan maddeler

f-Stres ile artan katekolaminler

g-Fagositik inflamasyon hücrelerinde salgılanma

h-Genel

*Yaşlanma,

* Dolaşım şoku,

*Periferik ödem

3.3.2. Serbest Oksijen Radikal Türleri

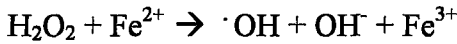
Serbest radikaller ortaklanmamış elektron taşıyan kimyasal bir yapı olarak tanımlanır. Serbest radikaller, bir molekülün bir parçası olarak da kabul edilebilir. Biyolojik ortamlardaki en önemli serbest radikaller şüphesiz oksijen radikalleridir. Tek bir elektronun transfer yoluyla oksijene verilip redüklenmesi süperoksit serbest radikal anyonunu (süperoksit, O_2^-) oluşturmaktadır.



Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi ise hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur.



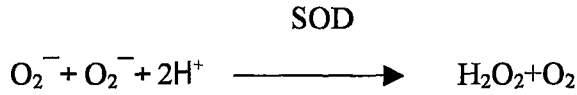
Hidrojen peroksit, serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Çünkü geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla parçalanıp oksijen radikallerinin daha reaktif ve biyolojik sistemlerde daha fazla hasar oluşturan hidroksil radikalini ($\cdot OH$) oluşturur.



Bu ifade edilen reaksiyon demir katalizli Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır.

Süperoksit radikali (O_2^-) : Serbest radikal olmasına rağmen hasar oluşturucu özelliğe sahip değildir. Asıl önemi; hidrojen peroksitin kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının redükleyicisi olmasıdır. NO^- ile reaksiyona girerek peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturur. Süperoksit, düşük pH'da daha reaktif olan perhidroksil radikaline (HO_2^-) protonlanır, fakat fizyolojik pH'da bu form %1'in altındadır. Fizyolojik şartlarda ferritinde bulunan demiri (Fe^{+2}) indirger.

O_2^- ; süperoksit dismutaz (SOD) adı verilen enzim ailesinin katalize ettiği reaksiyonlar ile elimine edilir.



Hidrojen peroksit (H_2O_2) : Okside edici bir ajan olup reaktivitesi en düşük olan oksijen türevlerindedir. (1,67) Asıl önemi; geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerini oluşturmasıdır. (75) Metal katalizörlerin yokluğunda süperoksit ve hidrojen peroksit kolaylıkla uzaklaştırılır ve zararsız hale getirilir.

Hidroksil radikali ($\cdot OH$) : Hemen hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen yüksek reaktivitesi olan bir ajandır. Reaksiyona girmeden önce hücrede diffüze olması güçtür çünkü çok kısa ömürlüdür. Fakat küçük miktarları bile üretildiği yerde aşırı hasar yapabilecek kapasitededir

Singlet oksijen (1O_2) : Singlet oksijen yapı olarak çifleşmemiş elektron içermediğinden radikal olmayıp, sıklıkla serbest oksijen radikalleriyle birlikte anılan reaktif oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonlarıyla üretilebilir. Diğer oksijen radikallerinden daha uzun ömürlü olması ve elektronların konumu nedeniyle kolayca kimyasal reaksiyonlara girebilmesi bu oksijen bileşiğinin çok reaktif olmasına neden olur. Orbitalde paralel gezinen elektronlar enerji girişiyle antiparalel olurlar ve sonuçta oksidan kapasiteyi artırır (29,151). Singlet oksijen radyasyon sonucu oluşabileceği gibi *in vivo* olarak sitokrom P-450, prostaglandin endoperoksit sentetaz ve miyeloperoksidaz reaksiyonları ile de enzimatik olarak oluşabilmektedir (151)

Karbon merkezli radikaller ($R\cdot$) : Lipid, nükleik asit, karbohidrat veya protein gibi biyolojik bir molekülü okside edici bir radikalın etkilemesiyle oluşur (örneğin $OH\cdot$ Radikali). Bunlar oksijen molekülü ile birlikte çok hızlı bir şekilde ilgili peroksil radikallerini ($ROO\cdot$) oluşturmak üzere birleşirler. Diğer taraftan bu peroksil radikalleri, alkoksil radikalleri ($RO\cdot$) üreten reaksiyonlara karışabilir. Sülfür atomları, yeni bir serbest radikal üretimi (thiol) radikaller, $RS\cdot$) için kaynak olabilir.

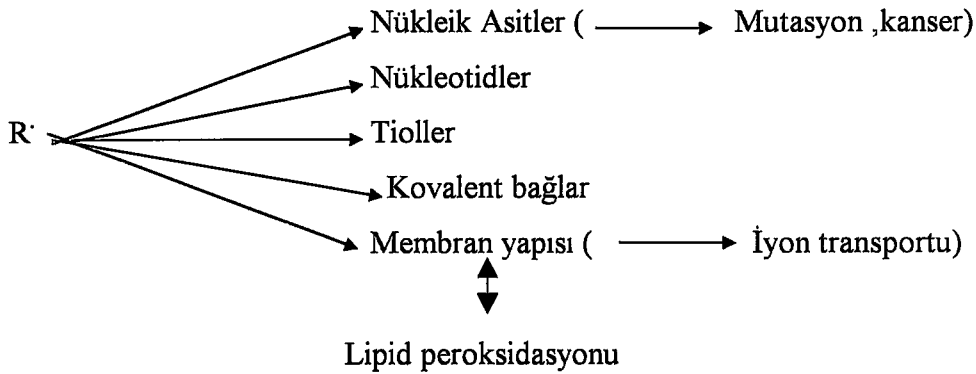
3.3.3. Serbest Radikallerin Hücresel Yapılara Etkileri

Genel olarak serbest radikaller DNA'nın yapısında değişikliğe neden olarak mutasyon veya sitotoksite oluşturmaktadır (133,150). Oksijen serbest radikalleri $NAD^+/NADH$ ve $NADP^+/NADPH$ redoks çiftlerini etkileyerek $NAD(P)$ meydana getirmektedir. Şekil 3'de belirtildiği gibi serbest radikaller nükleotidlerin biyolojik özelliklerini değiştirmekte, protein ve non protein tiol gruplarını oksitleyerek thiol radikalleri oluşturmaktadır. Serbest radikaller kovalent bağları etkileyerek protein,

nükleik asit ve lipidlerin yapı ve fonksiyonlarını bozmaktadır (Şekil 2). Bu hasar radikallerin membran enzimlerine ve reseptörlerine kovalent bağlanarak antijenik karakter ve transport fonksiyonunu bozması, poliansatüre yağ asidi / protein oranını değiştirmesi ve lipid peroksidasyonunu başlatması ile olmaktadır. Hasar sekonder olarak, lipid peroksit radikalleri, lipid hidroperoksitleri ve diğer lipid parçalanma ürünler ile devam ettirilir. Lizozom hasarı ile salınan lizozomal enzimler (hidrolitik enzimlerde) hücre hasarını daha artırmaktadırlar (151,24).

3.3.4.Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler:

Hücre membranları, okside edici radikallerle kolaylıkla etkilenebilen poliansatüre yağ asitlerince (PUFAs) zengindir. Lipid peroksidasyonu olarak da bilinen PUFAs'ın oksidatif hasarı, sonuçta kendi kendine zincir reaksiyonları başlatarak işin kendiliğinden devam etmesine yol açar. Sonuçta oluşan peroksil radikalleri (LOO[•]) zincir reaksiyonunun bir aracısı olup bir sonraki PUFAs'ı okside ederek yeni zincir reaksiyonlarını başlatırlar (4). Bu işlemlerin sonunda oluşan ürün hidroperoksitlerdir (LOOH) ve bunlar da daha şiddetli radikal özelliği olan türlere, özellikle aldehitlere çevrilirler. Aldehitler daima lipid hidroperoksitler parçalandığı zaman oluşurlar ve çoğu biyolojik olarak aktiftirler. Bunlardan en çok bilineni hidroksialkenoller'dir ve bunlar da 4-hidroksinonenal üyesidir (49). Lipid hidroperoksitleri ve lipid peroksi radikalleri, serbest oksijen radikalleri gibi, aynı hücrenin birçok komponentiyle reaksiyona girerek, hücrenel ve metabolik fonksiyonlar üzerinde toksik etkilerini gösterirler (133). Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu tayininde en sık ölçülen bir ürün olan MDA, CO₂'e metabolize olmasına rağmen, idrarda asit ile hidrolize edilebilen formda küçük miktarda bulunmaktadır(152).



Şekil 5. Oksijen Radikallerinin hücre metabolik fonksiyonlarını bozma yolları.

3.3.5. Proteinlerde ve Nükleik Asitlerde Oluşan Yapısal Değişiklikler

Protein ve nükleik asitler serbest radikal saldırılarına PUFAs'lardan daha az duyarlıdır. Çünkü bunlarda hasar oluşturucu zincir reaksiyonlarının oluşma ihtimali çok zayıftır (Şekil.5).DNA, okside edici radikaller tarafından radikallerin DNA'ya yakın bölgelerde meydana gelmelerinden dolayı kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir. Proteinlerde olduğu gibi hızlı zincir reaksiyonlarının olma ihtimali çok azdır.

3.4. Antioksidan Sistem

Hücrelerin metabolik yollarının işleyişinin doğal bir sonucu olarak farklı derecelerde radikaller oluşmaktadır. Organizmada bu oluşum sürekli olmasına rağmen güçlü savunma sistemleriyle bunlara karşı defansif yapı oluşturularak canlı doğası korunmaktadır. Zararlı oksidan ajanlara karşı canlılarda koruyucu antioksidan sistemler gelişmiştir.

Antioksidan defans sistemi:

- a) Oksijenin uzaklaştırılması veya lokal oksijen konsantrasyonlarının azaltılması,
- b) Katalitik metal iyonlarının (Fe, Cu) uzaklaştırılması,
- c) Anahtar rolündeki serbest oksijen radikallerinin uzaklaştırılması,
- d) Hasarı başlatıcı serbest radikallerin (OH[•], LO[•] ve LOO[•]) temizlenmesi ,
- e) Zincirleme devam eden reaksiyonları kırılması,
- f) Singlet oksijenin temizlenmesi,

Antioksidanlar, iki grupta toplanabilir (136).

Endojen Antioksidanlar

1- Enzimatik

- | | |
|--|-----------------------|
| -Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi | -Süperoksit dismutaz |
| -Katalaz | -Glutasyon peroksidaz |

2-Nonenzimatik

a-Lipid faz (membran)

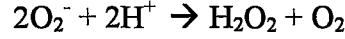
- | | |
|------------------------|--------------------|
| - α - tokoferol | - β -karoten |
|------------------------|--------------------|

b-Sıvı faz (non-membran)

- | | | | |
|-------------|----------------|-------------|-----------|
| - Glutasyon | -Askorbik asit | -Ürat | |
| -Sistein | -Seruloplazmin | -Transferin | |
| -Laktoferin | -Albumin | -Billurubin | -Ferritin |

Enzimatik Korunma Mekanizması : Hücre içerisinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik (enzimatik) olarak çalışırlar. Enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) antioksidan defans sisteminin majör enzimleri dir.(136).

Süperoksit Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) : Süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;



Enzim bir metalloenzim olup, insanda Cu,Zn-SOD ve Mn-SOD olarak ilk defa 1969 yılında McCord ve Fridovic tarafından tanımlanmıştır (100,53). Ökaryotlarda ise üç SOD izoformu tanımlanmıştır. Bunlar ekstrasellüler SOD (ecSOD), sitoplazmik SOD (Cu,Zn-SOD) ve mitokondrial SOD (Mn-SOD)'dur (100). Cu,Zn-SOD; hücrenin sitoplazmasında bulunur. Molekül ağırlığı 32.000 daltondur. İki alt ünitesi vardır ve bunların herbirinde bir Cu ve bir Zn atomu bulunmaktadır. Mn-SOD ise mitokondrial bir enzimdir ilk olarak 1970 yılında Keele ve arkadaşları tarafından Prokaryotların sitozolünden izole edilmiştir (76). Enzim 23.000 dalton ağırlığında olup +3 değerlikli Mangan iyonlarını içerir. Enzim iki alt birimden oluşmuş olup her alt biriminde bir Mn atomu mevcuttur.

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9) : İlk kez memeli eritrositlerinde Siddons ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (147). Prostetik grup olarak Selenyum (Se) taşımaktadır. Bu yüzden metalloenzim grubunda değerlendirilir. Hidrojen peroksidin *in vitro* detoksifikasyonunu yüksek spesifite ile katalizlemektedir. Katalizleme sırasında redükte glutatyon okside glutatyona çevrilmektedir. Reaksiyon şu şekildedir;

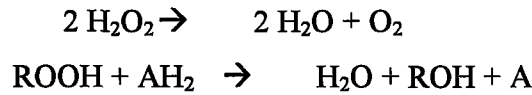


Ayrıca lipid peroksidlerinin indirgenmesini de katalizler (68).

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) : 1901 yılında tabiatta yaygın bir şekilde yer aldığı Leew ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (2). İlk defa 1937'de Sumner ve Dounce (39) tarafından karaciğerden kristal formda elde edilmiştir. Molekül kütlesi 240.000 daltondur. CAT, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Dört alt üniteden oluşmuştur. Bu alt üniteler ferriprotoporfirin grubu şeklindedir. Yani prostetik grubunda Fe⁺³ bulunan protoporfirin IX bulunmaktadır. Doku katalaz aktiviteleri büyük farklılıklar gösterir. En yüksek aktivite karaciğer ve böbrekte

saptanmıştır. En az aktivite ise destek dokusunda gözlenir. Dokularda esas olarak mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunur. Ayrıca sitoplazma ve endoplazmik retikulumda da aktivitesi vardır. Oksidazların aktivitesi ile oluşan H₂O₂'i direkt olarak suya çevirir. H₂O₂'in konsantrasyonunun aşırı arttığı ortamlarda aktivite gösterir. Düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında diğer enzimler (glutasyon peroksidaz gibi) devreye girer (3). GSH-Px ile aynı etkiyi gösterir. Fakat hücre içi dağılımı açısından farklılık söz konusu olup, GSH-Px esas olarak mitokondri ve sitozolde aktif iken katalaz peroksizomlarda aktiftir.

Katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;

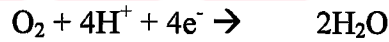


(ROOH: metanol, etanol, formik asit, fenoller gibi bir elektron vericisidir.)

Glutasyon Redüktaz (GSH) : Okside glutasyonun, redükte glutatona dönüşümünü sağlayarak dolaylı antioksidan etki göstermektedirler.

Glutasyon-S-transferaz : Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynarlar. Lipid peroksitlerine karşı (Se bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek) bir savunma mekanizması oluştururlar (4).

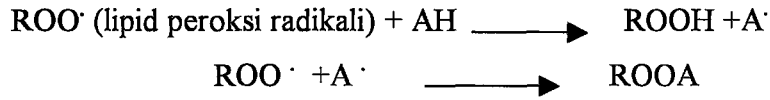
Mitokondrial Sitokrom Oksidaz : Süperoksit radikalının *in vivo* olarak oluştuğu major yollar mitokondri ve mikrozomal elektron transport sistemleridir. Mitokondrial elektron transportunda normal şartlar altında bir moleküler oksijene 4 elektron aktarılarak 2 molekül su oluşturulur:



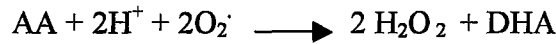
Sitokrom oksidaz, kısmen elektronlanmış oksijenleri aktif merkezinde sıkıca tutar, böylece elektron sızıntısını minimale indirmiş olur. Dolayısıyla buradaki konumu bir antioksidan özellik arz etmektedir. Eğer kısmî olarak elektronlanmış oksijen atomlarını (serbest radikal) yapısında tutmamış olsa, ortamda oksidatif stres artacaktır.

Nonenzimatik Korunma Mekanizması : Normal hücrede birçok non enzimatik korunma mekanizması mevcuttur. Lipid ve sıvı faz antioksidanları olarak adlandırdığımız düşük molekül ağırlıklı serbest radikal toplayıcılarının dışında glutatyonda, lipid peroksidasyonunu önlemeye çalışır (43).Enzimatik olmayan antioksidanlar aşağıda belirtilmiştir;

E Vitamini : Membranların lipid kısmında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur. Lipid peroksitleri inaktive eder ve lipid peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonu tepkimelerini engeller. Vitamin E, peroksit ve hidroperoksitleri hidrojen iyonları ile doyurup, peroksit radikallerinin aktivitesini azaltarak otooksidasyonun başlatıcısı olan bu reaksiyonları inhibe eder . GSH-Px'e benzer etki göstererek hücre zar oksidasyonunu önleyerek dokuların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü sağlar .Vitamin E , etkisini zar fosfolipitlerinde bulunan araşidonik aside bağlanarak gösterir ve kendi başlattığı reaksiyon ile bir radikale (A[·]) dönüşerek peroksidasyon zincir reaksiyonunu keser.(130)



C vitamini : Askorbik asit (AA) olarak bilinir.Hücre dışı sıvılarda bulunur. Süperoksit ve hidroksil radikalının doğrudan temizleyicisidir. Askorbik asit singlet oksijen, süperoksit ve hidroksil radikallerini yok edici etkiye sahiptir. Askorbik asitin enzimatik reaksiyonlar üzerine etkisi prostetik metal iyonlarını indirgenmiş halde tutmasından kaynaklanmaktadır (116). İskemi ve reperfüzyon süreçleri serumda askorbik asitin azalması ile sonuçlanmaktadır. A vitamini; singlet oksijenin ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu çok erken safhalarda önleyici etkiye sahiptir (13). AA, güçlü bir redükleyici ajan ve antioksidan olup süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidroaskorbik asiti (DHA) oluşturur (24).



β-Karoten : Vitamin A öncülü olup, membranlarda bulunur. Temizleyicidir ve peroksitlere direkt etkisi sözkonusudur. Yağda eriyen bir vitamin olan β-karoten,alkoksil ve peroksil radikallerinin etkin temizleyicisidir (165).

Seruloplazmin : SOD benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Ferro demiri yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece serbest radikal oluşumunu inhibe eder.

Transferrin : Dolaşımdaki serbest demiri bağlar.

Ürik asit : Normal plazma konsantrasyonlarında süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini temizler.

Albumin : Geçiş metallerini bağlar, lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) toplayıcısıdır.

Bilirubin : Serbest radikal tutucusudur, süperoksit ve hidroksil radikal toplayıcısıdır.

Glutasyon : Karaciğerde, genetik bilgiye gerek olmadan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Çok önemli bir antioksidan olan glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca proteinlerdeki, -SH gruplarını da redükte halde tutarak oksidasyondan korur.

Sistein : Serbest radikal ve hipoklorit toplayıcısıdır.

Taurin : Ksenobiotiklere bağlanır. Hipoklorit ile reaksiyona girer.

Glukoz : Hidroksil radikal tutucusudur.

Piruvat : H_2O_2 tutucusudur.

Hemoglobin : Oksidanları, Haptoglobulin; hemoglobini, Hemopeksin de; serbest hemi bağlayarak antioksidan özellik göstermektedir.

Melatonin : Pineal bezden salınan indolamin yapısında bir hormon olup OH⁻ radikalini ortadan kaldıran etkin bir antioksidandır (4).

3.5. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Serbest Radikallerin Rolü

Moleküler oksijenin indirgenmesi veya uyarılması sonucu birkaç serbest oksijen radikali oluşmaktadır. Bunlardan süperoksit; mitokondrial, endoplazmik retikulum, membran elektron transport işlemleri, hemoglobin, aldehid oksidaz ve ksantin oksidaz tarafından üretilen bir yan üründür. İn vivo olarak süperoksit oluşumu hemen hemen tamamen hidrojen peroksit üretimindeki artma ile birlikte dir. Hidroksil radikali; demirin rol aldığı Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu yoluyla üretilmektedir. Bu radikal biyolojik sistemlerdeki en reaktif serbest radikaldir ve lipid peroksidasyonu, sitokrom enzimlerin inaktivasyonu, membran transport proteinlerindeki değişiklikler ve sülfidril gruplarının oksidasyonu gibi yıkıcı olaylardan sorumludur. Daha önce bahsedildiği gibi biyolojik sistemlerde serbest radikal üreten birkaç mekanizma tanımlanmıştır. Mitokondrial elektron transport zincirinde fizyolojik olarak sızma tarzında küçük miktarlarda serbest radikaller oluşturulmaktadır. Patolojik süreçlerde ise serbest radikaller ksantin oksidaz metabolizmasından, aktive olmuş nötrofillerden, katekolamin oksidasyonundan, endotel hücrelerinden ve prostaglandinlerden üretilmektedir (87). Postiskemik dokudaki serbest radikallerin esas kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. İskemi esnasında ilgili dokuya demir iyonu girişi olur. Reperfüzyon gerçekleştiği takdirde süperoksit ve hidrojen peroksit üretilir. Süperoksit serbest ferröz demirin (Fe^{+2})

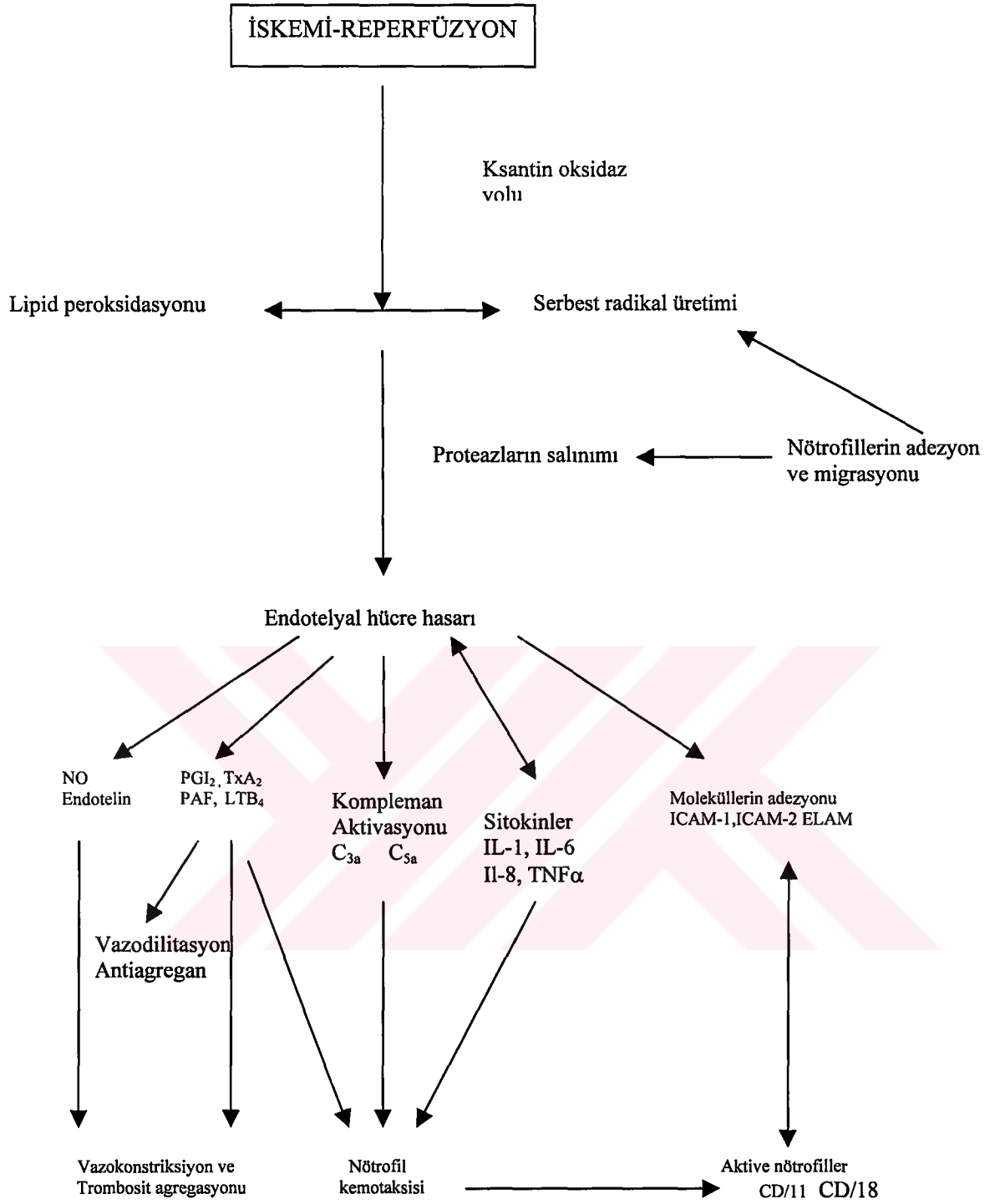
ferritinden salınımını arttırır . Böylece fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten bol miktarda hidroksil radikali oluşur.

Kalp iskemisini takip eden hem akut hem de subakut reperfüzyon fazında SOR üretilebilir. Reperfüzyonun akut fazında SOR protein oksidasyonu ve yıkılımı, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı üzerinden direkt hücresel hasar oluşturur (120). Bütün bu akut redoks hasar çeşitleri daha sonra sinyal iletim yollarını aktive ederek subakut hasarın başlamasına yol açabilir. Hasarın subakut fazı esnasında proenflamatuar sinyal iletim kaskad'ının akut-faz aktivasyonu ile üretilen sitokinler nötrofillerin tutulmasına NO kaskadı'nda katılımıyla ve hasarlı dokunun hasarının daha da artmasına sebep olur. Ayrıca subakut faz esnasında nötrofillerden sekrete edilen proinflamatuar sitokinler reseptör aracılı yollar ile hasarlı dokuda hücre içi SOR üretimini arttırarak organ hasarını derinleştirirler.

3.5.1. Kardiyak İskemi-Reperfüzyon

İskemi; organa gelen kan akımının yetersizliği veya dokunun bozulmuş perfüzyonu olup, uzayan iskemide hücrelerin bütünlüğü kaybolmakta ve hücresel ölüm meydana gelmektedir. Nitrik oksit ve serbest oksijen radikallerinin iskemi-reperfüzyon hasarındaki rolü bu alanda en çok çalışılan konular arasında yer almaktadır. İskeminin neden olduğu patolojik olaylar; özellikle iskemik kalp hastalıkları, serebral iskemi ve organ transplantasyonu gibi hem sık karşılaşılan hem de yaşamı tehdit eden durumlardır.

Miyokardiyal iskemi, birbirine bağımlı veya birbirinden bağımsız bir çok fizyolojik ve patolojik sürecin sonucu olarak ortaya çıkabilir.(Şekil.6) İskemi, ateroskleroz veya tromboembolilerin bir sonucu olarak ortaya çıkabildiği gibi, perkütanöz transluminal koroner anjioplasti (PTCA), koroner arter bypass veya transplantasyon gibi cerrahi işlemler sırasında da oluşabilir. İskeminin sebebi ne olursa olsun sonuçları daima aynıdır: miyokardiyal yeterli oksijen ve metabolizmayı devam ettirmeye yetecek miktarda substrat ulaşamaz.İskeminin ilk dakikalarında glikolitik yol büyük ölçüde stimüle olur, fakat daha sonra aşama aşama, doku asidozunun gelişmesi, NADH, sitrat ve laktat birikmesi sonucu glikolitik yol inhibe olur (111). Oksidatif fosforilasyon için gerekli oksijen yeterince sağlanamadığı için, glikoliz sonucu oluşan piruvat krebs döngüsüne gireceği yerde laktata dönüşür. Bunun sebebi, glikolizin yürümesi için gliseraldehit-3-fosfatın gliseraldehit-fosfat dehidrogenaz enzimi ile 1,3-difosfogliserata çevrilmesi basamağında mutlaka gerekli



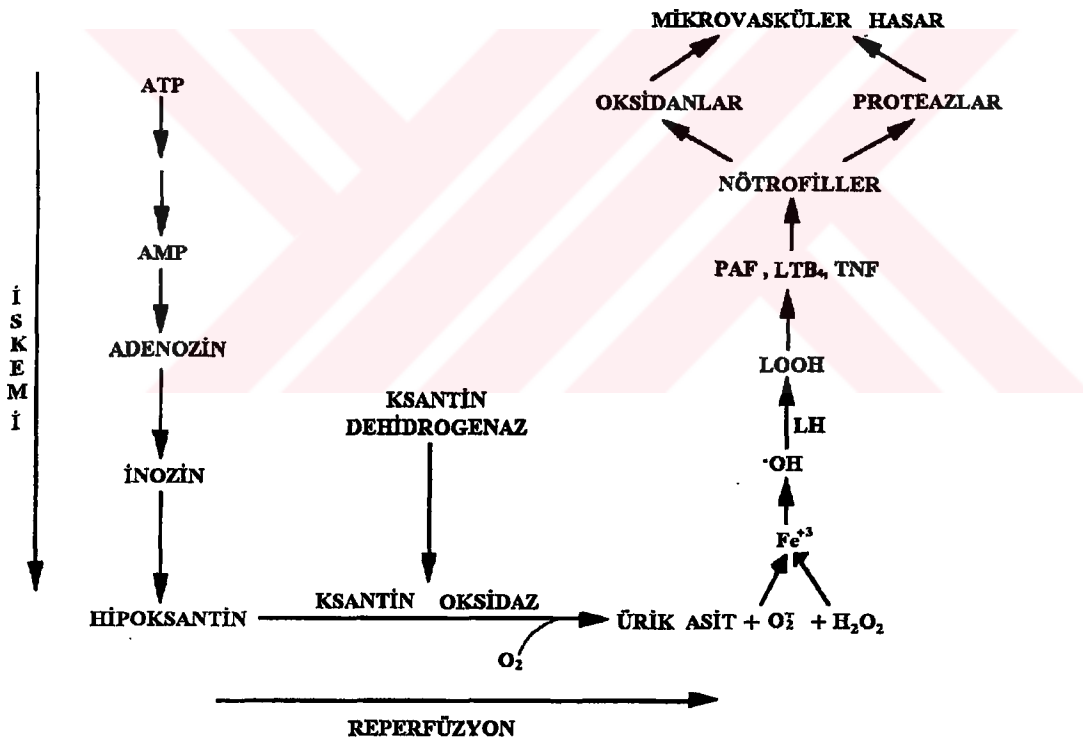
Şekil 6. İskemi-reperfüzyon hasarında endotelial hücrelerin rolü (57).

NO: Nitrik oksit. PAF: Trombosit aktive edici faktör. PGI₂: Prostaglandin I₂
 TxA₂: Tromboksan A₂, LTB₄: Lökotren B₄. IL: İnterlökin. C_{3a}: Kompleman.
 TNF α : Tümör nekroz faktör α . ICAM: İntrasellüler adezyon molekül.
 ELAM: Endotelial lökosit adezyon molekül,
 CD:Farklılığın gruplanması.

olan NAD'nin ancak piruvat→laktat dönüşümünden elde edilebilmesidir. Anaerobik yolla üretilen ATP, dokunun ihtiyacını karşılayacak miktarda değildir. İskeminin devam etmesi ile birlikte doku ATP düzeyi düşer ve yeni durum hücreyi hasara uğratacak bir seri olayın başlamasına yol açar. Bunların en önemlisi, hücrenin membran iyon dengesini koruma yeteneğini kaybetmesidir. Çünkü hücre içinde üretilen enerjinin %70 gibi bir oranı membran transport sistemlerinde, iyon kanallarında ve membran için gerekli yapı maddelerinin endoplazmik retikulum ve golgi cisminde sentezinde kullanılmaktadır. Reperfüzyon ile hızla Ca^{+2} hücre içine girer. $Na^{+}-Ca^{+2}$ değişimi, reperfüze edilmiş alandaki hücreye Ca^{+2} girişini açıklayan mekanizmalardan sadece birisidir. Kalsiyumun hücre içinde artışı; çıkışın azalmasına değil girişin artmasına bağlıdır (17). Hücrede serbest kalsiyumdaki artış, hücrenin iyon dengesinde bozulmaya yol açar. Kalsiyum kolayca mitokondriye alınır. Mitokondriler kalsiyum ile aşırı yüklenince ATP üretemez ve sonunda parçalanır (121). Kalsiyum varlığında hücrenin proteaz ve fosfolipazlarının çoğu aktive olur; reperfüzyondan sonra hücrenin daha ileri hasarlanmasının sebebi bu litik enzimlerin aktivasyonudur. Fosfolipazların aktivasyonu hücre membranında hasar oluşturur: Serbest yağ asitlerinin ve lizofosfolipitlerin salınmasına yol açar. Bu bileşikler tek başına toksik değildirler, araşidonik asit metabolizmasını başlatabilirler (106). Sonuçta reperfüzyon ile birlikte radikal türevleri ve diğer sitotoksik ürünlerin üretilmesi söz konusu olabilir (84). Proteazların aktivasyonu hücre iskeletinin sindirimine ve enzim sistemlerinde değişikliklere yol açar.(Şekil.7) Sonuçta reperfüzyon üzerine bunlar serbest radikal türlerini oluşturur (12). İskemide meydana gelen olaylara aslında reperfüzyonda hasarı başlatacak ve hızlandıracak bir hazırlık aşaması olarak bakılabilir. İskemi aşamasındaki olaylar, reperfüzyon aşamasındaki hasarın öncüsüdür(100). Deneysel çalışmalar, reperfüzyonun (yeniden kanlanma) akut fazı esnasında önceki olarak bilinen bu ardışık olaylar; intraselüler enzimlerin salınımını potansiyalize eder, Ca^{+2} 'un hücre içine girişi, sarkolemmal fosfolipitlerin bozunumu ve hücre membranlarının dağılması; bütün bunlar tek başına veya kombine olarak sonunda hücre ölümüyle sonuçlanır. Bu değişiklikler, iskemi esnasında değil de, daha çok reperfüzyon esnasında meydana geldiğinden "reperfüzyon hasarı" olarak bilinir. Reperfüzyon hasarının en az üç bileşeni vardır. Bunlar; mikrovasküler hasar, hücre nekrozu ve hemorajidir. Aslında iskemiyeye maruz kalan her organda reperfüzyon hasarı oluşur ki; iskemi esnasında biyokimyasal olayların oluşumuyla kendini gösterir ve sonuçta süperoksit anyonu, hipoklorik asit

(HOCl) ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen metabolitleri yanında Ca^{+2} artar ve sarkolemmal fosfolipitlerin kaybı meydana gelir (165). İskemik rat kalbinde, iskemi-reperfüzyon hasarında histamin reseptörlerinin etkilerini araştırıldığı bir çalışmada erken reperfüzyonun; akut miyokardiyal hasarda kardiyak hasarın azalmasında daha etkili olduğu görülmüştür.(73)

Ksantin oksidaz (XO) sistemi memelilerde iskemi reperfüzyon hasarını takiben SOR üretiminin en önemli kaynaklarından biri olarak kabul edilir. Ksantin dehidrogenaz (XDH) ve XO, ksantin oksidoredüktazın iki ayrı formudur. Hem XDH hem de XO hipoksantin, ksantine, ksantin, ksantin de ürik aside dönüşümünü katalize eder. Bunlardan XDH elektronları tercihen NAD'ye transfer ederken XO akseptör olarak oksijeni tercih eder ve süperoksit oluşturur. Ksantin oksidaz endotel hücrenin önemli bir serbest radikal kaynağıdır (Şekil 7).



Şekil 7. Ksantin oksidaz enzimi ile oksidan maddelerin üretilmesi

Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz enzimini kullanarak ve NADPH + H⁺ varlığında ksantin ve NADP⁺ oluşur. Ancak iskemi sırasında Şekil 7'de görüldüğü gibi ksantin dehidrogenaz enzimi bol miktarda bulunur ve ksantin oksidaz enzimine yukarıda açıklanan mekanizmayla çevrilir. Reperfüzyon sırasında aniden

ve çok miktarda oksijen sisteme dahil olur. Bu da pürinlerin çok süratli bir şekilde okside olmasına neden olur. Oluşan ürat ve süperoksit anyonundan süperoksit; Haber-weiss ve Fenton reaksiyonlarını kullanarak demir veya bakır varlığında serbest hidroksil radikallerinin üretilmesine neden olur

Ancak son yıllarda doku hasarına neden olan kompleksin Fe^{+3} -dioksijen- Fe^{+2} (perferil) radikalinin olabileceği görüşü ileri sürülmektedir (136) Süperoksit anyonu endotelial hücrelerde H_2O_2 , $OH\cdot$ ve $HOO\cdot$ gibi diğer oksijen metabolitlerinin de açığa çıkmasına neden olur. Doku yaralanmalarında endotelial hücre bir tetik görevi görmektedir. Ksantin oksidaza bağımlı serbest radikal oluşumuna esas teşkil eden sistem endotelial hücrenin kendisinde mevcuttur. Ksantin oksidaz ve nötrofil sistemi doku zedelenmesine esas teşkil eden mekanizmayı meydana getirir. Süperoksit anyonu H_2O_2 'e nötrofillerde mevcut olan SOD etkisiyle dönüşür. Bu olay daha çok ince barsak ve miyokard iskemilerinde gözlenir. (66)

3.5.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Oksidan ve Antioksidanların Rolü

Miyokardiyal reperfüzyon esnasında serbest radikaller ve nitrik oksitin rolü konusundaki ilk araştırmalar esas olarak indirekt metodlara dayanmaktadır. Myokardial iskemik hasarın patogenezinde, serbest oksijen radikallerinin rolü oldukça önemlidir. Miyokard infarktüsünden sonra NO, agresif radikallerin nötrale edilmesinde özel bir rol oynamaktadır. İntrakoronar lizis sırasında ortaya çıkan radikaller NO tarafından süpürülebilir. Bu, miyokardın korunmasına ve iyileşmesine yardım eder (98) Serbest radikallerin miyokard reperfüzyon hasarındaki rolünü anlamadan önce miyokard reperfüzyonunda hangi serbest radikal türleri ile bu hasar olmaktadır, bunu anlamak önemlidir. Şimdilerde yaygın olarak serbest radikallerin reperfüzyon esnasında üretildiğine inanılsa da serbest radikallerin gerçek kaynağı tartışmalıdır

Reperfüzyon esnasında meydana gelen bir çok olaylardan birisi de fosfolipazların kalsiyum-bağımlı aktivasyonudur (12). Bu enzimlerin aktivitesi ile araşidonik asit başta olmak üzere membran yağ asitleri açığa çıkar (12). Siklooksijenaz ve lipooksijenazlarla araşidonik asidin metabolize edilmesi sonucu hidroksil radikalinin ve ara ürün olarak da peroksi bileşiklerinin üretildiği gözlenmiştir. Bunların ikisi de reperfüzyon üzerine doku hasarını hızlandırır (84). Araşidonik asit enzimatik oksidasyon ile de metabolize edilebilir (12). Spesifik lipooksijenazlarla yapılan bu metabolik yıkım ile mono- ve di-hidroperoksi yağ

asitleri üretilir . Hidroperoksi yağ asitleri olarak adlandırılan bu yapılar iki ayrı mekanizma ile doku hasarı yapabilir:

(1) Geçiş metal iyon kompleksleri ile reaksiyona girerek hidroperoksi radikalleri veya hidroksil radikallerini oluştururlar. Her ikisi de yeniden oksijenlenme esnasında daha ileri doku hasarını başlatma yeteneğine sahiptir (103).

(2) Diğer bir çok araşidonik asit metabolitleri gibi hidroperoksi yağ asitleri ikinci haberciler olarak görev yapabilirler ve hem inflamatuvar hem de immün cevapları modüle edebilirler. Her iki durum da reperfüzyon aracılı hasarda önemli bir rol oynayabilir (38).

İskemik miyokard dokusunun tekrar reperfüzyonundan sonra inflamatuvar sürecin bir sonucu olarak aktive olmuş nötrofiller reperfüze dokuya invaze olurlar . Nötrofillerin ve diğer fagositik hücrelerin bakterisidal etkisi, bu hücrelerin süperoksit üretimine dayanmaktadır. Lökotrienler, kemotaktik peptitler ve mekanik bozulmaların hepsi nötrofiller ve makrofajları aktive etmeye yardımcı olurlar. Aktive olmuş nötrofiller membran bağımlı bir NADPH oksidaz tarafından süperoksit üretir. Respiratuvar patlama esnasında bu hücreler tarafından %70-90 arasında değişen oranlarda oksijen tüketimi, süperoksit üretiminde kullanılır . Nötrofiller tarafından üretilen hidrojen peroksidin hepsi süperoksitin dismutasyonu ile gerçekleştirilir. Hipoklorik asit, miyeloperoksidaz enziminin katalizi ile hidrojen peroksitten klor iyonları varlığında oluşur. Bu reaksiyon, miyeloperoksidaz içeren lizozomal veziküllerin füzyonundan sonra nötrofillerin fagositik vakuolünde gerçekleşir. Reperfüzyondan sonra meydana gelen serbest radikal üretimine aktive olmuş nötrofillerin katkıda bulunup bulunmaması, nötrofillerin iskemik dokuya ne kadar hızlı birikme gösterdiğine bağlıdır. Nötrofiller yüksek konsantrasyonda serbest radikal üretebilmekle beraber asıl önemli olan nokta bunların iskemi- reperfüzyona maruz kalmış dokuya ulaşma zamanlarıdır. Nötrofiller daima infarkte miyokard dokusu ile birlikte düşünülmüş olmasına rağmen, buradaki rolünün sebep mi sonuç mu olduğu henüz net değildir. Nötrofillerin reperfüzyon-bağımlı serbest radikal üretimine katkıda bulunup bulunmadığını ölçmek oldukça zordur.

Amaç; Bu çalışmada kardiyak iskemi reperfüzyon sonucu oluşan hücre hasarının fizyopatolojik mekanizmasında nitrik oksit ile serbest oksijen radikallerinin ve antioksidatif sistemin rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bir Nitrik Oksit Sentetaz enzim inhibitörü ve antioksidan olan Aminoguanidinin İskemik -Reperfüzyon hasarının önlenmesine olan etkisi araştırılacaktır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Cerrahi Uygulama

Bu tez çalışmasında T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden sağlanan Wistar–Albino cinsi 250 –350 g ağırlığındaki erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar standart şartlarda (sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) özel kafeslerde bekletilmiştir. Sıçanların beslenmesi için yem olarak, 8 mm'lik rat pellet yemi kullanılmıştır. Deney hayvanlarının seçimi ve cerrahi uygulamalar sırasında yerel etik komitesinden izin alınarak , sıçanlara uygulandığı bilinen uluslararası deneysel ve cerrahi teknikler kullanılmıştır. Çalışmada toplam 36 adet erkek sıçan kullanılmış olup bu sıçanlar; Sham grubu , İskemi reperfüzyon grubu, İskemi-Reperfüzyon grubu + Aminoguanidin 1 grubu ve İskemi-Reperfüzyon grubu + Aminoguanidin 2 grubu olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır.

Sham grubu (n:9): Bu grup kontrol grubu olarak kullanıldı ve bu gruba sadece torakotomi uygulanarak cerrahi iplik koroner arterin çevresinden geçirildi fakat oklüze edilmedi

İskemi-Reperfüzyon grubu (n:9): Bu gruba 10 dakika iskemi , 10 dakika reperfüzyon işlemi uygulandı. İskemiden önce ilaç grubuna verilen hacime eşit serum fizyolojik (%0.9) intravenöz (iv) olarak verildi ve belirlenen sürenin sonunda reperfüzyon sağlandı.

İskemi-Reperfüzyon grubu + Aminoguanidin I (n:9): İskemi yapılmadan önce 10mg/kg dozda aminoguanidin (AG) intravenöz olarak uygulandı ve daha sonra aynı süre ile iskemi reperfüzyon yapıldı.

İskemi-Reperfüzyon grubu + Aminoguanidin II (n:9): Bu gruba 10 dakika iskemi uygulandı ve reperfüzyon işlemi yapılmadan 10mg/kg dozda aminoguanidin intravenöz olarak verilerek reperfüzyon yapıldı.

Cerrahi Uygulama: Deney hayvanlarına anestezi; 1.2-2.4 g/kg Üretan'ın intraperitoneal (ip) uygulaması ile yapıldı .Yapay solunum için, trakea, ilaç uygulaması için de Jügüler ven kanülasyonu yapıldı. Karotid artere konan bir kanül, transdüser (Harvard model, 50-8952) ve bir kaydedici (Harvard Universal penrecorder) yardımıyla kan basıncı, kalp hızı ve EKG takibi yapıldı. Göğsün sol tarafına 1-1.5 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldıktan sonra cilt, cilt altı dokuları ve göğüs kasları geçilerek, uygun bir şekilde torakotomi yapmak için yaklaşık olarak



Şekil 8. Kalbin ve koroner arterlerin anatomik olarak görünüşü (156).

sternumun 2mm solunda dördüncü kosta kesilerek sol torakotomi yapıldı. Toraks açıldığı anda, içerideki negatif basıncın ortadan kalkması nedeniyle, solunumun devamı ve normal pCO₂, pO₂ ve pH değerlerini korumak amacıyla, ventilasyon cihazıyla (Harvard Animal Rodent Ventilator) 1.5ml/100g'lık hacim ve 60 atım / dakikalık bir hızla oda havası verilerek pozitif basınçlı solunum uygulanmaya başlandı. Daha sonra göğsün sağ tarafına nazikçe basılarak kalp dışarı alındı. 10mm'lik, yuvarlak uçlu iğneyle 6/0 ipek sutur sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızlıca geçildi (Şekil.8). Daha sonra kalp yeniden göğüs içine yerleştirilerek 20 dakika stabilizasyon için beklendi. Lambeth Conventions'da belirlenen değerlendirme kriterleri göz önüne alınarak bu işlemlere bağlı herhangi bir aritmi görülmesi ya da ortalama kan basıncının oklüzyon öncesi 70mmHg'nin altına düşmesi halinde denek çalışma dışı bırakıldı(162). Konulmuş olan sütürün iplikleri 1mm çap ve 1cm boyda ufak bir plastik tüp içinden geçirildi. 20 dakika stabilizasyon periyodu sonunda damarın altından geçirilmiş olan ip plastik tüp ve bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak damarın kapatılması

sağlanmıştır. On dakikalık iskemi süresi tamamlandığında klemp açılarak tüp içinden geçen ip gevşetildi ve böylece yeniden kanlanma (reperfüzyon) sağlandı. Reperfüzyon süresi 10 dakika olarak uygulandı. Daha sonra deneye son verildi. Hayvanlar Vena Cava İnferiordan (VCI) kan örnekleri alınarak sakrifiye edildi.

İlaç Uygulaması: Hayvanlar rastgele örnekleme metoduyla seçilerek sham (n=9), iskemi-reperfüzyon (n=9), iskemi-AG (n=9) ve reperfüzyon-AG (n=9) grubu olarak oluşturuldu. Aminoguanidin hemisülfat tuzu, (A-7009, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, ABD) 10mg/kg dozda iskemi grubuna intravenöz olarak jüğüler venden oklüzyondan 10 dakika önce verildi. 10 dakika sonra oklüzyon yapıldı. Reperfüzyon grubuna 10mg/kg dozda aminoguanidin, iskeminin sonunda reperfüze edilmeden 1-2 dakika önce jüğüler venden intravenöz olarak verilerek reperfüzyon sağlandı. Kontrol grubuna eşit hacimde serum fizyolojik (%0.9'luk NaCl) verildi.

4.2. Örneklerin Alınması ve Hemodinamik Parametrelerin Ölçülmesi

Deney sonunda Vena Cava İnferiordan alınan kan örnekleri, antikoagülanlı (K₃-EDTA) ve normal tüplere konuldu. Plazma ve serumları ayrılarak sıvı azot gazında (-180 ° C) donduruldu. Kalp dokusu; atrioventriküler bileşkedan ayrılarak, serum fizyolojik ile yıkanarak kanından temizlendi. Sıvı azot gazında (-180 ° C) hemen dondurularak diğer örneklerle birlikte -80 ° C 'de derin dondurucuda saklandı.

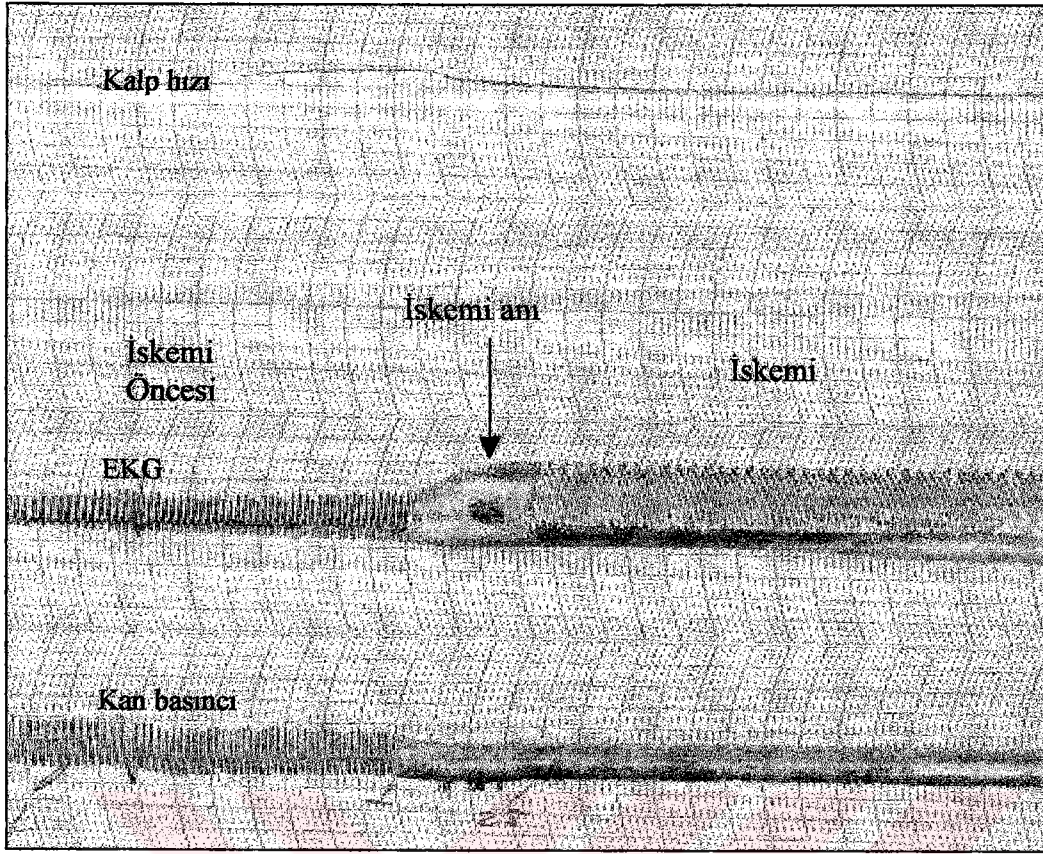
Hazırlık sırasında ve iskemi reperfüzyon dönemlerinde EKG, kan basıncı ve kalp hızı kaydedilmiştir. Ayrıca ortalama arter kan basıncı (OAKB) ve kalp hızları değerlendirildi. Ortalama kan basıncının hesaplanması, sistolik kan basıncı değerlerinin %40'ı, diastolik kan basıncı değerlerinin %60'ı toplanarak yapıldı.

İskemi Oluşturma Kriterleri : Lambert Conventions da belirtildiği gibi EKG'de QRS genişliğinin iskemi öncesinin 1.5-2 katına çıkması ve kan basıncında düşme ve kalp hızında artış gözlenmesi olarak kabul edilmiştir. (Şekil 9)

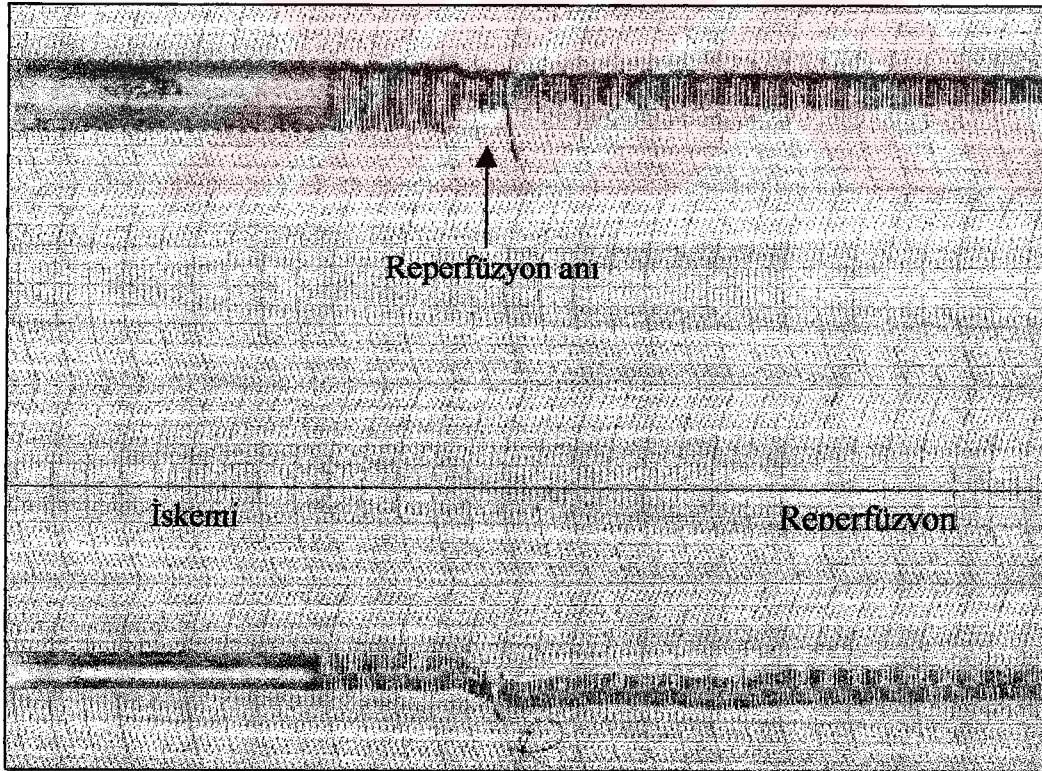
Reperfüzyon Oluşturma Kriteri: Lambert Conventions da belirtildiği gibi EKG'de QRS genişliğinin iskemi öncesindeki genişliğine dönmesi (aritmler hariç) kabul edilmiştir.(Şekil 10)

4.3. Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Yaklaşık 1 g olarak tartılan kalp dokuları + 4 °C ' de temiz cerrahi bir makasla parçalara ayrıldı. Homojenizasyon tüpüne aktarılan doku üzerine 9 ml Tris-HCl tamponu (0.2 mM ve pH: 7,5) eklenerek 1/10 oranında dilüsyon yapıldı. Dilüe edilen doku örnekleri, 16000 devir/dakika hızda 3 dakika homojenize edildi (5).



Şekil 9.İskemi sırasındaki EKG,kalp atım hızı ve kan basıncı değişiklikleri



Şekil 10.Reperfüzyon sırasındaki EKG,kalp atım hızı ve kan basıncı değişiklikleri

Hazırlanan homojenatların bir kısmından nitrik oksit(NO[•]) ve malondialdehit(MDA) düzeyleri tayin edildi.

Homojenatların geri kalan kısmı, + 4 °C'de soğutmalı santrifüjde, 3500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan, Katalaz (CAT), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), ve Total protein düzeyleri ölçüldü. Süpernatantda ; SOD aktivitesini tayin etmek için süpernatant, 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol karışımı ile (Kloroform/ Etanol 3/5 v/v oranında) karıştırıldı daha sonra 3500 rpm hızda 40 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi (159). Üstte oluşan etanol fazından alınarak protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

4.4. Ölçüm Yöntemleri

4.4.1. Doku ve Plazma Nitrik Oksit (NO[•]) Düzeylerinin Ölçümü

Vücutta endojen olarak üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir (107). Çünkü nitrik oksit, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO₂⁻) daha sonra da nitrate (NO₃⁻) dönüşür. Bununla beraber proteinden zengin homojenat, serum ve plazma gibi solüsyonlarda spesifik olmayan reaksiyonlar meydana gelebileceğinden, Griess reaksiyonu ile ölçümlerde belli bazı sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu açıdan biz nonspesifik reaksiyonların önüne geçebilmek için homojenatları önce deproteinize edip daha sonra nitrit ve nitrat konsantrasyonlarını ölçtük. Zor olmakla birlikte *in vivo* olarak direkt NO ölçümü de mümkündür. Bu amaçla NO propları geliştirilmiştir ama bunların *in vitro* / *ex vivo* şartlarda çalışılması mümkün değildir (97). Dokuda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlendi (32). Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile tayin edildi. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyona bırakılarak nitratın redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N-naftiletillen diamin(NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonucu oluşan pembe bir rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlendi.

Nitrit Standartlarının hazırlanması:

Stok solüsyon: 0.1 mol/L NaNO₂ olup oda ısısında 9 ay stabildir. Hazırlanan standart solüsyonundan farklı konsantrasyonlarda dilüsyon yapılarak standart eğri çizildi (Şekil.11).

Ayrıraçlar:

Çalışma reaktifi;Kadmiyum granülleri (Cd), pH 9.7 Glisin-NaOH tamponu, sülfanilamid, N-naftiletlen diamine (NNDA), 5 mmol/L CuSO₄, 0.1 mol/L H₂SO₄, standart solüsyonu (0.1 mol/L NaNO₂, 10 mmol/L Na₂B₄O₇ içinde çözülür.)

Kadmiyumların aktifleştirilmesi:

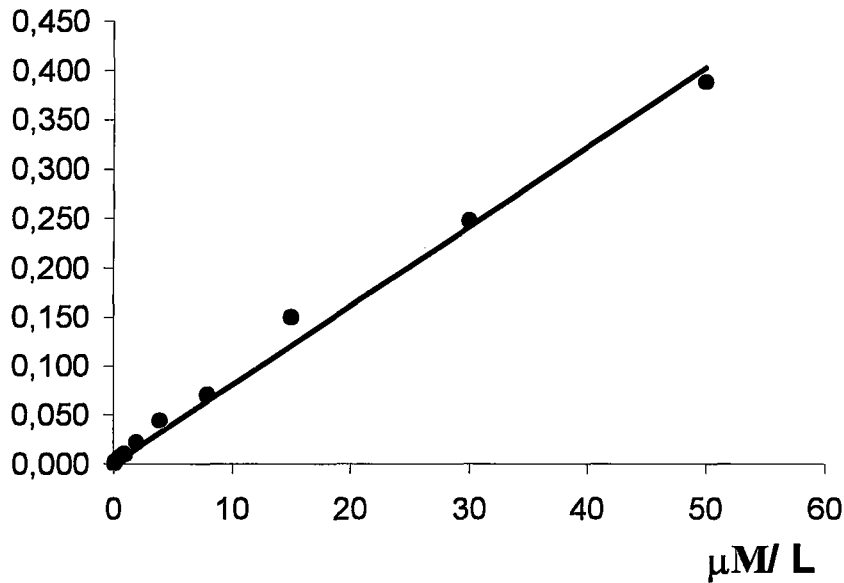
Kadmiyumlar 2.5-3 gr olarak 20 mililitrelik plastik tüplere (ağız kapatılan) dağıtılır. Granüller 3 defa deiyonize ile yıkanır. 1-2 dakika CuSO₄ solüsyonu içinde bekletilir ve solüsyon tekrar süzülerek dökülür. 3 defa glisin tamponu ile yıkanır. Granüller kullanıldıktan sonra distile su ile hemen yıkanır ve H₂SO₄ solüsyonu içinde en az 1 gün saklanır.

Ölçüm Yöntemi:

Deproteinizasyon işlemi: 250 µL numune + 1mL ZnSO₄ (75 mmol/L) vortekslenir. 1.250 mL NaOH (55 mmol/L) ilave edilip tekrar vortekslenir ve 3500xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant numune olarak kullanılır.

En son glisin tamponu ile yıkanmış aktif granül tüplerinin üzerine 1 mL glisin tamponu ilave edilir. 1 ml deproteinize numune konur. Üzerine 2 ml distile su eklenir. 90 dakika oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 2 ml alınıp üzerine 2,5ml distile su ve 1ml sülfanilamid, 1ml NNDA ilave edilerek 1 saat inkübe edilir. 545 nm'de köre karşı okunur.

Absorbans



Şekil 11. NO⁻ standart grafiği.

4.4.2. Doku Lipid Peroksit (LPO) Düzeylerinin Ölçümü

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonildialdehid (MDA) tayini Ohkawa (112) tarafından belirlenen yöntem ile spektrofotometrik olarak yapıldı. Dokuda lipid peroksidasyonunun tayini pH'nın 3,5 olduğu ve aerobik şartlar altında ,tiyobarbitürik asit (TBA) ile doku homojenatının kaynar su banyosunda 1 saat inkübasyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

Ayırıcılar:

1-%8.1'lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

2-%20'lik Asetik Asit

3-%0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA)

4-n-Bütanol/ Piridin (15:1,v/v)

5-Stok standart (1,1,3,3 tetra metoksiopropan)

	Kör (ml)	Std (ml)	Örnek (ml)
Homojenat	----	-----	0.2
SDS	0.2	0.2	0.2
Asetik asit	1.5	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.6	0.6

95⁰C de 1 saat inkübe edildikten sonra soğuk su altında soğutuldu. Tüplere;

Saf su	1.0	1.0	1.0
n-butanol/piridin	5.0	5.0	5.0

eklenerek iyice karıştırıldı. Daha sonra 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik faz alınarak 532 nm'de köre karşı standart ve örnek absorbansları ölçüldü.

Hesaplama :

$$\text{MDA (nmol/ g.yaş doku)} = \frac{\text{Örnek O.D.}}{\text{Standart O.D.}} \times \text{Standart Konsantrasyonu}$$

4.4.3. Plazma Lipid Peroksit (LPO) Düzeylerinin Ölçümü

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehid (MDA) tayini Satoh (141) ve Yagi'den (164) modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak Shimadzu UV-1201 spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

Plazmada bulunan lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA, aerobik şartlarda, pH' nın 3.4 olduğu bir ortamda tiyobarbutirik asit (TBA) ile 95°C de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturur. Bu pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile MDA miktarı saptanır.

Ayıraçlar:

1-N/12 sülfirik asit

2-%10 fosfotungustik asit (PTA)

3-Tiyobarbutirik asit (TBA) ayıracı: Eşit hacim %0.67 TBA ile glasiyel asetik asit karıştırılır.

4- n-Bütanol

5-Standart (1,1,3,3,tetrametoksipropan)

Standart Eğri Çizimi:Stok standarttan 10µl alınıp 100 ml'ye tamamlanarak konsantrasyonu 40 mmol/L olan günlük stok standart hazırlandı. Bu stok standarttan belirli oranlarda sulandırmalar yapılarak 2, 4, 8, 10, 20 nmol/ml konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Ayıraçlar tüplere şu şekilde ilave edildi.

	Kör	Std (1)	Std (2)	Std (3)	Std (4)	Std (5)
Distile su (ml)	4	3	3	3	3	3
TBA ayıracı(ml)	1	1	1	1	1	1
Standart (ml)	---	1 (2nmol/ml)	1 (4nmol/ml)	1 (8nmol/ml)	1 (10nmol/ml)	1 (20nmol/ml)

Tüpler iyice karıştırıldı ve üzerine cam biye konularak 90⁰ C de 60 dakika kaynar su banyosunda kaynatıldıktan sonra soğutuldu ve her tüpe 3 ml n-bütanol eklendi. Vorteks edilen tüpler 3000 rpm'de 10 dakika. santrifüj edildi. Bütün standartların n-bütanol fazı 532 nm'de köre karşı okundu. Belirli oranlarda hazırlanan bu standartlar kullanılarak eğri çizimi yapıldı ve daha sonra çalışılan tüm örnekler için bu eğri kullanılarak MDA düzeyleri belirlendi.

Örnek çalışması için ayıraçlar aşağıda verilen tabloda belirtildiği şekilde tüplere konuldu

	Kör	Standart	Örnek
Plazma (ml)	-----	-----	0.3
N/12 H2SO4(ml)	-----	-----	4
% 10 PTA(ml)	-----	---	0.5

İyice karıştırıldı ve oda ısında 5 dakika bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, altta kalan presipitat alındı ve üzerine 3 ml distile su konularak karıştırıldı. Tekrar 3000 rpm.'de 10 dakika. santrifüj edildi ve yine presipitat alındı.

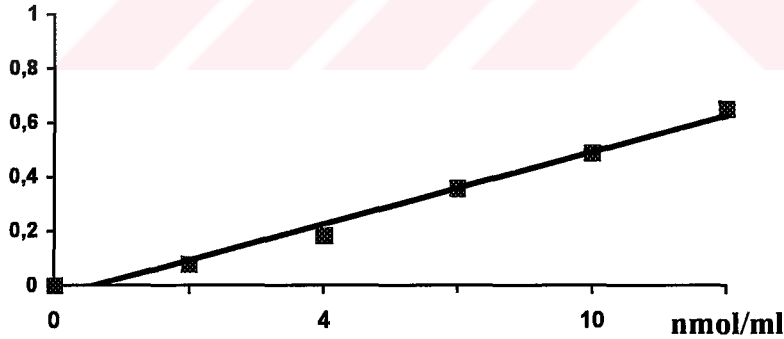
Distile su (ml)	4	3	4
TBA ayıracağı (ml)	1	1	1
Standart (ml)	----	1	----

Tüpler karıştırıldı ve üzerine cam bilye konularak 90°C de 60 dakika kaynatıldı. Soğuk su altında soğutulan tüplerin üzerine 3 ml n-bütanol eklendi ve karıştırıldı. Tüpler 3000 rpm.'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik faz alınarak 532 nm.'de köre karşı absorbansları okundu.

Hesaplama:532 nm.'de okunan örnek absorbansları (OD) standart eğriden değerlendirildiği gibi, günlük çalışılan belirli konsantrasyondaki standartlar ile oranlanarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi.

$$\text{MDA (nmol /ml)} = \frac{\text{Örnek OD} \times \text{Standart Konsantrasyonu}}{\text{Standart O.D}}$$

Absorbans



Şekil.12. MDA standart grafiği

4.4.4.Doku ve Plazma Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi

Süperoksid dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metodu ile Durak ve arkadaşlarının yapmış olduğu modifikasyona göre tayin edildi (159,46). Bu metotta SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksidin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksid radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme

meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{kör}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/ mg protein olarak ifade edildi.

Ayırıcılar:

0.3 mmol/L xanthine, 0.6 mmol/L EDTA (2 Na tuzu), 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃, 1g/L bovine serum albumin (BSA), xanthine oxidase (XO), 2M (NH₄)₂SO₄ , 0.8 mmol/L CuCl₂

	Kör(ml)	Örnek (ml)
Ölçüm reaktifi	2,85	2,85
Örnek (hemolizat—extrak)	-	0,1
Distile su	0,1	-
Ksantin oksidaz	0,05	0,05

Karıştırılır 25 °C’de 20 dakika inkübe edildikten sonra

CuCl ₂	1	1
-------------------	---	---

Süperoksit dismutaz aktivitesinin hesaplanması:

$$\% \text{ İnhibisyon} = ([\text{Absorbans kör (K)} - \text{Absorbans Örnek(Ö)}]) / \text{K} \times 100$$

% 50’lik inhibisyona 1 Ü denildiği için

$$\text{Aktivite (Ü/ml)} = [(\% \text{ inhibisyon}/50) \times (1 / 0.1)] \quad \text{ml.}$$

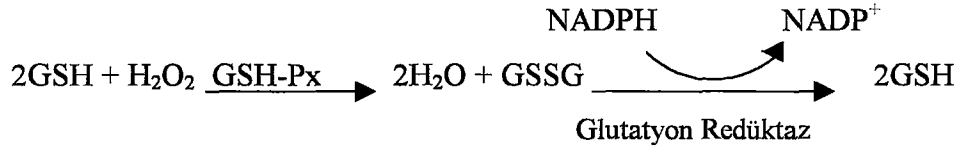
$$\text{Ü/ml} = [(K-\text{Ö}) / K] \times 20 \times 5 \text{ (sulandırma faktörü)}$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg protein)} = [\text{U/mL/mg/ml protein}]$$

4.4.5. Doku ve Plazma (GSH-Px) Aktivitesini Ölçümü

Glutasyon Peroksidaz (EC 1.11.1.9) aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (117). GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px’in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH’a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH’ın NADP⁺’ya

yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.



Enzim Ünitesi: Birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol miktarıdır.

Ayırıcılar:

150 mM redükte GSH, 8 mM NADPH, 1 M NaN₃, GSH-Redüktaz, 50 mM H₂O₂, fosfat tamponu (pH = 7.50 mM), 3.2 M (NH₄)₂SO₄.

	Örnek (ml)
EDTA'lı Fosfat tamponu	2,65
Redükte GSH	0,1
NADPH	0,1
GSH Redüktaz	0,01
Soyum Azid	0,01
Örnek(hemolizat-plazma)	0,1

Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri 5 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının olduğu absorbans aralığının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

GSH-Px aktivitesinin hesaplanması:

$$\text{Hesap : IU/L} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0.02)$$

$$\text{Spesifik aktivite IU/mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

4.4.6. Doku ve Plazma Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi Aebi metoduna göre çalışıldı (142). Hidrojen peroksit (H₂O₂) 240 nm'de maksimum absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H₂O₂ katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorbans azalması şeklinde göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon şu şekildedir



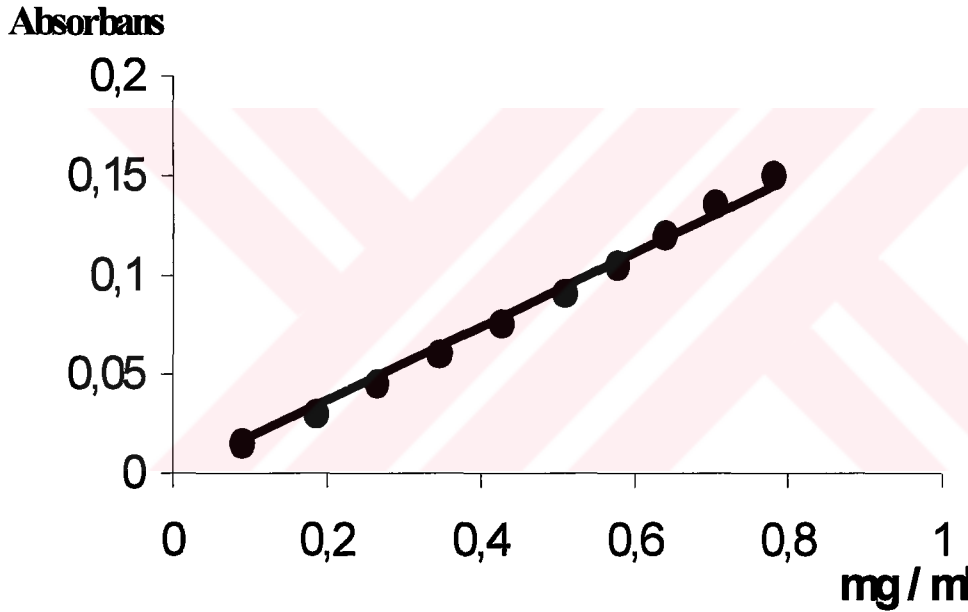
Ayırıcılar:

Fosfat tamponu (pH 7, 50 mM), absorbansı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponu.

Fosfat tamponuna göre 240 nm dalga boyunda sıfırlanan köre karşı H₂O₂ çözeltisi 0.500'e ayarlandı. Numune ilavesi ile absorbans azalması her 15 sn'de bir defa olmak üzere 2 dakika süre ile kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri esas alındı.

	Kör(ml)	Örnek(ml)
Fosfat Tamponu	2,99	-
H ₂ O ₂ çözeltisi	0,01	2,99
Örnek (hemolizat-plazma)	-	0,01

Hesaplama; $k = \{ [2.3 \times \log (OD_1 / OD_2)] / \Delta t (sn) \}$ k/mg protein = k / [(mg/ml protein) x 1000]



Şekil.13. Protein standart grafiği

4.4.7. Protein Düzeylerinin Ölçümü

Biyolojik sıvılarda protein düzeylerinin ölçümü Lowry yöntemi ile yapıldı (93). Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10 da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilave

edilmeli ve karıştırılmalıdır. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

Ayrıçalar:

CuSO₄, Na₃Sitrat, Na₂CO₃, NaOH, Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi

Ölçüm Yöntemi: Standart grafiği çizmek için konsantrasyonunu bildiğimiz Bovin serum albuminden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. “Optik dansite (OD) – mg/mL protein konsantrasyonu” grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu (Grafik 3). Standart ve numuneler köre karşı 700 nm’de okundu.

Hesaplama:

Protein (mg/ml) = grafikten okunan değer x faktör

F (faktör) = standart hacmi (0.5 ml)/numune hacmi (0.010ml) = 50

Not: Faktör, kullanılan numunenin miktarına göre değişir. Kullanılan numunenin miktar değişikliği distile su hacmi ile ters orantılı olarak tüpe pipetlenir.

4.4.8. Dokuların Histopatolojik İncelenmesi

Tüm gruplardan alınan kalp dokuları % 10’luk formol içinde tespit edilerek rutin takip işlemlerinden geçirildi.Parafin bloklara gömülen dokulardan 5µm kalınlığında kesitler alındı.Alınan kesitler deparafinize edilerek Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi ve fotoğrafları alındı.

Histopatolojik incelemede; miyokarddaki koagülasyon nekrozu, intramiyokardiyal kanama, kontraksiyon bantları, iltihabi hücre infiltrasyonu, değişiklikleri 0-3 dereceler arasında yukarıdaki gibi değerlendirildi.

-
- 0 : Miyokardiyal hasar yok
 - 1 : Hafif miyokardiyal hasar
 - 2 : Orta miyokardiyal hasar
 - 3 : Şiddetli miyokardiyal hasar.
-

4.4.9. İstatistiksel Analizler

İstatistikler SPSS® 10.0 ile yapıldı.Grupların dağılımları non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi.Grupların normal dağılım göstermesinden dolayı grupların karşılaştırılmasında parametrik testlerden one-way ANOVA testi ve Post Hoc testlerden LSD,Tukey B ve Scheffe kullanıldı. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için p<0.05 olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

Kardiyak iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda aminoguanidinin etkilerini inceleyen bu çalışmada doku ve plazmada Nitrik Oksit (NO) düzeyleri, Süperoksid Dismutaz (SOD) , Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Katalaz (CAT) ile doku lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan Malondialdehid (MDA) düzeyleri çalışılmıştır. Belirtilen parametrelerin düzeylerinde gruplara bağlı olarak görülen değişimler aşağıda gösterilmiştir.

5.1. Doku ve Plazma NO Düzeylerinin Değişimi

Doku NO düzeylerinin; sham (Grup 1), iskemi-reperfüzyon (Grup 2), iskemi-öncesi+Aminoguanidin (Grup 3) ve reperfüzyon öncesi+ Aminoguanidin (Grup 4) gruplarında değişimi aşağıda verilmiştir (Tablo 5, Şekil 14-15).

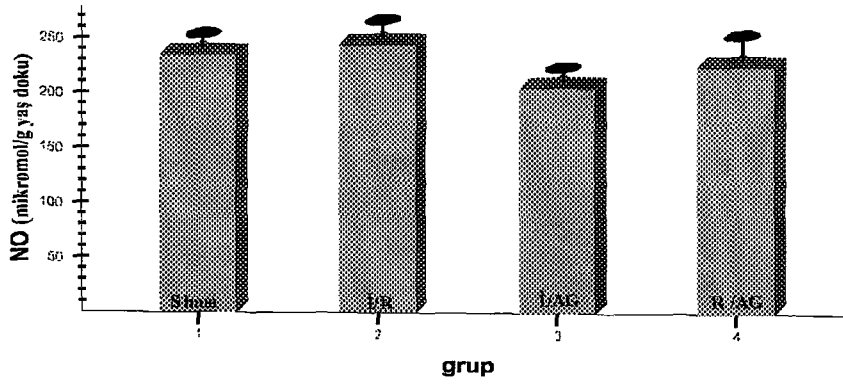
Doku NO düzeyleri; grup 2 ile karşılaştırıldığında, aminoguanidin uygulanan gruplar olan grup 3 ve 4 'de anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.05$). Ayrıca Grup 1'in doku NO düzeyleri ile 3. grubun doku NO düzeyleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Plazma NO düzeyleri iskemi- reperfüzyon grubunda ve aminoguanidinin kullanıldığı gruplarda sham grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p< 0.001$). Ayrıca plazma NO düzeyleri bakımından grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 5.Doku ve Plazma NO Düzeylerinin Değişimi

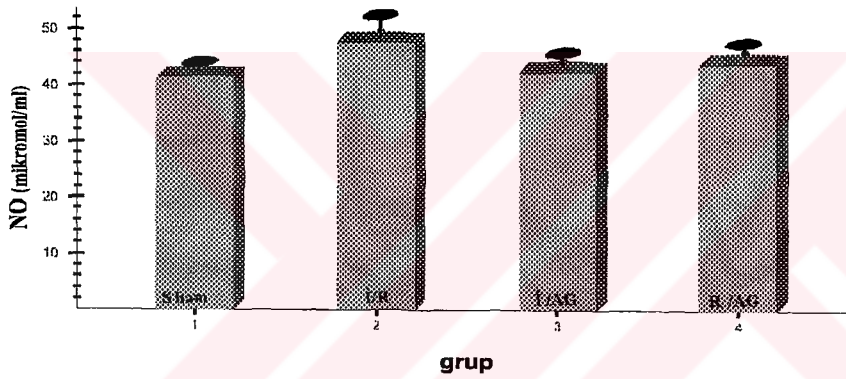
Gruplar	NO (mikromol/ g yaş doku)	Plazma NO (mikromol/ml)
1 sham	234.37 ± 15.85* (n:9)	41.30 ± 2.07 (n:9)
2 IR	243.67 ± 19.58 (n:9)	47.50±4.86** (n:9)
3 I/AG	204.52 ± 15.50* (n:9)	42.41 ±2.94** (n:9)
4 R/AG	224.65 ± 26.09* (n:9)	43.92 ±3.30** (n:9)

*grup 3 ve 4; grup 2 ile karşılaştırıldığında ayrıca grup 1 grup 3 ile karşılaştırıldığında ($p<0.05$)

** Sham grubu ile karşılaştırıldığında ($P<0.001$).



Şekil 14. Doku NO Düzeylerinin Değişimi



Şekil 15. Plazma NO Düzeylerinin Değişimi

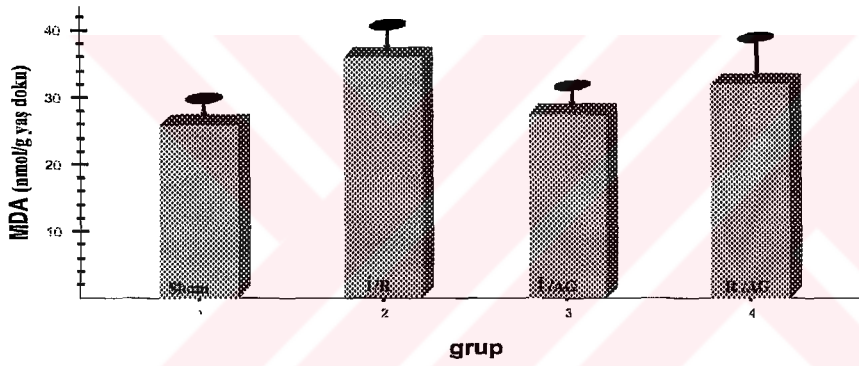
5.2.Doku ve Plazma MDA Düzeylerinin Değişimi

Kardiyak iskemi reperfüzyon yapılan ratlarda lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehidin (MDA) doku ve plazma düzeylerinin değişimi Tablo 6 ve Şekil 16-17'de verilmiştir. Doku MDA düzeyleri incelendiğinde, sham grubuna göre iskemi-reperfüzyon grubunda MDA düzeylerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0.001$). Ayrıca iskemi reperfüzyon grubu ile iskemi öncesi aminoguanidin uygulanan gruplar arasında doku MDA düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.001$). Plazma MDA düzeyleri incelendiğinde sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubundaki değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.001$). Ayrıca grup 2 plazma MDA düzeyleri ile grup 3 'ün MDA düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur($p<0.001$).

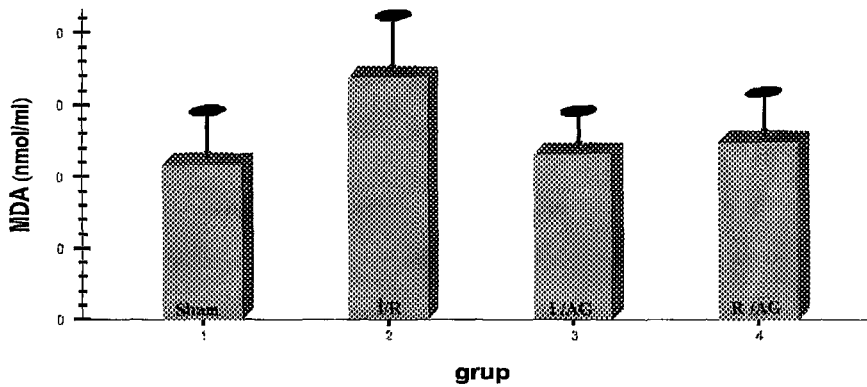
Tablo 6. Doku ve Plazma MDA Düzeylerinin Değişimi

Gruplar	Doku MDA (nmol/g yaşdoku)	Plazma MDA (nmol/ml)
1 sham	25.85 ± 3.49 (n : 9)	0.21 ± 0.07 (n : 9)
2 IR	35.82 ± 4.50* (n : 9)	0.33 ± 0.09* (n : 9)
3 I/AG	27.52 ± 3.71 ** (n : 9)	0.21 ± 0.06** (n : 9)
4 R/AG	32.02 ± 6.60 (n : 9)	0.24 ± 0.07 (n : 9)

* Sham ve ** iskemi reperfüzyon grubuna göre p<0.001



Şekil 16. Doku MDA Düzeylerinin Değişimi



Şekil 17. Plazma MDA Düzeylerinin Değişimi

5.3.Doku ve Plazma SOD Aktivitelerinin Değişimi

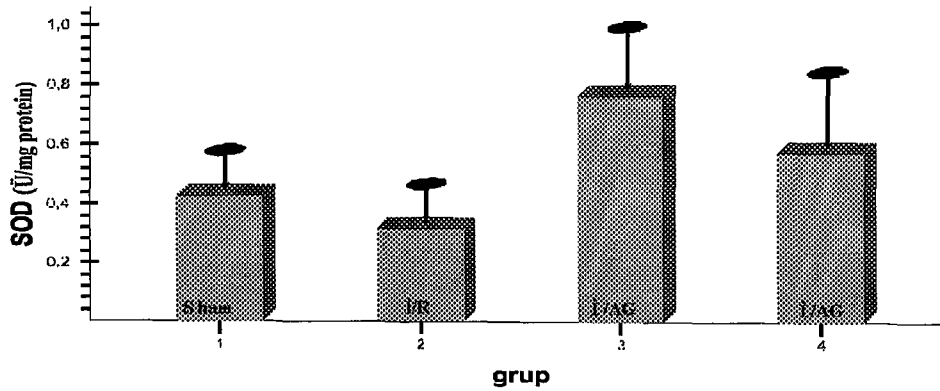
Çalışmada doku SOD enzim aktiviteleri ; iskemi öncesi aminoguanidin uygulanan grupta (grup 3) , sham grubu ve iskemi reperfüzyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0.001). Doku SOD enzim aktivitesi reperfüzyon uygulanan grupta , iskemi reperfüzyon grubuna göre anlamlı bir değişim göstermiştir (p<0.05). (Tablo 7; Şekil 18-19)

Tablo.7. Doku ve Plazma SOD Aktivitesinin Değişimi

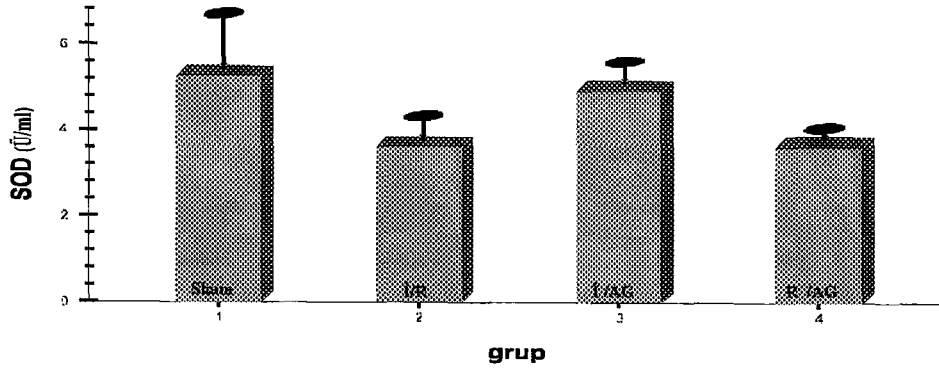
Gruplar	Doku SOD (U/mg protein)	Plazma SOD (U/ml)
1 sham	0.42 ± 0.12 (n: 9)	5.23 ± 1.58 (n: 9)
2 IR	0.31 ± 0.12 (n: 9)	3.59 ± 0.72* (n: 9)
3 I/AG	0.76 ± 0.20 * (n: 9)	4.91 ± 0.65** (n: 9)
4 R/AG	0.57 ± 0.25 ** (n: 9)	3.62 ± 0.36* (n: 9)

* sham ve iskemi reperfüzyon grubuna göre p<0.001; ** grup 2' ye göre (p<0.05).

Plazma SOD enzim aktiviteleri sham grubuna göre IR ve R/AG gruplarında anlamlı olarak azalmıştır (p<0.001).IR grubuna göre , I/AG grubunda plazma SOD aktivitesinde artış saptanmıştır (p<0.05).



Şekil 18. Doku SOD Aktivitelerinin Değişimi



Şekil 19. Plazma SOD Aktivitelerinin Değişimi

5.4. Doku ve Plazma GSH-Px Aktivitelerinin Değişimi

Doku ve plazma GSH-Px aktivitelerinin değişimi ; Tablo 8 ve Şekil 20-21 'de gösterilmiştir. Doku enzim aktiviteleri; I/AG ve R/AG gruplarında sham grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Ayrıca I/AG ve R/AG gruplarının doku GSH-Px aktiviteleri IR grubu ile karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.001$). Plazma enzim aktiviteleri IR grubunda sham grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.001$). Ayrıca IR grubu ile I/AG grubunun enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında aktivite düzeyleri I/AG grubunda anlamlı olarak yükselmiştir ($p < 0.05$).

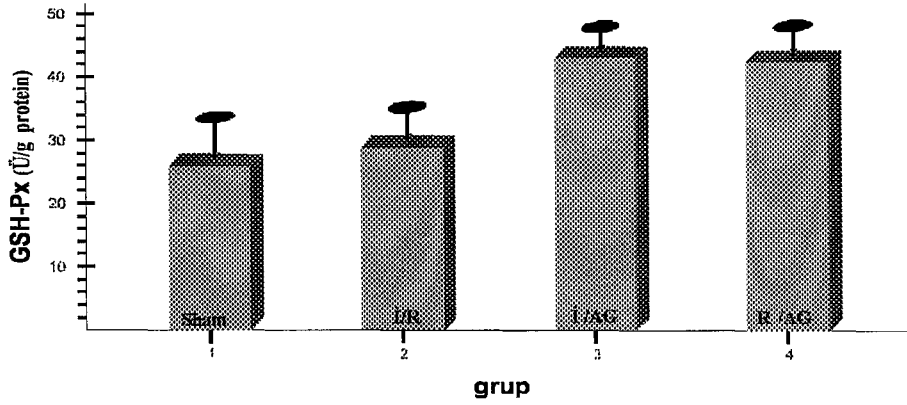
Tablo 8. Doku ve Plazma GSH-Px Aktivitelerinin Değişimi

Gruplar	Doku GSH-Px (U/ g protein)	Plazma GSH-Px (U/dl)
1 sham	25.91 ± 7.22 (n:9)	679.60 ± 40.42 (n:9)
2 IR	28.91 ± 5.71 (n:9)	631.27 ± 24.69** (n:9)
3 I/AG	42.98 ± 4.33* (n:9)	667.20 ± 16.81 *** (n:9)
4 R/AG	42.38 ± 5.19* (n:9)	642.86 ± 41.51 (n:9)

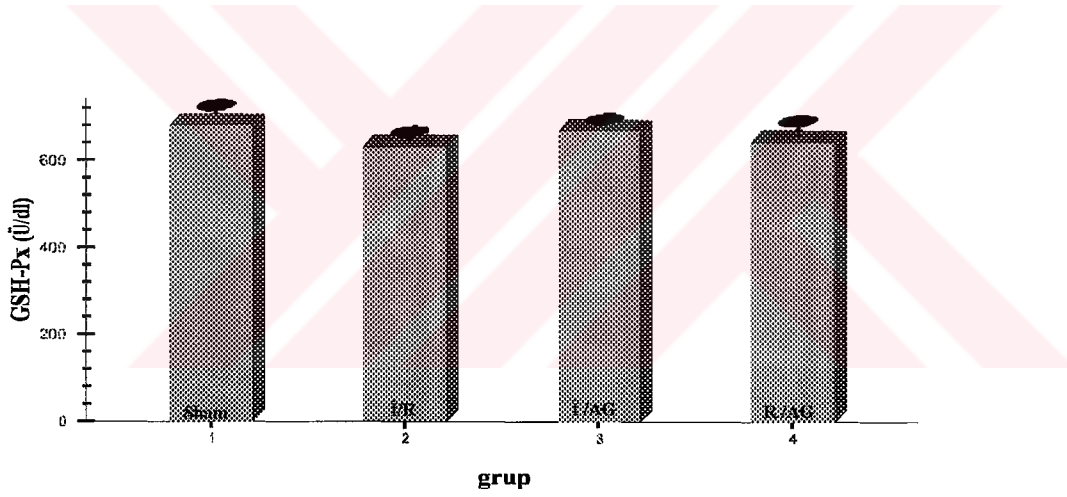
* sham grubuna ve IR grubuna göre $p < 0.001$;

** Plazma GSH-Px aktivitesi , sham grubuna göre $p < 0.001$;

*** Plazma GSH-Px aktivitesi , IR grubuna göre $p < 0.05$



Şekil 20. Doku GSH-Px Aktivitelerinin Değişimi



Şekil 21. Plazma GSH-Px Aktivitelerinin Değişimi

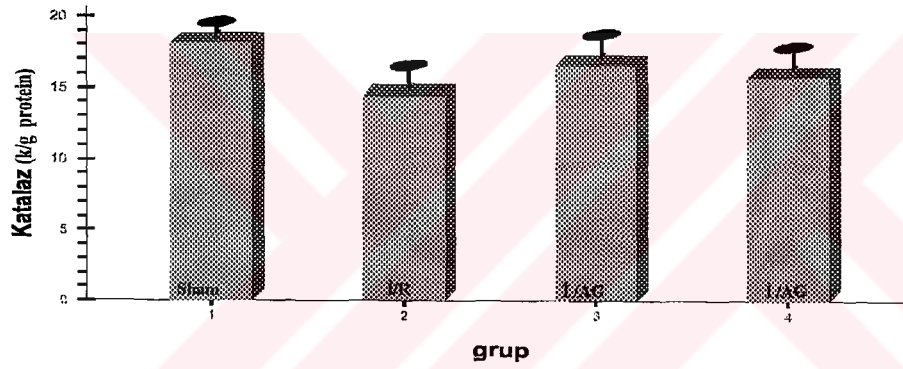
5.5. Doku ve Plazma Katalaz Aktivitelerinin Değişimi

Doku katalaz aktiviteleri , IR grubunda ve R/AG grubunda , sham grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.001$). Ayrıca I/AG grubunda doku katalaz aktiviteleri , IR grubuna göre önemli olarak yükselmiştir ($p < 0.05$). Plazma katalaz düzeyleri sham grubuna göre IR grubunda ve I/AG grubunda anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$). Sonuçlar Tablo 9 ve Şekil 22-23'de görülmektedir.

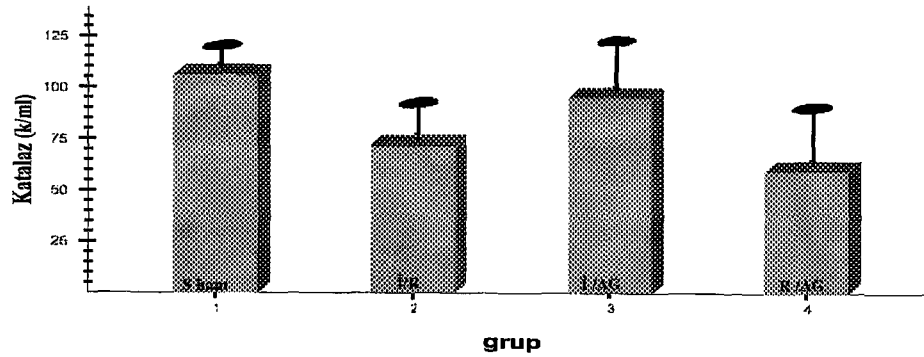
Tablo 9. Doku ve Plazma Katalaz Aktivitelerinin Değişimi

Gruplar	Doku CAT (k/ g protein)	Plazma CAT (k/ml)
1 sham	18.06 ± 1.17 (n:9)	105.83 ± 14.30 (n:9)
2 IR	14.45 ± 1.88 * (n:9)	71.90 ± 21.77 *** (n:9)
3 I/AG	16.52 ± 1.98 *' ** (n:9)	95.13 ± 30.33 *** (n:9)
4 R/AG	15.72 ± 1.90 (n:9)	59.79 ± 33.71 (n:9)

* p<0.001; *** p<0.05: Sham grubuna göre ** IR grubuna göre p<0.05,



Şekil 22.Doku Katalaz Aktivitelerinin Değişimi



Şekil 23.Plazma Katalaz Aktivitelerinin Değişimi

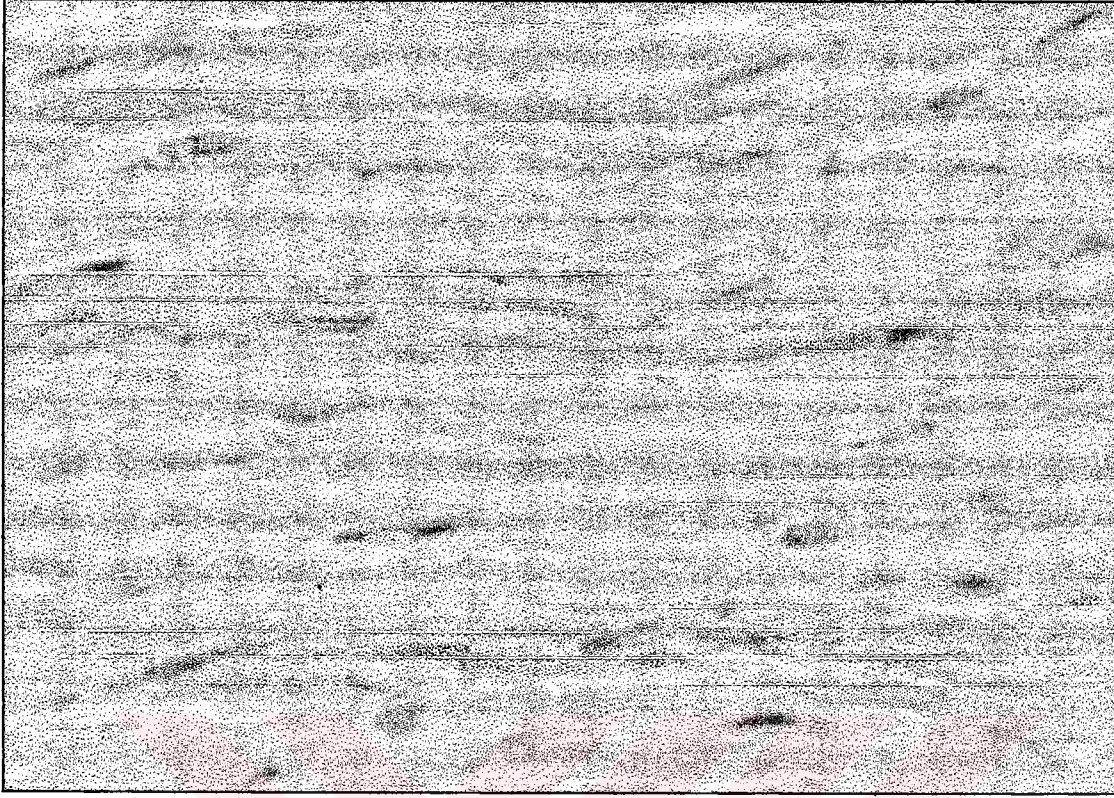
5.6.Histopatolojik Bulgular

Tüm gruplardan hazırlanmış olan histolojik kesitlerden 0'dan 3'e kadar histopatolojik skorlama yapılarak gruplar değerlendirildi.(Tablo 10)

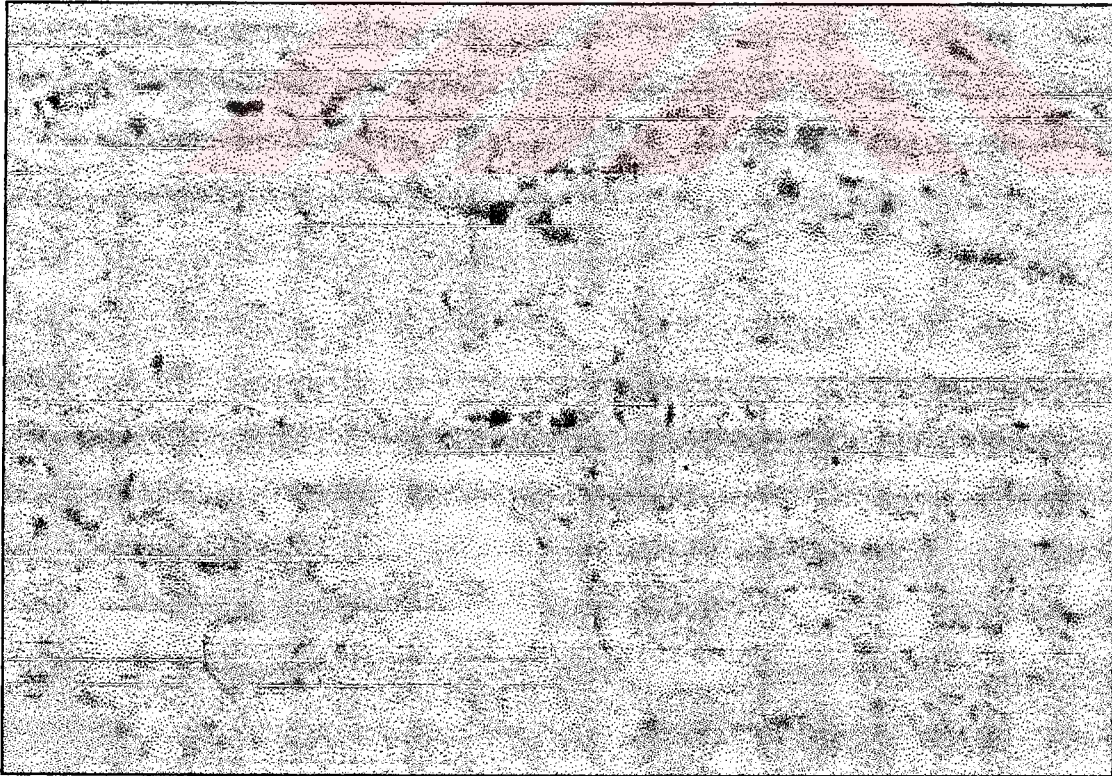
Tablo 10. Miyokard İskemi-Reperfüzyonunda Histopatolojik Skorlama

	Koagülasyon Nekrozu	İntramiyokardiyal Kanama	Kontraksiyon Bantları	İltihabi İnfiltrasyon
Sham	0	1	0	0
İ/R	3	3	3	0
İ/AG	0	2	1	0
R/AG	1	2	2	0

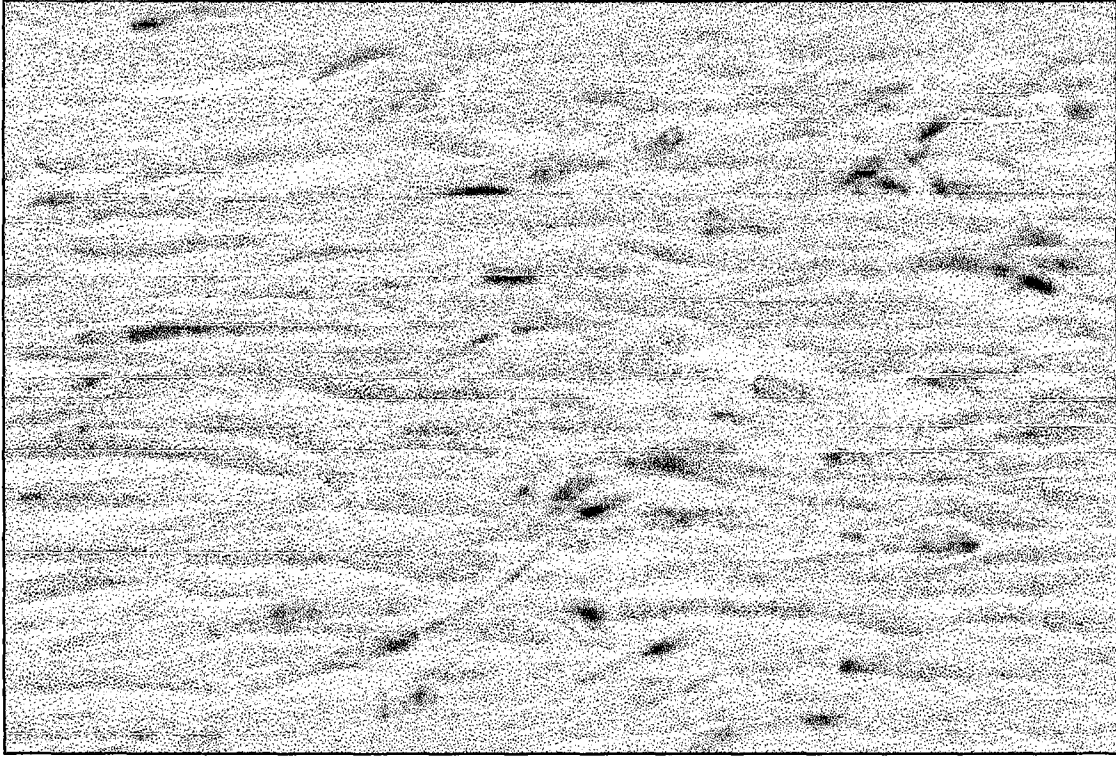
Sham grubu (Şekil 24) ile iskemi- reperfüzyon (İ/R) grubu (Şekil 25) karşılaştırıldığında; Işık mikroskopik kesitlerde; İ/R grubunda kalp kasında yaygın koagülasyon nekrozu, kontraksiyon bantları dilate damar ,damar içi konjesyon ve yaygın intramiyokardiyal kanama izlendi. İskemi öncesi aminoguanidin (İ/AG) verilen grupta (Şekil 26) Sham (Şekil 24) karşılaştırıldığında; İ/AG grubunda, yer yer kanama ve kontraksiyon bantları görülmekle beraber kontraksiyon bantları, nekroz ve ödem görülmemektedir.Reperfüzyon öncesi AG (R/AG) verilen grupta (Şekil 27) Sham (Şekil 24) karşılaştırıldığında; R/AG grubunda, orta derecede kontraksiyon bantları, intramiyokardiyal kanama ,ödem ve nekroz alanları izlenmiştir.



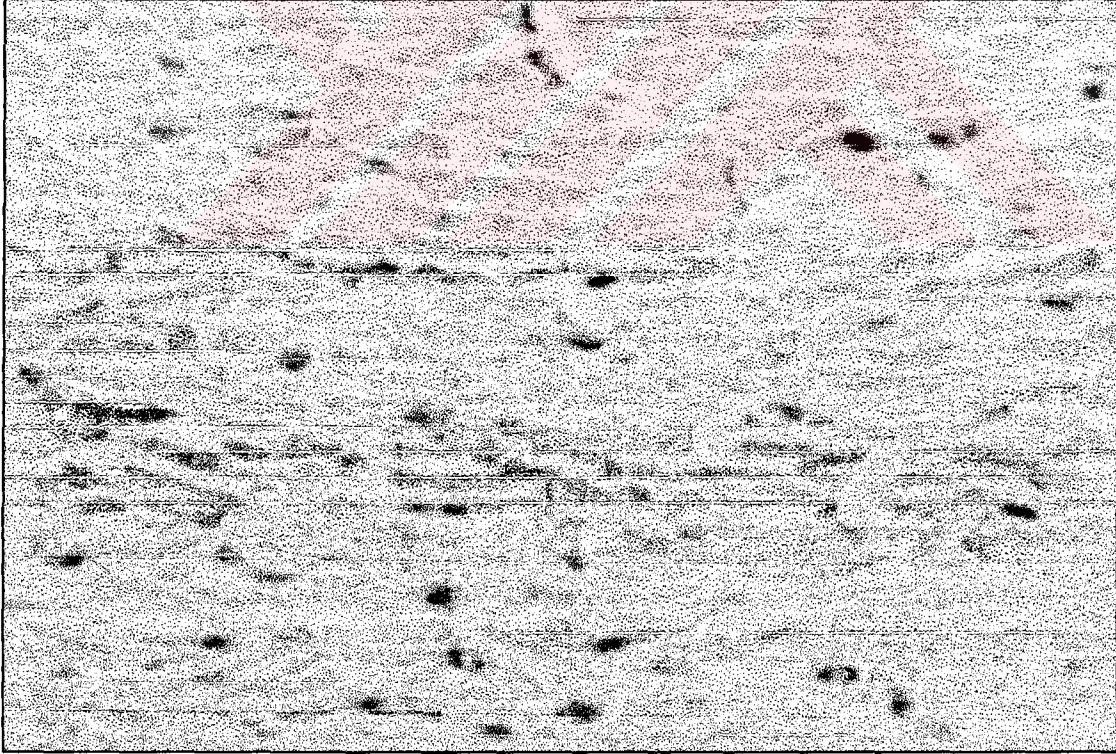
Şekil 24.Normal miyokardın (Sham) ışık mikroskopik görünümü H-E,x 400



Şekil 25.Hasara uğramış miyokardın (I/R) ışık mikroskopik görünümü H-E,x 200



Şekil 26. İskemi öncesi AG uygulanan miyokardın (İ/ AG) ışık mikroskopik görünümü H-E x 400



Şekil 27. Reperfüzyon öncesi AG uygulanan miyokardın (R/ AG) ışık mikroskopik görünümü H-E x 400

6. TARTIŞMA

Nitrik oksit ve serbest radikaller iskemi-reperfüzyon sırasında hücrel yapılar da morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere yol açar. Nitrik oksit ve serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol aldıkları reaksiyonlar ve radikal bileşiklere karşı geliştirilen koruyucu sistemlerin ortaya çıkması, çeşitli fizyolojik (vasküler tonus, pıhtılaşma iletişim, fagositoz vb.) ve fizyopatolojik (akut miyokard infarktüsü, diyabet, sepsis, ateroskleroz, hipertansiyon) olayların mekanizmasını aydınlığa kavuşturacaktır.

Akut Miyokard İnfarktüsü (AMİ) günümüzde ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Akut miyokard infarktüsünden korunma, infarktüsün erken teşhisi, tedavisi ve tedavi sonrası, infarktüs sonucu oluşan hasarın giderilmesi ve kalbin fonksiyonlarının normale döndürülmesi için çok önemlidir. Bu yüzden günümüzde kalpte hasara neden olan etkenler ve bunlardan koruyucu bileşikler üzerindeki çalışmalar artmıştır(57,127). Kalpte hasara neden olan etkenlerin en önemlisi kalbin iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalmasıdır. İskemi ile oluşan oksidan bileşikler ve reperfüzyonla bu zararlı oksidan bileşiklerin düzeyinin artması miyokardiyal hasarın temel mekanizmasını oluşturur. Bütün bu zararlı ajanlara karşı vücudumuzda antioksidan adı verilen koruyucu sistemler gelişmiştir. Kalbin antioksidan sistemi miyokardiyal hasarın önlenmesinde önemli bir koruyucu mekanizmayı oluşturmaktadır (25).

Miyokardiyal iskemi, birbirine bağımlı veya bağımsız fizyopatolojik olayların sonucu ortaya çıkabilir. İskemi, ateroskleroz veya tromboembolilerin bir sonucu olarak ortaya çıkabildiği gibi, perkütanöz transluminal koroner anjioplasti (PTCA), koroner arter bypass veya transplantasyon gibi cerrahi işlemler sırasında da miyokardiyal iskemi oluşabilir. İskemide miyokard dokusuna yeterli oksijen ve metabolizmayı devam ettirmeye yetecek miktarda substrat ulaşamaz. İskemi süresince ve özellikle reperfüzyonda oksidatif hasar, fazla radikal üretiminden, SOD, CAT ve Glutatyon peroksidaz gibi koruyucu enzimlerin ve oksidanları temizleyen moleküllerin eksikliğinden dolayı ortaya çıkar. Radikaller; proteinlere (sülfidril oksidasyonu) saldırır, lipid peroksidasyonuna yol açarlar(26). İskemik miyokard dokusunun tekrar reperfüzyonundan sonra inflamatuvar sürecin bir sonucu olarak aktive olmuş nötrofiller reperfüze dokuya invaze olurlar(108). Nötrofillerin ve diğer fagositik hücrelerin

bakterisidal etkisi, bu hücrelerin süperoksit üretimine dayanmaktadır. Lökotrienler, kemotaktik peptitler ve mekanik bozulmaların hepsi nötrofiller ve makrofajları aktive etmeye yardımcı olurlar. Aktive olmuş nötrofiller membran bağımlı bir NADPH oksidaz tarafından süperoksit radikalini üretir. Respiratuar patlama olarak bilinen bu olay esnasında aktifleşmiş hücreler tarafından %70-90 arasında değişen oranlarda oksijen tüketimi, süperoksit radikal üretiminde kullanılır (8).

İskemi-reperfüzyon hasarında reperfüzyona bağlı oluşan serbest oksijen radikalleri, kompleman, trombositler, endotelial faktörler, monositler, sitokinler ve nötrofillerin (sistemik hasarda önemli rol oynarlar), mitokondrial disfonksiyon ve intrasellüler kalsiyum seviyesinin artmasında da etkili oldukları bildirilmektedir. (15,128). İskemi-reperfüzyonu takiben dolaşımda IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler açığa çıkar. Reperfüzyon hasarının oluşmasında rol oynayan oksijen bağımlı serbest radikalleri, hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit olup bunlardan en toksik olanı hidroksil radikaldır. İskemi - reperfüzyon hasarı sırasında açığa çıkan serbest radikallerin ortadan kaldırılması ve dokuları hasardan korumak bu açıdan oldukça önemlidir. Oluşan serbest radikaller; vücuttaki bir takım antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz v.b.) tarafından ortadan kaldırılır (57). Süperoksit , hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin post iskemik kalpte gelişen reperfüzyon hasarından sorumlu oldukları ileri sürülmektedir. (69)

Suda ve lipid de çözünebilir ve endojen bir serbest radikal olan nitrik oksit (fizyolojik ve birçok patolojik olaylarda fonksiyonu bulunmaktadır) dokuya kan akımının sağlanması ve doku hasarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. İskemi sonucunda damar endotelinden dokuya infiltre olan nötrofiller ve makrofajlar Nitrik oksit sentetaz aktivitesinde artışa neden olur (83). İskemi esnasında doku NO^{*} düzeyi artarken reperfüzyon ile değişik mekanizmalar ile süperoksit radikal üretimi artar. Bu iki bileşimin reaksiyonu ile peroksinitrit (ONOO⁻) oluşur. Miyokardiyal iskemide onu izleyen reperfüzyon olayında endotel fonksiyonu bozulur; serbest oksijen radikalleri ve NO^{*} salınır, vasküler tonus artışı, nötrofil kümelenmesi ve endotelial vazoaaktif maddelerin birikimi olur (125). İskemi sonrası kalpte ve diğer dokularda NO^{*} düzeylerinin arttığı bir çok çalışma ile gösterilmiştir(14). NO^{*}kardiyovasküler sistemde çok önemli bir düzenleyici role sahiptir. NO^{*} ; fizyolojik şartlar altında normal

fonksiyonlar için belirli düzeyde üretilir ve çeşitli doku hasarlarında yüksek düzeylerde NO^{*} üretimi gerçekleşir. Bu aşırı NO^{*} üretiminin hasardan koruyucu etkisinin olduğunu ileri süren çalışmalar olduğu gibi (125,126); artan NO^{*}'in hasarı artırıcı yönde etkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (14,124). NO^{*}, iki ucu keskin kılıç gibi görülen bir molekül olup faydalı ve zararlı etkilerinin hangi düzeylerde başlayıp bittiği halen tartışmalıdır (124).

Gavin ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada NO^{*} 'in iskemi ve reperfüzyon sırasında vasküler tonüsü ve koroner kan akımını düzenleyerek kardiyoprotektif etki yaptığını göstermişlerdir (54). Ayrıca Flaharety ve Kloner adlı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da NO^{*}'in serbest radikalleri temizleyerek koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (51). NO^{*}'in koruyucu etkisini savunanlar NO^{*} dönörlerinin hasarı önlemede faydalı olduğunu belirtmişlerdir. Bununla beraber Patel (122) ile Schulz ve arkadaşları (144) tarafından yapılan çalışmalarda kalpte deneysel iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında üretilen nitrik oksitin direkt toksik etkili olduğu açıklanmıştır. Ayrıca nitrik oksitin süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek güçlü oksidan bir bileşik olan peroksinitriti oluşturarak dokular için zararlı bir etki gösterdiği bilinmektedir. (14,48)

Çalışmamızda doku nitrik oksit düzeyleri; sham grubunda 234.37 ± 15.85 g/yaş doku, iskemi-reperfüzyon (İ/R) yapılan grup da 243.67 ± 19.58 g/yaş doku, iskemi öncesi aminoguanidin verilen (İ/AG) grup da 204.52 ± 15.50 g/yaş doku ve reperfüzyon öncesi aminoguanidin verilen (R/AG) grup da 224.65 ± 26.09 g/yaş doku olarak bulunmuştur. Buna göre İ/R grubunda doku NO^{*} düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber artmıştır. İskemi öncesi aminoguanidin (AG) verilen gruptaki doku NO^{*} düzeyleri İ/R grubunun düzeyleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0.05$). Reperfüzyon öncesi AG verilen grubun doku NO^{*} düzeyleri İ/R grubu ile karşılaştırıldığında İ/AG grubundaki kadar olmamakla beraber istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir azalma göstermiştir. Ayrıca sham ile iskemi öncesi AG verilen grubun doku NO^{*} düzeyleri karşılaştırıldığında İ/AG grubunda anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p < 0.05$). Bu bulgular ışığında ; iskemiden ve reperfüzyondan önce Nitrik Oksit Sentaz (NOS) inhibitörü olarak verilen aminoguanidinin, doku NO^{*} düzeylerini

azalttığı ve NO^{*}'in zararlı etkilerinden kalbi koruduğu saptanmıştır. İ/R grubunda doku NO^{*} düzeyleri sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermemiştir. Bunun nedenleri arasında; endojen koruyucu etkenler ve sham grubundaki cerrahi müdahale sırasında yapılan uygulamaların az da olsa NO^{*} düzeylerini arttırması sayılabilir. Bundan dolayıdır ki; sham ile iskemi öncesi AG verilen grup karşılaştırıldığında İ/AG grubunda anlamlı bir azalma görülmüştür. R/AG grubunda sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma izlenmemiştir.

Plazma NO^{*} düzeyleri; sham grubunda 41.30 ± 2.07 mikromol/ml, İ/R yapılan grup da 47.50 ± 4.86 , mikromol/ml, İ/AG grubun da 42.41 ± 2.94 mikromol/ml, R/AG grubun da 43.92 ± 3.30 mikromol/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre; İ/R grubunda plazma NO^{*} düzeyleri sham grubuna göre anlamlı bir yükselme göstermiştir ($p < 0.001$). İskemi öncesi AG uygulanan grubun plazma NO^{*} düzeyleri, İ/R grubu düzeylerine göre anlamlı bir azalma göstermiştir ($p < 0.001$). Reperfüzyon öncesi AG verilen grubun plazma NO^{*} düzeyleri İ/R grubuna göre İ/AG deki kadar olmasa bile anlamlı bir azalma göstermiştir ($p < 0.05$). Sonuçlarımız incelendiğinde; İlaç verilmeyen İ/R grubunda , sham grubuna göre plazma NO^{*} düzeylerinde anlamlı bir artış saptanmıştır. Aminoguanidin uygulanan gruplarda plazma NO^{*} düzeylerinde görülen azalmanın aminoguanidinin nitrik oksit sentaz enzimini inhibe ettiğini göstermekte olup bu bileşiğin özellikle iskemi öncesi uygulandığında daha etkili olduğu bulunmuştur.

Serbest radikaller; membran poliansatüre yağ asitlerine saldırarak lipid peroksidasyonu reaksiyonlarının başlamasına neden olur. Bu yolla oluşan lipid peroksitleri yıkılarak Malondialdehit (MDA) 'in de içinde bulunduğu farklı sekonder ürünleri oluştururlar. Lipid peroksidasyonu, yeni radikal oluşumuna, protein veya DNA gibi başka makromoleküllerle reaksiyona girerek hasarın daha çok büyümesine neden olabilir. MDA iskemi esnasında az miktarda üretilirken reperfüzyon esnasında belirgin olarak artmaktadır (130). Lipid peroksitleri organ ve dokularda belli bir düzeye ulaştınca kan dolaşımına geçer ve serum ve plazma MDA düzeyini artırırlar. Plazma ve doku lipid peroksit düzeylerinin artışı, diğer doku ve organlar üzerine de toksik etki yaparak, yeni hasarlara neden olur. Lipid peroksidasyonu sonucu gelişecek hasardan korumak için

vücutta bulunan endojen antioksidanlar devreye girerler. Ancak gelişen peroksitler vücuttaki antioksidanlardan daha fazla bir düzeye ulaştığında ve dışarıdan verilecek antioksidanlar yeterli olmadığı takdirde bu hasar daha da artmaktadır. (92).

Yapılan çalışmalarda; deneysel iskemi-reperfüzyon sonucu, iskemik kalp hastalığı pre ve post operatif doku iskemileri v.b. gibi durumlarda plazma ve doku örneklerinde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinin yüksek bulunması; peroksidasyona uğrayan membranların fazla oluşunu ve hasara uğrayan hücrelerin yaygınlığını göstermektedir (23,31). Feng ve arkadaşları izole rat kalbinde İ-R hasarı sonucunda oluşturulmuş aritmilerde ekzojen olarak verilen taurin ile oksidatif hasarın göstergesi olan MDA düzeylerinde ve gelişen aritmilerde anlamlı bir azalma olduğunu göstermişlerdir. (28)

Bu çalışmada doku MDA düzeyleri ; sham grubunda 25.85 ± 3.49 g/ yaş doku İ/R yapılan grup da 35.82 ± 4.50 g/yaş doku, İ/AG grubunda 27.52 ± 3.71 g/yaş doku, R/AG grubunda ise 32.02 ± 6.60 g/yaş doku olarak bulundu. Doku MDA düzeyleri, İ/R grubunda sham grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.001$).İskemi öncesi AG verilen grubun MDA düzeyleri İ/R grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$). Reperfüzyon öncesi AG verilen grubun doku MDA düzeyleri, İ/R grubunun düzeylerine göre azalmış olarak bulundu.

Plazma MDA düzeyleri; sham grubunda 0.21 ± 0.07 nmol/ml, İ/R yapılan grup da 0.33 ± 0.09 nmol/ml, İ/AG grubunda 0.21 ± 0.06 nmol/ml, R/AG grubun da ise 0.24 ± 0.07 nmol/ml bulundu.Plazma MDA düzeyleri gruplar arasında ; İ/R grubunda sham grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.001$). İskemi öncesi AG verilen grubun MDA düzeyleri İ/R grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$).R/AG grubunun plazma MDA düzeyleri , İ/R grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.05$).

İskemi öncesi verilen aminoguanidinin kalpteki iskemi-reperfüzyon hasarının başlıca göstergesi olan MDA düzeylerini anlamlı bir şekilde azalttığı saptanmıştır. Reperfüzyon öncesi verilen aminoguanidinin de MDA düzeylerin azalttığı bulunmuş olup reperfüzyon esnasında da MDA üretilmesi nedeni ile aminoguanidin uygulanan gruplar arasında MDA düzeyleri bakımından farklılıklar görülmüştür. Bir antioksidan ve NOS enzim inhibitörü olan aminoguanidin bir çok organın deneysel iskemi-reperfüzyon

modelinde hasarın göstergesi olan MDA miktarlarını azalttığı saptanmıştır. Othman ve arkadaşları karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında aminoguanidinin MDA düzeylerini azalttığını açıklamıştır (114).

Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) enzimleri serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı en önemli defans mekanizmalarını oluşturur. SOD enzimi, süperoksit iyonlarının dismutasyonunu sağlayarak potansiyel zararlı etkilere karşı savunmada çok önemli bir rol oynar. Kan örneklerinde ve homojenize edilmiş doku örneklerinde SOD ve GSH-Px düzeylerine bakılarak canlıların iskemi-reperfüzyon hasarından ne derecede etkilendiği belirlenebilir (86). Antioksidan bir enzim olan SOD'un aktivitesinin ölçülmesinin yanısıra deneysel olarak dışarıdan verilmesi ile oluşan koruyucu etkisi de bilinmektedir (9).

Bu çalışmada doku SOD aktiviteleri; sham grubunda 0.42 ± 0.12 U/mg protein İ/R yapılan grupta 0.31 ± 0.12 U/mg protein, İ/AG grubunda 0.76 ± 0.20 U/mg protein, R/AG grubunda ise 0.57 ± 0.25 U/mg protein olarak bulundu. İ/R grubunda bulunan SOD aktiviteleri, sham grubuna göre düşük olmasına rağmen anlamlı bulunmamıştır. İ/R grubu ile sham grubu karşılaştırıldığında, I/R grubunda anlamlı olarak doku SOD aktiviteleri yüksek bulundu ($p < 0.001$). R/AG grubunda SOD aktiviteleri, İ/AG'dan daha az yüksek bulunmasına rağmen (I/R grubuna göre) anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Plazma SOD aktiveleri ise; sham grubunda 5.23 ± 1.58 U/ml, İ/R yapılan grupta 3.59 ± 0.72 U/ml, İ/AG grubunda 4.91 ± 0.65 U/ml, R/AG grubunda ise 3.62 ± 0.36 U/ml olarak bulundu. İ/R grubunda, plazma SOD aktiviteleri sham grubuna göre azalmış olarak bulundu ($p < 0.05$). İ/AG ve R/AG gruplarının plazma SOD aktiviteleri İ/R grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$, $p < 0.05$).

SOD aktiviteleri, artan serbest radikallere bağlı olarak IR grubunda anlamlı olarak azalmıştır. Antioksidan olan aminoguanidin verilen gruplarda iskemi öncesi verilen grupta daha fazla olmak üzere SOD aktiviteleri anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu da aminoguanidinin hasara bağlı olarak oluşan serbest radikalleri temizlediğini göstermektedir. Kalp de dahil olmak üzere vücudun diğer dokularında I/R modellerinde endojen antioksidanlar yeterince çalışmamıştır. Antioksidan enzimlerin çalışıldığı araştırmalar daha çok kalp ve intestinal sistem ile ilgilidir. Loeper ve arkadaşları

miyokard infarktüsülü ve anjina pektorisli kişilerde eritrosit içi SOD ve GSH-Px aktivitelerini araştırmışlar, infarktüstten sonra geçen zamana bağlı olarak enzim aktivitelerinin düzensiz bir şekilde değiştiğini fakat genel olarak enzim aktivitelerinin azaldığını bulmuşlardır (90). İntestinal iskemide erken ve geç dönemlerde serum antioksidan kapasitesinin araştırıldığı bir diğer çalışmada erken dönemde serum antioksidan kapasitenin arttığı bulunmuştur (153). Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon oluşturulmuş ratlarda doğal bir antioksidan olan EGB 761 (Extract Ginkgo Biloba 761) kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada ise; kardiyak iskemi-reperfüzyon hasarında Ginkgo Bilobanın çeşitli biyolojik serbest radikal hasarı modellerine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. (69)

Glutatyon peroksidaz, mitokondri, sitoplazma , lizozomlarda ve katalazın daimi bulunduğu memeli peroksizomlarında tespit edilmiştir (44). Peroksizomlarda GSH-Px'in lokalize olmasının nedeni hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin detoksifikasyonu için katalaza alternatif bir enzim sistemi olarak rol almasıdır (50). Singh ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada GSH-Px enzimi rat karaciğer peroksizomlarında tanımlanmıştır(149). Mc Cay ve arkadaşları GSH-Px'in membran lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini, membran lipidlerini serbest radikallerin etkisinden koruma rolü oynadığını ve fosfolipitlerin oksidatif indirgenmesini önlediğini belirtmişlerdir (101). Plazmada üretilen ve eritrosit hücre membranını geçebilen hidrojen peroksit ve süperoksit iyonları eritrositlerde toplanır. Eritrositlerde hidrojen peroksidin detoksifikasyonunu sağlayan doğal antioksidan savunma sistemi mevcuttur. Kardiyak operasyonlar esnasında insan kalbindeki süperoksit radikal ve ksantin oksido redüktaz aktivitesini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada; lipid peroksidasyonunun, süperoksit radikallerini arttırdığı ve bunun sadece lokal olmayıp, yaygın sistem ve organlarını da etkilediği gösterilmiştir (148).

Çalışmamızda doku GSH-Px aktiviteleri; sham grubunda 25.91 ± 7.22 U/g protein, İ/R yapılan grupta 28.91 ± 5.71 U/g protein, İ/AG grubunda 42.98 ± 4.33 U/g protein, R/AG grubunda ise 42.38 ± 5.19 U/g protein olarak bulunmuştur. Doku GSH-Px aktiviteleri İ/AG ve R/AG gruplarında sham grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Ayrıca İ/AG ve R/AG gruplarının doku GSH-Px aktiviteleri, İR grubu ile karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0.001$).

Plazma GSH-Px aktiviteleri; sham grubunda 679.60 ± 40.42 U/dl, İ/R yapılan grupta 631.27 ± 24.69 U/dl, İ/AG grubunda 667.20 ± 16.81 U/dl, R/AG grubunda ise 642.86 ± 41.51 U/dl, olarak bulunmuştur. Plazma enzim aktiviteleri I/R grubunda sham grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.001$). Ayrıca I/R grubu ile I/AG grubunun enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında aktivite düzeyleri I/AG grubunda anlamlı olarak yükselmiştir ($p < 0.05$). Sonuçlara göre; iskemi-reperfüzyon hasarı ile GSH-Px enzim aktivitelerinde oluşan serbest radikallere bağlı olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Koruyucu olarak verilen aminoguanidine bağlı olarak enzim aktiviteleri iskemiden önce verilen grupta anlamlı olarak yükselmiştir. Aynı zamanda reperfüzyondan önce verilen grupta da enzim aktivitelerinde anlamlı bir yükselme saptanmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Katalaz karbonik anhidraz enzimi ile beraber bilinen en hızlı enzimdir. Glikoprotein yapısında olup, peroksizomlarda lokalizedir, hücre dışında yoktur veya çok az miktardadır. Oksidazların aktivitesi ile oluşan toksik H_2O_2 'i direkt olarak suya çevirir. İn vivo olarak süperoksit dismutaz ile birlikte kombine bir şekilde etkisini gösterir.

Çalışmamızda, doku katalaz düzeyleri; sham grubunda 18.06 ± 1.17 k/g protein, İ/R yapılan grup da 14.45 ± 1.88 k/g protein, İ/AG grubunda 16.52 ± 1.98 k/g protein, R/AG grubunda ise 15.72 ± 1.90 k/g protein, olarak bulunmuştur. Plazma katalaz düzeyleri; sham grubunda 105.83 ± 14.30 k/ml, İ/R yapılan grupta 71.90 ± 21.77 k/ml, İ/AG grubunda 95.13 ± 30.33 k/ml, R/AG grubunda da 59.79 ± 33.71 k/ml, olarak bulunmuştur. Doku katalaz aktiviteleri, I/R grubunda ve R/AG grubunda, sham grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.001$). I/AG grubunda doku katalaz aktiviteleri, I/R grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. ($p < 0.05$). Ayrıca doku katalaz aktiviteleri, R/AG grubunda İ/R grubuna göre sayısal olarak yükselmiş ama istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Plazma katalaz aktivite düzeyleri sham grubuna göre IR grubunda ve R/AG grubunda anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$). Plazma katalaz aktiviteleri, İ/AG grubunda, İ/R grubuna göre sayısal olarak artmış bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Bulgularımıza göre İ/R hasarı ile katalaz aktiviteleri anlamlı bir şekilde azalmıştır. Antioksidan olarak iskemi öncesi AG verilen grupta aminoguanidinin katalaz aktivitelerini arttırdığı bulunmuştur.

Reperfüzyon öncesi AG uygulamasının plazma katalaz aktivitelerini etkilemediği bulunmuştur.

Aminoguanidin hakkındaki bilgiler yüzyıl öncesine dayanmakla beraber son on yılda aminoguanidinin önemli ve ilginç etkileri olduğu bulunmuştur(16). Bunlar arasında reaktif glikozilasyon ürünlerinin inhibisyonu ile diyabetin oluşumu ve komplikasyonlarının önlenmesi, nitrik oksit sentaz inhibisyonu ile NO^{*} nun rol aldığı fizyopatolojik süreçlere olan etkiler, diamin oksidaz enziminin inhibisyonu ve S adenosil metiyonin dekarboksilaz enziminin stabilizasyonu ile aktif diaminler (histamin,putressin) üzerine olan etkiler sayılabilir (16). Ayrıca LDL'nin oksidasyonunu önleyerek ateroskleroz ve vasküler hastalıkların mekanizmasına etki yaptığı saptanmıştır (129). Bir çok çalışmada aminoguanidinin hem prooksidan hem de antioksidan özellikleri olduğu gösterilmiştir (115,131,142.).

Aminoguanidin antioksidan etkisini; hasar ile oluşan süperoksit ve hidroksil radikallerini temizleyerek göstermesiyle beraber fluoresans bir protein olan alfofosiyanın'ın oksidasyonunu peroksil ve hidroksil radikallerinin oluşumunu önleyerek de gösterir(27). Giardino ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada aminoguanidinin antioksidan etkisini ve SOR oluşumunu azalttığını ayrıca lipid peroksidasyon ürünlerine (MDA) karşı hücre ve dokuları koruduğunu göstermişlerdir (55). Bizim çalışmamızda da iskemi öncesi verilen gruplarda daha anlamlı olmak üzere uygulanan aminoguanidinin lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerini anlamlı bir şekilde azaltarak kalbi iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruduğu bulunmuştur.

Ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında fazla miktarda serbest oksijen radikalleri üretilmektedir. Bu çalışmada, serbest oksijen radikallerine karşı enzimatik korunmayı sağlayan SOD, GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerinin iskemi reperfüzyon hasarı sonucu azaldığı bulunmuştur. İskemi öncesi aminoguanidin uygulanan gruplarda bu üç enzimin aktivitesi yüksek bulunmuş olup bu durum aminoguanidinin antioksidan özelliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Aminoguanidinin en önemli etkisi NOS üzerine olan etkisidir.NOS enzimi L-arjininden sitrüllin oluşumunu kataliz eder. Bu sırada fizyolojik ve fizyopatolojik fonksiyonlar için çok önemli rolü olan NO^{*} üretilir. NO^{*} miyokardiyal hasar sırasında fazla miktarda üretilir (6). İR hasarı sırasında oluşan NO^{*}, ya endotel kaynaklı yapısal

NO^{*} veya ortama gelen makrofaj ve çeşitli uyarıcıların tetiklediği reaksiyonla üretilen induklenebilir NO^{*}'den kaynaklanır. Yapılan çalışmalar aminoguanidinin hem cNOS hem de iNOS enzimlerini çeşitli düzeylerde inhibe ettiğini göstermiştir(89,91). Aminoguanidinin NOS'ı nasıl inhibe ettiği bilinmemekle beraber kimyasal yapı benzerliği ve substrat analogu olarak kullanılması en çok rağbet gören mekanizmaları oluşturur (33, 16). Myokardiyal iskemiyi takip eden süreçte, NO^{*}' nun kritik rolü faydalı ve zararlı etkisi, tartışmalıdır.NO^{*} iskemiyi takip eden zaman dilimi içerisinde artmaktadır(140). Bir çok çalışmada iskemi ile artan NO^{*}' nun ilişkisi gösterilmiştir (58).Aminoguanidin; NOS'ı inhibe ederek iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu artan NO^{*}' nun zararlı etkilerinden hücre ve dokuları korumaktadır. Çeşitli deneysel çalışmalarda NO^{*}' nun bu etkisi gösterilmiştir. Çalışmamızda; kardiyak iskemi-reperfüzyon yapılan ratlarda, İR sonucu NO^{*} düzeyleri hem doku hem de plazmada yüksek olarak bulunmuştur. NOS inhibitörü olan AG verilen gruplarda; iskemi öncesi verilen grupta daha çok anlamlı olmak üzere reperfüzyon öncesi grupta da NO^{*} düzeyleri doku ve plazmada anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bu da aminoguanidinin NOS enzimini inhibe ederek NO^{*} seviyelerini azalttığını ve bu mekanizma ile IR hasarından kalbi koruduğunu göstermektedir.

Miyokard dokularının histopatolojik incelemesinde sham grubu ile iskemi-reperfüzyon grubu karşılaştırıldığında; ışık mikroskopik kesitlerde; İ/R grubunda kalp kasında yaygın koagülasyon nekrozu, kontraksiyon bantları dilate damar ,damar içi konjesyon ve yaygın intramiyokardiyal kanama izlendi. İskemi öncesi aminoguanidin verilen grupla sham karşılaştırıldığında; İ/AG grubunda, yer yer kanama ve kontraksiyon bantları görülmekle beraber kontraksiyon bantları, nekroz ve ödem görülmemektedir.Reperfüzyon öncesi AG verilen grupla sham karşılaştırıldığında; R/AG grubunda, orta derecede kontraksiyon bantları, intramiyokardiyal kanama ,ödem ve nekroz alanları izlenmiştir. Histopatolojik incelemede de görüldüğü gibi; İ/R grubunda azalmış antioksidan enzim aktiviteleri, artan oksidasyon ürünleri ,serbest radikaller ve NO^{*}' e bağlı miyokard da ciddi hasar oluşmuş, iskemi öncesi verilen AG ye bağlı olarak İ/AG grubunda serbest radikallerin ve NO^{*}' in düzeyleri azalmış antioksidan enzimlerin aktiviteleri artmış ve buna bağlı olarak miyokard da ki hasar

önlenmiştir.Reperfüyon öncesi verilen AG iskemi öncesi verilen kadar olmasa da etkili olarak miyokard da ki İR hasarını gidermiştir.

Sonuç olarak; Aminoguanidinin kardiyak hasardan korunma ve hasarı önlemede önemli rolleri olduğu , kardiyovasküler yapılar için doğrudan veya dolaylı olarak toksik etkileri olan nitrik oksit ve lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu engellediği, vücuttaki antioksidan enzimleri serbest radikal giderici özelliği ile artırmasından dolayı kardiyak dokuda oluşan iskemi-reperfüzyon hasarına karşı etkili olduğu bulunmuştur. Aminoguanidinin antioksidan özelliği ile ilgili daha başka çalışmaların yapılmasının serbest radikaller ve nitrik oksit ile oluşan hasarın önlenmesi ve mekanizmasının aydınlatılması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.



7.KAYNAKLAR

1. Abdülkerim S, Kenneth L, Allen M, Samarel J, Bell P, Lucchesi A. (1998). Hydrogen peroxide activates mitogen-activated protein kinases and Na-exchange in neonatal rat cardiac myocytes *Circ Res.* 82: 1053-1062.
2. Aebi H. (1974). Catalase In Bergmeyer U. *Methods of enzymatic analysis.* New York and London: Academic Press; 673-677.
3. Agar N S, Sadrzadeh S M, Hallaway P E, Eaton J W. (1986). Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense. *J Clin Invest;*77:319-21.
4. Akkuş İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler Mimoza yayınları, Konya; 1-132.
5. Akkuş İ. (1997). Klinik biyokimya laboratuvarı el kitabı. Akkuş.Öz Eğitim Bas Yay Dağ., Konya 1-354.
6. Akivama K, Suzuki H, Grant P. (1997). Oxidation products of nitric oxide, NO₂ and NO₃, in plasma after experimental myocardial infarction. *J. Mol Ce/I Cordiol* 29:1-9.
7. Archer S. (1993). Measurement of nitric oxide in biological mol. *FASEB J* 7: 349-360, 1993
8. Babior B M. (1984). The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest;* 73: 599-601.
9. Bannister J V, Bannister W H. (1984). Isolation and characterization of superoxide dismutase.methods in enzymology.105.(9). 88-93.
10. Baughman V L, Brody M A. (1995). Neurologic outcome in rats subjected to incomplete ischaemia after nitric oxide synthase inhibition. *Anesth Analg;* 80: 1-581.
11. Beckman J. (1994). Reactions and diffusion of nitric oxide. *The Biochemist* : 8-10
12. Bersohn M M, Philipson K D. (1982). Sodium calcium exchange and sarcolemmal enzymes in ischaemic rabbit hearts .*Am J Physiol;* 242: C288-C295.
13. Biesalski H K, Frank J. (1995). Antioxidants in nutrition and their importance in the anti-/oxidative balance in the immune system. *Immun Infekt.;*23:166-73. Review.
14. Beckman J S, Kopponen W H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am.J Physiol Cell Physiol,* 40:C1424-1437.
15. Bigaud M, Gfeller P, Deveze S, Vogt G, Evenou J P, Bruns C, Zennes H G. (1998). Transplantation-Induced ischemia/reperfusion injury. In *The Rat Heart. Transplantation Proceedings.* 30. 2311-2313.
16. Nilsson B O. (1999). Biological effects of aminoguanidin: An update .*Inflamm.Res.* Review 48,509-515.
17. Bourdillon P D, Poole-Wilson P A. (1982). The effects of verapamil, wuiscence and cardioplegia on calcium exchange and mechanical function in ischemic rabbit myocardium. *Circ res;* 50: 360-368.
18. Bolanos J P, Almeida A, Stewart V, Peuchen S. (1997). Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: Mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry;* 68(6): 2227-2240.

19. Borg D C, Merrill T, Fred S. (1993). Oxygen free radicals and tissue injury. In *Free Radicals in Tissue Damage*. Birkbuser: Boston. 13-51.
20. Bridges A B, Mc Neill G P, Pringle T H, Niblock A, Belch J J. (1993). Free radical markers in patients with angina pectoris and coronary angiograms. *Cardiology*. 82 : 7 -11.
21. Bredt D S, Snyder S H. (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 9030-9033.
22. Brüne B, Sandau K. (1995). The role of nitric oxide in cell injury . *Toxicology Letters*; 82/83 : 233- 23 7 .
23. Bulkley G B. (1993). Free Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites: Clinical Relevance and the Therapeutic Efficacy of Antioxidant Therapy. *Surgery*. 113, 479-483.
24. Bulkley G B. (1983). The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery*. 94,(3), 407-411.
25. Cameron G, Mazer C D. (1996). Myocardial protection. *Current Opinion in Anesthesiology* 9: 110-116
26. Carmeliet E. (199). Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiological Reviews*; 79: 917-1017
27. Carol C M, Dalloz F, Veronique M, Luc R. (1999). Antioksidant properties of aminoguanidine. *Fundam. Clin. Pharmacol* 13,535-540
28. Chahine R, Feng J. (1998). Protective effects in attenuation of ischemia and reperfusion injury in rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 30 (9): 1803-1815.
29. Cheeseman K H. (1993). An Introduction to Free Radical Biochemistry. P.481-493. Ed. K.H. Cheeseman and T.F. Slater. In: 'Free radicals in Medicine'. British Medical Bulletin. London.
30. Choen R A, Shepherd J T, Vanhoutte P M. (1983). Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets, *Science* 221:273-4,
31. Chwiecko M, Holownia A, Bielawska A, Farbiszewski R. (993). Inhibition of non-enzymatic lipid peroxidation by 'Essentiale' a drug enriched in phosphatidylcholine in ethanol-induced liver injury. *Drug and Alcohol Dependence*. 33,87-93
32. Cortas N K, Wakid N. 1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*; 36:1440-3.
33. Corbett J . Tilton R G, Chang K. (1992). Aminoguanidine. a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 41: 5526
34. Çakmakçı M. (1996). Nitrik oksit; Toksik molekülden iletişim ve savunmanın vazgeçilmez medyatörüne. *Hacettepe Tıp D.*; 27(3-4):79-84
35. Çakmakçı M. (1999). Zehirli molekülden haberci maddelerin kraliçeliğine; Nitrik Oksit. *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi*; 374: 58-62.
36. Darley-USmar V. (1994). Free radicals in the vasculature: the good, the bad and the ugly. *The Biochemist* : 15-18,.

37. Davies M J, Thomas A J. (1985). Plaque fissuring the-cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death and crescendo anjina. *Br Heart J* 53: 363-73,.
38. Dawson V L, Dawson T M, Bartley D A, Uhl G R, Snyder S H. (1993). Mechanisms of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neuroscience*; 13:2650-2661
39. Deisseroth A, Dounce A L. (1969). The purification and crystallization of beef erythrocyte catalase. *Arch Biochem Biophys.*;131:18-29.
40. Dinerman J L, Dawson T M, Schell M J, Snowman A, Snyder S H. (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic It" plasticity .*Proc Natl Acad Sci USA*; 91 : 4214-4218.
41. Domachowske J B. (1997). The role of NO in the regulation of cellular iron metabolism . *Biochemical and molecular medicine*; 60: 1- 7 .
42. Dormandy T L. (1978). Free-radical oxidation and antioxidants.*The Lancet.* 25,647-650.
43. Dormandy T L. (1983). An approach to free radicals. *The Lancet.*29,1010-1014.
44. Draper H, Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.*186,(43),421-427.
45. Dupuy P M, Shore S A, Drazem J M, Frostell C, Hill W A, Zapol W M. (1992). Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea-pig. *J. Clin invest* 90: 421.
46. Durak I, Yurtarslani Z, Canbolat O, Akyol O. (1993). A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta*; 214:103-104.
47. Endoh M, Maiese K, Wagner J. (1994). Expression of the inducible fofo1 of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res*; 651: 92-100.
48. Erbaş D. (1997). Nitrik Oksit. *Türk Fizyolojik Bilimler Demeği XXIII. Ulusal Fizyoloji Kongresi.* Adana,; 14-15.
49. Esterbauer H, Cheeseman K. (1991). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde on related aldehydes. *Free Radic Biol Med*; 11:81-128.
50. Faraji B, Kang H K, Valentine J L. (1987). Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. *Clin.Chem.* 33,(4),539-543.
51. Flaherty J T, Weisfeldt.M L. (1988). Reperfüzyon injury free radic. *Biol.Medic.*3 ,409-419
52. Flaherty J T, Zweier J L. (1991).Role of oxygen radicals in myocardial reperfusion injury: Experimental and clinical evidence. *Wien. Klin. Wochenschr.* 69 : 1061-1065.
53. Fridovich I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science.* 201,875-880.
54. Gavin J B, Herdson P B. (1983). The no-reflow phenomenon in ischemic myocardium. *İnt.Rev.Exp. Pathol.*25,361-381.
55. Giardino I, Fard A K, Hatchell D L, Brownlce M. (1998). Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation. and oxidant-induced apopitosis. *Diabetes* 47 ;1114-1119.

56. Gibaldi M. (1993). What is nitric oxide and why are so many people studying it? *J Clin Pharmacol*; 33: 488.
57. Grace PA. (1994). Ischemia -reperfusion injury. *British Journal of Surgery* 81, 637-647.
58. Giraldez R R, Panda A, Xia Y. (1997). Decreased nitric synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. *J Biol Chem.*;272 ;21420-6.
59. Griffiths M, Messent M, Mac A R J, Evans T W. (1993). Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*;110: 963-968
60. Griffiths M J D, Messent M, Curzen N P , Evans T W. (1995). Aminoguanidine selectively decreases cyclic GMP levels produced by inducible Nitric Oxide Synthase. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 152: 1599- 1604.
61. Grisham M B. (1992). Potential role of nitric oxides in pathophysiology. *In biology and medicine* : 76-84
62. Grisham M B. (1992). Reactive metabolites of oxygen and nitrogen. *In biology and medicine.* 70-75.
63. Gross S S, Volln M S. (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol*; 57: 737- 769.
64. Gutteridge J M C. (1982). Fate of oxygen free radicals in extracellular fluids. *Biochemical Society Transactions*, 10: 72- 73
65. Halliwell B, Gutteridge J M C. (1989). *Free radicals in biology and medicine* .Second edition.Oxford university press, Oxford.
66. Halliwell B. (1989). Superoxide , iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radic Res Common.* 5, 315-18.
67. Halliwell B, Auroma O I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. It mechanism and measurement in mammalian systems. *Febs.* 281(1.2) : 9-19
68. Halliwell B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease; curiosity, cause or consequence?. *Lancet*; 344:721-724.
69. Haramaki N. (1994). Effects of natural antioxidant ginkgo biloba extract (EGB 761) On Myocardial Ischemia- Reperfusion Injury.Vol.16 No. 6.pp- 789- 794
70. Hattari Y, Kawasaki H, Abe K, Kanno M. (1991). Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 261: H 1086.
71. Hinder R .A, Stein H J. (1991).Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg.* 126,104-105.
72. Jaachke H, Schini V B, Farhood A. (1992). Role of nitric oxide in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury of the liver. *Life Sci* 50: 1979
73. Dzierzkowska A, Witanowska E, Wojtccka-Lukasi T, Dron J A. (1994). Are histamine H-1 receptors involved in ischemia /reperfusion injury in rat heart ? *Journal Of Physiology And Pharmacology*, 45,4, 493-499
74. Kaley G. (1986). Endothelium-derived relaxing factor in the microcirculation, *Blood Vessels* 23: 81.

92. Longoni B, Salgo M. (1998). Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals . *Life Sci.* 55:PL 271-276.
93. Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, Randall R J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193:265-275.
94. Ludmer P L, Selwyn A P, Shook T L. (1986). Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic human coronary arteies. *N Engl J Med* 513: 1046-51.
95. Lüscher T F, Richard V, Yang Z. (1990). Interaction between endothelium-derived nitric oxide and SIN-1 in human and porcine blood vessels. *J. Cardiovasc Pharmacol* 14 (Suppl. II): 76-80.
96. Magal E, Zwiller J, Revel M O, Yavin E, Louis J C. (1990). Cyclic GMP alterations in fetal rat cerebrum after global intrauterine ischemia: role of guanylate cyclase. *J Mol Neurosci*; 2: 91-99.
97. Malinski T, Taha Z. (1992). Nitric oxide release from a single cell measured insitu by a porphyrinic-based microsensor. *Nature.*;358:676-8.
98. Malinski T, Bailey F, Zhang Z G, Chopp M. (1993). Nitric oxide measured by porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb Blood Flow Metab* .13(3): 355-358.
99. Marangoz C. (1996). Nitrik oksit ve epilepsi. *OMÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* 13(3): 165-183.
100. Mc Cord J M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med.* 312: 159-163.
101. McCay P B, Gibson D D, Fong K L, Hornbrook K R. (1976). Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes *biochimica. Biophysica Acta.* 431,459-468.
102. Mehta J L. (1995). Endotelyum, coronary vasoiflilation and organic nitrates. *Am Heart J*; 129: 382-391.
103. Meldrum B. (1989). Excitotoxicity in ischemia: An overview. In: Ginsberg MD, Dietri WD (eds.) *Cerebrovascular Diseases-Sixteenth Research (Princeton) Conference.* New York: Raven Press; 47-60.
104. Mohanlal R, Mauve I, Zoet A. (1988). Reperfusion induced enzyme release: washout effect or manifestation of reperfusion damage? *Cardiovasc. Res.* 22: 603-610.
105. Moncada S. (1992). Nitric oxide gas: mediator, modulator and pathophysilogic entity. *J. Lab Clin Med* 120(2): 187-191, 1992.
106. Murphy E, Aitcon J F, Horres C R, Lieberman M. (1983). Calcium elevation in cultured heart cells; its role in cell injury. *Am J Physiol*; 245: C316-C321.
107. Mueller A R, Platz K P, Langrehr J M, Hoffman R A, Nussler A K, Nalesnik M, Billiar T R, Schraut W H. (1994). The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. *Transplantation.*;58:1309-16.
108. Mullane K M, Read N, Salmon J A, Mancada S. (1984). Role of leukocytes in acute myocardial damage in anaesthetised dogs: relation ship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther*; 228:510-522.

75. Karwatowska-P E, Czarnowska E. (1992). Iron availability and free radical induced injury in the isolated ischaemic/reperfused rat heart. *Cardiovascular Research*. 26:58-66.
76. Keele B B, McCord J M, Fridovich I. (1970). Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem.*;245:6176-81.
77. Kehrer J P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 23(1):21-48.
78. Kharitonov V G. (1994). Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *J. Biol Chem* 269 (8): 5881-5883.
79. Kılınç K. (1985). Oksijen radikalleri üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi*. 10,(2),59-89.
80. Kiechle F L, Malinski T. (1993). Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology and detection. *Clin Chem* 100 (5): 567-575.
81. Knowles R G, Palacios M, Palmer R M J, Moncada S. (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 5150-5162.
82. Kocatürk U. (1981). Açıklamalı tıp terimleri sözlüğü. (Birinci baskı). Erzurum, Atatürk Üniversitesi Basımevi; 290.
83. Koltuksuz U, Karaman A. (2000). Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol Res.*;28:360-3.
84. Konotos H A, Wei E P, Povlishock J J, Dietrich W D, Magiera C J, Ellis E F. (1980). Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin G2. *Science*; 209: 1242-1245.
85. Koşay S. (1996). Nitrik oksidin hastalıklardaki fizyopatolojik rolü. *Ege Üniv Tıp Fak Ayın Kitabı Dergisi*; 83: 1-89.
86. Köksel O. (1998). İskemi – reperfüzyona bağlı akciğer hasarı üzerine α -lipoik asidin etkisi (Uzmanlık Tezi). Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı. Elazığ.
87. Kukreja R C, Kontos H A, Hess M L, Ellis E F. (1986). PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res.*; 59:612-9.
88. Lahera V, Salazar J, Romero J C. (1992). Deficient production of nitric oxide induces volume-dependent hypertension. *J Hypertension* 10 (Suppl 7): 173-7.
89. Laszlo I, Whittle B J R. (1995). Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat intestinal microvasculature in vivo. *Eur J Pharmacol* ; 272: 169-75.
90. Loeper J, Goy J, Rozensztajn L, Bedu O, Moisson P. (1991). Lipid peroxidation and protective enzymes during myocardial infarction. *Clin Chim Acta*.196, 119-126.
91. Lopez-Belmonte J, Whittle B J R. (1995). Aminoguanidine-provoked leukocyte adherence to rat mesenteric venules: role of constitutive nitric oxide synthase inhibition. *BrJ Pharmacol* ; 116:2710-4.

109. Nathan C. (1994). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
110. Nava E, Palmer R M J, Moncada S. (1992). The role of nitric oxide in endotoxic shock: Effects of N-Monomethyl-L-arginine. *J Cardiovasc Pharmacol* 220 (Suppl 12): 132.
111. Neely J R, Whitmer J I, Rovetto M J. (1975). Effects of coronary blood flow on glycolytic flux and intra cellular pH in isolated rat hearts. *Circ res*; 37: 733-741.
112. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95,351-358.
113. Oliva P B, Breckenridge J C. (1977). Arteriographic evidence of coronary arterial spasm in acute myocardial infarction. *Circulation* 56: 366-74.
114. Othman A, Shabanah A. (2000). Protective effect of aminoguanidin ,a NOS inhibitor ,against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice, *Life S*.vol.66,No. 3 pp.265-270
115. Ou P, Wolff S.P. (1993). Aminoguanidine a drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 46;1139-1144.
116. Padh H. (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol.* 68:1166-73. Review.
117. Paglia D E, Valentine W N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med*; 70:158-169.
118. Palmer G C. (1985). Cyclic nucleotides in stroke and related cerebrovascular disorders. *Life Sci*; 36: 1995-2006.
119. Panagiotidis G, Alm P, Lundquist I. (1992). Inhibition of islet nitric oxide synthase increases arginine-induced insulin release. *Eur J Pharmacol* 229: 277.
120. Pardini R S. (1995). Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch Insect Biochem Physiol.*;29:101-18. Review
121. Parr D R, Wimhurst J M , Harris E F. (1975). Calcium-induced damage of rat heart mitochondria. *Cardiovasc Res*; 9: 366-372.
122. Patel V.C, Yellon D M. (1993). Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the in situ rabbit heart. *Bioch. Biophys. Res. Commun* 194, 234-238 .
123. Pearson P J, Lin P J, Schaff H V. (1992). Global myocardial ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent relaxations to aggregating platelet in the canine coronary artery. A possible cause of vasospasm after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103: 1147.
124. Penghang W, Jay L. (1996). Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. *The J. of Biological Chemistry*. 271 .15 pp.29223-29230
125. Pernow J, Q D Wang. (1999). The role of the L-arginine/nitric oxide pathway in myocardial ischemic and reperfusion injury. *Acta Physiol Scand* ,167,151-159
126. Pernow J, Gonon A T. (2001). The role of the endothelium for reperfusion injury. *Eurp.H.J.Suppl.*3,C22-C27

127. Margaret A, Grisar J, Martin De Jong W. (1991). Protective effects of an a-tocopherol analogue against myocardial reperfusion injury in rats. *European Journal of Pharmacology*. 210 : 85-90.
128. Peter R H. (1995). Role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion *Circulation*. 91: 1872-1885.
129. Picard S, Parthasarathy S, Fruebis J, Witztum J L. (1992). Aminoguanidine inhibits oxidative modification of low density lipoprotein protein and subsequent uptake by macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6876-80
130. Pieri C, Recchioni R. (1994). Melatonin: A Peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E *Pharmacology Letters. Life Sciences*. Vol.55. No. 15 pp. 271-276.
131. Philis-T A, Panhasarathy S P, Palinski S. (1995). Aminoguanidine has both pro-oxidant and antioxidant activity toward LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 367-376.
132. Pique J M, Esplugues J V, Whittle B J. (1992). Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilation during acid secretion. *Gastroenterology* 102: 168-74.
133. Porter, N A. (1984). Chemistry of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 105,(32), 273-282.
134. Radomski N W. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 11: 1057-8.
135. Radomski N W. (1987). Endogenous nitric oxide inhibits platelet adhesion to vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92: 639-46.
136. Rangan U, Bulkley G B. (1993). Prospects for treatment of free radical mediated tissue injury. P. 700-717. Ed. KH Cheeseman and T.F. Slater. *Free radicals in Medicine. British Medical Bulletin. London*.
137. Reiter Russel J, Poeggeler B, Tan D X, Chen L. (1993). Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. Department of Cellular and Structural Biology, Mini review
138. Rossaint R, Falke K J, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapal W M. (1993) Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 328: 399.
139. Sampath V. (1994). Characterization of interactions of nitric oxide with human hemoglobin A by infrared spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 198(1): 281-287.
140. Sandrino L, Veronique M. (2001). Levels of nitric oxide in the heart after experimental myocardial ischemia. *J of Cardiovascular P.* 37;55-63
141. Satoh K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim Acta.* 90, 37-43.
142. Scaccini C, Chiesa G J. (1994). A critical assessment of the effects of aminoguanidine and ascorbate on the oxidative modification of LDL: evidence for interference with some assays of lipoprotein oxidation by aminoguanidine. *J. Lipid. Res.* 35.
143. Schmidt H H. (1992). NO, CO and OH: Endogenous soluble guanylyl cyclase- activating factors. *FEBS Lett*; 307: 102-107.
144. Schulz R, Wambolt R. (1995). Inhibition of nitric oxide synthase protects the isolated working rabbit heart from I/R injury. *Cardio vasc Res.* 30,432-439

145. Shibata M, Araki N, Ohta K, Hamada J, Shimazu K, Fukuuchi Y. (1996). Nitric oxide regulates NMDA-induced dopamine release in rat striatum. *NeuroReport*; 7 : 605-608.
146. Shimokawa H, Flavahan N A, Vanhutte P M. (1989). Natural course of endothelium dependent relaxations after balloon endothelium-removal in porcine coronary arteries. *Circ Res* 65: 740.
147. Siddons R C, Mills C F. (1981). Glutathione peroxidase activity and erythrocyte stability in calves differing in selenium and vitamin E status. *Br J Nutr.*;46:345-55.
148. Simon W M B, Frcsi, Mark O S, Leonie Y, Thomas F G. (1995). Superoxide radical and xanthine oxidoreductase activity in the human heart during cardiac operations. *Ann Thorac Surg* .60: 1289-1293.
149. Singh A K, Dhaunsi G S, Gupta M P, Orak J K, Asayama K, Singh I. (1994). Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.315,(2), 331-338.
150. Slater T F. (1982). Lipid peroxidation. *Biochemical Society Transactions*.10,70-71.
151. Slater T F. (1984). Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 222 ,1-15.
152. Slater T F. (1984). Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*.105,(33),283-293
153. Slavikova H, Lojek A, Hamar J, Duskova M, Kubala L, Vondracek J, Ciz M. (1998). Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. *Free Radic Biol Med.*;25:9-18.
154. Snyder S H. (1992). Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science*; 257: 494-496.
155. Sorrentino R, Sautebin L, Pinto A. (1997). Effect of methylguanidine, guanidine and structurally related compounds on constitutive and inducible nitric oxide synthase activity. *Life Sci*; 61: 1283-1291.
156. Schwarzenberg U. (1982). *Sobotta of Human anatomy Volume 1.10 the English Edition.* München, Vienna, Baltimore
157. Stamler J S, Singel D J, Loscalzo J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox- activated forms. *Science*; 26: 1898-1902.
158. Summersgill J T, Powell L A, Buster B L, Miller R D, Ramirez J A. (1992). Killing of *Legionella pneumophila* by nitric oxide in gamma-interferon-activated macrophages. *J Leucoc Biol* 52: 625.
159. Sun Y, Oberley L W, Ying L. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*; 34:497-500.
160. Van Der Vusse G J, Bilsen M V, Reneman R S. (1994). Ischemia and reperfusion induced alterations in membrane phospholipids: An overview. *Cellular, Biochemical and molecular aspects of reperfusion injury.* Ann. NY Acad. Sci. 723, 1-14.
161. Vankatesan N. (1998). Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *British Journal of Pharmacology.* 12:125-127.

162. Walker M J, Curtis M J, Campbell R W F. (1988). The lambeth conventions; guidelines for the study of arrhythmias in ischemia infarction and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 22;447-455
163. Wennmalm A, Benthin J, Edlund A. (1993). Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. *Circ Res*; 73: 1 121-1 127 .
164. Yagi, K. (1984). Assay of blood plasma or serum. *Methods in enzymology.* 105, 328-331.
165. Yaprak M. (1998). Akut Miyokart Enfarktüsünde Biyokimyasal Parametreler ve Antioksidan Sistemle İlişkisi (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana.
166. Zhao W , Tilton R G, Corbett J A, McDaniel M L, Misko T P, Williamson J R, Cross A H, Hickey W F. (1996). Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *Journal of Neuroimmunology*; 64: 123-133.



8.ÖZGEÇMİŞ

Giresun'da 1970 yılında doğdum.İlk ve orta öğrenimimi Giresun'da yaptım 1996'da Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum.Mezuniyetten sonra 1997 yılında Zonguldak SSK Bölge Hastanesinde göreve başladım.1997 Kasımında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Uzmanlık için göreve başladım.1998 yılının Nisan TUS sınavında aynı üniversitenin Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalında ihtisası kazanarak Biyokimya ve Klinik Biyokimyadaki görevime başladım ve halen devam etmekteyim.İngilizce biliyorum.Evliyim ve iki çocuk babasıyım.

