

**T.C**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**İTERNAL TORASİK ARTER ÜZERİNE TOPİKAL UYGULANAN  
PAPAVERİN, DİLTİAZEM VE NİTROPRUSSİD' İN APOPTOTİK  
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI**

**Dr. Orçun ÜNAL**

**Kalp ve Damar Cerrahisi**  
**Anabilim Dalı**  
**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danıőmanı: Prof Dr M. Behçet SEVİN**

**ESKİŞEHİR**

**2006**

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Orçun ÜNAL'a ait "İnternal torasik arter üzerine topikal uygulanan papaverin, diltiazem ve nitroprussidin apoptotik etkilerinin karşılaştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliğı ile kabul edilmiştir.

Tarih:20.09.2006

Jüri Başkanı: Prof. Dr. M. Behçet SEVİN  
K.D.C. Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Recep ASLAN  
K.D.C. Anabilim Dalı

Üye: Yrd. Doç. Dr. Murat İKİZLER  
K.D.C. Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun.....  
Tarih ve..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Erol GÖKTÜRK  
Dekan

## TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana destek veren sayın hocalarıma, asistanlığın tüm yorucu ve sıkıntılı anlarını beraber paylaştığım ve güç aldığım değerli asistan arkadaşlarıma ve eğitimim süresince birlikte emek verdiğimiz tüm hemşire ve sağlık personeline teşekkür ederim. Ayrıca tezimin gerçekleştirilmesi aşamasında yapmış oldukları katkılardan dolayı Tıbbi Genetik Anabilim Dalından Prof. Dr. Sevilhan ARTAN ve Behiye KAYTAZ'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Erinç ARAL ile Anadolu Üniversitesi Öğretim Üyesi Bülent BATMAZ'a teşekkür ederim. Asistanlığım boyunca her an yanımda olan eşime, eğitim ve öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi varlıklarını her zaman hissettiğim anneme ve babama sevgi ve şükranlarımı sunarım. Bulgu ve sonuçlarımın geleceğe ışık tutması dileğiyle...

## ÖZET

**Ünal, O. İnternal torasik arter üzerine topikal uygulanan papaverin, diltiazem ve nitroprussidin apoptotik etkilerinin karşılaştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2006.** Bu çalışma, kliniğimizde elektif koroner arter bypass cerrahisi uygulanan on hastadan alınan internal torasik arter segmentleri kullanılarak yapıldı (yedi erkek, üç kadın, ortalama yaş 65,55). Her hastadan alınan internal torasik arter distal segmenti çıkarıldıktan hemen sonra dört eşit parçaya bölünerek, her biri ayrı olarak serum fizyolojik, diltiazem, nitroprussid ve papaverin içeren solüsyonlara aktarıldı. Her segmente, apoptotik hücre inceleme ve sayımı için hematoksilin ve eozin boyaması ve TUNEL tekniği uygulandı. Apoptotik hücreler, her parça için elli mikroskopik alan taranarak sayıldı. Hematoksilin eozin boyamasına göre gruplar arasında belirgin farklara rastlanmadı. TUNEL tekniği uygulandığında ise diltiazem grubunda ortalama apoptotik hücre sayısı diğer üç gruba göre belirgin artmış bulundu (13,3060). En az ortalama apoptotic hücre sayısı serum fizyolojik grubunda oldu (4,2500). Diltiazem ve papaverin grubuyla karşılaştırıldığında en az ortalama apoptotik hücre sayısı nitroprussid grubundaydı (9,4840). Papaverin grubunun ortalama apoptotik hücre sayısı ise 10,7540 olarak bulundu. Çalışmada diyabetik hastalarla diyabetik olmayan hastalar arasında ilaçların apoptotik etkilerinin farklı olmadığı bulundu. Sonuç olarak bizim çalışmamıza göre bu çok kullanılan vazodilatör ilaçlar farklı derecelerde apoptoza neden olabilmekte ve bu durum greftlerin apoptoz ve onun kötü etkilerinden korunması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, internal torasik arter, papaverin, diltiazem, nitroprussid.

## ABSTRACT

**Ünal, O. Comparison of the apoptotic effect of topically applied papaverine, diltiazem and nitroprusside to internal thoracic artery. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Cardiovascular Surgery, Eskişehir, 2006.** This study was performed by obtaining internal thoracic artery segments of ten patients who undergoing coronary bypass surgery (seven male, three female, mean age 65,55). Distal segment of internal thoracic artery were obtained immediately after harvesting and were divided four equal pieces. Each internal thoracic artery segments were immersed to the four different solutions which containing seperately papaverine, diltiazem nitroprussid and saline. Each segments were examined with both hematoxylin-eosin and TUNEL method in the aim of apoptotic cells determinations and counting. Apoptotic cells were counted in fifty microscobic areas of each segments. No significant difference was observed among the four groups according to hematoxylin-eosin staining. However, TUNEL method was revealed a significant increase of mean apoptotic cell in diltiazem group when compared to other three groups(13,3060). Least mean apoptotic cell number was counted in saline group (4,2500). The most decreased mean apoptotic cell number were counted in nitroprussid group when compared to diltiazem and papaverine groups (9,4840). Mean apoptotic cell number of papaverine group was 10,7540. No difference was observed in diabetic and non diabetic patients samples in apoptotic effects of the studied compounds. In conclusion, according to our results the most used vasodilatory agents may cause in several level of apoptosis and in this situation we should prevent grafts from apoptosis and its deleterious effects.

Key Words: Apoptosis, internal thoracic artery, papaverine, diltiazem, nitroprussid.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnternal Torasik Arter	3
2.2. Apoptozis	5
2.2.1. Apoptozisin Genetik Kontrolü	7
2.2.2. Apoptozis Mekanizmaları	10
2.2.3. Apoptozda Hücrede Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler	12
2.2.4. Apoptozda Hücrede Oluşan Morfolojik Değişiklikler	13
2.2.5. Apoptozda Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler	15
2.2.6. Apoptozisi Saptamada Kullanılan Yöntemler	16
2.3. Papaverin	17
2.4. Diltiazem	18
2.5. Nitroprussid	19
2.6. Apoptozisin Vasküler Olaylardaki Rolü	21
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1. Dokuların Alınması ve Takibi	24
3.2. Doku Takip Metodu	25
3.3. TUNEL Metodu	25
3.4. Hücre Sayımı ve İstatiksel Analiz	27
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	39
6.SONUÇ	44
KAYNAKLAR	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ALG-2: Apoptosis-Linked Gene 2 product.

AIF: Apoptosis Inducing Factor.

Apaf-1: Apoptosis Activating Factor.

ATP: Adenozin Triphosphate.

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate.

cGMP: Cyclic Guanosine Monophosphate.

DNA: Deoksiribonükleik Asit.

DISC: Death Inducing Signaling Complex.

FADD: Fas-Associated Death Domain.

IAPs: Inhibitors of Apoptosis Proteins.

İTA: İnternal Torasik Arter.

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide.

NO: Nitrik Oksit.

SD: Serbestlik Derecesi

Smac/Diablo: Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with Low pI.

TNF: Tümör Nekrozis Faktör.

TNFR1: Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü 1.

TRADD: TNFR-Associated Death Domain.

TRAIL: Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand.

TRAMP: Tumor Necrosis Factor Apoptosis Mediating protein.

TWEAK: Tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis.

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

## ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1: Sağ subklavyen ve İTA'in şematik anatomisi	4
2.2: Hücrenin apoptoza ve nekroza giderken gösterdiği farkların şematik gösterimi	7
2.3: Apoptozun intrensek ve ekstrensek mekanizmasının şematik gösterimi	12
2.4: Apoptozisde görülen morfolojik değişiklikler	14
4.1: Hematoksilin ve eosin boyası ile boyanmış serum fizyolojik grubuna (a) ve diltiazem grubuna (b) ait arter kesitleri	28
4.2: Hematoksilin ve eosin boyası ile boyanmış nitroprussid grubuna (a) ve papaverin grubuna (b) ait arter kesitleri	29
4.3: TUNEL metodu ile boyanmış serum fizyolojik grubuna ait bir arter kesiti	30
4.4: TUNEL metodu ile boyanmış diltiazem grubuna ait bir arter kesiti	31
4.5: TUNEL metodu ile boyanmış nitroprussid grubuna ait bir arter kesiti	32
4.6: TUNEL metodu ile boyanmış papaverin grubuna ait bir arter kesiti	33
4.7: Ortalama apoptotik hücre sayısı açısından ilaç gruplarının karşılaştırılması	34



## TABLOLAR

	Sayfa
4.1: Grupların ortalama apoptotik hücre sayıları.	35
4.2: Gruplar arasındaki ortalama apoptotik hücre sayılarının farkını ortaya koymak için yapılan Anova testi.	35
4.3: Gruplar arasındaki farkı ortaya koymak için yapılan post Hoc testi ile Tukey çoklu karşılaştırması.	36
4.4: İlaç gruplarının diyabetik ve non-diyabetik örnekler için Mann Whitney U testi ile karşılaştırılması.	37
4.5: İlaç gruplarının diyabetik ve non-diyabetik örnekleri için Excet testi uygulanarak Monte Carlo 10.000 sınaması	38

## 1. GİRİŞ

Koroner arter bypass cerrahisi tüm dünya da sıklıkla uygulanan bir cerrahi yöntem olarak literatürde yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde 2000 yılında yaklaşık 400.000 koroner arter bypass cerrahisi yapılmıştır. Ülkemizde ise bu rakam yaklaşık yıllık 20.000 düzeyinde olduğu günümüzde artış gösterdiği tahmin edilmektedir.

İskemik kalp hastalıklarına yönelik gerçekleştirilen ilk cerrahi girişimler 1930'lu yıllara dayanmaktadır. Berk 1932 yılında deneysel olarak, pektoral kas flebini miyokardın etrafına sararak bu yönde ilk çalışmaları başlatmıştır (1). İlk defa insanlar üzerinde 1935 yılında uygulanmaya başlayan bu yöntemi, sonrasında omental ve akciğer flepleri, izlemiştir (2). 1941 yılında yine Beck koroner sinüsü daraltarak ve epikarda ablasyon uygulayarak granülasyon dokusunun gelişimini sağlamış, böylece miyokardı kanlandırmayı amaçlamıştır. Vineberg ise ilk defa sol ventrikül miyokardı içine İTA'ı (internal torasik arter) yan dalları açık bir şekilde gömerek miyokardı kanlandırmayı amaçlamıştır. Vineberg yöntemi olarak da adlandırılan bu yöntemle, İTA'de % 90'lara varan açık kalım oranı sağlanmıştır (3,4). Favaloro (5), 1968 yılında vena safena magna kullanarak aorta-koroner bypass ameliyatlarını yayınlamıştır. İTA'nın koroner bypass cerrahisinde greft olarak kullanımı, safen venden daha önce gündeme gelmiştir. 1961'de Kolesov Rusya'da ilk defa İTA kullanarak koroner bypass ameliyatını gerçekleştirmiştir (6). 1968 yılında Green İTA kullanarak ilk koroner arter bypass serisini yayınlamıştır (7,8). Green'in yayınladığı başarılı sonuçların ardından İTA tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır ve günümüzde arteriyel greftler arasında en sık kullanılan ve uzun dönemde gösterdiği başarılı sonuçları en iyi bilinen damardır. Bunun yanısıra vena safena magna ve radyal arter de diğer sık kullanılan greftler olarak sayılabilir. Ayrıca gastroepiploik arter ve inferiyor epigastrik arterde nadir de olsa kullanılabilecek arteriyel greftlerdendir.

Araştırmacılar İTA'nın kısa ve uzun dönem sonuçlarının daha iyi olması için farklı farmakolojik ajanları anastomoz öncesinde artere uygulamışlardır. İTA'ı anastomoz yapmadan önce en çok karşılaşılan ve en önemli problem vazospazmdir. Spazma uğrayan arterde kan akımı azalır ve erken dönemde istenilmeyen sonuçlarla karşılaşılabilir. Koroner arter bypass cerrahisinde İTA'nın kullanılmasıyla

operasyon sırasında ve sonrasında arterin vazospazma uğraması, miyokard enfarktüsü veya postoperatif mortaliteye neden olabilmektedir (123). Günümüzde de İTA’i vazospazmdan korumak amacıyla çeşitli vazodilatör ajanlar topikal veya sistemik olarak kullanılmaktadır. Bu vazodilatör ajanlar İTA’e intraluminal veya çoğunlukla uygulandığı üzere eksternal uygulanabilmektedir. Bu vazodilatörlerin İTA akımına olan etkileri birçok araştırmacı tarafından araştırılmış olup, günümüzde en çok kullanılanları “papaverin, diltiazem ve nitroprussid” olmuştur. Bu ilaçların yararlı etkilerinin yanı sıra apoptotik etkilerinin de olabileceği ve İTA’e hücresele seviyede zarar verebileceği de düşünülmüştür. Apoptozun hücresele seviyede yaptığı etkiler ve doku bütünlüğüne olan etkisi son zamanlarda popüler olarak yapılan araştırmalardandır. Ayrıca apoptozis, programlı bir hücre ölümü olarak tanımlanırken, vasküler lezyonların oluşumunda önemli bir mekanizmadır (225). Son yıllarda yapılan araştırmalarla, ateroskleroz oluşumunda ve gelişimiyle vasküler düz kas hücrelerindeki apoptoz ilişkilendirilmiştir (102).

Bizim çalışmamızın amacı, İTA diseksiyonu sırasında veya intraoperatif olarak İTA’de oluşabilecek vazospazmı engellemek amacıyla topikal olarak kullanılan papaverin, diltiazem ve nitroprussidin apoptotik etkileri kontrollü olarak karşılaştırılarak, İTA’de vazodilatasyon sağlanırken en az apoptoza yol açan ilacı bulabilmektir. Böylece koroner arter bypass cerrahisinin en çok kullanılan greftlerinden biri olan İTA’de ilaçların yaptığı apoptozun gösterilmesiyle, bu ilaçların yararlı ve zararlı etkileri kıyaslanabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnternal Torasik Arter

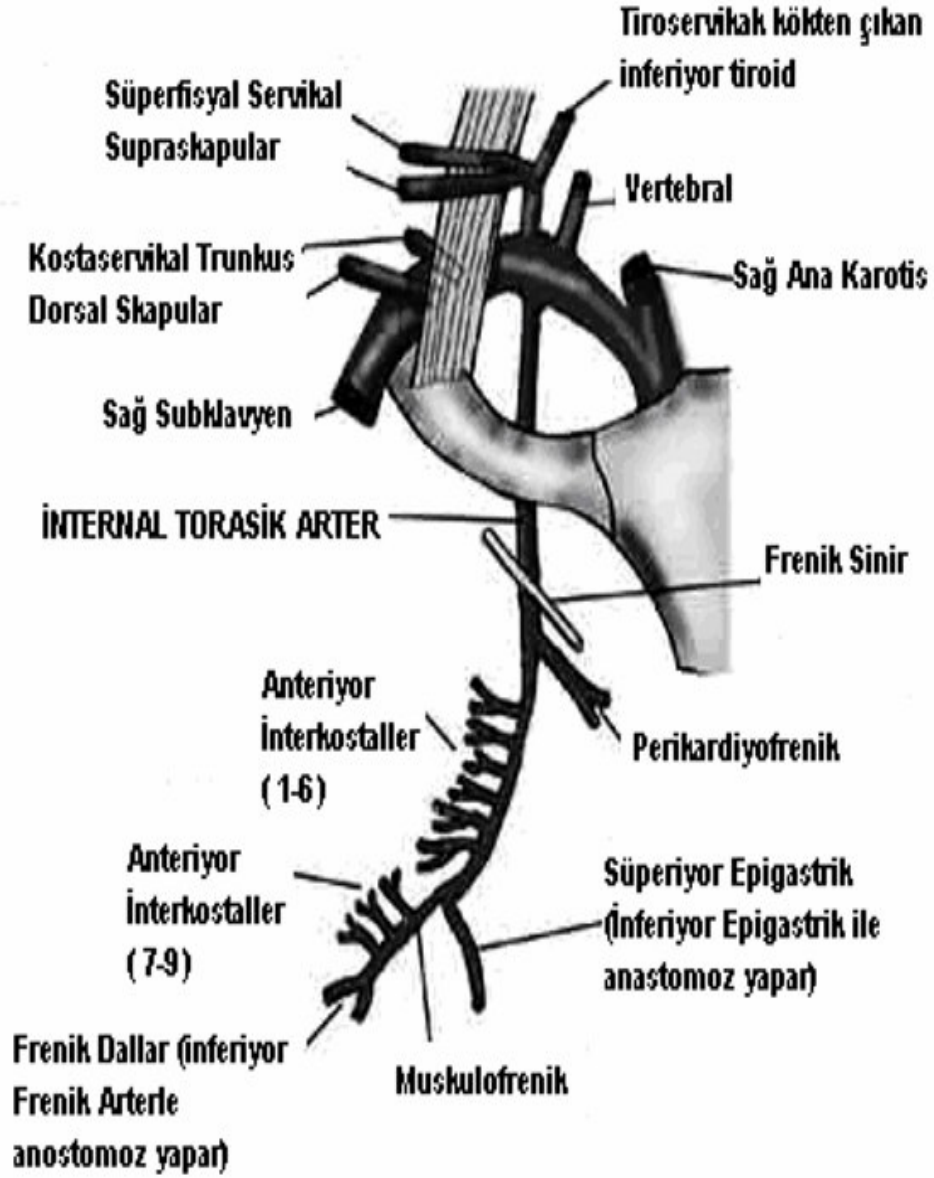
Arteriyel greftler arasında en sık kullanılan ve uzun dönem sonuçları en iyi bilinen damar İTA'dır. Hem açık kalım oranı hem de semptomların kontrol altına alınmasında, ven greftlerine olan üstünlüğü yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (9–11).

İTA, boyun kökünde anterior skalen kasın mediyalinde subklavyen arterin ilk kısmının inferiyorundan köken alır. Klavikula ve 1. kostal kıkırdağın arkasından toraksa iner. Sternum lateralinde seyrederek posteriyorda plevranın üzerindedir ve frenik sinir tarafından çaprazlanır. Süperiyor 6. kostal kıkırdağın arkasında interkostal kaslar arasından seyrederek 3. kostal kıkırdaktan sonra transversus thoracis kasının anteriorundan seyrederek ve 6. kostal kıkırdakta süperior epigastrik ve muskulofrenik arterler ayrılarak sonlanır (Şekil 2.1).

İTA, diğer arterlerin histolojik yapısına benzer şekilde sağlam bir internal elastik laminaya sahiptir. Bu yapının üzerinde subendotelial substrat, bazal lamina ve klasik arteriyel endotel yer alır. Bu yapı İTA'nın ateroskleroz gelişimine karşılık dirençli olmasına yol açar (12,13).

İTA diseksiyonu standart olarak medyan sternotomiye takiben yapılır. Yaklaşık 1–1,5 cm'lik bir pedikül bırakılarak koter yardımı ile çıkartılır. İTA çok dikkatli çıkartılmalıdır. Koter hasarını (*termal injury*) önlemek amacıyla elektrokoterin gücü düşük seviyede tutulmalı veya ultrasonik koter kullanılmalıdır. Alt uçta bifurkasyon öncesinde diseksiyon sonlandırılmalı, üstte ise 1. interkostal dalından ayrıldıktan sonra subklavyen arterden çıktığı noktaya kadar diseke edilmelidir (14). Özellikle alt ucun bifurkasyon öncesinde kesilmesi, kollateral dolaşım ile göğüs duvarı beslenmesine önemli katkı sağlamaktadır. Ayrıca bifurkasyon hemen öncesinin spazma en yatkın bölge olduğu bilinmektedir (15,16). İTA diseksiyonu tamamlandıktan sonra sistemik heparinizasyonu takiben İTA alt uçtan kesilir ve akım kontrol edilir. Arterin vazospazmına karşı topikal veya sistemik olarak vazodilatör ajanlar uygulanır.

## SAĞ SUBKLAVYEN & İTERNAL TORASİK ARTER



Şekil 2.1: Sağ subklavyen ve İTA'in şematik anatomisi.

## 2.2. Apoptozis

Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. İnsanlarda ve pek çok canlıda normal intrauterin gelişme ve erişkin yaşamı için hayati önem taşımaktadır. Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen ölüm sinyalleri ile başlar. Bu sinyaller iki ana apoptotik yolu; hücre dışı/ hücre ölüm reseptörü ve hücre içi/mitokondriyal yolu harekete geçirirler. Apoptoz sırasında bir grup proteaz harekete geçerek, DNA kırılmasına, hücre büzülmesine ve hücre yüzeyinde çıkıntılar oluşmasına neden olur. Apoptotik hücreler, apoptotik cisimciklere ayrılarak fagositler ve çevre hücreler tarafından dokudan uzaklaştırılırlar.

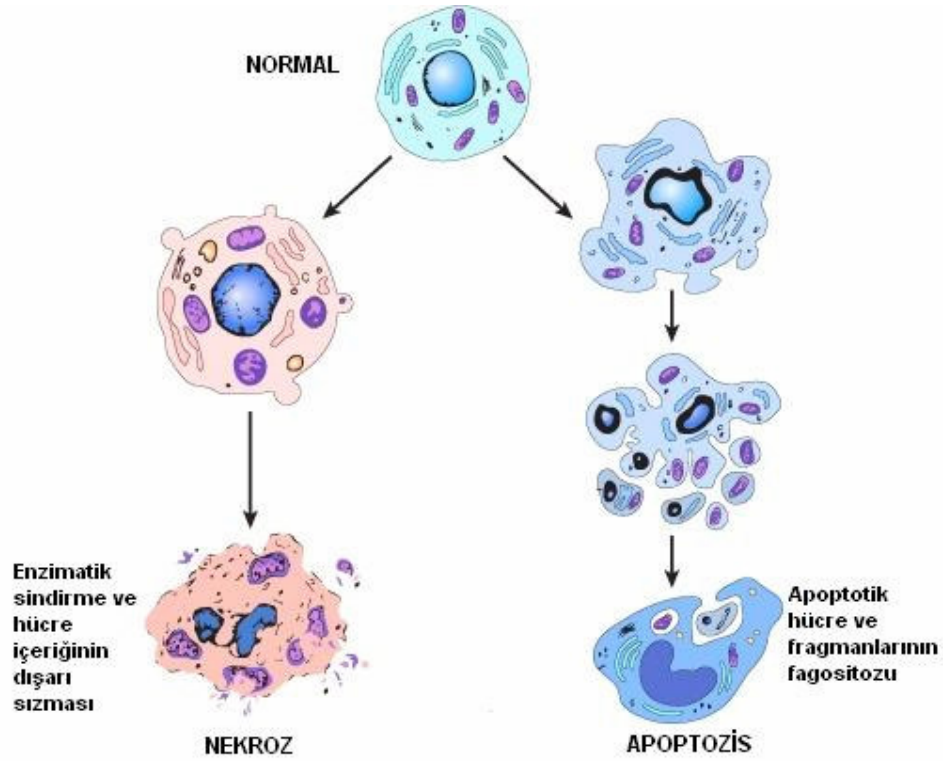
Organizma sürekli bir denge halinde bulunmaktadır. Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis), bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir. Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürlar, bunlar apoptozis ve nekrozdur (25,26). Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olayların sonucunda hücre ölümü meydana gelmektedir (27).

Hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Fizyolojik olarak oluşan hücre ölümü uzun yıllardır bilinmesine rağmen “apoptozis” terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie (28) adındaki patologlar tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzülme nekrozu olarak adlandırmıştır. Yunancada ‘*apo*’ ayrı, ‘*ptosis*’ düşen anlamındadır.

Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (29–31). Wyllie (32), 1980 yılında deneysel apoptozisi, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan

merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir. Bu tarihten sonra apoptoz ile ilgili çalışmalar hızlı bir şekilde artmıştır. 1993 yılında Cohen (33) yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise yönlendirdiğini bildirmiştir. Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (34).

Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir (34). Apoptozisi anlamak için nekrozisle karşılaştırılarak öğrenilmesi faydalı olacaktır (Şekil 2.2). Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken “*cell swelling*”, apoptotik hücre tam tersine küçülür “*cell shrinkage*”. Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır “*choromatin aggregation*” ve kondanase olur “*choromatin condensation*”. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepçikler “*membrane blebs*” oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre “*apoptotic bodies*” denen küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozisde plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salınması sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (20). Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmantasyonu ile karakterizedir (20,35).



Şekil 2.2: Hücrenin apoptoza ve nekroza giderken gösterdiği farkların şematik gösterimi. Walker NI ve ark (54)'dan uyarlanmıştır.

### 2.2.1. Apoptozisin Genetik Kontrolü

Apoptozun genetik mekanizması ilk kez *Caenorhabditis elegans* isimli nematodun gelişim aşamalarında belirlenmiştir. *C. elegans*'ın gelişim sürecinde 1090 somatik hücre oluşmaktadır; fakat bunlardan 131 tanesi ölmektedir. Bu programlı hücre ölümünü gerçekleştiren genler, araştırmacılar tarafından *ced-3* ve *ced-4* olarak tanımlanmıştır. Bu genlerden biri ya da her ikisi de mutasyona uğradığı zaman bu 131 hücre yaşamaya devam etmektedir (58,61,62).

Protoonkogenler, normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogen adını alır. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirir. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör baskılayıcı genlerdir (39–41). Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir (42). Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-



myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (22,23,43,44).

### **p-53:**

İnsanda Apoptozisi düzenleyen genlerden biri tanesi, bir tümör süpresör gen olarak çalışan p-53 genidir. p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik ajanlarla hücre hasarının oluşması, bir transkripsiyon düzenleyici geni olan p53'ü aktive eder. p53 protein yapısı, DNA transkripsiyonunun düzenlenmesini sağlar ve direk olarak DNA ya bağlanarak DNA hasarını tanımlar. Böylece iki önemli hücreyel olay gerçekleşir; hücre döngüsü G1 de durabilir ya da apoptoza neden olabilir. Eğer hücre hasarı tamir edilebilir duruyorsa p53 aktive olmuş DNA tamir oluncaya kadar bekler. Tamir edilemeyecek kadar büyük hasarlarda ise bozulmuş DNA segmenti içeren hücrenin defektif ya da malign olarak proliferasyonunu engellemek için, p53 hücreyi apoptoza yönlendirir (43,45,46,53).

### **C-myc:**

Bir transkripsiyon düzenleyici faktör olan c-myc proteini, ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ve apoptozise uğramasına neden olur (47). C-myc protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlar. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, her ikisi de yeterli ise çoğalma olur, c-myc olduğu halde büyüme faktörleri yoksa apoptozis görülür (31,47,48).

### **Bcl-2,Bax:**

Bcl-2/bax ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur (53,63) ve yirmi tane üyesi tanımlanmıştır (64). Bunlardan bazıları apoptoz inhibitör proteinler iken ( bcl-2 ve bcl-xl, Bcl-w,Boo, Mcl-1), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Proapoptotik genler: Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk,BNIP3, Bad, Bid gibi) olmak üzere iki alt aileye sahiptir (57). Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar (53,60). Örneğin; Bcl- 2'nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını

sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (59). p53 genellikle Bax/Bax, Bax/Bcl-2 ve Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarının regülasyonu ile fonksiyon görür (53). Mitokondri çift duvarlı bir organeldir. Bcl-2, 24–26 kDa'luk protein kodlayan bir proto-onkogendir ve ürettiği protein, mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan nükleus membranında yerleşmiştir (65). Bu proteinler, iyon alışverişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu etki yaparlar. Özellikle anti-apoptotik genler içinde yer alan Bcl-xL'in mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi koruduğu ileri sürülmektedir. Bu sayede apoptoz inhibisyonu gerçekleşmektedir (57). Bcl-2 ailesinin bir diğer ilginç özelliği de reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol etmesidir (56). Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının “permeabilite geçiş poru” na doğru yönelirler ve buraya bağlanırlar. Bu bağlanma, seçici iyon geçirgenliğini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF, doğrudan kromatin kondansasyonunun ve nükleer fragmentasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c, bir sitoplazma proteini olan Apaf-1 (*Apoptosis-Activating-Factor-1*) in aktivatörüdür (53). Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks “apoptozom” olarak isimlendirilir (66). Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (53). Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay apoptozun neden enerji gereksinimi duyduğunu açıklamaktadır (60). Bad, sağlıklı hücrelerde mitokondri membranının dış zarında bulunur. Apoptozis sırasında bax değişime uğrar ve N terminal uç açığa çıkarken bcl-xl bad'dan ayrılır (36,49). Bid, bcl-2'yi inaktive etmek veya bax'ı aktiflemek üzere mitokondriye yönelir (23). Endojen bid'in yarısı sitozolde erir. Diğer yarısı ise hücre içi membranlarda özellikle de endoplazmik retikulumda bulunur (19,20,37).

#### **NAIP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP ve survivin:**

IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*) denen apoptoz inhibitör proteinleri, omurgalı ve omurgasızlarda bulunan, insanda sekiz farklı tipi gösterilmiş olan

proteinlerdir. Tüm IAP'ler anti-apoptotik etki için BIR domaini ve yetmiş adet aminoasit grup içermektedir (84). BIR domainlerinin kaspazlarla etkileşiminin anti-apoptotik etkiyi oluşturduğuna inanılmaktadır. Fakat XIAP, c-IAP1 ve c-IAP2'nin kaspaz 3,7 ve 9'u direkt olarak inhibe ettiği düşünülmektedir (85). XIAP BIR3 domaini direkt kaspaz 9'un küçük alt ünitesine bağlanırken, BIR2 domaini kaspaz 3 ve 7'nin aktive edilmiş bağlanma paketiyle etkileşirler (86,87). BIR domainlerine ek olarak, c-IAP1, c-IAP2, ve XIAP C-terminal uçlarında E3 ubiquitin ligaz aktivitesi olan RING domainine sahiptir. Bu RING domain sayesinde IAPs kendi ubiquinasyonunu katalize eder ve böylece proteazom tarafından indirgenir (88). Ayrıca ubiquinasyon ve indirgenme için kaspaz 7 ve 8 için hedef olurlar (89,90). Hücre için kaspaz gibi proteolitik enzimlerin aktivasyonu sonucu geri dönüşümsüz olayların başladığı düşünülürse, kaspaz aktivitesinin c-IAPs tarafından direkt inhibe edilmesi oldukça önemli olmaktadır. Bir başka önemli nokta da, mitokondriyal apoptotik olaylar sırasında mitokondriyal intermembran alanından salınan Smac/Diablo (*Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with Low pI*), IAPs'nin kaspaz üzerine olan inhibe edici etkisini azaltabilmektedir. Smac/Diablo IAPs'in negatif düzenleyicisidir ve bu onun apoptozu artırıcı etkisini açıklamaktadır (91).

### 2.2.2. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptoz hücrede temel olarak intrinsek ve ekstrinsek mekanizma diye bilinen iki mekanizma ile tetiklenir (Şekil 2.3). Ekstrinsek mekanizma, hücre membranında yerleşmiş olan fas reseptörü gibi transmembran ölüm reseptörlerinin uyarılmasıyla başlar. İntrinsek yolda ise hücre içinde yer alan mitokondri tarafından salınan uyarıcı faktörlerle apoptoz başlar (Şekil 3).

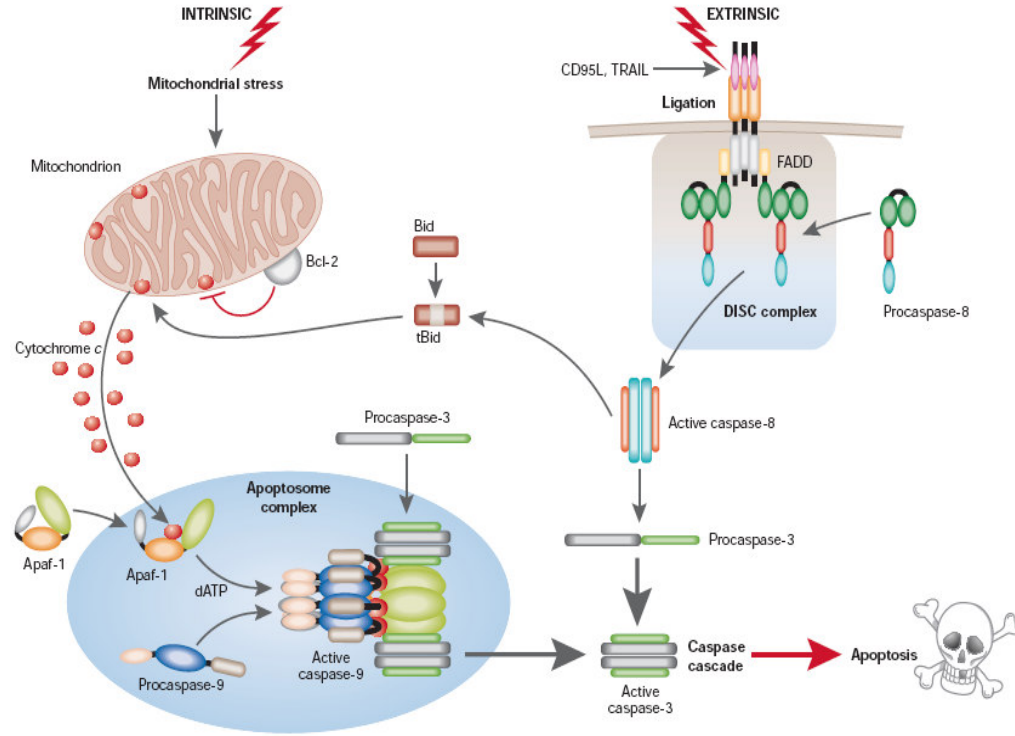
**İntrinsek Yol:** DNA hasarı, oksidatif stres ve iskemi gibi, özellikle mitokondride stres yaratan faktörlerle apoptoz indüklenir (72). Stres sinyali alınır alınmaz sitoplazmada bulunan bax ve bid proapoptotik proteinleri, mitokondri dış zarına yapışarak sinyalin içeri salınmasını başlatır. Ancak bax ve bid tam salınma için yeterli değildir. Mitokondri içinde yer alan bir diğer proapoptotik protein olan bak, sitokrom c ve mitokondri intramembran içeriğinin tam olarak salınımını sağlar (73). Salınımdan sonra sitokrom c sitoplazmada ATP ve bir enzim olan Apaf-1 ile

kompleks oluşturur. Bu kompleks bir başlangıç proteini olan kaspaz 9'u aktive eder. Böylece kaspaz 9 ile sitokrom c, ATP ve Apaf-1 kompleksi beraber apoptozu oluşturur. Buda efektör protein olan kaspaz 3'ü aktive eder. Mitokondri intramebran alanından sitokrom c salınırken aynı zamanda apoptoz inhibitörlerini inhibe eden, AIF ve DNA fragmantasyonunu başlatan Smac/Diablo proteini salınır (73).

**Ekstresek Yol:** Diğer hücreler tarafından salınan ve sinyal molekülü olarak bilinen ligandlar, hedef hücrede transmembran ölüm reseptörlerine bağlanarak apoptozu başlatır. Tanımlanmış olan ölüm reseptörleri; Fas (CD95/Apo1) (74), TNRF1 (Tümör Nekroz Faktör (TNF) reseptör 1) (p55) (75), TRAMP (*Tumor necrosis factor apoptosis mediating protein, WSL-1/Apo3/DR3/LARD*) (76), TRAIL-R1 (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, DR4*) (77) ve TRAIL-R2'dir (DR5/Apo2/KILLER) (78). Fas Ligand (CD95 ligand) Fas a bağlanır, TNF ve lymphotoxin TNFR1'e bağlanır (79), TWEAK (*Tumor necrosis factor -like weak inducer of apoptosis, Apo3 Ligand*) TRAMP'a (bağlanır (80) ve TRAIL (Apo2 ligand) hem TRAIL R1 (81) hem de TRAIL R2 (82) için ligandır. Ölüm reseptörleri ligandların bağlandığı intraselüler ölüm domainlerine sahiptir. Bunlar direk etkileşimden sorumlu olan FADD (*Fas-Associated Death Domain*) ve indirek etkileşimden sorumlu olan TRADD'dir (*TNFR-associated death domain*) (79,83). FADD pro-kaspaz 8 ile etkileşime girerek DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) kompleksini oluşturur. DISC kaspaz 8'in aktive olmasını sağlar. Böylece kaspaz 3'de aktive olur ve döngü başlar. Aktif kaspaz 8 ayrıca bid proteinini tbid'e ayırarak mitokondri membranından sitokrom c salınımıyla intresek yolu da başlatır (72).

Son yapılan çalışmalarda kaspaz 12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (21,24). Bu yol intresek ve ekstresek apoptotik yollardan farklı bir yoldur. Endoplazmik retikulum, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir (24). Kaspaz 12, endoplazmik retikulum membranında lokalize olan ve endoplazmik retikulum aracılı apoptozu tetikleyen bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki kalsiyum seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz 12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz 7 salınımı ile de prokaspaz 12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur (37). Aktiflenmiş kaspaz 12

sitoplazmaya yönelir. Kaspaz 9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (37). Son çalışmalar, *in vivo* ve *in vitro* olarak kaspaz 12'nin kaspaz 9'u aktive ettiğini göstermiştir (38).



Şekil 2.3: Apoptozun intrinsek ve ekstrinsek mekanizmasının şematik gösterimi. Marion MacFarlane & Ann C. Williams (55)'dan uyarlanmıştır.

### 2.2.3. Apoptozda Hücrede Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler

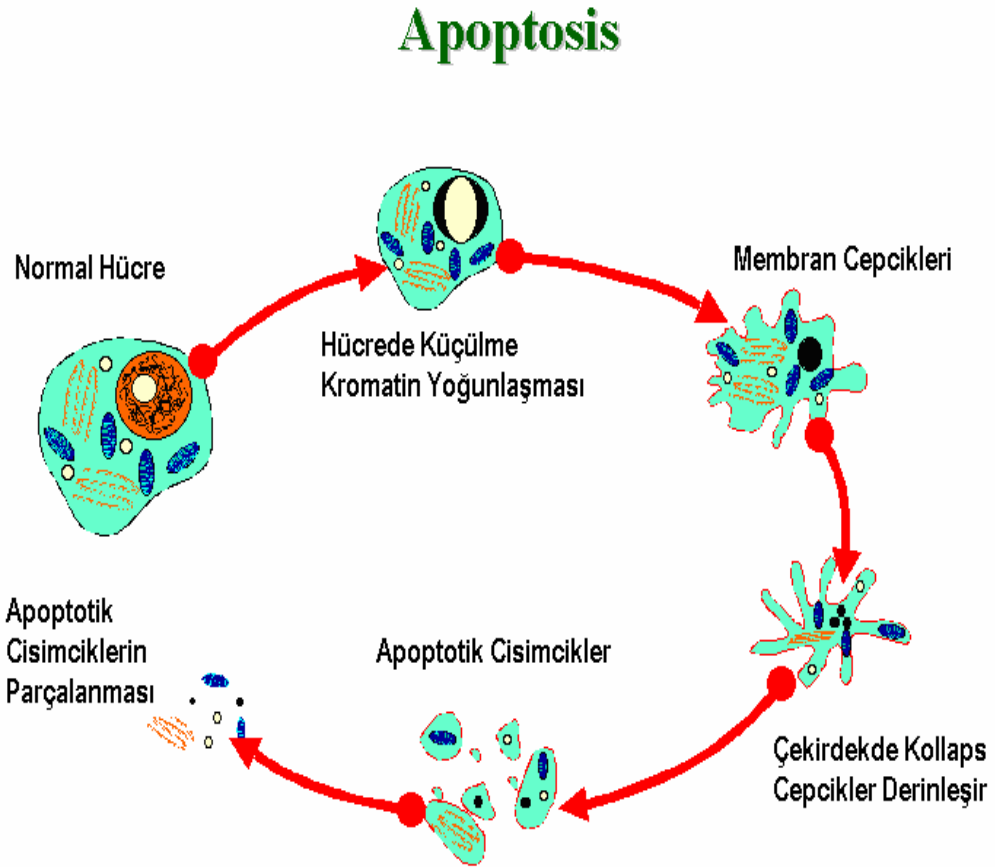
Apoptoz, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hüresel büzüşmenin nedeni, Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır (56). Apoptotik uyarım alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Hücre zarında iç yüzeyden dışarıya fosfatidilserin translokasyonu olur. Plazma ve çekirdek kondansasyonunu takiben kromatinin kümelenmesi şekillenir. Kromatindeki değişikliklerin bağlamasının

hemen öncesinde sitozolik kalsiyum düzeyinde önemli bir artış olmaktadır. Kromatin kondansasyonu, nukleozomlar arasındaki bağlantı bölgelerinin ayrılması ile karakterizedir. 180–200 baz çiftinden oluşan parçalar, elektroforezde ip merdiven (*ladder*) görüntüsü oluşturur (59). Hedef proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren kalsiyum-magnezyum bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nukleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur (17,18). Endonükleazlar timositler gibi bazı hücrelerde yapısal olarak bulunur, bazı hücrelerde ise apoptozun başlamasından önce transkripsiyon ile oluşturulur. Hücrenin parçalanmasıyla nükleer materyal içeren zarla çevrili “apoptotik cisimcikler” oluşur. İki katlı lipit tabakada fosfolipit asimetrisi, hücre zarının bir özelliğidir. Fosfolipidler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ve dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP’ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu fosfatidilserinin dış yüzey tabakaya yerleşmesi ile sonuçlanır. Bu durum, apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır (53). Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptoz 30–60 dakika gibi bir sürede tamamlanır (56). Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir ve stabilizasyonu apoptozu engellemektedir. Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan bir proteindir. Aktin filamanlarının yıkılması ile hücre normal şeklini kaybeder (18).

#### **2.2.4. Apoptozda Hücrede Oluşan Morfolojik Değişiklikler**

Apoptozdaki morfolojik değişiklikler elektron ve ışık mikroskopuyla gösterilmiştir. Apoptoz çoğunlukla tek bir hücre ya da hücre gruplarını etkilemektedir. Ultrastrüktürel olarak en erken olan değişiklikler hücre bağlantılarının ve mikrovillus gibi plazma membran yapılarının kaybolmasıdır. Plazma membran yapısında kabarcıklaşmalar olur ve bu yapıya “zeiosis” adı verilir. Organellerin birbirlerine yakınlaştığı izlenir. Organeller genel olarak sağlamdır. Bazen

ribozomlarda çökme izlenebilir. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar (17). Aynı zamanda sitoplazma kondensasyonu ve çekirdek kromatin yoğunlaşması izlenir. Kromatin değişik şekil ve büyüklüklerde çöker. Elektron mikroskop ile bakıldığında kromatinin yoğun granüler yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği izlenir. Olay devam ettikçe çekirdek birkaç fragmana ayrılır. İntraselüler sıvı ve iyonların kaybı ile sitoplazma hacmi azalır (67). Sonunda endoplazmik retikulum dilate olur, veziküller oluşur. Bunlar plazma membranını eriterek içeriğin extraselüler ortama çıkmasına neden olur (68). Hücre birkaç membranla çevrili, düz yüzeyle, içinde sitoplazmik organel ve çekirdek parçaları taşıyan apoptotik cisimciklere parçalanır.



Şekil 2.4: Apoptozisde görülen morfolojik değişikliklerin şematik gösterimi. Balakumran A. ve ark.(51)'dan uyarlanmıştır.

Apoptotik cisimciklerin sayısı hücrenin boyutuna göre değişebilir ve her birinin boyutu farklı olabilir. Apoptotik cisimcikler tipik olarak yandaki hücreler tarafından fagosite edilir. Bu hücreler çoğunlukla mononükleer fagositer sistemin hücreleri olmasına rağmen, normal epitel hücreleri, vasküler endotelyum veya tümör hücreleri olabilir (69). Fagosite edilen apoptotik cisimcikler hızla yıkılır. Ancak bazen apoptotik cisimcikler fagosite edilmez ve lümene atılırlar (Şekil 2.4). Bu apoptotik cisimcikler hızla dilate olur ve sitoplazmik organelleri yıkılır. Bu olaya sekonder nekroz adı verilir (70,71). Dokuda 4–9 saat tanımlanabilir halde kalan apoptotik hücreler daha sonra fagozomlar içinde birkaç saat kadar görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalır (30,31).

### **2.2.5. Apoptozda Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler**

Apoptozun farklı örneklerinde hücre ölümünün morfolojisindeki benzerlik apoptozun mekanizmasının tüm hücre tiplerinde aynı olabileceğini düşündürmektedir. Çekirdek içi DNA yıkımının apoptozun birçok örneğinde bulunması bu düşüncüyü desteklemektedir. Apoptoz sırasında hücre içi sinyal iletiminde, hücre içi kalsiyum artar, protein kinaz a ve c aktive olur, makromolekül sentezine ihtiyaç duyulur ve gen ekspresyonu değişir (31).

Apoptoza giden hücrede en erken saptanabilen değişiklik, intraselüler kalsiyum konsantrasyonunun ani ve hızlı bir şekilde artmasıdır (31). Kalsiyum dengesindeki ani değişiklikler apoptozda kritik bir öneme sahiptir (93,94). Sitoplazmada kalsiyum konsantrasyonunun artması, Fas antijeni kaynaklı apoptozda anahtar bir role sahiptir (95). Ayrıca bcl-2 nin endoplazmik retikulum membranından kalsiyum akımını düzenleyerek (96) ya da sitoplazmik ve çekirdek içi normal kalsiyum konsantrasyonunu koruyarak (97) apoptozu engellediği gösterilmiştir. Kalsiyum bağlayan proteinlerden olan kalsiyum-magnezyum bağımlı endonükleaz (not,24), kalmodulin (98,103) ve ALG-2 (*Apoptosis-linked gene 2 product*) (104) apoptozda rol almaktadır. Kalsiyumdaki ani artış; kalpain, transglutaminaz ve fosfolipaz gibi proteazları aktive ederken (94,105), apoptozda önemli bir rolü olan interlökin 1-B dönüştürücü enzim ailesinden olan kaspaz 3 (CPP32, YAMA, apopain olarak adlandırılır) aktivitesini de artırır (106). Kalsiyumla endonükleazların aktive olmasıyla, apoptotik hücre biyokimyasının en karakteristik bulgularından olan oligonükleozom uzunluğunda DNA fragmanlarının



oluşmasına neden olur (107). Kalsiyum bağımlı enzim aktivitesinin, farklı hücrelerde karakteristik apoptotik kromatin ayrılmasını yaptığı gösterilmiştir (108,109). Transglutaminazlarda kalsiyum bağımlı enzim grubundandır. Sitozolik kalsiyumun artmasıyla aktive olurlar. Ölen hücrede transglutaminazın aktive olmasıyla mRNA ve prein seviyeleri belirgin olarak artar (107). Yapılan çalışmalarda nedeni tam olarak anlaşılmasa da enzimin fazla olmasının apoptotik hücre ölümünü tetiklediği düşünülmektedir (110). Kalsiyum bağımlı bir nötral proteaz olan kalpain, kalsiyumla oluşan apoptozda diğer bir hedefidir. Bir hücre iskelet proteini olan fodrin, apoptotik hücrede kalpain için bir substrattır ancak kaspazlardan da etkilenmektedir (112). Ayrıca kalpain ile oluşan bu durum nekrotik hücrelerde de gösterildiğinden apoptoza özel olmayabilir (112). Çekirdek yapı proteazı da apoptozda aktive olan kalsiyum duyarlı bir enzimdir (107). Normalde fosfolipidler plazma membranında asimetrik olarak bulunurlar. Fosfatidilkolin ve sfingomyelin hücre dışı yüzeyde, fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin hücre içi yüzeyde yer alırlar (112,113). Membran lipid asimetrisi için, fosfatidilserin lokalizasyonu enerji bağımlı düzenlenmektedir. Burada fosfolipid translokaz enzimi görev almaktadır. Sitoplazmada kalsiyum konsantrasyonunun artmasıyla taşıma engellenir ve bütün fosfolipidler uygun olmayan bir dağılıma geçer (115). Makrofajlar hücreyi yabancı bir hücre olarak algırlar ve fagosite eder (52). Kalsiyum mitokondri ve endoplazmik retikulum arasında apoptoz için bir mesajcı görevini gördüğü gösterilmiştir. Mitokondriden çok az miktarda sitokrom c salınması, endoplazmik retikulum membranında bulunan inositol-1.4.5-trifosfat yoluyla kalsiyum salınımına yol açar. Kalsiyumun hücre içine salınmasıyla mitokondriden çok miktarda sitokrom c salınımı uyarılır ve bu da kaspaz ve nükleaz enzimlerini uyarak apoptozu başlatır (93). Protein fosforilasyonunda rol oynayan zar ve sitoplazma enzimlerinin apoptotik sinyallerin iletiminde önemli oldukları kanıtlanmıştır (29). Bu enzimlerden protein kinaz-A, apoptozisi sağlarken, protein kinaz-C apoptozisi durdurur (34,50).

### **2.2.6. Apoptozisi Saptamada Kullanılan Yöntemler**

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında morfolojik, immunohistokimyasal, biyokimyasal, immünolojik ve morfolojik görüntüleme yöntemleri yer almaktadır. Günümüzde her dokunun temel incelemesinde kullanılan hematoksilin ve eozin boyamanın yanında apoptozisin

saptanmasında en çok kullanılan yöntemler histokimyasal yöntemlerdir. Doku kesitlerinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarının in situ saptanmasında en duyarlı ve en hızlı metod olan TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*) yöntemi bizim çalışmamızda da kullanılmıştır. Bu yöntem temelinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanarak, apoptoza giden hücrelerin görüntülenmesini sağlamaktadır.

### 2.3. Papaverin

Papaverin (*1-(3,4-dimethoxybenzyl)-6,7-dimethoxyisoquinoline*), opium alkaloidlerinin alt grubu olan benzilizokinolin üyesi olan bir maddedir. Klinikte kullanılan formu papaverin hidrokloriddir. Non selektif bir düz kas gevşeticisi olan papaverin etkisini spazm varlığında daha iyi göstermektedir. Etkili bir vazodilatör olan papaverin klinikte vazospazmik hastalıkların tedavisinde geniş olarak kullanılmaktadır (126). Ayrıca koroner arter bypass sırasında ve sonrasında koroner greft spazmının tedavisinde ve korumasında intraluminal ve/veya ekstraluminal kullanımı da yaygındır (134,135).

Endotel, vazorelaksan ve vazokonstriktör ajanların salınımını kontrol ederek vasküler tonusun oluşmasını sağlar. Ayrıca fiziksel ve fizyolojik olarak bir bariyer oluşturur ve vasküler düz kas hücrelerini vazoaaktif ajanlardan ayrı tutar (136). Bazı çalışmalar, papaverinin safen ven endotelinde hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını etkilediğini (137) ya da asetilkoline endotel kaynaklı gevşemeyi bozduğunu (124) göstermiş ve papaverinin endotel üzerine kötü etkilerini tanımlamıştır. Ancak papaverinin vasküler hücrelere yaptığı bu etkilerin mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Papaverin hidroklorid sadece asit ortamda çözünebilmektedir. Ekstraselüler asiditenin polimorf nükleer lökositlerde gösterildiği gibi (138) intraselüler pH'ı düşürdüğü iyi bilinmektedir. İntraselüler asiditenin kültürdeki rat nöronlarında (139) ve insan promyelositik lösemi hücrelerinde kaspaz aktivitesini arttırarak (140) apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada da papaverinin kan damarlarına yaptığı yapısal veya fonksiyonel etkilerin solüsyonun asidik içeriğinden olabileceği savunulmuştur (125). Ancak papaverin hidroklorid solüsyonuyla aynı pH'daki asidifiye solüsyonla yapılan çalışmada endotel veya düz kas hücrelerinde

apoptoz oluşmadığı gösterilmiştir (126). Buna destek olarak, sığır aortasında asidik ortamın (pH 7.0) apoptozu inhibe etmesi gösterilebilir (141). pH 'ın apoptoz üzerine olan etkisi hücre tipine göre değişebilmektedir. Normal insan polimorf nükleer lökositlerde asidik ortamda apoptoz inhibe olurken (142), alkalın durumda artmaktadır (138).

Papaverin potent bir fosfodiesteraz inhibitörüdür (129), ve hücre içi cAMP (*Cyclic adenosine monophosphate*) düzeyini artırır. cAMP nin artması vasküler düz kas hücrelerinde apoptozu tetikleyebilir (130,131). Bu yolla apoptozun başlaması cAMP bağımlı protein kinaz, özel protein fosforilasyonu ve DNA fragmantasyonunun uyarılması (130,143) ve Mcl-1 ekspresyonunun azalması (144) yoluyla olabilir.

Papaverinin kalsiyum antagonisti gibi olan etkisi gösterilmiştir (132). Kalsiyum biyolojik olaylarda ikinci mesajcı gibi davranır. Kalsiyum dengesindeki bozulma hücre içi kalsiyumu artırabilir ya da azaltabilir. Buda apoptozu tetiklemede rol oynayabilir.

Papaverin, NADH (*Nicotinamide adenine dinucleotide*) bağımlı mitokondri solunumu ve kompleks I aktivitesini inhibe ederek mitokondriyal fonksiyonları bozabilir (145,146). Elektron taşınması ve ATP yapımının bozulması sitokrom c salınımına ve böylece hücrel oksidasyon redüksiyon potansiyelinin değişmesi apoptozu tetikleyebilir (147,148). Sonuç olarak endotel ve düz kas hücrelerinde papaverin kaynaklı apoptozun nedeni tam olarak açık değildir.

#### **2.4. Diltiazem**

Diltiazem, kalsiyum kanal blokörleri sınıflamasında yer alan, benzotiyopinas grubuna ait bir ilaçtır. L tipi kalsiyum kanal blokörlerinin farmakolojik modülatörleri bulunduğundan beri, bu ajanların apoptoz ve hücre proliferasyonuna etkileri incelenmektedir (156). Bazı araştırmacılar kalsiyum kanal blokörlerinin apoptoz için potansiyel bir uyarıcı olduğunu savunmaktadır (150,158,159). Ancak yapılan çalışmalarda sitoplazmik kalsiyumun artmasının DNA endonükleazlarının aktivasyonu ya da apoptozun başlatılmasında tek başına gerekli olmadığı gösterilmiş (130,151,157,160). Ayrıca sitoplazmik kalsiyum değerinin düşmesiyle de apoptoz olabilmektedir (151,155). Nedeni tam olarak anlaşılmasa da düşük kalsiyum değerleri, apoptozun uyarılmasıyla sonuçlanan DNA nötralizasyonundan hücreyi

korumaktadır. Hücre içi kalsiyum bağlayıcıları kalmodulin inhibitörü W-7, nötrofillerde apoptoz oranını belirgin olarak hızlandırmaktadır (161). Hücresel koşullarda sitoplazmik kalsiyum eksikliği durumunda, hücre kalsiyum inoforları veya kalsiyum kanal blokörlerinin kullanılması ile apoptotik hücre ölümünden kurtarılabilir (153,155).

Literatüre bakıldığında kalsiyum kanal blokörlerinin apoptoz mekanizmasına olan etkisi kalsiyuma hem bağımlı hem de bağımsızdır (149). Farklı çalışmalarda, hem transforme hemde transforme olmamış hücre modellerinde kalsiyum kanal blokörlerinin eklenmesi apoptoza neden olmaktadır (130,152-154,162-170). Ancak bunların rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Kalsiyum kanal blokörleriyle apoptozun engellendiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (173,174). Pankreatik beta hücreleri (165) ve endotelial hücrelerle (170,171) kalsiyum kanal blokörlerinin bu yararlı etkileri gösterilmiştir. Verapamil ve nifedipin kültüre edilmiş insan aortik düz kas hücrelerinde apoptozu engellemektedir (175). Birçok çalışmada da kalsiyum kanal blokörlerinin konsantrasyonlarının, yapabileceği apoptoz oranı için (pozitif ya da negatif) önemli olabileceği savunulmuş, prostatik glandüler hücrelerde apoptotik etki için normal farmakolojik değer bin kat fazlası olması gerektiği söylenmiştir (158). Kalsiyum kanal blokörlerinin apoptotik etkilerinin membran kanallarında kalsiyum akımında yaptığı farmakolojik etkilerinden tamamen bağımsız olduğunu gösteren çalışmalarda yapılmıştır (130,152,166). Kalsiyum kanal blokörlerinin bu etkileri, hücre içi kinazlar ve membran transport proteinleriyle olan etkileşiminden kaynaklanabilir (149).

## 2.5. Nitroprussid

Nitroprussid, nitrik oksit (NO) metaboliti ile düz kas hücresinde relaksasyon sağlamaktadır. Nitroprussid düz kas hücresi içine girdikten sonra denitrasyona (hidrolize) uğrar ve NO oluşur. NO, guanilat siklazı aktive ederek siklik guanozin 5'-monofosfat seviyesini artırır, cGMP'de (*Cyclic guanosine monophosphate*) protein kinaz G yi aktive eder (177). Protein kinaz G ile oluşan düz kas gevşemesi başlıca şu mekanizmaları içerir:

- 1) Kalsiyumun hücre içi depolardan salınımının inhibisyonu,
- 2) Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının inhibisyonu,
- 3) Sodyum/kalsiyum değiş-tokuşunun aktivasyonu,

- 4) Fosfolipaz C'nin ve IP3 oluşumunun inhibisyonu,
- 5) Kalsiyuma bağlı potasyum kanallarının aktivasyonu.

Nitroprussid kan ve dokularda siyanojene metabolize olur ve siyanojen karaciğerde tiyosiyanata çevrilerek atılır.

NO' in vasküler tonus ve vasküler hücre proliferasyonunun kontrolünde anahtar moleküllerden biri olduğunu bilmekteyiz. Son yıllarda NO'in apoptozda iki taraflı regülasyon yaptığı anlatılmaktadır. Bir tarafta, vasküler endotelial hücrelere (178), hepatositlere (179), eozinofiller (180), ve splenositlerde (181) anti-apoptotik etki yaptığı gösterilmiştir. Diğer tarafta ise NO'in vasküler düz kas hücrelerinde (182), makrofajlarda (183), pankreatik islet hücrelerinde (184), timositlerde (185) ve nöronlarda (186) apoptozu tetiklediği gösterilmiştir.

NO'in bu etkilerinin arkasındaki mekanizma oldukça yaygın olarak araştırılmakta olan bir konu olmakla birlikte, vasküler düz kas hücrelerinde NO ile oluşan apoptozu oluşturan mediyatörler halen tam olarak bilinmemektedir (229). Bazı çalışmalarda, vasküler düz kas hücrelerinde oluşan NO kaynaklı apoptozisin anahtar mekanizmasının c-GMP bağımlı yol olduğu söylenmektedir (187,188). Bazı çalışmalarda ise, araştırmacılar NO kaynaklı apoptozun c-GMP bağımsız bir mekanizma ile olduğunu göstermişlerdir(189,190). Son zamanlarda pulmoner vasküler düz kas hücrelerinde NO'in potasyum kanallarını aktive ederek hücre dışına potasyum çıkmasına ve sitozolik potasyum kaybına yol açarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (191). Bazı kaynaklarda NO kaynaklı apoptoz için protein kinaz C sinyal yolu ve nükleer faktör-kb bağlanma aktivitesinin regülasyonunun önemine dikkat çekmektedir(192). Ayrıca apoptozla alakalı genlerden Fas antijeni(193) ve CPP32 proteazın (194,195) vasküler düz kas hücrelerindeki NO kaynaklı apoptozla ilişkili olabileceği rapor edilmiştir. Yakın bir zamanda yapılan çalışmada, NO' in bax ve bcl2 gen ekspresyonu dengesini düzenlediği ve sitokrom c nin mitokondriden sitoplazmaya geçmesine neden olduğu anlatılmıştır (176). Sitoplazmik sitokrom c nin artmasıyla kaspaz 1'den çok kaspaz 3 aktive olmakta ve vasküler düz kas hücresinde apoptoz meydana gelmektedir.

Vasküler endotelial hücrelerde NO kaynaklı apoptozun nedenini araştırmak için yapılan bir çalışmada, düşük konsantrasyonlarda NO' in TNF alfa kaynaklı apoptozu inhibe ettiği ancak yüksek konsantrasyonlarda apoptozu uyardığı

gösterilmiştir(196). Aynı çalışmada endotel hücrelerinde c-GMP ile anti-apoptotik etkinin gözlemlendiği ve NO' in anti-apoptotik etkisinin kısmen bu yol üzerinden olduğu gösterilmiş, ayrıca yüksek konsantrasyonlarda NO' in c-GMP den bağımsız bir yolla endotel hücresinde apoptoz yaptığı anlatılmıştır. NO/cGMP hareketinin CD95 sinyal yolunu yeterli bir şekilde inhibe etmesine ve T lenfositleri apoptozdan korumasına rağmen(197) NO veya c-GMP nin TNF alfa kaynaklı apoptozu tamamen baskılayamaması farklı bir bakış açısı oluşturmaktadır.

## **2.6 Apoptozisin Vasküler Olaylardaki Rolü**

Apoptozisin in vivo çalışmalarda proaterojenik etkisinin olabileceğine yönelik deliller bulunmaktadır. Endotel hücrelerinde aşırı apoptoz olması aterogenezis oluşumuna yol açabilmektedir (196). Maymunlarda yapılan bir çalışmada endotel hücre apoptozisinin olması, endotel vazodilatör fonksiyonların bozulmasıyla ilişkili olarak bulunmuştur (120). Ayrıca mikropartiküllerin (apoptotik hücrelerden geriye kalan cisimcikler) direkt olarak endotel disfonksiyona neden olduğunu gösteren bulgular vardır (121). Koroner bypass olan hastaların çoğunun ortak noktasının ateroskleroz olması, bypassda kullanılan İTA'in da bu sistemik hastalıktan etkilenebileceğini bilinmektedir. Bu açıdan İTA'in daha uzun bir süre koroner beslenmeye yardımcı olması istenildiğinden ateroskleroz ile apoptoz arasındaki bağlantı oldukça önemli olmaktadır (198).

Aterosklerotik lezyon arteriyel intimal ve düz kas hücre proliferasyonu, lipid toplanması ve bağ dokusu depolanması ile tanımlanır (199). Arteriyoskleroz düz kas hücre hiperplazisi ya da hipertrofisi ve lipid depolanması olarak ya da olmadan intima ve/veya media tabakalarında matriks proteini birikimiyle karakterizedir. Arter duvarının sertleşmesi ve kalınlaşmasıyla sonuçlanır. Vasküler düz kas hücreleri arteriosklerotik lezyonların ana hücresel komponentidir (198).

Vasküler endotel hücrelerde tüm kan damarlarında bulunan ve damarın vasküler tonusu ile antikoagülan içeriği olan fonksiyonlarının devamını sağlar. Endotel hücrelerin apoptozu ya da disfonksiyonu ateroskleroz gibi birçok hastalıkta önemlidir (200). Endotel hücrelerinin apoptozu ayrıca vasküler düz kas hücrelerinin apoptozunu da regüle eder (115). Normal erişkin arterlerinde vasküler düz kas hücrelerinin turnover değeri ve apoptoz ile mitoz indeksi düşüktür (116).

Hasta dokularında değişik faktörlerin eklenmesiyle hücre proliferasyonu ve apoptoz dengesi değişik derecelerde olabilir.

Vasküler endotel hücrelerinde apoptozis sadece ateroskleroz ilerlemesini etkilemekle kalmaz, ayrıca da plak rüptürü, trombus ve emboli oluşumuna da yol açabilmektedir. Bu olaylarda apoptozisin rolü muhtemelen, fibröz kılıfın zayıflamasına yol açması, nekrotik bölgenin genişlemesine neden olması ve en önemlisi de aterosklerotik plak içeriğinin trombojenitesini arttırmasıdır.

Doku faktörü, 47 kDa'luk transmembran glikoproteinidir. Koagülasyon faktör VII' e bağlanarak aktif form olan faktör VII a dönüşümü sağlar. Buda faktör IX ve X aktive ederek trombin oluşumu sağlar. Hücresel ve hücre dışı doku faktörü insanda lipid çekirdeğın trombojenitesine karar veren ana faktördür. Vasküler doku faktörünün rekombinant doku faktörü yolu inhibitörü ile inhibe edilmesiyle lipidden zengin plaklarda akut trombus oluşumu engellenmiştir (117). Doku faktörü hücrenin yüzeyinde çalışmaktadır ve aktivitesi yüksek oranda fosfatidilserin bulunmasına bağlıdır. Anyonik fosfolipidler apoptotik ölüm sırasında hücre yüzeyine dağılırlar ve apoptotik hücrenin etkili bir pro-koagulan aktiviteye sahip olmasına neden olurlar (118). Apoptoz sırasında, hücre yüzeyinde fosfatidilserin belirgin olarak gözlenir ve fosfatidilserin içeren membran mikropartikülleri ortama yayılır. Hücre apoptoza gittiği zaman hemen yutulmaz, apoptotik cisimcikler ya da fosfatidilserin içeren mikropartiküller plak içerisinde doku faktörü aktivasyonuna neden olabilir. Doku faktörünün ortaya çıkması (hücresel veya hücre dışı) ve apoptotik ölüm aynı lezyon içinde oluşmakta, buda bize doku faktörünün hücre ölümü sırasında doku faktörünün apoptotik mikropartiküllerden salınmış olabileceğini göstermektedir (119).

Lümendeki endotelial hücrelerdeki apoptoz, erozyon ve trombus oluşumuna neden olan mekanizmalardan biri olabilir. Uzunlamasına yapılan plak kesitlerinde, çalışılan plakların %60'ında endotelial apoptozis gözlenmiştir. Apoptozisin artışı hücre proliferasyonundaki artışla dengelenmemektedir, böylece aterosklerotik plakların distal kısımlarındaki geniş endotelial erozyonlar endotelial apoptozun bir sonucu olarak düşünülebilir.

Vasküler düz kaslarda apoptozis oluşumuyla:

1) Aterosklerotik plağın fibröz kapsülünde düz kas hücrelerinin kaybı oluşur. Düz kas hücreleri kollajen sentez eden tek hücrelerdir ve fibröz kapsülün

esnekliğini sağlar. Böylece plağın duyarlı bölgesinde düz kas hücrelerinin artmış apoptozu ile plakta zayıflama ve rüptür oluşabilir (99,100).

2) Tromboz riski artar. Apoptotik düz kas hücresi membranına fosfatidilserin uygulanmasıyla trombin oluşumu yukarıda endotel hücrelerindeki apoptoz gibi trombin oluşumunu arttırır (101).

3) Plak kalsifikasyonu olur. Plak içerisinde düz kas apoptotik hücrelerinden matriks vezikülleri gibi geriye kalanlar plak kalsifikasyonunu başlatabilir (102).

Aterosklerotik hasta grubunda sık görülen bir hastalık olan diabetes mellitus da apoptozda önemli bir yere sahiptir. Bilindiği üzere vasküler endotelial disfonksiyon diyabette görülen bir durumdur. Diyabette endotelial disfonksiyonun üç ana kaynağı vardır (202-205). İlk olarak hiperglisemi ve buna bağlı oluşan biyokimyasal olaylar endotelial fonksiyonu direkt olarak değiştirir (202). Endotelial ve vasküler düz kas hücrelerine glikoz transportu insülin bağımsız olarak hızlandırılmış difüzyonla olmaktadır. Glikoz transportu glikoz tarafından düz kas hücrelerinde otheregüasyonla olurken, endotelial hücrelerde bu şekilde olmaz. Endotel hücrelerinde kan glikoz konsantrasyonunda ki artış intraselüler glikoz ve onun metabolitlerinin artışına neden olacaktır. Yüksek glikoza maruz kalan endotel hücrelerinde kollajen ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks komponentlerinin ve vonWillebrand faktörü ve doku faktörü gibi prokoagulan proteinlerin yapımı artacaktır. Böylece hücrede proliferasyon, migrasyon ve fibrinolitik potansiyel azalırken, apoptoz artış gösterecektir (206-211). İkinci olarak, yüksek glikoz diğer hücrelerde olduğu gibi growth faktör ve vazoaktif ajanların sentezi ile indirekte olarak endotel hücre fonksiyonlarını etkiler (212). Üçüncü olarak, metabolik sendromun komponentleri endotel fonksiyonunu etkileyebilir (201,213).



### 3. MATERYAL VE METOD

Çalışmaya Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalına koroner arter hastalığı tanısıyla yatırılan ve elektif koroner arter bypass cerrahisi uygulanan 10 ardışık hasta dâhil edildi. Hastaların yedi tanesi erkek, üç tanesi kadındı. Hastaların ortalama yaşı  $65,55 \pm 7,7$  olarak hesaplandı. Hastaların 6 tanesi diyabetik, dört tanesi diyabetik değildi. Hastalarda başka bir sistemik veya otoimmün hastalık hikâyesi yoktu. Diyabetik hastaların hepsinin kan şekeri regülasyonu operasyondan önce yapıldı. Hastalara ait olan kırk adet örnek serum fizyolojik grubu (n=10), diltiazem grubu (n=10), nitroprussid grubu (n=10) ve papaverin grubu (n=10) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Her grup kendi içinde diyabetik (n=6) ve non-diyabetik (n=4) olarak da ikiye ayrıldı.

Çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 11.04.2006 tarih ve 244 sayı numaralı onayı ile yapılmıştır.

#### 3.1. Dokuların Alınması ve Takibi

Koroner bypass ameliyatı olacak olan hastalarda standart medyan sternotomiye takiben sol İTA diseksiyonuna geçildi. Diseksiyon sırasında İMA yaklaşık 2 cm'lik pedikülü ile beraber düşük seviyede elektrokoter kullanılarak ve yan dalları hemoklip kullanılarak bağlanarak proksimalde subklavyen arterden, distalde superior epigastrik arter-muskuloferinik arter ayırımına kadar diseke edildi. Diseksiyonu tamamlanan İTA in terminal segmentinden 1–1,5 cm'lik kısmı sistemik heparinizasyon (300 Ünite/kg) yapılmasının ardından çalışma için hemen ayrıldı. Alınan bu segment 2,5X büyütme loop ile diseke edilerek, yaklaşık 2–2,5 mm'lik dört eşit parçaya ayrıldı. Parçalar hemen oda sıcaklığında bekleyen ve içinde 10 ml SF içinde çözülmüş 2 ml %2 papaverin HCl, 10 ml SF içinde çözülmüş 25 mg diltiazem HCl ve 10 cc %5 dextroz içinde çözülmüş 5 mg nitroprussid sodyum bulunan kaplara aktarıldı. Örnekler oda sıcaklığında tam 60 dakika bekletildikten sonra histolojik değerlendirmeler için nötral formalin solüsyonuna bırakıldı. Bu solüsyon içinde 24 -48 saat süreyle fiksasyonu sağlandı ve rutin takip işlemleri uygulanarak parafin blokları hazırlandı. Mikrotom kullanılarak 5µ kalınlığında alınan damar kesitlerine genel yapı özelliklerini ortaya koymak için hematoksilin-eosin boyası ile apoptosisi belirlemek için TUNEL tekniği uygulandı.

Nötral Formalin Solüsyonu:

- Formaldehit 10 cc
- Distile Su 90cc
- Sodyum dihidrojen fosfat 0,35gr
- Disodyum dihidrojen fosfat 0,65gr

### 3.2. Doku Takip Metodu

1- Çeşme suyunda	3 saat yıkama
2- %70'lik Etil alkol	15 dakika
3- %80'lik Etil alkol	15 dakika
4- %90'lık Etil alkol	15 dakika
5- %96 (I)'lik Etil alkol	15 dakika
6- %96 (II)'lik Etil alkol	15 dakika bekletilir.
7- Ksilol I	3 dakika
8- Ksilol II	1 dakika şeffaflandırılır.
9- Parafin I	15 dakika
Parafin II	30 dakika
Parafin III	45 dakika tutularak bloklama

### 3.3. TUNEL Metodu

Araştırmamızda TUNEL tekniği için *Roche Cat No 1 684 795 In Situ Cell Detection Fluorescein* Kiti kullanılmıştır.

1- Poly-L-lisin'li lamlara alınan 5 µ kalınlığındaki kesitler 45 dakika ksilolde deparafinize edildi.

Kesitler daha sonra sırasıyla

2- Absolü alkol

    %96'lık Etil alkol

    %90'lık Etil alkol

    %80'lik Etil alkol

    %70'lik Alkoller ve distile suda çalkalandı.

3- PBS solüsyonunda yıkandı.

4- Kesitler üzerine permabilizasyon solüsyonu damlatılarak ve üzeri parafilmle kapatılarak 37 °C lik etüvde 8 dakika bırakıldı.

- 5- PBS solüsyonunda iki kez yıkandı.
- 6- Kit içinde yer alan işaretleme ve enzim solüsyonları karıştırılarak kesitler üzerine damlatıldı.
- 7- Kesitlerin üstü yine parafilmle kapatılarak 37° C'lik etüvde 1 saat bırakıldı.
- 8- Karanlık ortama geçilerek kesitler PBS solüsyonunda üç kez yıkandı.
- 9- Kesitler oda ısısında bırakılarak kurutuldu.
- 10- İşaretleme hücrelerin görünür hale getirilmesi için kesitler DAPI boyası ile boyandı.
- 11- Kesitler üzerine son olarak vectra shield damlatılarak lamel ile kapatıldı.
- 12- İnceleme aşamasına kadar kesitler -20 °C de ve karanlıkta bekletildi.

### TUNEL Tekniğinde Kullanılan Stok Solüsyonlar

#### 10XPBS Solüsyonu

NaCl	8gr
KCl	2.01gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11.36gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.04gr
Distile Su	1 litre

HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

#### 1XPBS Solüsyonu

10XPBS	20 ml
Distile Su	180 ml

HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

#### İşaretleme Solüsyonu

Enzim Solüsyonu (vial1)	50µl
İşaretleme solüsyonu (vial2)	450µl

### 3.4. Hücre Sayımı ve İstatiksel Analiz

Gruplara ait her hastanın TUNEL tekniği uygulanmış, rasgele seçilmiş 5–6 kesitinde ve 50 alanda apoptotik hücreler X100 büyütme ile sayılarak gruplar arasındaki farklılıklar ortaya kondu. Kesitler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik ve Histoloji Anabilim dallarında Olympus BX61 flouresan mikroskobu ile incelendi.

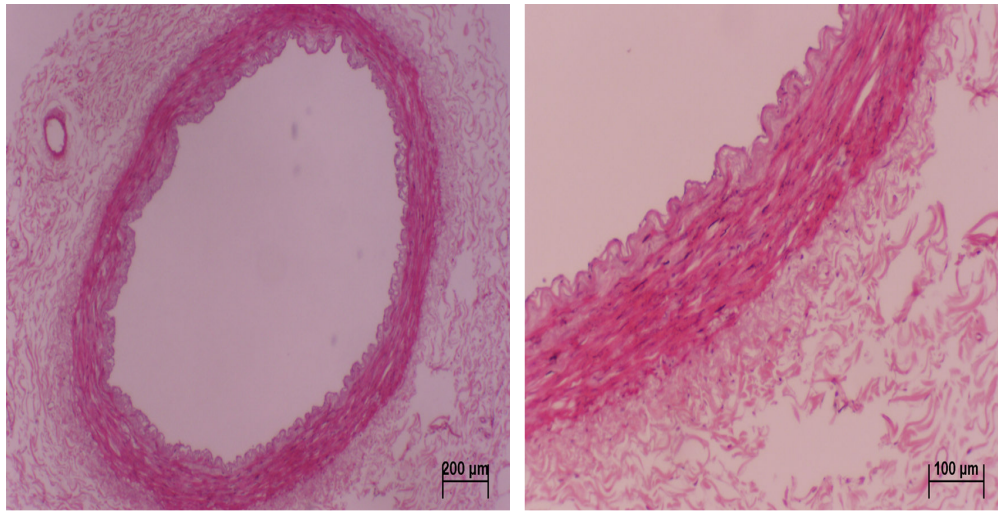
Çalışmada hastalardan alınan materyaller serum fizyolojik, diltiazem, nitroprussid ve papaverin içeren solüsyonlara konuldu. Serum fizyolojik içine konulan materyaller serum fizyolojik grubu (n=10), diltiazem solüsyonu içine konulan materyaller diltiazem grubu (n=10), nitroprussid solüsyonu içine konulan materyaller nitroprussid grubu (n=10) ve papaverin solüsyonu içine konulan materyaller de papaverin grubu (n=10) olarak adlandırıldı. Gruplar birbiriyle hematoksilin ve eosin boyamasıyla histolojik olarak birbiriyle karşılaştırıldı. Ayrıca TUNEL metoduyla boyanan örneklerde, gruplarda bulunan her bir materyal için 50 mikroskobik alan taratıldı. Her bir materyal için sayılan 50 alandaki apoptotik hücre sayılarının ortalamaları alındı. İlaç gruplarının ortalama apoptotik hücre sayısı açısından birbiriyle karşılaştırılması için SPSS 13.0 istatistik programında bulunan Annova testi, dört grubun varyanslarını homojenliği için ise Levene testi uygulandı. Ayrıca gruplar arasındaki farkı ortaya koymak için post Hoc testi ile Tukey çoklu karşılaştırması yapıldı.

Çalışmamızda yer alan hastaların altı tanesinde diyabet olduğundan dolayı diyabetik olan ve olmayan hastalarda aynı ilaç grubu açısından apoptotik hücre sayısı oranı karşılaştırması yapıldı. Bunun için nonparametrik Mann Whitney U testi ve excat testiyle Monte Carlo sınaması uygulandı.

#### 4. BULGULAR

Hematoksin ve eosin ile boyanan İTA'e ait kesitlerde genel yapı özellikleri incelendi. Serum fizyolojik, diltiazem, nitroprussid ve papaverin grupları arasında hematoksin ve eosin boyamasının ardından yapılan mikroskopik incelemeler şekil 4.1 ve 4.2'de gösterildiği üzere boyanma özellikleri ve genel histolojik yapıları açısından birbiriyle karşılaştırıldı.

Hematoksin ve eosin ile boyanan serum fizyolojik solüsyonu içinde bekletilmiş olan İTA kesitlerinde yapılan histolojik incelemede tunika intimada yer alan ve damarın iç duvarını döşeyen endotel hücre tabakasının yapı ve bütünlüğünü koruduğu görüldü. Ayrıca tunika media ve tunika adventisya tabakalarının da intakt olduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.1a). Serum fizyolojik grubunu oluşturan örnekler arasında da hematoksin ve eosin boyamasıyla yapılan incelemede histolojik açıdan fark bulunmadı.



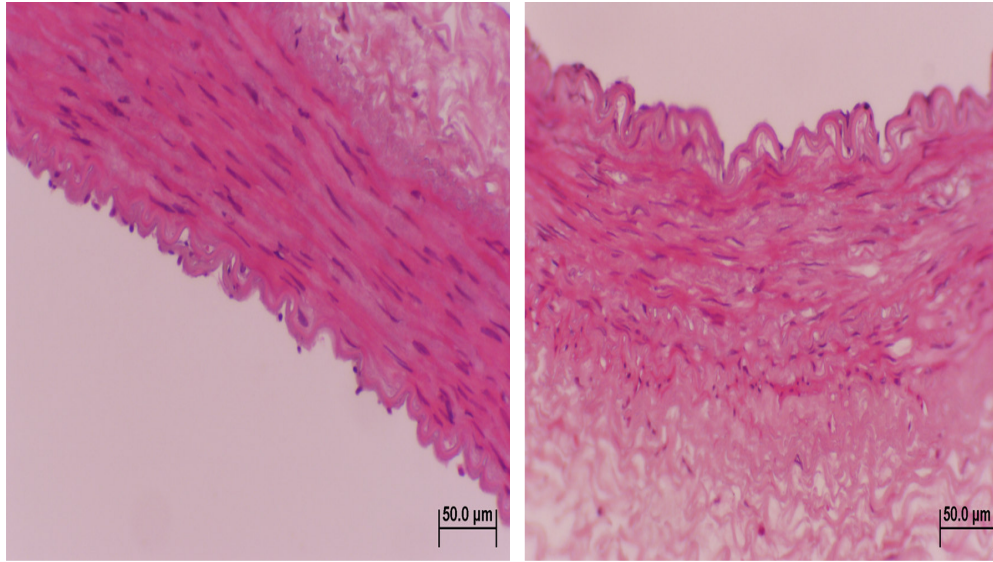
a) Serum fizyolojik grubuna ait arter kesiti (Bar 200 µm).

b) Diltiazem grubuna ait arter kesiti (Bar 50 µm).

Şekil 4.1: Hematoksin ve eosin boyası ile boyanmış serum fizyolojik grubuna (a) ve diltiazem grubuna (b) ait arter kesitleri.

Hematoksin ve eosin ile boyanan diltiazem solüsyonu içinde bekletilmiş olan İTA kesitlerinde yapılan histolojik incelemede arteriyel yapıya ait histolojik morfolojinin korunduğunu (Bkz. Şekil 4.1b) ve histolojik açıdan diğer gruplarla

arasında fark olmadığı gözlemlendi. Yine nitroprussid ve papaverin solüsyonu içinde bekletilmiş olan İTA materyallerine yapılan histolojik incelemede lümen çevresinde bulunan tunika intima, tunika medya ve tunika adventisya yapılarının korunduğunu ve tunika intimada yer alan endotel tabakasının intakt olduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.2).

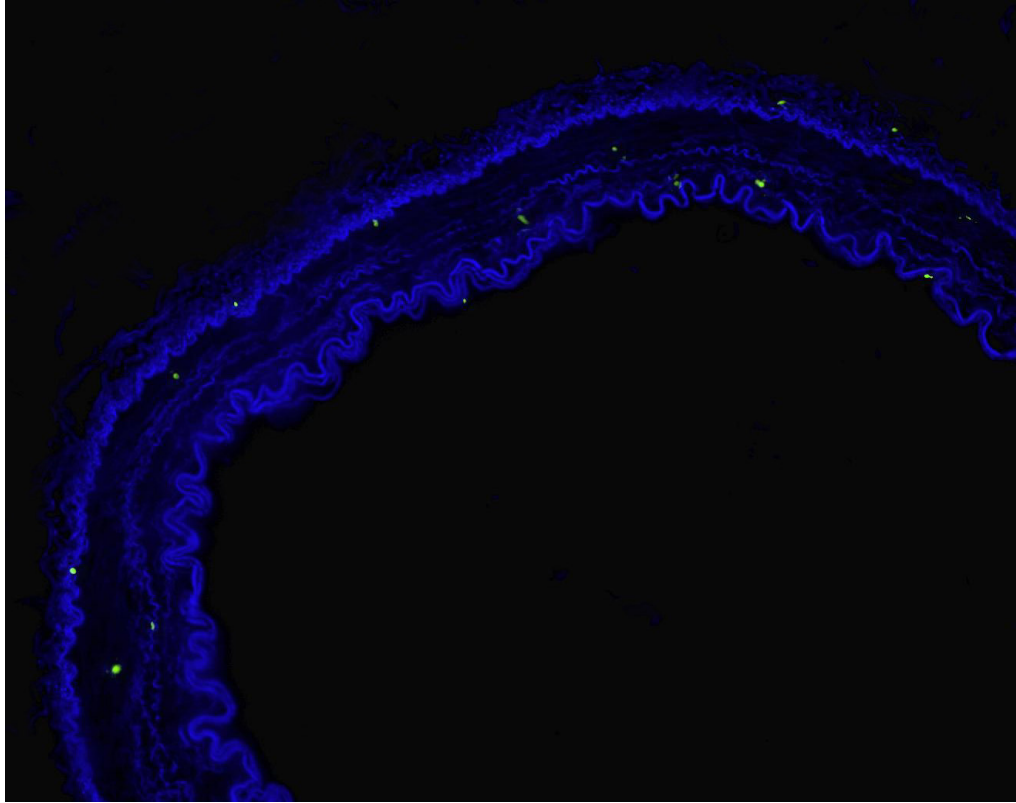


a) Nitroprussid grubuna ait arter kesiti (Bar 50 µm).

b) Papaverin grubuna ait arter kesiti (Bar 50 µm).

Şekil 4.2: Hematoksilin ve eosin boyası ile boyanmış nitroprussid grubuna (a) ve papaverin grubuna (b) ait arter kesitleri.

Hematoksilin ve eosin ile boyanmış olan kırk adet İTA materyali incelendiğinde histolojik olarak bütün arterlerin tunika intima, tunika medya ve tunika adventisyaya sahip olduğu, tunika intimada yer alan endotel tabakasının yapı ve bütünlüğünün korunduğunu gözlemledik. Bu açıdan gruplar ve örnekler arasında fark bulunmamıştır.

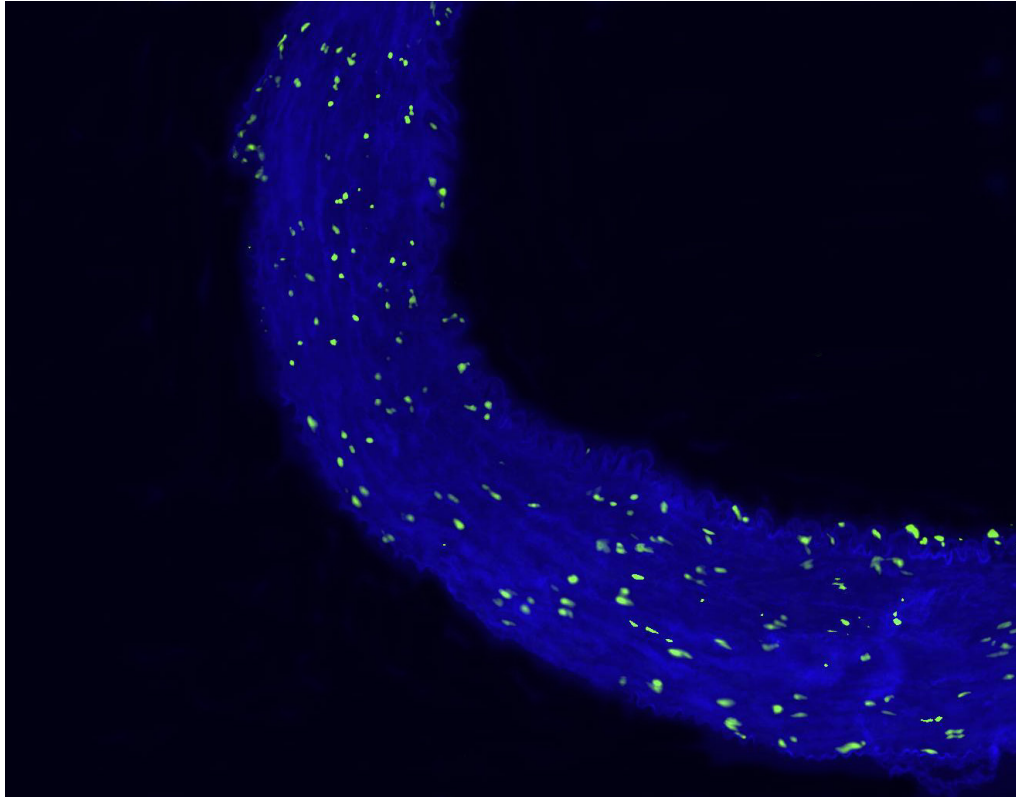


Şekil 4.3: TUNEL metodu ile boyanmış serum fizyolojik grubuna ait bir arter kesiti görülmekte (Büyütme X100). Parlak olarak gözlenen apoptotik hücreler oldukça az.

TUNEL tekniği uygulanmış İTA kesitlerinde dört gruba ait örnekler Olympus BX61 flouresan mikroskobu ile incelendi. Mikroskobik görünüm açısından yapılan incelemede en az apoptotik hücre görünümünün serum fizyolojik solüsyonu içinde bekletilmiş olan kesitlerde olduğu ve en çok apoptotik hücre görünümünün ise diltiazem solüsyonu içinde bekletilmiş olan kesitlerde olduğu gözlemlendi. Nitroprussid ve papaverin grubuna ait olan kesitlerde ise orta seviyede apoptoz olduğu gözlemlendi. Gruplara ait kesit örnekleri şekil 4.3-4.6'da gösterilmiştir.

Serum fizyolojik grubuna ait olan örnekler apoptotik hücre sayısı açısından incelendiğinde, apoptotik hücreler oldukça nadir olarak gözlenmiştir. (Bkz. Şekil 4.3). Serum fizyolojik grubuna ait 10 örnekte taranan beş yüz alanda dokuzdan daha fazla apoptotik hücre içeren alan gözlenmedi. Serum fizyolojik grubuna ait olan her bir kesit için sayılan elli alandaki apoptotik hücre sayısının ortalaması alındığında, en

az 3,88 ve en fazla 4,58 hücre olduğu bulunmuştur (Tablo 4.1). Buna göre serum fizyolojik grubunda (n=10) ortalama apoptotik hücre sayısı 4,2500 olarak hesaplanmıştır.

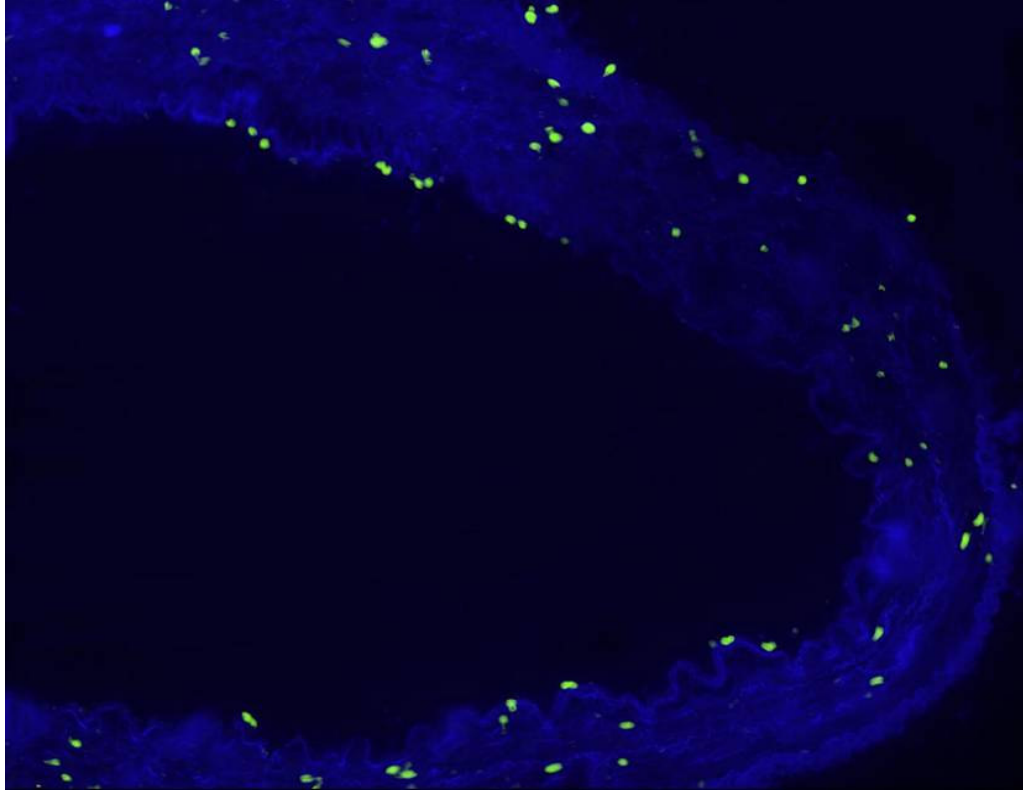


Şekil 4.4: TUNEL metodu ile boyanmış diltiazem grubuna ait bir arter kesiti (Büyütme X100). Parlak olarak gözlenen apoptotik hücreler tüm damar yapısında oldukça yoğun olarak mevcuttur.

Diltiazem grubuna ait olan kesitler incelendiğinde ise oldukça yoğun apoptotik hücreler dikkati çekmiştir (Bkz. Şekil 4.4). Apoptotik hücreler arterde bulunan tunika intima, tunika medya ve tunika adventisya tabakalarının hepsinde bulunmaktadır. Bu gruba ait örneklerde mikroskopik alanlarda sayılan en fazla apoptotik hücre sayısı yirmi iki olmuştur. Diltiazem grubuna ait olan on örneğin her biri için taranan elli alandaki apoptotik hücre sayısının ortalaması hesaplandığında, en az 12,40 ve en çok 13,76 apoptotik hücre olduğu bulunmuştur (Tablo 4.1).

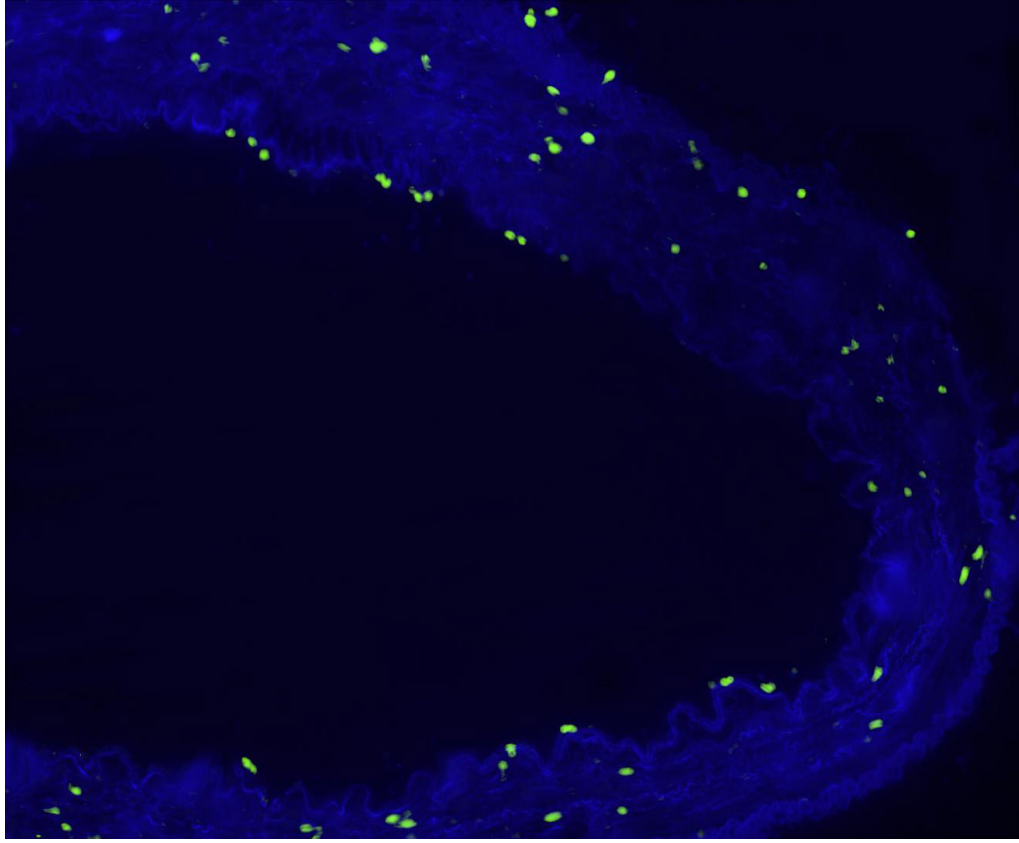


Diltiazem grubu (n=10) ortalama apoptotik hücre sayısı 13,3060 olarak en yüksek ortalamaya sahip olan grup olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.5: TUNEL metodu ile boyanmış nitroprussid grubuna ait bir arter kesiti görülmektedir (Büyütme X100).

TUNEL metodu ile boyanan nitroprussid grubuna ait İTA kesitleri mikroskopik olarak incelendiğinde yine arteriyel yapının her tabakasında apoptotik hücreler olduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.5). Bu grup içinde incelenen mikroskopik alanlara bakıldığında, sayılabilen en çok apoptotik hücre sayısı ise on sekizdi. Bu gruba ait örneklerin her biri için incelenen ellişer adet alandaki apoptotik hücre sayısı ortalamasına bakıldığında en az 8,34 ve en fazla 9,84 apoptotik hücre olduğu hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Buna göre nitroprussid grubunun (n=10) ortalama apoptotik hücre sayısı 9,4840 olarak bulunmuştur.

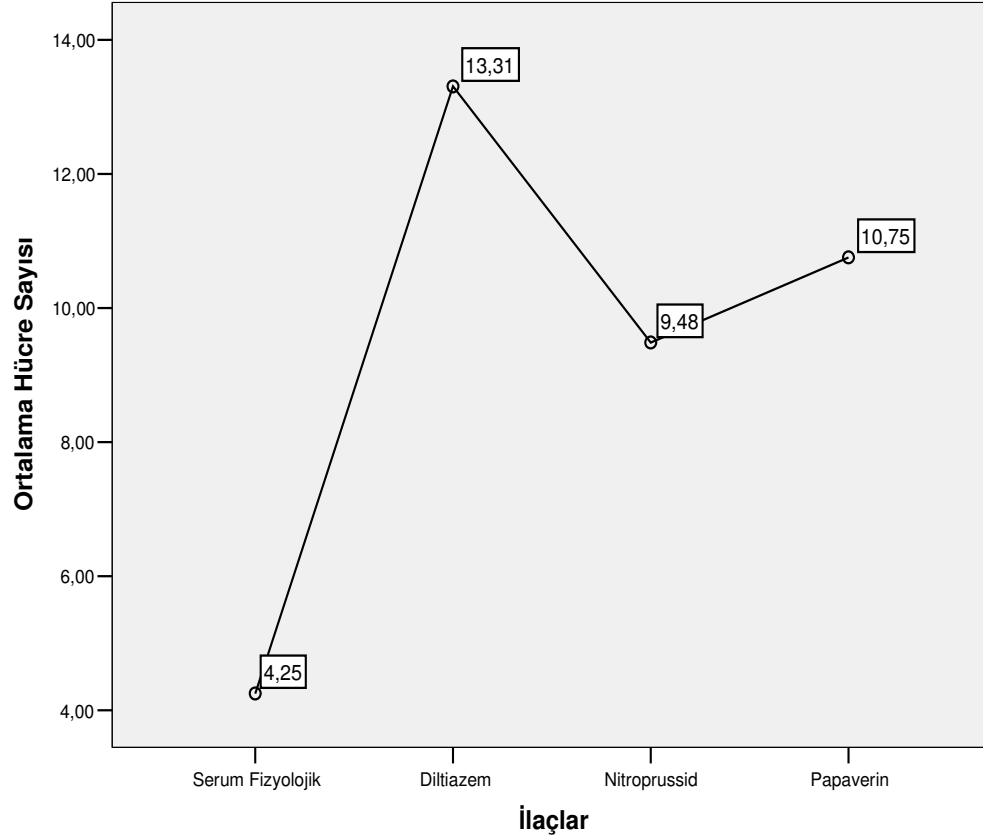


Şekil 4.6: TUNEL metodu ile boyanmış papaverin grubuna ait bir arter kesiti görülmektedir (Büyütme X100). Parlak boyanan hücreler apoptotik hücreleri göstermektedir.

Papaverin grubuna ait kesitlerde arteriyel tabakaların hepsinde apoptotik hücreler gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.6). Papaverin grubunun (n=10), sayılan apoptotik hücre ortalamaları için en az 10,06 ve en fazla 11,38 ortalamaya sahip olduğu bulunmuştur. Bu grubun da ortalama apoptotik hücre sayısı 10,7540 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Şekil 4.7’de dört farklı ilaç grubundaki her birisi için alınan on örnekteki ellişer alanda sayılan apoptotik hücre sayısı ortalamaları gösterilmiştir. Serum fizyolojik, diltiazem, nitroprussid ve papaverine ait her örneğe ait elli alandaki apoptotik hücre sayılarının ortalamaları alınıp, her grup için ortalama apoptotik hücre sayısı bulunduğu şekil 4.7’de de görüldüğü üzere ortalama apoptotik hücre sayısı en fazla diltiazem grubunda olurken, en az ortalama apoptotik hücre sayısı serum fizyolojik grubunda gözlemlendi. Nitroprussid ve papaverin grubu da serum fizyolojik

grubuna göre daha fazla ve diltiazem grubuna göre de daha az apoptotik hücre ortalamasına sahiptir.



Şekil 4.7: Ortalama apoptotik hücre sayısı açısından ilaç gruplarının karşılaştırılması.

Bu dört grup ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının testi için ANOVA (Varyans Analizi) uygulanmıştır (Tablo 4.2). ANOVA testi için grup varyanslarının homojenliğinin sağlanması gerekmektedir. Buna göre dört grubun varyanslarının homojenliği için Levene testi uygulanmıştır. Levene testi sonucuna göre ( $P= 0,061 >0,05$  olduğu için) grupların homojen oldukları bulunmuştur. Buna göre ANOVA testi sonucunda serum fizyolojik, diltiazem, nitroprussid ve papaverin gruplarının ortalama apoptotik hücre sayısı açısından istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu sonucuna varıldı. (Tablo 4.2’de gösterildiği gibi  $p= 0,0001 < 0,05$  ve  $0,01$  olduğundan dolayı.)

Tablo 4.1: Grupların ortalama apoptotik hücre sayıları.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	% 95 Ortalamaların Güven Aralığı		Minimum	Maksimum
					Alt Sınır	Üst Sınır		
<b>Serum Fizyolojik</b>	10	4,2500	,19258	,06090	4,1122	4,3878	3,88	4,58
<b>Diltiazem</b>	10	13,3060	,50014	,15816	12,9482	13,6638	12,40	13,76
<b>Nitroprussid</b>	10	9,4840	,46921	,14838	9,1483	9,8197	8,34	9,84
<b>Papaverin</b>	10	10,7540	,32756	,10358	10,5197	10,9883	10,06	11,38
<b>Total</b>	40	9,4485	3,36511	,53207	8,3723	10,5247	3,88	13,76

Tablo 4.2: Gruplar arasındaki ortalama apoptotik hücre sayılarının farkını ortaya koymak için yapılan ANOVA testi.

	Toplam Kareler	SD	Ortalama Kareler	F	P
<b>Gruplar Arasında</b>	436,103	3	145,368	945,973	,000
<b>Gruplar İçinde</b>	5,532	36	,154		
<b>Total</b>	441,635	39			

Dört grup arasındaki ortalama apoptotik hücre sayısı açısından farklılığın hangi gruplar arasında olduğunun tespitinde post Hoc testi ile Tukey çoklu karşılaştırma sonucunda, bütün grupların birbirinden farklı olduğu bulunmuştur. Gruplar birbirinden  $p=0,001<0,05$  ve  $0,01$  anlam düzeylerinde farklılık göstermiştir (Tablo 4.3). Buna göre en büyük farkın serum fizyolojik grubu ile diltiazem grubu arasında olduğu gösterilmiştir ( $-9,0560$   $P=0,001<0,05$  ve  $0,01$ ). İlaç verilen gruplar arasında ortalama apoptotik hücre sayısı açısından birbirinden karşılaştırıldığında, en az fark nitroprussid ile papaverin grubu arasında gözlenmiştir ( $-1,270$   $P=0,001<0,05$

ve 0,01). Serum fizyolojik grubu ile karşılaştırıldığında, bu grup ile arasında en az fark bulunan grup ise nitroprussid grubu olduğu bulunmuştur (-5,23400 P=0,001<0,05 ve 0,01).

Tablo 4.3: Gruplar arasındaki farkı ortaya koymak için yapılan post Hoc testi ile Tukey çoklu karşılaştırması.

(I) İlaçlar	(J) İlaçlar	Ortalama fark (I-J)	Standart Hata	P	95% Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
Serum Fizyolojik	Diltiazem	-9,05600(*)	,17531	,000	-9,5282	-8,5838
	Nitroprussid	-5,23400(*)	,17531	,000	-5,7062	-4,7618
	Papaverin	-6,50400(*)	,17531	,000	-6,9762	-6,0318
Diltiazem	Serum Fizyolojik	9,05600(*)	,17531	,000	8,5838	9,5282
	Nitroprussid	3,82200(*)	,17531	,000	3,3498	4,2942
	Papaverin	2,55200(*)	,17531	,000	2,0798	3,0242
Nitroprussid	Serum Fizyolojik	5,23400(*)	,17531	,000	4,7618	5,7062
	Diltiazem	-3,82200(*)	,17531	,000	-4,2942	-3,3498
	Papaverin	-1,27000(*)	,17531	,000	-1,7422	-,7978
Papaverin	Serum Fizyolojik	6,50400(*)	,17531	,000	6,0318	6,9762
	Diltiazem	-2,55200(*)	,17531	,000	-3,0242	-2,0798
	Nitroprussid	1,27000(*)	,17531	,000	,7978	1,7422

Çalışmada yer alan grupların her birisi için diyabetik (n=6) ve non-diyabetik (n=4) alt grupları oluşturuldu. Gruplar içindeki her örneğin ellişer mikroskopik alanındaki ortalama apoptotik hücre sayıları diyabetik ve non-diyabetik gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma için nonparametrik Mann-Whitney U

testi Excat testi ile birlikte uygulanmıştır (Tablo 4.4 ve 4.5). Monte Carlo 10 000 sınaması sonucuna göre dört ilacın diyabetik olan ve diyabetik olmayan örneklerinin, birbirinden ortalama apoptotik hücre sayısı açısından farklı olmadıkları sonucuna istatistiksel olarak ulaşılmıştır.

Tablo 4.4: İlaç gruplarının diyabetik ve non-diyabetik örnekler için Mann Whitney testi ile karşılaştırılması.

	Diyabet-Non Diyabet	N	Ort. Rank	Rank Toplamı
Serum Fizyolojik	Diyabet	6	5,75	34,50
	Non Diyabet	4	5,13	20,50
	Total	10		
Diltiazem	Diyabet	6	4,83	29,00
	Non Diyabet	4	6,50	26,00
	Total	10		
Nitroprussid	Diyabet	6	4,50	27,00
	Non Diyabet	4	7,00	28,00
	Total	10		
Papaverin	Diyabet	6	4,50	27,00
	Non Diyabet	4	7,00	28,00
	Total	10		

Her ilaç grubu için oluşturulan diyabetik ve non-diyabetik alt gruplar için uygulanan Excat testi, Monte Carlo 10 000 sınaması sonucunda; Serum fizyolojik için hesaplanan z değeri 0,05 anlam düzeyi için  $-0,321 < 1,96$  ve 0,01 anlam düzeyi için  $-0,321 < 2,58$ , ( $p = 0,799 > 0,05$  ve 0,01) olduğundan diyabetik ve non diyabetik serum fizyolojik solüsyonunda bekletilmiş olan örnekler apoptotik hücre sayısı ortalaması için farklılık göstermemektedir.

Diltiazem için hesaplanan z değeri 0,05 anlam düzeyi için  $-0,853 < 1,96$  ve 0,01 anlam düzeyi için  $-0,853 < 2,58$  ( $p = 0,476 > 0,05$  ve 0,01) olduğundan diyabetik ve non diyabetik diltiazem solüsyonunda bekletilmiş olan örnekler apoptotik hücre sayısı ortalaması için farklılık göstermedi.

Nitroprussid için hesaplanan z değeri 0,05 anlam düzeyi için  $-1,279 < 1,96$  ve 0,01 anlam düzeyi için  $-1,279 < 2,58$  olduğundan ( $p = 0,255 > 0,05$  ve 0,01) olduğundan diyabetik ve non diyabetik nitroprussid solüsyonunda bekletilmiş olan örnekler apoptotik hücre sayısı ortalaması için farklılık göstermemektedir.

Papaverin için hesaplanan z değeri 0,05 anlam düzeyi için  $-1,279 < 1,96$  ve 0,01 anlam düzeyi için  $-1,279 < 2,58$  olduğundan ( $p = 0,255 > 0,05$  ve 0,01) olduğundan diyabetik ve non diyabetik papaverin solüsyonunda bekletilmiş olan örnekler apoptotik hücre sayısı ortalaması için farklılık göstermemektedir.

Tablo 4.5: İlaç gruplarının diyabetik ve non-diyabetik örnekleri için Excat testi uygulanarak Monte Carlo 10.000 sınaması.

			Serum Fizyolojik	Diltiazem	Nitroprussid	Papaverin
<b>Mann-Whitney U</b>			10,500	8,000	6,000	6,000
<b>Wilcoxon W</b>			20,500	29,000	27,000	27,000
<b>Z</b>			-,321	-,853	-1,279	-1,279
<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>			,748	,394	,201	,201
<b>Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]</b>			,762	,476	,257	,257
<b>Monte Carlo Sig. (2-tailed)</b>	<b>p</b>		,799	,476	,255	,255
	<b>99% Güvenlik Aralığı</b>	<b>Alt sınır</b>	,789	,464	,243	,243
		<b>Üst Sınır</b>	,810	,489	,266	,266
<b>Monte Carlo Sig. (1-tailed)</b>	<b>P</b>		,400	,245	,132	,132
	<b>99% Güvenlik Aralığı</b>	<b>Alt Sınır</b>	,387	,234	,123	,123
		<b>Üst sınır</b>	,412	,256	,141	,141

## 5. TARTIŞMA

Koroner arter bypass cerrahisinde İTA vazgeçilemeyen ve açık kalım oranı safen ven ile karşılaştırıldığında çok iyi olan canlı bir grefttir (214). Loop ve ark. (214) ven grefti kullanılan hastaların İTA grefti kullanılan hastalardan 10 yıllık ölüm riskinin 1,61 kat daha fazla olduğunu söylemişlerdir. İTA'in spazmdan korunmasının da açık kalım oranını arttırdığı çalışmalarla da bildirilmiştir (215,216). Son ve ark. (224) *shear stres* ile İTA'in intima ve internal elastik laminasını histolojik yapısında kötü etkiler oluşabileceğini göstermişlerdir. Operasyon sırasında İTA kullanımında çeşitli vazodilatörler spazmdan korumak ve akım oranını arttırmak amacıyla kullanılmaktadır. Birçok çalışmada da İTA'de vazodilatör kullanımıyla greftin kalitesinin arttığı gösterilmiştir (127,217,218). Ancak yapılan çalışmalar göstermiştir ki kullanılan vazodilatörlerin yararlı etkilerinin yanı sıra apoptozis gibi greftin kalitesini ve ileriye yönelik etkinliğinin devamını kötü yönde etkileyebilecek etkilerinin de olması bu ilaçlar için daha fazla çalışmalar yapılması gerekliliğini getirmiştir. Bu ilaçların faydalarının ve zararlı etkilerinin daha açık bir şekilde ortaya konulması hem yapılan operasyonların başarısını arttıracak hem de hastaların ileride karşılaşılabileceği bazı problemlerin de önüne geçilebilecektir. Günümüzde İTA'i vazospazmdan korumak ve akımını arttırmak amacıyla en çok kullanılan ilaçlardan olan diltiazem, nitroprussid ve papaverin bizim çalışmamızda da kullanıldı.

Vasküler yapıların en önemli komponentlerinden biri olan endotelyum, normal kan damarlarının duvarlarında anti-trombotik ve anti-inflamatuvar bir bariyer görevi ile damarı korumaktadır. Endotel prostasiklin gibi vazorelaksan ajanların salınımıyla vasküler tonusu düzenlemektedir. Bu hücreler apoptoza giderlerse normal fonksiyonlarını kaybederler ve damardan atılırlar veya komşu hücrelerce temizlenirler (122). Endotel hücrelerinin disfonksiyonunun aterogenezis oluşumuna yol açabileceği gösterilmiş ve aşırı apoptoz oluşumunun da aterogeneze yol açabileceği söylenmiştir (196). Arteriyel vasküler yapıların fonksiyonunda diğer önemli bir komponentde vasküler düz kas yapısıdır. Vasküler düz kaslardaki apoptozun aterosklerotik plaklarda rüptür oluşumuna (99,100), tromboz riskinin artmasına (101) ve plak kalsifikasyonlarına yol açtığına (101) çeşitli çalışmalarda değinilmiştir. Bu açıdan arteriyel greftlerde bütün vasküler tabakaların apoptozdan



korunabilmesi ya da daha az apoptoz yapan ilaçların kullanılması çalışmamıza yön veren nedenlerin başında gelmiştir.

Diltiazem, bir kalsiyum kanal blokörüdür ve koroner bypass cerrahisinde arteriyel greftleri vazospazmdan korumak için topikal ve sistemik olarak kullanılmaktadır. Y. Tabel ve ark. (221) yaptığı bir çalışmada diltiazem infüzyon olarak İTA diseksiyonu süresince verilmiş ve nitrogliserin ile yapılan karşılaştırmada diltiazemin nitrogliserinden daha iyi bir akım sağladığı gösterilmiştir. Ancak diltiazemin arteriyel greftlerdeki faydalı etkilerinin yanı sıra, yine bir kalsiyum kanal blokörü olan verapamil ile Pei Huang ve ark. (172) yaptığı vasküler greft modeli çalışmasında verapamilin adventisyel hücre apoptozunu arttırdığı gösterilmiştir. Vasküler greft modeli çalışmasında adventisyel apoptozla intimal hiperplazide yeni hücre oluşumunu engelleyerek faydalı bir etki gösterdiği anlatılsa da, arteriyel yapılarda apoptozun birçok zararlı etkisi gösterilmiştir. Çalışmamızda İTA üzerine topikal olarak uygulanan diltiazemin ilaç uygulanmamış hastalarla kıyaslandığında oldukça fazla apoptoz yaptığını gördük. Ayrıca diltiazem diğer ilaçlarla (nitroprussid ve papaverin) karşılaştırıldığında da en fazla apoptoz oranına sahip olan ilaç olduğu gösterildi. Buda diltiazemin İTA' i vazospazmdan korumak için kullanımının her ne kadar faydalı olduğu düşünülse de, yüksek apoptoz yapma potansiyelinden dolayı greftin ileri dönemlerdeki etkinliği için soru işaretlerine neden olmaktadır. He ve ark. (217) yaptığı bir çalışmada İTA'de vazodilatasyon sağlamak amacıyla gliseril trinitrat ve başka bir kalsiyum kanal blokörü olan verapamil kullanılmış, sonuç olarak da verapamil farklı bir seçenek olarak önerilmiştir. Her ne kadar çalışmamızda verapamilin apoptotik etkileri araştırılmamış ve apoptotik etkilerinin olduğu başka çalışmalarda gösterilmiş olsa da kalsiyum kanal blokörlerinin arteriyel greftlerde vazodilatasyon yapmak için kullanılabilmesi için diltiazemle verapamilin İTA'de yaptığı apoptozun karşılaştırılması oldukça yararlı olabilir.

Koroner bypass cerrahisinde İTA'i vazospazmdan korumak için kullanılan diğer bir ilaçta nitroprussiddir. Nitroprussid bir NO donörü olarak görev yapar ve vazodilatasyon sağlar. Copper ve ark. (220) yaptığı çalışmada İTA'e topikal olarak salın, papaverin ve nitroprussid verilmiş ve akım oranları karşılaştırıldığında nitroprussidin salın ve papaverine göre daha etkili olduğu söylenmiştir. NO'in önceki çalışmalarda apoptozda iki taraflı regülasyon yaptığı gösterilmişti (194).

Vasküler endotel hücrelerde anti-apoptotik etki gösterirken (178), vasküler düz kas hücrelerinde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (182). Ayrıca az miktardaki NO'nin c-GMP aracılı yol ve direkt olarak kaspaz aktivitesinin inhibisyonu ile apoptozu inhibe ettiği (226,227), daha yüksek konsantrasyonlarda ise apoptozu neden olduğu düşünülmektedir (189). He ve Yong (219) yaptığı çalışmada nitroprussidin 1,7 mmol/L (0,5 mg/ml) konsantrasyonunda güçlü vazodilatör etki gösterdiğini bulmuşlardır. Çalışmamızda nitroprussidin vazodilatör etkisinin daha iyi olması için klinikte kullanılan dozlamı olan 10 ml %5 dekstoz içinde çözünmüş olan 5 mg sodyum nitroprussid solüsyonu kullanıldı. Bu yüksek konsantrasyon değerinde nitroprussid grubuna ait alan örneklerin ortalama apoptotik hücre sayısı değerlendirildiğinde nitroprussid grubunda serum fizyolojik grubuna göre apoptoz oranında anlamlı bir artış bulunurken (5,23400 P=0,001<0,05 ve 0,01), diltiazem ve papaverinle kıyaslandığında her ikisine göre de daha az apoptotik hücre sayısı ortalaması bulundu. Nitroprussidin etkili bir vazodilatör olması ve çalışmada yer alan diğer iki vazodilatör olan diltiazem ve papaverine göre daha az apoptozu yol açması bizim çalışmamıza göre nitroprussidi oldukça avantajlı bir konuma getirmektedir.

İTA'de vazodilatasyon yapmak için en çok kullanılan ilaçlardan biride papaverindir. Papaverin vazodilatasyon etkisini spazm varlığında daha iyi göstermektedir. Diğer ilaçların aksine papaverinin koroner bypass cerrahisinde İTA vazospazmına olan etkisi için birçok çalışma yapılmıştır. Jett ve ark. (222) yaptığı çalışmada papaverinin birçok vazodilatörden farklı olarak insan İTA'de hem potasyum hem de norepinefrin kaynaklı kontraksiyonu en çok inhibe eden ilaç olduğu gösterilmiştir. Sasson ve ark. (223) yaptıkları çalışmada ise topikal vazodilatörlerin vazodilatasyonda belirgin etkilerinin olmadığını söylemişler. Ancak bu fikrin yapılan birçok çalışmayla aksi kanıtlanmış ve topikal vazodilatasyonun etkileri gösterilmiştir. Papaverinin intraluminal uygulanmasıyla ilgili yapılan çalışmalarda eksternal uygulamaya oranla iki kata kadar daha iyi akım sağladığı ve distal dilatasyon yaptığı söylenmiş ancak mekanik damar duvarı hasarı oluşabileceği anlatılmıştır (135). Papaverinin endotel üzerine olan etkileri de oldukça tartışmalıdır. Hillier ve ark. (127) yaptığı çalışmada koroner bypass sırasında intraluminal papaverin kullanımının endotel kaynaklı gevşemeyi bozmadığı gösterilmiş olmasına rağmen, Schyvens ve ark. (124) yaptığı çalışmada greft olarak kullanılan arterlerde

papaverinin endotel kaynaklı gevşemeyi bozduğu, He (128) yaptığı çalışmada asetilkolin kaynaklı gevşemeninde bozulduğu anlatılmıştır. Sonuç olarak papaverinin koroner bypass hastalarında greft vazodilatasyonunda yaygın olarak kullanılmasından dolayı pek çok çalışma yapılmış ve bu konuda pek çok fikir ortaya atılmıştır.

Papaverinin kullanımında tartışmaya yol açan başka bir konuda papaverin solüsyonunun asiditesidir. Papaverin HCl sadece asit ortamda çözünebilmektedir (pH 3.9,  $10^{-2}$  mol/L). Klinikte ve bizim çalışmamızda kullanılan form bu şekildedir. Yapılan bir çalışmada papaverin solüsyonunun asiditesinin vasküler hücrelerde hasara yol açabileceği söylenmiştir (125). Köpek İTA'ı kullanılarak yapılan başka bir çalışmanın sonucunda papaverinin asidifiye olmasından değil ama papaverinin kendisinden kaynaklanan bir etkiyle endotelial hücre hasarı yaptığı yorumu kullanılmıştır (122). Aynı çalışmada yer alan başka bir yorumda papaverinin endotelial fonksiyonu bozucu etkisinin endotel hücrelerinde papaverinin oluşturduğu apoptozdan kaynaklanabileceği söylenmiştir. Endotel hücrelerinin vasküler olaylardaki rolü zaten bilinmektedir. Papaverin de hücre içi cAMP düzeyini artırarak (129–131), kalsiyum antagonisti gibi davranarak (132,133) ve mitokondriyal fonksiyonu bozarak apoptoz oluşturduğu birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Ayrıca papaverinin hem tunika intima, hem tunika medya ve hem de tunika adventisya da yaptığı apoptozla insan ve köpek İTA de yaptığı fonksiyonel bozukluklar Yu-Jing Gao ve ark. (122) tarafından yapılan çalışmada net olarak gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da histolojik olarak bu çalışmaya çok benzer sonuçlar ortaya konuldu. Papaverinin serum fizyolojik ile yapılan karşılaştırmasında papaverinin İTA'in tüm katmanlarında apoptoza yol açtığı ve apoptoz oranı serum fizyolojik ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak papaverinin daha fazla apoptoza yol açtığı gösterildi (  $6,50400$   $P=0,001<0,05$  ve  $0,01$ ). Ayrıca papaverinin diltiazem ve nitroprussid ile yapılan karşılaştırmasında diltiazemden az nitroprussidden daha çok apoptoz yaptığı bulundu. Diğer çalışmalarda birlikte değerlendirildiğinde papaverinin apoptoz yapıcı etkisinin yapabileceği güçlü vazodilatasyonla birlikte düşünülüp, diğer ilaçlarla olan kıyasında bu etkilerinin göz önünde tutulmasının yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışma esnasında akla gelen bir diğer soru da, diyabetik hastalarla diyabetik olmayan hastaların arasında çalışmada adı geçen ilaçların İTA'e topikal uygulamacında apoptoz oranı açısından fark yaratıp yaratmadığı oldu. Bazı çalışmalarda yüksek glikoza maruz kalan endotel hücrelerinde apoptoza eğilimin arttığından bahsedilmekte ve bunun için değişik mekanizmalar öne sürülmektedir (206–213). Bizim çalışmamızda hiçbir ilaca maruz kalmayan serum fizyolojik solüsyonuyla muamele edilen İTA kesitlerinde diyabetik olan ve olmayan hastaların apoptoz oranı açısından fark göstermediği ortaya çıktı. Ayrıca diltiazem, nitroprussid ve papaverin grupları diyabetik sınıflama ile ayrı ayrı kendi içinde incelendiğinde, diyabetik olanlarla olmayanlar arasında apoptoz oranı açısından hiçbir ilacın farklı yanıt vermediği ortaya çıktı. Diyabetik hastalarda kullanılan İTA greftlerindeki apoptoz oranıyla ilgili literatürde net bir bilgi olmasa da diyabetli hastaların apoptoz potansiyeli açısından bu konuda diyabeti hastalardan farklı olmadığını bizim çalışmamıza göre söyleyebiliriz. Ancak diyabetin sistemik bir hastalık olması ve özellikle regüle olmayan diyabetli hastaların bütün vasküler yapılarının bu hastalıktan etkilendiği düşünülürse, bu hasta grubunda İTA kalitesinin diyabetik olmayan hastalardan farklı olabileceği akılda tutulmalıdır.

## 6. SONUÇ

Koroner bypass cerrahisi günümüzde koroner arter hastalarının tedavi edilmesinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu operasyonun da vazgeçilemeyen ve yapılan çalışmalarda uzun açıklık oranlarıyla en çok kullanılan greftlerden biri olan İTA'nın kalitesi çok önemlidir. İTA'ya faydalı olduğunu düşündüğümüz ve onu vazospazmdan korumak için kullandığımız ilaçların etkileri de çok dikkatli ve ayrıntılı olarak tartışılmalıdır. Bu noktada amacımız en az zararlı en çok faydayı veren ilaçları kullanarak greftten en iyi şekilde yararlanabilmektir.

Vasküler düz kas ve özellikle endotel hücrelerinin vasküler olaylardaki rolü bilinmekte ve buralarda oluşan apoptozun koroner bypass gibi bir operasyonda kullanılan İTA grefti için ne kadar büyük bir öneme sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. Apoptoz oranının uygunsuz olarak artışı organ bütünlüğünün bozulmasına neden olabileceği (228) zaten bilinen bir gerçektir.

Bizim çalışmada kullanılan ilaçlar göz önüne alındığında diltiazemin en çok apoptoz yapan vazodilatör ilaç olduğunu, daha sonra papaverinin yine apoptoz yaptığını ancak bu açıdan diltiazeme daha üstün olduğunu gösterdik. Üç ilaç grubu içinde en az apoptoz oranına sahip olanın ise nitroprussid grubu olduğunu bulduk. Birçok çalışmada etkili vazodilatasyon yaptığı gösterilen ve bizim çalışmamızla da apoptoz oranının diltiazem ve papaverine göre daha az olduğu bulunan nitroprussid, apoptozun arteriyel vasküler yapılarda gösterdiği etkiler düşünüldüğünde kullanılabilirliği açısından daha güvenilir gibi görünmektedir. Çalışmadaki diyabetik hastalarla diyabetik olmayan hastalar açısından konu incelendiğinde, bu hastaların İTA üzerinde ilaçlarla oluşan apoptotik yanıtlarının aynı olduğu bulundu.

Ancak bütün bu konularda yapılabilecek daha farklı çalışmalarla hem daha güçlü vazodilatasyon yapan ve hem de daha az apoptoza neden olan ilaçların araştırılması veya apoptozu azaltabilecek yeni ilaçlarla yapılan çalışmaların geliştirilmesi, İTA'nın daha kaliteli bir şekilde kullanımında oldukça faydalı olabileceği kanaatindeyiz.

**KAYNAKLAR**

1. Beck CS. Coronary artery disease: physiologic concepts; surgical operation. *Ann Surg* 145(4): 439–60, 1957.
2. Vineberg Am, Shanks J, Pifarr'e R, Criollos R, Kato Y, Baichwal Ks, Myocardial Revascularization By Omental Graft Without Pedicle: Experimental Background And Report On 25 Cases Followed 6 To 16 Months. *J Thorac Cardiovasc Surg* 49: 103–29, 1965.
3. Vineberg AM. The Vineberg Operation. I. Revascularization of the heart. *JAMA* 195(8): Suppl: 43–7, 1966.
4. Vineberg AM. Revascularization of the entire heart by internal mammary artery implantation, epicardiectomy and free omental graft. *Can Med Assoc J* 94(8): 378–85, 1966.
5. Favaloro RG. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique. *Ann Thorac Surg* 5(4): 334–9, 1968.
6. Kolesov VI, Kolesov EV. Twenty years results with internal thoracic artery-coronary artery anastomosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 101(2): 360-1, 1991.
7. Green GE. Internal mammary artery-to-coronary artery anastomosis. Three years experience with 165 patients. *Ann Thorac Surg* 14(3): 260-71, 1972.
8. Green GE, Stertzer SH, Reppert EH. Coronary arterial bypass grafts. *Ann Thorac Surg* 1968; 5(5): 443-50, 1968.
9. Lytle BW, Loop FD, Cosgrove DM, Ratliff NB, Easley K, Taylor PC. Long term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 89(2): 248-58, 1985.
10. Lytle BW, Loop FD, Thurer RL, Groves LK, Taylor PC, Cosgrove DM. Isolated left anterior descending coronary atherosclerosis: long term comparison of internal mammary artery and venous autografts. *Circulation* 61(5): 869-74, 1980.

11. Pick AW, Orszulak TA, Anderson BJ, Schaff HV. Single versus bilateral internal mammary artery grafts: 10-year outcome analysis. *Ann Thorac Surg* 64(3): 599-605, 1997.
12. Mestres CA, Rives A, Igual A, Vehi C, Murtra M. Atherosclerosis of the internal mammary artery. Histopathological analysis and implications on its results in coronary artery bypass graft surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 34(6): 356-8, 1986.
13. Vahl CF, Carl I, Muller-Vahl H, Struck E. Brachial plexus injury after cardiac surgery. The role of internal mammary artery preparation: a prospective study on 1000 consecutive patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 102(5): 724-9, 1991.
14. He GW, Ryan WH, Acuff TE, Yang CQ, Mack MJ. Greater contractility of interna mammary artery bifurcation: possible cause of low patency rates. *Ann Thorac Surg* 58(2): 529-32, 1994.
15. de Jesus RA, Acland RD. Anatomic study of the collateral blood supply of the sternum. *Ann Thorac Surg* 59(1): 163-8, 1995.
16. Cunningham JM, Gharavi MA, Fardin R, Meek RA. Considerations in the skeletonization technique of the internal thoracic artery dissection. *Ann Thorac Surg* 54(5): 947-51, 1992.
17. Kass E J, Belman A B. Reversal of testicular growth by varicocele ligation. *J Urol*,137:145, 1987.
18. Saypol D C, Howards S S, Turner T T. influence of surgically induced varicocele in testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs: *J Clin Invest*, 68:39, 1981.
19. Li M, Ona V O, Chen M, Kaul M, Tenneti L, Zhang X, Stieg P E, Lipton S A, Friedlander R M. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 99: 333-342, 2000.
20. Lu J, Ashwell K, Ken W S, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine* 25: 1859-1866, 2000.

21. Keane R W, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea J R, Krajewski S, Reed J C, Dietrich W D. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 422-429, 2001.
22. Choi W S, Lee E H, Chung C W. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. *J Neurochem* 77:1531-1541, 2001.
23. Newton K, Strasser A: The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 8: 68-75, 1998.
24. Nakamura K, Bossy-Wetzell E, Burns K, et al. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* 150: 731-740, 2000.
25. Ameisen J S. The origin of programmed cell death. *Science* 272: 1278, 1996.
26. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462, 1995.
27. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin* 18: 482-491, 1998.
28. Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-245, 1972.
29. Bellamy C O, Malcomson R D, Harrison D J, Wyllie A H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 6: 3-16, 1995.
30. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 146: 3-15, 1995.
31. Schwartzman R A, Cidloski J A. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 14: 133-144, 1993.
32. Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980.



33. Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 15: 35-43, 1993.
34. Cohen J J. Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130, 1993.
35. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992.
36. Takahaski K, Schwarz E, Ljubetic C, Murray M, Tessler A, Saavedra RA. DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats. *J Comp Neurol* 404: 159-71, 1999.
37. Rao R V, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276: 869-874, 2001.
38. Bao F and Liu D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3. *Neuroscience* 116: 59-70, 2003.
39. Akins P T, Liu P K, Hsu C Y. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: Friend or Foe ?. *Stroke* 27: 1682-1687, 1996.
40. Millerk D M, Blume S, Borst M. Oncogenes: Malignant transformation and modern medicine. *Am J Med Sci* 300: 59-65, 1990.
41. Nowell P C. Cytogenetics of tumor progression. *Cancer* 65: 2172-2175, 1990.
42. Caotes P J, Hales S A, Hall P A. The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. *J Pathol* 178: 71-7, 1996.
43. Nakano R. Apoptosis: Gene directed cell death. *Horm Res* 48: 2-4, 1997.
44. Wyllie A H. The genetic regulation of apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 97-104, 1995.

45. Miyashita T, Krajewski S, Krajewski M. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 bax gene expression in vivo. *Oncogene* 9: 1799-1805, 1994.
46. Spencer S, Cataldo N A, Jaffe R B. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and Gynecological Survey* 5: 314-323, 1996.
47. Evan G L, Wyllie A H, Gilbert G S, Littlewood T D, Lond H, Breaks M. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69: 119-128, 1992.
48. Wagner A J, Small M B, Itoy N. Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2. *Mol Cell Biol* 13: 2432-2440, 1993.
49. Wingrave J M, Schaefer K E, Sribnick E A. Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *Journal of Neuroscience Res.* 73: 95-104, 2003.
50. Eastman A. Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. *Cancer Biology* 6: 45-52, 1995.
51. Balakumran A, Champbell G A, Maslen M T. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 139: 122-127, 1996.
52. Bortner C D, Oderburg N B E, Crdlowski J A. The role of fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 5: 21-28, 1995.
53. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist* 4:332-9, 1999.
54. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Archiv Exp. Pathol* 13: 18-54, 1988.
55. Marion MacFarlane & Ann C. Williams, *EMBO reports* 5, 7, 674-678; 2004.
56. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom.* 13: 102-7, 2001.

57. Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 269-90, 1999.
58. Hart S. The drama of cellular death. *Bioscience* 44: 451-5, 1994.
59. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Official Publication of The American College of Chest Physicians (CHEST)* 117: 1771-7, 2000.
60. Hetts SW. To die or not to die. *The Journal of The American Medical Association (JAMA)* 279: 300-7, 1998.
61. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266 : 699-717, 1999.
62. Kaipia A, Hsueh AJW. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology* 59: 349-63, 1997.
63. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology* 16: 395- 419, 1998.
64. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal/( Clinical Research Ed.) (BMJ)* 322: 1536-8, 2001.
65. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. *Annual Review of Microbiology* 53: 577-628, 1999.
66. Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* 14: 1340-44, 2000.
67. Lockshin RA, Beaulaton J. Cell death: questions for histochemists concerning the causes of the various cytological changes. *Histochem J* 13: 659-666, 1981.
68. Morris Rg, Duvall ED, Hargreaves AD, Wyllie AH. Hormone-induced cell death. II. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am J Pathol* 115: 426-436, 1984.

69. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306, 1980.
70. Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, Harmoon B, Kerr JFR. An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol* 116: 129-138, 1975.
71. Don MM, Ablett G, Bishop CJ, Bundesen PG, Donald KJ, Searle J, Kerr JFR. Death of cells by apoptosis following attachment of specifically allergized lymphocytes in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 55: 407-417, 1977.
72. Adrain, C, Creagh, E. M, and Martin, S. J. Caspase Cascades in Apoptosis. Caspases-their role in cell death and cell survival. Ed. Marek Los and Henning Walczak. *Molecular Biology Intelligence Unit* 24. New York: New York, 41-51, 2002.
73. Hague, A., and Paraskeva, C. Apoptosis and disease: a matter of cell fate. *Nature Cell Death and Differentiation* 3 September. 1-7 2004.
74. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin K. M, Krammer P. H. Autocine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*. 6513, 438-441, 1995.
75. Tartaglia L. A, Rothe M, Hu Y. F, Goeddel D. V. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signalled b the p55 TNF receptor. *Cell*. 72, 213-216, 1993.
76. Kitson J, Raven T, Jiang Y. P, Goeddel D. V, Giles K. M, Pun K. T, Grinham C. J, Brown R, Farrow S. N. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature*. 6607, 372-375, 1996.
77. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan A. M., Gentz R., Ebner R., Ni J., Dixit V. M. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*. 276, 111-113, 1997.
78. MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula S. M, Fernandes-Alnemri , Cohen G. M, Alnemri E. S. Identification and molecular cloning of two novel

- receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 272, 25417-25420, 1997.
79. Ashkenazi A, Dixit V. M. Death receptors: signalling and modulation. *Science.* 5381, 1305-1308, 1998.
  80. Marsters S. A, Sheridan J. P, Pitti R. M, Brush J, Goddard A, Ashkenazi A. Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr. Biol.* 8, 525-528, 1998.
  81. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan A. M, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit V. M. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science.* 276, 111-113, 1997.
  82. Walczak H, Degli-Esposti M. A, Johnson R. S, Smolak P. J, Waugh J. Y, Boiani N, Timour M. S, Gerhart M. J, Schooley K. A, Smith C. A, Goodwin R. G, Rauch C. T. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16, 5386-5397, 1997.
  83. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal.* 16, 139-144, 2004.
  84. Takahashi, R, Deveraux, Q, Tamm, I, Welsh, K, Assa-Munt, N, Salvesen, GS and Reed, JC. "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases." *J Biol Chem* 273(14): 7787-90, 1998.
  85. Salvesen, GS and Duckett, CS. "IAP proteins: blocking the road to death's door." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(6): 401-10, 2002.
  86. Huang, Y, Park, YC, Rich, RL, Segal, D, Myszka, DG and Wu, H. "Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain." *Cell* 104(5): 781-90, 2001.
  87. Srinivasula, SM, Hegde, R, Saleh, A, Datta, P, Shiozaki, E, Chai, J, Lee, RA, Robbins, PD, Fernandes-Alnemri, T, Shi, Y and Alnemri, ES. "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." *Nature* 410(6824): 112-6, 2001.

88. Yang, Y, Fang, S, Jensen, JP, Weissman, AM and Ashwell, JD. "Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli." *Science* 288(5467): 874-7, 2000.
89. Huang, H, Joazeiro, CA, Bonfoco, E, Kamada, S, Levrson, JD and Hunter, T. "The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7." *J Biol Chem* 275(35): 26661-4, 2000.
90. Suzuki, Y, Nakabayashi, Y, Nakata, K, Reed, JC and Takahashi, R. "X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes." *J Biol Chem* 276(29): 27058-63, 2001.
91. Du, C, Fang, M, Li, Y, Li, L and Wang, X. "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* 102(1): 33-42, 2000.
92. Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nature Cell Biol.* 5, 1051–1061, 2003.
93. Orrenius S, McCabe M J Jr, Nicotera P. Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett.* 64/65: 357-364, 1992.
94. McConkey D J, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J Leukoc Biol* 59: 775-783, 1996.
95. Oshimi Y, Miyazaki S. Fas antigen-mediated DNA fragmentation and apoptotic morphologic changes are regulated by elevated cytosolic Ca<sup>2+</sup> level. *J Immunol* 154: 599-609, 1995.
96. Lain M, Dubyak G, Chen L, Ntmez G, Miesfeld RL, Distelhorst C W. Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6569-6573, 1994.

97. Matin M C, Fernandez A, Bick R J et al. Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Oncogene* 12: 2259-2266, 1996.
98. McConkey D J, Hartzell P, Duddy S K, Hakansson H, Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherogenesis: implications for plaque destabilization. *Eur Heart J* 19 Suppl G: G23-8, 1998.
99. Von der Thusen JH, van Vlijmen BJ, Hoeben RC, Kockx MM, Havekes LM, van Berkel TJ, Biessen EA. Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice after adenovirus-mediated transfer of p53. *Circulation* 105: 2064-70, 2002.
100. Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Research* 45: 736-46, 2000.
101. Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR. Thrombin generation by apoptotic vascular SMCs. *Blood* 89: 4378-84, 1997.
102. Orrenius S. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by Ca<sup>2+</sup> mediated endonuclease activation. *Science* 14; 242: 256-259, 1988.
103. Bellomo G, Perotti M, Taddei F et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca<sup>2+</sup> concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res* 52: 1342-1346, 1992.
104. Vito P, Lacana E, D'Adamio L. Interfering with apoptosis: Ca<sup>2+</sup>-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science* 271: 521-525, 1996.
105. Orrenius S, McConkey D J, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 10: 281-285, 1989.
106. An S, Knox K A. Ligation of CD40 rescues Ramos-Burkitt lymphoma B cells from calcium ionophore- and antigen receptor-triggered apoptosis by inhibiting activation of the cysteine protease CPP32/Yama and cleavage of its substrate PARP. *FEBS Lett* 386: 115-122, 1996.

107. David J. McConkey,<sup>1</sup> and Sten Orrenius. The Role of Calcium in the Regulation of Apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 239, 357–366, 1997.
108. Hewish, D. R. and Burgoyne, L. A. Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 52, 504–510, 1973.
109. Vanderbilt, J. N, Bloom, K. S, and Anderson, J. N. Endogenous nuclease: Properties and effects on transcribed genes in chromatin. *J. Biol. Chem.* 257, 13009–13017, 1982.
110. Melino, G, Annicchiarico-Petruzzeli, M, Piredda, L, Candi, E, Gentile, V, Davies, P. J, and Piacentini, M. Tissue transglutaminase and apoptosis: Sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6584–6596, 1994.
111. Jordan, J, Galindo, M. F, and Miller, R. J. Role of calpain- and interleukin-1 beta converting enzyme-like proteases in the beta-amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture. *J. Neurochem.* 68, 1612–1621, 1997.
112. Verkleij, A. J, Zwaal, R. F, Roelofsen, B, Comfurius, P, Kastelijn, D, and van Deenen, L. L. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochem. Biophys. Acta.* 323, 178–193, 1973.
113. Zwaal, R. F, Roelofsen, B, Comfurius, P, and van Deenen, L. L. Organization of phospholipids in human red cell membranes as detected by the action of various purified phospholipases. *Biochem. Biophys. Acta.* 406, 83–96, 1975.
114. Bevers, E. M, Verahllen, P. F, Visser, A. J, Comfurius, P, and Zwaal, R. F. Bidirectional transbilayer lipid movement in human platelets as visualized by the fluorescent membrane probe 1[4-(trimethylammonio)phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene. *Biochemistry* 29, 5132–5137, 1990.



115. Hata, S, Fukuo, K, Morimoto, S, Eguchi, Y, Tsujimoto, Y. and Ogihara, T. Vascular smooth muscle maintains the levels of Bcl-2 in endothelial cells. *Atherosclerosis* 154, 309–316, 2001.
116. Gordon, D, Reidy, M. A, Benditt, E. P. and Schwartz, S. M. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4600–4604, 1990.
117. Badimon, J.J. et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 99, 1780–1787, 1999.
118. Bach, R. and Rifkin, D.B. Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6995–6999, 1990.
119. Mallat, Z. et al. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99, 348–353, 1999.
120. Asai, K. et al. Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1493–1499, 2000.
121. Boulanger, C.M, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedqui A, Mallat Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 104, 2649–2652, 2001.
122. Gao Y-J, Yang H, Teoh K, Lee RMKW. Detrimental effect of papaverine on the human internal thoracic artery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 126(1); 179-185, 2003.
123. Sason L, Cohen AJ, Hauptman E, Schachner A. Effect of topical vasodilators on internal mammary arteries. *Ann Thorac Surg.* 59: 494-6, 1995.
124. Schyvens CG, Owe-Young RA, Spratt PM, Mundy JA, Farnsworth AE, Macdonald PS. Papaverine abolishes endothelium-dependent dilatation of

- human internal mammary arteries in vitro. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 24(2–3): 223–8, 1997.
125. Cooper GJ, Gillot T, Parry EA, Kennedy A, Wilkinson GA. Papaverine injures the endothelium of the internal mammary artery. *Cardiovascular Surgery*. 3(5): 553–5, 1995.
126. GaoY.J, Stead S, Lee R.M.K.W. Papaverine induces apoptosis in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Life Sci*. 70: 2675-85, 2002.
127. Hillier C, Watt PA, Spyt TJ, Thurston H. Contraction and relaxation of human internal mammary artery after intraluminal administration of papaverine. *Annals of Thoracic Surgery* 53(6): 1033–7, 1992.
128. He G-W. Verapamil plus nitroglycerin solution maximally preserves endothelial function of the radial artery: comparison with papaverine solution. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 115: 1321-7, 1998.
129. Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implication of multiple isoforms. *Physiological Reviews* 75(4): 725–47, 1995.
130. Leszczynski D, Zhao Y, Luokkamaki M, Foegh ML. Apoptosis of vascular smooth muscle cells. Protein kinase C and oncoprotein Bcl-2 are involved in regulation of apoptosis in non-transformed rat vascular smooth muscle cells. *The American Journal of Pathology* 145(6): 1265–70, 1994.
131. Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26(4): 642–8, 1995.
132. Kimura M, Kobayashi S, Tadano K, Kimura I. Effects of papaverine on the relative distribution of <sup>45</sup>Ca ion in subcellular fractions of dog biliary muscles. *Biochemical Pharmacology* 33(2): 281–6, 1984.
133. Martikainen P, Isaacs J. Role of calcium in the programmed death of rat prostatic glandular cells. *Prostate* 17(3): 175–87, 1990.

134. Vilandt J, Kjaergard H, Aggestrup S, Andreasen JJ, Olesen A. Intraluminal papaverine with pH 3 doubles blood flow in the internal mammary artery. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 33(6): 330–2, 1999.
135. Dregelid E, Heldal K, Resch F, Stangeland L, Breivik K, Svendsen E. Dilation of the internal mammary artery by external and intraluminal papaverine application. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 110(3): 697–703. 1995.
136. Walia M, Sormaz L, Samson SE, Lee RM, Grover AK. Effects of hydrogen peroxide on pig coronary artery endothelium. *European Journal of Pharmacology* 400(2–3): 249–53, 2000.
137. Rubens FD, Labow RS, Meek E, Bedard E, Gill IS, Dudani AK, Ganz PR. Papaverine solutions cause loss of viability of endothelial cells. *The Journal of Cardiovascular Surgery (Torino)* 39(2): 193–9, 1998.
138. Leblebicioglu B, Walters J. Alkaline conditions accelerate polymorphonuclear leukocyte apoptosis in vitro. *Infection and Immunity* 67(4): 2019–21, 1999.
139. Ding D, Moskowitz SI, Li R, Lee SB, Esteban M, Tomaselli K, Chan J, Bergold PJ. Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. *Experimental Neurology* 162(1): 1–12, 2000.
140. Park HJ, Lyons JC, Ohtsubo T, Song CW. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *British Journal of Cancer* 80(12): 1892–7, 1999.
141. D’Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, Melillo G, Illi B, Testolin L, Gaetano C, Capogrossi MC. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circulation Research* 86(3): 312–8, 2000
142. Ahlin A, Gyllenhammar H, Ringertz B, Palmblad J. Neutrophil membrane potential changes and homotypic aggregation kinetics are pH dependent: studies of chronic granulomatous disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 125(3): 392–401, 1995.

143. McConkey DJ, Orrenius S. Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells* 14(6): 619–31, 1996.
144. Myklebust JH, Josefsen D, Blomhoff HK, et al. Activation of the cAMP signaling pathway increases apoptosis in human B-precursor cells and is associated with downregulation of Mcl-1 expression. *Journal of Cellular Physiology* 180(1): 71–80, 2001.
145. Goto K, Mochizuki H, Hattori T, Nakamura N, Mizuno Y. Neurotoxic effects of papaverine, tetrahydropapaverine and dimethoxyphenylethylamine on dopaminergic neurons in ventral mesencephalic-striatal coculture. *Brain Research* 754(1–2): 260–8, 1997.
146. Browning ET, Groppi Jr VE, Kon C. Papaverine: a potent inhibitor of respiration of C-6 astrocytoma cells. *Molecular Pharmacology* 10(1): 175–82, 1973.
147. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381): 1309–12, 1998.
148. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1): 147–57, 1996.
149. Preston Mason R. Calcium Channel Blockers, Apoptosis and Cancer: Is there a Biologic Relationship? *JACC* 34(7): 1857-66, 1999.
150. Trump BF, Berezsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 9: 219 –28, 1995.
151. Kluck RM, McDougall CA, Harmon BV, Halliday JW. Calcium chelators induce apoptosis—Evidence that raised intracellular ionised calcium is not essential for apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1223: 247–54, 1994.
152. Kondo S, Yin D, Morimura T, Takeuchi J. Combination therapy with cisplatin and nifedipine inducing apoptosis in multidrugresistant human glioblastoma cells. *J Neurosurg* 82: 469 –74, 1995.

153. Koike T, Martin DP, Johnson EM Jr. Role of Ca<sup>2+</sup> channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: evidence that levels of internal Ca<sup>2+</sup> determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6421–5, 1989.
154. Galli C, Meucci O, Scorziello A, et al. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci* 15: 1172–9, 1995.
155. Rodriguez-Tarduchy G, Malde P, Lopez-Rivas A, Collins MK. Inhibition of apoptosis by calcium ionophores in IL-3-dependent bone marrow cells is dependent upon production of IL-4. *J Immunol* 148: 1416–22, 1992.
156. Mason RP. Calcium channel blockers and cancer: a biological link remains elusive (letter). *Am J Hypertens* 9: 1047–9, 1996.
157. Fitzpatrick AL, Daling JR, Furberg CD, Kronmal RA, Weissfeld JL. Use of calcium channel blockers and breast carcinoma risk in postmenopausal women. *Cancer* 80: 1438–47, 1997.
158. Martikainen P, Isaacs J. Role of calcium in the programmed death of rat prostatic glandular cells. *Prostate* 17: 175–87, 1990.
159. Whitfield JF. Calcium signals and cancer. *Crit Rev Oncog* 3: 55–90, 1992.
160. Reynolds JE, Li J, Craig RW, Eastman A. BCL-2 and MCL-1 expression in Chinese hamster ovary cells inhibits intracellular acidification and apoptosis induced by staurosporine. *Exp Cell Res* 225: 430–6, 1996.
161. Whyte MK, Hardwick SJ, Meagher LC, Savill JS, Haslett C. Transient elevations of cytosolic-free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 92: 446–55, 1993.
162. Balakumaran A, Campbell GA, Moslen MT. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 139: 122–7, 1996.

163. Shchepotin IB, Soldatenkov V, Buras RR, et al. Apoptosis of human primary and metastatic colon adenocarcinoma cell lines in vitro induced by 5-fluorouacil, verapamil, and hyperthermia. *Anticancer Res* 14: 1027–31, 1994.
164. Shamash J, Davies DC, Lister TA. Apoptosis and cell proliferation control induced by pulsed calcium channel blockade in a low grade lymphoma cell line expressing BCL-2 (abstr). *Blood* 84: 448A 1994.
165. Juntti-Berggren L, Larsson O, Rorsman P, et al. Increased activity of L-type Ca<sub>v</sub>2.1 channels exposed to serum from patients with type I diabetes. *Science* 261: 86–90, 1993.
166. Li LH, Wine RN, Miller DS, et al. Protection against methoxyacetic-acid-induced spermatocyte apoptosis with calcium channel blockers in cultured rat seminiferous tubules: possible mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 144: 105–19, 1997.
167. Connor J, Sawczuk IS, Benson MC, et al. Calcium channel antagonists delay regression of androgen-dependent tissues and suppress gene activity associated with cell-death. *Prostate* 13: 119–30, 1988
168. Kyprianou N, English HF, Isaacs JT. Activation of a Ca<sub>v</sub>2.1-Mg<sub>v</sub>2.1-dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate* 13: 103–17, 1988.
169. El-Azzouzi B, Tsangaris GT, Pellegrini O, et al. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. *Toxicology* 88: 127–39, 1994.
170. Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Pieraggi MT, et al. Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurointricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 331–9, 1997.
171. Mason RP. Cytoprotective properties of a long-acting calcium channel blocker: new mechanism of action (abstr). *Am J Hypertens* 11: 245A, 1998.
172. Huang P, Hawthorne WJ, Peng A, Angelini GL, Medbury HJ, Fletcher JP. Calcium channel antagonist verapamil inhibits neointimal formation and

- enhances apoptosis in a vascular graft model. *The American Journal of Surgery* 181: 492–498, 2001.
173. Raafat AM, Murray MT, McGuire T, et al. Calcium blockade reduces renal apoptosis during ischemia reperfusion. *Shock* 1997;8:186–92.
174. Rabkin SW, Kong JY. Nifedipine does not induce but rather prevents apoptosis in cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 388: 209–17, 2000.
175. Ares MP, Porn-Ares MI, Thyberg J, et al. Ca<sup>2+</sup> channel blockers verapamil and nifedipine inhibit apoptosis induced by 25-hydroxycholesterol in human aortic smooth muscle cells. *J Lipid Res* 38: 2049–61, 1997.
176. Chae IH, Park KW, Kim HS, Hee Oh B. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clinica Chimica Acta* 341: 83–91, 2004.
177. Ignarro LJ and Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth cell relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25: 171-191, 1985.
178. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1- beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 185: 601–7, 1997.
179. Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor $\alpha$ - induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 272: 1402–11, 1997.
180. Hebestreit H, Dibbert B, Balatti I, et al. Disruption of fas receptor signaling by nitric oxide in eosinophils. *J Exp Med* 187: 415–25, 1998.
181. Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C, Bosca L. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest* 95: 1884–90, 1995.

182. Lincoln TM, Cornwell TL, Komalavilas P, Boerth N. Cyclic GMPdependent protein kinase in nitric oxide signaling. *Methods Enzymol* 269: 149– 66, 1996.
183. Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 150: 5080–5, 1993.
184. McDaniel ML, Corbett JA, Kwon G, Hill JR. A role for nitric oxide and other inflammatory mediators in cytokine-induced pancreatic beta-cell dysfunction and destruction. *Adv Exp Med Biol* 426: 313–9, 1997.
185. Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V, Kolb- Bachofen V. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol* 155: 2858–65, 1995.
186. Heneka MT, Loschmann PA, Gleichmann M, et al. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J Neurochem* 71: 88–94, 1998.
187. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis; countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 79: 748– 56, 1996.
188. Chiche JD, Schlutsmeyer SM, Bloch DB, et al. Adenovirusmediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and proapoptotic effects of nitric oxide/cGMP. *J Biol Chem* 273: 34263–71, 1998.
189. Nishio E, Fukushima K, Shiozaki M, Watanabe Y. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Comm* 221: 163–8, 1996.
190. Nishio E, Watanabe Y. Nitric oxide donor-induced apoptosis in smooth muscle cells is modulated by protein kinase C and protein kinase A. *Eur J Pharmacol* 339: 245–51, 1997.



191. Krick S, Platoshyn O, Sweeney M, et al. Nitric oxide induces apoptosis by activating K<sup>+</sup> channels in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(1): H184–93, 2002.
192. Ibe W, Bartels W, Lindemann S, et al. Involvement of PKC and NF-kappaB in nitric oxide induced apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 11(5): 231–40, 2001.
193. Fukuo K, Hata S, Suhara T, et al. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension* 27: 823–6, 1996.
194. Nishio E, Watanabe Y. NO induced apoptosis accompanying the change of oncoprotein expression and the activation of CPP32 protease. *Life Sci* 72: 239–45, 1998
195. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts; Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147–57, 1996.
196. Ying H, Shen, Xing L, Wang, David E.L, Wilcken. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways *FEBS Letters* 433: 125-131, 1998.
197. Sciorati C, Rovere P, Ferrarini M, Heltai S, Manfredi AA. and Clementi E. *J. Biol. Chem.* 272: 23211-23215, 1997.
198. Nigris F, Lerman A, Ignarro LJ, Ignarro SW, Sica V, Baker AH, Lerman LO, Geng YJ, Napoli C. Oxidation-sensitive mechanisms, vascular apopyosis and atherosclerosis. *Trends in Molecular Medicine* 9(8): 351-9, 2003.
199. Best, P.J. et al. Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 14–22, 1999.
200. Victoria EA, Bennett RA, Bennett S. Role of apoptosis in atherosclerosis and its Therapeutic implications. *Clinical Science* 107: 343-54, 2004.

201. Casper G, Stehouwer S, Stehouwer CDA. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science* 109: 143-159, 2005.
202. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature (London)* 414: 813–820, 2001.
203. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, Neumaier M, Bergfeld R, Giardino I, Brownlee M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.* 9: 294–299, 2003.
204. Singh R, Barden A, Mori T and Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129–146, 2001.
205. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 106: 453–458, 2000.
206. Baumgartner-Parzer S. M, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A and Waldhausl W. High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 44: 1323–1327, 1995.
207. Cagliero E, Maiello M, Boeri D, Roy S And Lorenzi M. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J. Clin. Invest.* 82: 735–738, 1988.
208. Boeri D, Almus FE, Maiello M, Cagliero E, Rao LV and Lorenzi M. Modification of tissue-factor mRNA and protein response to thrombin and interleukin 1 by high glucose in cultured human endothelial cells. *Diabetes* 38: 212–218, 1989.
209. McGinn S, Saad S, Poronnik P and Pollock CA. High glucose-mediated effects on endothelial cell proliferation occur via p38 MAP kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E708–E717, 2003.
210. Graier WF, Grubenthal I, Dittrich P, Wascher TC and Kostner GM Intracellular mechanism of high d-glucose-induced modulation of vascular cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* 294: 221–229, 1995.

211. Maiello M, Boeri D, Podesta F, Caqliero E, Vichi M, Odetti P, Adezati L and Lorenzi M. Increased expression of tissue plasminogen activator and its inhibitor and reduced fibrinolytic potential of human endothelial cells cultured in elevated glucose. *Diabetes* 41: 1009–1015, 1992.
212. Kofler S, Nickel T and Weis M. The role of cytokines in cardiovascular diseases: focus on endothelial response to inflammation. *Clin. Sci.* 108: 205–213, 2005.
213. Cacicedo JM, Yagihashi N, Keaney Jr JF, Ruderman NB and Ido Y. AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF- $\kappa$ B transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324: 1204–1209, 2004.
214. Loop FD, Lytle BW, Cosgrove DM, Stewart RW, Goormastic M, Williams GW, Golding LAR, Gill CC, Taylor PC, Sheldon WC, Proudfit WL. Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. *N Engl J Med* 314: 1–6, 1986.
215. Blanche C, Chaux A. Spasm in mammary artery grafts. *Ann Thorac Surg* 45: 586, 1988.
216. Wendler O, Tscholl D, Huang Q, Schafers HJ. Free flow capacity of skeletonized versus pedicled internal thoracic artery grafts in coronary artery bypass grafts. *Eur J Cardiothorac Surg* 15: 247–50, 1999.
217. He GW, Buxton BF, Rosenfeldt FL, Angus JA, Tatoulis J. Pharmacologic dilatation of the internal mammary artery during coronary bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 107: 1440–7, 1994.
218. Zabeeda D, Medalion B, Jakobshvilli S, Ezra S, Schachner A, Cohen AJ. Comparison of systemic vasodilators: effects on flow in internal mammary and radial arteries. *Ann Thorac Surg* 71: 138–41, 2001.
219. He GW, Yang CQ. Inhibition of vasoconstriction by potassium channel opener aprikalim in human conduit arteries. *Br J Clin Pharmacol* 44: 353–9, 1997.

220. Cooper GJ, Wilkinson GAI, Angelini GD: Overcoming perioperative spasm of the internal mammary artery; Which is the best vasodilator? *J Thorac Cardiovasc Surg* 104: 465, 1992.
221. Tabel Y, Hepağuşlar H, Erdal C, Çatalyürük H, Açıkkel Ü, Elar Z, Aslan Ö. Diltiazem provides higher internal mammary artery flow than nitroglycerin during coronary artery bypass grafting surgery *European Journal of Cardiothoracic Surgery* 25: 553–559, 2004.
222. Jett GK, Guyton RA, Hatcher CR Jr, Abel PW. Inhibition of human internal mammary artery contractions. An in vitro study of vasodilators. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 104: 977–82.
223. Sasson L, Cohen AJ, Hauptman E, Schachner. Effect of topical vasodilators on internal mammary arteries. *Ann Thorac Surg* 59: 494–6, 1995.
224. van Son JAM, Tavilla G, Noyez L. Detrimental sequelae on the wall of the internal mammary artery caused by hydrostatic dilatation with diluted papaverine solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 104: 972–6, 1992.
225. Bennett MR, Boyle JJ. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 138: 3–9, 1998.
226. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 185: 601–7, 1997.
227. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 272: 31138–48, 1997.
228. Abello, P. A., Fidler, S. A., Bulkley, G. B., and Buchman, T. G. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin. *Arch. Surg.* 129: 134–141, 1994.
229. Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res.* 41: 361–8, 1999.