

TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA İSOPROTRENOL İLE OLUŞTURULAN MİYOKARD
İNFARKTÜSÜ MODELİNDE DNA HASARI VE OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE LASİDİPİN, RAMİPRİL VE VALSARTAN'NIN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yasin BAYIR

**Tez Yöneticisi
Doç. Dr. M.Sait KELEŞ**

**Doktora Tezi
Erzurum - 2008**

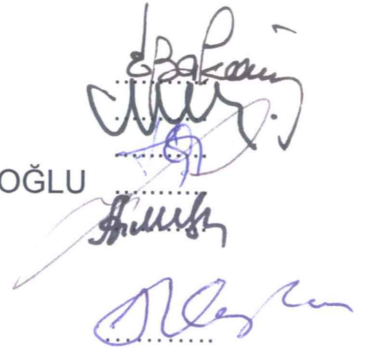
TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA İSOPROTRENOL İLE OLUŞTURULAN MİYOKARD
INFARKTÜSÜ MODELİNDE DNA HASARI VE OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE LASİDİPİN, RAMİPRİL VE VALSARTAN'NIN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yasin BAYIR

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16 / 09 / 2008
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 04 / 11 / 2008
Jüri Başkanı : Prof.Dr. Ebubekir BAKAN
Jüri üyesi/Tez Danışmanı : Doç. Dr. M.Sait KELEŞ
Jüri üyesi : Prof. Dr. Fatih AKÇAY
Jüri üyesi : Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Jüri üyesi : Doç. Dr.Halis SÜLEYMAN

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. İsmail CEYLAN



**Tez Yöneticisi
Doç. Dr. M.Sait KELEŞ**

**Doktora Tezi
Erzurum-2008**

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IV
TABLolar LİSTESİ.....	VI
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	IX
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KALBİN ANATOMİSİ.....	3
2.2. KALBİN FİZYOLOJİSİ.....	3
2.3. MİYOKARD İNFARKTÜSÜ.....	4
2.4. MYOKARD İNFARKTÜSÜNÜN TEŞHİSİ.....	6
2.5. MİYOKARD İNFARKTÜSÜNDE OLUŞAN BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER...	6
2.6. BİYOKİMYASAL KARDİYAK BELİRTEÇLERİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	10
2.7. MİYOKARD İNFARKTÜS TEDAVİSİ.....	11
2.8. DENEY HAYVANLARINDA DENEYSEL OLUŞTURULAN MİYOKARD İNFARTÜS MODELLERİ.....	16
2.9. İSOPROTERENOLÜN YAPISI VE ETKİ MEKANİZMASI.....	17
2.10. ANTİOKSİDANLAR.....	18
2.10.1. SERBEST RADİKALLER.....	18
2.10.1.1. SERBEST RADİKAL ÇEŞİTLERİ.....	19
2.10.2. SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI.....	23
2.10.2.1. EKSOJEN RADİKAL KAYNAKLARI.....	23
2.10.2.2. ENDOJEN RADİKAL KAYNAKLARI.....	23
2.10.3. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ.....	25
2.10.3.1. MEMBRAN LİPİTLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ.....	26
2.10.3.2. PROTEİNLER ÜZERİNE ETKİLERİ.....	27
2.10.3.3. DNA ÜZERİNE ETKİLERİ.....	27
2.10.3.3.1. 8-HİDROKSİ GUANİN OLUŞUMU VE ÖNEMİ.....	31
2.10.3.3.2. DNA HASAR TAMİRİ.....	32
2.10.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	33
2.10.4.1. ENDOJEN (DOĞAL) ANTİOKSİDANLAR.....	33
2.10.4.1.1. PRİMER ANTİOKSİDANLAR (ENZİMLER).....	33

2.10.4.1.2. SEKONDER ANTİOKSİDANLAR.....	35
3. MATERYAL METOD.....	36
3.1. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASALLAR.....	36
3.2. DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR.....	36
3.3. DENEYLERDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER VE HAZIRLANIŞLARI.....	36
3.4. DENEY HAYVANLARI.....	39
3.5. DENEYDE KULLANILAN İLAÇLARIN DOZLARI.....	40
3.6. RATLARDA MİYOKARD İNFARKTÜS MODELİNİN OLUŞTURULMASI.....	40
3.7. DENEY GRUPLARI VE İLAÇ UYGULAMASI.....	40
3.8. ÖRNEKLERİN ALINMASI.....	42
3.8.1. KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI.....	42
3.8.2. DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI.....	42
3.9. ANALİZLER.....	42
3.9.1. EDTA'LI TAM KANDAN DNA İZOLASYONU.....	42
3.9.2. CK-MB, CK, AST VE TNI ÖLÇÜMÜ.....	43
3.9.3. KANDA DNA 8-OHGUA MİKTARI ANALİZİ.....	43
3.9.3.1. KROMOTOGRAFIK KOŞULLAR.....	44
3.9.4. SERUMDA NİTRİK OKSİT ÖLÇÜMÜ.....	45
3.9.5. KALP DOKUSUNUN BİYOKİMYASAL İNCELENMESİ.....	46
3.9.5.1. DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI.....	47
3.9.5.1.1. CAT AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	47
3.9.5.1.2. SOD AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	48
3.9.5.1.3. MPX AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	49
3.9.5.1.4. TOTAL GLUTATYON (GSH) MİKTARI ÖLÇÜMÜ.....	49
3.9.5.1.5. LİPİT PEROKSİDASYON (LPO) MİKTARI ÖLÇÜMÜ.....	50
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. AST AKTİVİTESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	52
4.2. CK AKTİVİTESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	53
4.3. CK-MB AKTİVİTESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	54
4.4. TNI AKTİVİTESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	55
4.5. ANTİOKSİDAN PARAMETRELERE AİT SONUÇLAR.....	55
4.5.1. SOD AKTİVİTESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	56

4.5.2. CAT AKTİVİTESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	56
4.5.3. MPX AKTİVİTESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	57
4.5.4. LPO AKTİVİTESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	58
4.5.5. GSH AKTİVİTESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	58
4.6. NO SEVİYESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	59
4.7. 8-OHGUA/GUA SEVİYESİ ÜZERİNE DENEY PROTOKOLÜ DEĞERLERİ.....	60
5. TARTIŞMA.....	61
6. KAYNAKLAR.....	72

TEŞEKKÜR

Tezimin, planlanmasında, yürütülmesinde rehberlik eden ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. M.Sait KELEŞ'e ve yoğun iş temposunda tezimin her aşamasında dostluğunu ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Zekai HALICI'ya,

Doktora tezi olarak sunduğum ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D.'nde gerçekleştirilen bu çalışmanın ortaya çıkmasında bütün imkanlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Ebubekir BAKAN ve nezdinde desteklerini esirgemeyen tüm anabilim dalı öğretim üyeleri, araştırma görevlileri özellikle Araş. Gör Hakan ALP'e ve anabilim dalı personeline,

Doktora Eğitimim esnasında desteklerini esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Dekanı sayın Prof. Dr. Yunus KARA ve nezdinde tüm Eczacılık Fakültesi personeline,

Her türlü sıkıntıda yanımda olan ve bilimin ne derece meşakkatli ve bir o kadar da keyifli olduğunu bana öğreten, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU, Doç. Dr. Ahmet ÇAKIR'a, Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN'a,

Çalışmalarım esnasında kapılarını sonuna kadar açan 'Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi müdürü Doç. Dr. Derviş ÖZDEMİR ve yardımcısı Yrd. Doç. Dr. Nilüfer SABUNCUOĞLU ÇOBAN, Farmakoloji A.B.D. Başkanı sayın Prof. Dr. Fatma GÖÇER, Doç.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU, Araş.Gör.Elif ÇADIRCI ve Araş.Gör.Beyzagül POLAT'a ve nezdinde tüm Farmakoloji A.B.D. ekibine,

Lisans yıllarından bu yana hep beraber olduğumuz hayatımın her anında ve her alanında yanımda olan çok değerli dostum kardeşim Dr. Mesut B.HALICI'ya,

Tez çalışmam sırasında bir ay boyunca her gün hayvan deneylerine katılan beni yalnız bırakmayan; Eczacılık Fakültesi M.S.öğrencilerimizden Fadime ATALAY ve Selma MUTLU'ya gösterdikleri alaka ve yaptığı fedakârlıklardan dolayı,

Yine tez çalışmalarım sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Patoloji A.B.D.Başanı olan Prof.Dr.Cemal GÜNDOĞDU ve ekibine, Histoji A.B.D.'dan Araş.Gör. Osman KELEŞ'e, A.Ü.Aziziye Hastanesi Biyokimya ve Acil Personeli ve dostum A. Özgür GÜVENÇ'e, gösterdikleri alaka ve yaptığı fedakârlıklardan dolayı,

Hayatımın her anında ve her alanında yanımda oldukları için canım aileme de sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

ŞEKİLLER LİSTESİ	Sayfa No :
Şekil 1 : İsoproterenolün moleküler yapısı.....	17
Şekil 2 : Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen argininden nitrik oksit oluşumu...	22
Şekil 3 : Pürinlerin ·OH radikali ile Reaksiyonları.....	29
Şekil 4 : Guaninin 4 ve 5 nolu karbonunda hidroksillenmiş radikallerinin reaksiyonları.....	29
Şekil 5 : Oksijen yokluğunda Guaninin 8 nolu karbonunda hidroksillenmiş radikalinden ürünlerin oluşum mekanizması.....	30
Şekil 6 : DNA bazlarından oluşabilecek major oksidatif hasar ürünleri.....	30
Şekil 7 : Hasarlı bazın yanlış eşleşmesi.....	32
Şekil 8 : Kardiyomiyositlerde ROS/RNS tarafından oluşan hasarın antioksidanlarla ilgili mekanizması.....	34
Şekil 9 . Glutatyon'un molekül yapısı.....	35
Şekil 10 : 8-OHGua ve Gua'ya ait HPLC-ECD ile alınmış örnek kromatogram.....	44
Şekil 11 : GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	50
Şekil 12 . LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....	51

TABLolar LİSTESİ	Sayfa No :
Tablo 1: Kardiyak belirteçlerin kanda ilk görülme, pik düzeye erişme ve kandan kaybolma gibi özellikleri açısından karşılaştırması.....	10
Tablo 2: Rat Çalışma Protokolü.....	41
Tablo 3: Tez çalışma protokolü gruplarında serumdan elde edilen AST ve CK enzim aktiviteleri değerleri.....	52
Tablo 4. Tez çalışma protokolü gruplarında serumdan elde edilen CK-MB enzim aktivitesi ve Tnl değerleri.....	54
Tablo 5. Tez çalışma protokolü gruplarında Kalp dokusundan elde edilen SOD, CAT ve MPx enzim aktiviteleri değerleri.....	55
Tablo 6. Tez çalışma protokolü gruplarında Kalp dokusundan elde edilen LPO, GSH değerleri.....	57
Tablo 7. Tez çalışma protokolü gruplarında tam kandan elde edilen 8-OHGua ve serumdan elde edilen NO değerleri.....	59

KISALTMALAR

ACE	: Anjiotensin dönüştürücü enzim
AMI	: Akut Miyokard İnfarktüs
ATP	: Adenozin tri fosfat
CAT	: Katalaz
CK	: Kreatin Kinaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DRAS	: Doku renin-anjiotensin sistemi
Gua	: Guanin
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
GC	: Gaz kromatografisi
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
OH·	: Hidroksil radikali
HRAS	: Hormonal renin-anjiotensin sistemi
HO ₂ ⁻	: Peroksil
LPO	: Lipit peroksidasyonu
ISO	: İsoproterenol
IP	: İntraperitoneal
MDA	: Malondialdehit
MI	: Miyokard İnfarktüs
MPx	: Miyeloperoksidaz
MS	: Kütle spektroskopisi
NO·	: Nitrik oksit
NBT	: Nitro blue tetrazolium
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
¹ O ₂	: Singlet oksijen
RNS	: Reaktif Azot türleri
ROS	: Reaktif Oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
8-OHGua	: 8-Hidroksiguanin
8-OHdG	: 8- Hidroksiguanin-2-deoksi guanozin

SIÇANLARDA İSOPROTRENOL İLE OLUŞTURULAN MİYOKARD İNFARKTÜSÜ MODELİNDE DNA HASARI VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE LASİDİPİN, RAMİPRİL VE VALSARTAN'NIN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**ÖZET**

Bu çalışmada, lasidipin, ramipril ve valsartan'ın sıçanlarda Isoprotrenolle (ISO) oluşturulan Miyokard İnfarktüsü (MI) modelinde gelişen DNA hasarı ve oksidatif stres üzerine etkileri incelendi. Lasidipin, ramipril ve valsartan sırasıyla 3, 3 ve 30 mg/kg dozlarda oral sonda ile 30 gün boyunca verildi. MI oluşturmak için oral ilaç uygulamalarını takip eden son 2 günde sıçan gruplarına 180 mg/kg dozda ISO 24 saat aralıklarla iki kez subkutan enjeksiyonla verildi. Son ISO uygulamasını takip eden 24. saatte yüksek doz anestezi maddeyle gruptaki tüm ratlar ötanazi edildi. Bu süreç sonunda ratların kanından elde edilen serumlarda MI'nin rutin biyokimya göstergeleri olan Aspartat amino transferaz (AST), Kreatin kinaz (CK), Kreatin kinaz-MB (CK-MB), Troponin I (TnI) ve aynı zamanda Nitrik oksit (NO) ölçüldü. Tam kanda DNA hasarı seviyesi [8-hidroksi guanin (8-OHGua)] belirlendi. MI indikatörleri ile MI belirlendikten sonra ratların kalp dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), miyeloperoksidaz (MPx) aktiviteleri ve glutatyon (GSH), lipit peroksidasyonu (LPO) seviyeleri literatürlere dayalı uygun metotlarla ölçüldü. Bulgular, kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Sağlıklı kontrol grubuna göre ISO uygulanmış kontrol grubunu istatistiksel olarak mukayese ettiğimizde, MI'nin biyokimyasal kardiyak belirteçlerinden AST, CK, CK-MB ve TnI'da artış, NO seviyesinde azalış, 8-OHGua'nın seviyesinde artış, SOD ve CAT aktivitelerinde azalış, MPx aktivitesinde artış, GSH seviyesinde azalış ve LPO seviyesinde artış belirlendi ($p<0.05$). ISO uygulanmış kontrol grubuna göre ilaç grupları mukayese edildiğinde ilaçların ISO uygulanmasına bağlı gelişen tüm olumsuz değişiklikleri engellediği belirlendi. MI uygulaması yapılamayan sadece ilaç uygulaması yapılan gruplarda ise sağlıklı kontrol gruba göre istatistiksel olarak önemli bir değişiklik belirlenmedi. Lasidipin, ramipril ve valsartan'ın ISO ile indüklenen MI modelinde kalp doku hasar belirteçlerini düzelttikleri, antioksidan sistem üzerine olumlu etki gösterdikleri ve DNA hasarı göstergesi olan 8-OHGua seviyesini kontrole göre düzelttikleri belirlendi. İlaç grupları arasında ise tüm parametrelerde herhangi bir farklılık belirlenmedi.

Sonuç olarak, ISO ile oluşturulan MI modelinde serbest radikallerin üretildiği ve bu radikallerin DNA'ya kadar sıçrayarak hasar verdiği belirlendi. Lasidipin, ramipril ve valsartan'ın antioksidan savunma sistemini olumlu etkileyerek MI'da bozulan oksidan, antioksidan ve kardiyak enzim parametrelerini düzelttikleri aynı zamanda DNA hasarını azalttıkları belirlendi.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF LACIDIPINE, RAMIPRIL AND VALSARTAN ON DNA DAMAGE AND OXIDATIVE STRESS IN ISOPROTERENOL-INDUCED MYOCARDIAL INFARCT MODEL OF RATS**SUMMARY**

In this study, the effects of lacidipine, ramipril and valsartan on DNA damage and oxidative stress occurred after isoproterenol (ISO)-induced myocardial infarct (MI) were investigated in rats. Lacidipine, ramipril and valsartan were administered by oral gavage at 3, 3 and 30 mg/kg doses, respectively during 30 days. To induce MI, at the last two days of drug administration, 180 mg/kg dose of ISO was administered to rat groups twice in 24 hour intervals via subcutaneous injection. At the 24th hour after the last ISO administration, all rats were euthanatized via high dose anesthetic agent. After this period, routine biochemistry indicators of MI, Aspartate aminotransferase (AST), Creatine kinase (CK), Creatine kinase-MB (CK-MB), Troponine I (Tnl) and also Nitric oxide (NO) were measured in the sera obtained from rats' blood. The level of DNA damage [8-hydroxy guanine (8-OHGua)] was determined in whole blood. After MI diagnosis with MI indicators, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and myeloperoxidase (MPx) activities and glutathione (GSH), and lipid peroxidation (LPO) levels were measured in the supernatants obtained from rats' tissue homogenates in accordance with the present literatures. Results were evaluated by comparing with those of the control groups. When we compare ISO-induced MI control group with the healthy group, increases in the biochemical cardiac MI indicators (AST, CK, CK-MB, Tnl), decreases in NO level, increases in 8-OHGua level, decreases in SOD and CAT activities, increases in MPx activities, decreases in GSH level and increases in LPO level were determined ($p < 0.05$). When we compared the drug groups with the ISO-administered control group, the drugs were determined to prevent all negative effects related to ISO application. There was no significant difference in the rat groups which received drugs without MI induction in comparison to healthy rat group. We observed that lacidipine, ramipril and valsartan improved heart tissue damage indicators, exerted positive effects on antioxidant system, and improved the level of 8-OHGua level, the indicator of DNA damage in ISO-induced MI model when compared to control group. There was no difference in none of the parameters of the drug groups when compared each other.

In conclusion, it was determined that reactive oxygen species were produced after ISO-induced MI model and these radicals damaged even DNA. Lacidipine, ramipril and valsartan were determined to improve the antioxidant and cardiac enzyme parameters which impaired after MI, and decrease DNA damage by affecting antioxidant defense system positively.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklar dünyadaki ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar içinde en sık görülen miyokard infarktüsü (MI)'dir. Sinsi ve ani bir şekilde ortaya çıkan MI, genelde orta ve ileri yaş hastalığı olup, kişinin ani ölümüne yol açabilir. Ani başlangıçlı olması veya semptomlarının non-spesifik olması (Göğüs ağrısı gibi), aynı zamanda MI sonrasında kalıcı ve düzeltilemez birçok hasarın meydana gelmesi, MI üzerine bilimsel çalışmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır. MI'ın birçok nedeni vardır ve birçok hastalıkta sekonder olarak gelişebilir. Bu nedenle, MI'ın gelişim fazının durdurulması veya risk gruplarındaki kişilerin korunması, bilimsel araştırmaların ilk hedefleri haline gelmiştir. MI geliştiğinde kaçınılmaz bir miyokard disfonksiyonu oluşmaktadır. MI'nin kalbi besleyen koroner arterlerin total tıkanması sonucu ortaya çıkar. Tıkanan arterin distalinde bulunan ve bu arterle beslenen miyokard dokusu iskeminin şiddetine göre çeşitli derecede hasar oluşturur. Tıkanan damarın beslediği alan ve iskemi süresi, miyokarddaki hasarın şiddetini belirleyen en önemli parametrelerdir. Miyokardın beslenememesi, iskemik bölgelerin oluşmasına ve bu bölgelerde açıklığa kavuşmuş birçok mekanizmayla dönüşümlü veya dönüşümsüz hasarlara neden olur. MI sonrası oluşan iskemik hasarın temel patofizyolojisinde hücre membranının bütünlüğünün bozulması gelmektedir. İskemik alanlarda hasarın oluşmasında Polimorfo Nükleer Lökosit (PNL) infiltrasyonu ve mitokondrilerden salınan serbest oksijen radikalleri çok önemli rol oynar. Serbest oksijen radikallerinin yoğunluğu, nekrotik alanların büyüklüğü ve hadisenin dönüşümlü veya dönüşümsüz olmasıyla doğru orantılıdır. Serbest oksijen radikallerinin artması ve bu ajanlarla uzun süreli temas, hasarın DNA'ya da sıçramasına neden olmaktadır. DNA'da oluşabilecek hasar hücresel değişikliklerin dönüşümsüz olmasına neden olmaktadır. MI sonrası gelişen hasar mekanizması sadece bu fenomenle sınırlı kalmamaktadır. Çözülmesi gereken başka bir sorunda reperfüzyon hasarıdır. Reperfüzyon, iskemik dokunun tekrar kanlanması, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması için gerekli bir süreçtir. Fakat reperfüzyon, iskeminin kalkmasıyla iskemiye maruz kalmış hücrelerin aşırı derecede oksijenlenmesine ve daha fazla hasar oluşmasına neden olur. Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Sonuçta serbest oksijen radikallerinin kontrolsüz bir şekilde lipid membranına saldırması ve bu arada önceden hasarlanmış hücrelerdeki antioksidant sistemlerin çalışamaz veya az çalışır hale gelmesi hasarın daha şiddetli olmasına neden olur. Hem iskemi hem de reperfüzyonun neden olduğu hasar, miyokardın kalıcı

disfonksiyonlarına ve çeşitli derecelerde kalp yetmezliğine neden olmaktadır. Bu nedenle MI'nın tedavisi çok yönlü olup temel olarak ikiye ayrılır. Birincisi; riskli gruplara MI gelişiminden önce koruyucu tedavidir ki bu sahaya birçok ilaç girmektedir. Kısaca belirtmemiz gerekirse MI'a yol olabilecek primer nedenin kontrol altına alınmasında ve primer bir neden olmaksızın risk grubunda bulunan kişilerde kullanılan ilaçlar bu kategoride sınıflandırılır. Örneğin hipertansiyon veya yüksek kolesterol düzeyi MI için önemli bir risk faktörü olup bunların kontrol altına alınması MI riskini de azaltmaktadır. İkincisi ise, MI sonrası akut safhada veya kronik safhada kullanılan ilaçlardır. MI sonrası acil müdahalede, trombolitik tedavinin yanı sıra invaziv yöntemlerle damar tıkanıklığının açılması da esas noktayı oluşturmaktadır. Akut ve kronik miyokard hasarı ve disfonksiyonunda farklı birçok ilaç grubu kullanılmaktadır. Her bir grubun birbirleri arasında avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu evrede kullanılan ilaçlarda aranan temel özellikler gerek iskemiye gerekse reperfüzyona bağlı hasarı en aza indirmektir. Aynı zamanda miyokard rejenerasyonuna yardım ederek optimal düzeyde miyokard fonksiyonunu sağlamaktır. Bu nedenle MI sonrası kullanılacak ilaçların temelinde miyokard fonksiyonu, koroner arterler üzerine yararlı etkileri ve antioksidan potansiyele sahip olmaları gerekmektedir. Bu özelliklerin bir veya bir kaçına sahip MI sonrasında kullanılan ilaçlar bulunmaktadır. Yalnız günümüzde yapılan yeni çalışmalarda iskemi sırasında oluşan oksidatif stresin DNA üzerinde de etkili olduğunu göstermektedir. DNA üzerine olan bu etki şiddetinin hasarın boyutu ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Etkinliğini MI'da deneyeceğimiz ilaçlar MI sonrasında kullanılan ilaçlar olup bu ilaçların seçiminde hala birçok tartışma bulunmaktadır. Literatür de bu konu ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Lasidipin, ramipril ve valsartan MI sonrasında kullanılan ilaçlardandır. Her üçü de MI sonrası kullanılan üç farklı grubun en sık reçete edilen ilaçlarıdır. Üç farklı grubu aynı deney kurgusunda karşılaştıran biyokimyasal bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızın amacı: Sıçanlarda oluşturulan akut MI (ISO) modelinde gelişen oksidatif stresin ve oksidatif strese bağlı DNA hasarının şiddetini belirlemek, klinikte MI tanısında kullanılan çeşitli doku hasarı ile DNA hasarı arasındaki ilişkiyi ortaya koymak, ISO'de gelişen DNA hasarının önlenmesinin, antioksidan savunma mekanizma ile açıklığa kavuşturmak ve son olarak lasidipin, ramipril ve valsartan'ın sıçanlarda ISO ile gelişen DNA hasarı, doku hasarı ve oksidatif stresi üzerine olan etkilerinin karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalbin anatomisi

İçi boş, kas yapısında bir organ olan kalp göğüs boşluğu içinde her iki akciğer arasında büyük bir alanı kaplar. Etrafı, perikardiyum adı verilen bir zar ile sarılıdır. Kalp kası (miyokard) hücrelerinden oluşan kas yapısında bir organdır.¹ Kalp duvarında 3 tabaka bulunur. En dışta epikardiyum, ortada miyokardiyum ve en içteki endokardiyumdur.^{1, 2} Kalp, iki akciğer arasında tepesi aşağıda tabanı yukarıda bir koniye benzer. Üçte biri orta çizginin sağında, üçte ikisi sol yanındadır. Genel olarak sternum arkasında eğik olarak durur. Ekseni, yukarıdan aşağıya, arkadan öne ve sağdan sola doğrudur. Kalbin iki atriyum ve iki ventrikül olmak üzere dört odacığı vardır. Bunlar sağ atrium, sol atrium, sağ ventrikül ve sol ventrikül olarak adlandırılır. Kalp, vücudun tüm bölümlerine kanı gönderen dolaşım sisteminin pompasıdır. Dolaşım sistemi kalp, arterler (atardamar), venler (toplardamar) ve kapillerlerden (kılcaldamarlar) oluşmuştur. Kalp ritmik kasılmalarla kanı arterlere pompalar. Pompa görevi ventriküllerindir.¹

Vücuttan venler aracılığıyla toplanan kan üst ve alt *kava veni* (*vena cava superior ve vena cava inferior*) ile sağ atriuma, oradan da sağ ventriküle gelir. Sağ ventrikül kanı, ana pulmoner arter (trunkus pulmonalis) aracılığı ile oksijenlenmesi için akciğerlere gönderir. Akciğerlerden sol atriuma gelen oksijenlenmiş kan hemen aşağıdaki sol ventriküle geçer. Kuvvetli kas yapısına sahip sol ventrikül kanı aort aracılığıyla tüm vücuda gönderir. Akciğerlerde kan akımına karşı direnç daha az olduğu için sağ ventrikülün iş yükü sol ventrikülün ki kadar fazla değildir. Bu nedenle sol ventrikülün duvar kas kalınlığı sağ ventriküle oranla daha kalındır.^{1,3}

2.2. Kalbin fizyolojisi

Miyokard devamlı olarak çalışan bir kastır. Yaşam olgusu olduğu sürece dokulara gerekli kanı pompalama görevini üstlenmiştir. Hiçbir şekilde durmadan çalışmaya programlanmış olan miyokard kendine özgü bir damarlanmaya sahiptir. Koroner arter dediğimiz miyokardı besleme görevi olan arter yumağı miyokard dokusunu çevrelemiştir.^{1,3}

Dinlenme halindeki bir kişide kalp dakika da 4-6 litre kan pompalar. Ağır egzersiz sırasında kalp bu miktarın 4-7 katını pompalaması gerekebilir.³ Kalbin aktif bir pompalama görevinden dolayı kalp kası hücrelerinin aktif bir metabolizması vardır ve bu hücreler oksijene sürekli olarak ihtiyaç duyarlar. Koroner dolaşım kalbe oksijene doymuş kan temin eder. İnsanda ortalama dinlenme koroner kan akımı 225 ml/dk'dır.³

Koroner kan akımı kalbin gereksinim duyduğu besinleri sağlayabilmek için 3-4 kat artabilir. Bu artış iş yükünün artışı kadar fazla değildir. Bu koroner kan akımının kalbin enerji harcamasının oranının azaldığı anlamına gelir. Kalp akımındaki bu göreceli azalmayı dengelemek üzere kalpte enerji kullanımının verimliliği artar. Koroner sistemde kan akımı hemen hemen tümüyle kalp kasının besin gereksinimine yanıt olarak ortaya çıkan lokal vazodilatasyon tarafından düzenlenir. Tersine aktivitenin azalmasına kan akımında azalma eşlik eder. Koroner kan akımı hemen hemen tümüyle kanın oksijen gereksinimiyle orantılı olarak düzenlenir. Kan akımı tamamen kalbin metabolik oksijen tüketimiyle orantılı olarak artar. Kalp, dinlenme durumunda enerji gereksiniminin % 60-80'ini karbohidratlar yerine yağ asitlerinden, % 20-40 arasında ise laktat ve glukozdan karşılanmaktadır. Glukoz ise kardiyositlere hem GLUT 1 hem de GLUT 4 ile çoğunlukla ise % 90 oranında GLUT 4 ile taşınır.⁴ Anaerobik ya da iskemik koşullarda diğer dokularda olduğu gibi kalp metabolizmasında da aerobik glikoliz enerji gereksinimini karşılamak üzere devreye girer.³ Bu yol kalbin büyük enerji gereksiniminin yalnızca küçük bir bölümünü karşılayabilir. Ayrıca glikoliz yüksek miktarda kan glukozunu kullanır ve aynı zamanda kalp dokusunda çok miktarda laktik asit oluşumuna yol açar.⁴ Laktik asit muhtemelen iskemi sırasında ortaya çıkan ağrıdan da sorumludur. Diğer dokularda olduğu gibi kalptede metabolik enerjinin % 95'i mitokondrilerde ATP oluşumu için kullanılan besinlerden sağlanır. ATP hücresel işlevler için gereken enerjiyi taşıyıcı olarak işlev yapar.⁴ Kalbe oksijen taşımakla yükümlü molekül hemoglobindir. İskemik koşullarda hemoglobin ile oksijen taşınamaması durumunda miyogloblin kalbin ihtiyacı olan oksijeni kısa süre için temin eder. Kısa süreli iskemilerde bu miyogloblindeki depo oksijen kullanılarak kardiyak hücrenin dönüşümsüz ölümü önlenmiş olur.³⁻⁵

2.3. Miyokard İnfarktüsü

ISO gün geçtikçe artan bir sağlık sorunu olmakla beraber aynı zamanda sağlık harcamalarında da en üst seviyelerde yer almaktadır. ABD'de 2001 yılında 900.000 MI geçirmiş hasta olduğu ve bu hastalar için yıllık yaklaşık 60 milyar dolar sağlık harcaması yapıldığı bildirilmiştir.⁶ Gelişen yeni tedavi stratejileri ve aynı zamanda yeni ilaçlarla 1988'de MI sonrası ölüm vakaları % 13.2 iken son yıllarda % 5.6'ya gerilenmiştir.⁷

MI'nın çok sık görülmesi ve ölüm oranının yüksek oranda olmasının en önemli nedenlerinden biri miyokard dokusunun yüksek metabolik aktivitesidir ki bu yüksek metabolik aktivite miyokardı iskemiye çok hassas hale getirmiştir.⁵ Genelde koroner

ateroskleroza bağlı olarak ve daha seyrek olarak da koroner arter enflamasyonu, tromboz veya koroner vazospazma bağlı olarak miyokard iskemisi meydana gelir. İskemik kalp hastalıklarını şöyle sıralayabiliriz: Akut myokard enfarktüsü (AMİ), stabil veya anstabil angina pektoris (AAP), kronik iskemik kalp hastalığıdır.⁵ Kalbi besleyen koroner damarlarda akut tıkanmadan hemen sonra tıkanmanın uç kısmında kalan bölgede kan akımı çevre dokuda küçük miktardaki kolleteral dolaşım dışında durur. Hiç kan almayan ya da aldığı kan kalp kasının işlevlerini yerine getirmesine yetmeyen bölgeye infarkt bölgesi olayın tümüne ise MI bölgesi denir. Aynı dönemde kas lifleri kandaki son oksijen kırıntılarını da kullanır ve hemoglobin tamamen indirgenerek koyu mavi bir renk alır. Kalp hücreleri kısıtlanan metabolizma nedeniyle şişmeye başlarlar.⁸ Kanlanmanın sağlanamaması durumunda birkaç saat içerisinde hücreler ölür.⁸ Bu evrede infarktüsün histolojik evölüsyonu ve miyokard kontraktilesi üzerine oksijen eksikliğinin fonksiyonel etkisi ile oluşur. Bu değişiklikler damar tıkanıldıktan sonra hemen (2 dakika içinde) başlar ve 2-4 gün içinde miyokard koagülasyon nekrozunun gelişmesi ile son bulur.⁸ Akut iske mi durumunda, anaerobik metabolizma yetersizleşince hücre içi ATP sunumu azalır. Sonuçta intrasellüler asidoz gelişir ve ATP'ye bağımlı prosesler bozulur (hücre içi Ca toplanır, ödem ve hücre ölümü oluşur).⁴ İnfarktüsün erken döneminde miyokard kontraktilesi azalınca kalp debisi düşer ve miyositlerin senkron kontraksiyonu kaybolur; hipokinezi, akinezi, diskinezi ve anevrizma gelişebilir. Küçük bir alanda iske mi var ise çok küçük bir kas bölgesi ölür ya da kas ölümü gözükmez. İskemik alan genişse birçok kas lifinin ölmesi kaçınılmazdır. Bunu izleyen günler içerisinde ölü bölge büyür. Çünkü uzayan iske mi sınırındaki birçok lifin ölümüne yol açar. Nekroz öncelikle akımın en fazla azaldığı yerde, endokardda meydana gelir ve daha sonra bunu endokarddan epikarda doğru uzanan, etrafa doğru sınırlı bir genişleme gösteren, hücre ölümü dalgası izler.⁸ Nekrozun genişliği koroner damardaki tıkanıklığın yeri, kollateral kan akımı, koroner damar tıkanıklığının süresi ve bölgesel miyokardiyal oksijen gereksinimi ile yakından ilişkilidir.⁹ Aynı süre için de ölü bölgede fibröz doku gelişmeye başlar.¹⁰ Çünkü iske mi fibroblastların gelişimini uyarır. Ve fibröz dokunun normalden daha fazla gelişmesine yol açar. Böylece ölü doku aşamalı olarak fibrotik dokuya dönüşmüş olur.⁸ Aynı dönemde kollaterallerin sürekli infarkte bölgenin dış tarafına doğru gelişmesi nedeniyle kasın işlevsiz bölümü giderek küçülür birkaç gün ile üç hafta arasında işlevsiz kas alanı ya normale döner ya da ölür.^{3, 11-13}

2.4. Myokard İnfarktüsünün Teşhisi

MI'ın teşhisi aşağıda verilen 3 bulgunun ikisinin varlığında konulur.¹⁴

- 1- Klinik hikaye
- 2- EKG değişiklikleri
- 3- Serumda enzim aktivite ve hücre içi proteinlerinin konsantrasyonlarının değişimleri

MI'ın yaklaşık %30'unda göğüs ağrısı atipiktir veya sessiz seyreder (Örn:Diabetik hastalar). Aynı şekilde hastaların bir bölümünde infarktüse özgü EKG değişiklikleri gözlenmez. Bu yüzden ISO'nin teşhisinde CK-MB, LDH ve AST gibi bazı enzimlerle intramyokardiyal proteinlerin (Myoglobin, Tnl ve TnT) serum seviyelerinin ölçümü en güvenilir diagnostik yöntemlerdir.¹⁵

2.5. Miyokard infarktüsünde oluşan biyokimyasal değişiklikler

MI'da oluşan temel fizyopatoloji iskemidir.³ İskemi, organa gelen kan akımının yetersizliği veya dokunun bozulmuş perfüzyonu olup, uzayan iskemi durumunda hücrelerin bütünlüğü kaybolup hücresel ölüm oluşabilmektedir.³ Kardiyak dokudaki bozuk perfüzyon enerji yetersizliğine ve oksijenden yoksun miyokard dokusunun kontraktıl aktivitesinin kaybına yol açar. Etkilenen hücrelerde kardiyak metabolizma artıklarının birikmesi yanında sarkolemma boyunca iyon dengesi de bozulur. Kardiyak hücrelerde iskeminin uzamasına bağlı olarak hücre bütünlüğü kaybolur ve hücre ölümü gerçekleşir. Sitoplazmik proteinlerin aşırı salınımı hücre membranının geçirgenliğini kaybettiğini gösterir ve iskemik atak esnasında internal membranlarda ultra strüktürel değişiklikler görülür.^{16, 17} Miyokardiyal iskemi, birbirine bağımlı veya birbirinden bağımsız bir çok fizyolojik ve patolojik sürecin sonucu olarak ortaya çıkabilir (İskemi, ateroskleroz, tromboemboli, perkütanöz transluminal koroner anjioplasti (PTCA), koroner arter bypass veya transplantasyon). İskeminin sebebi ne olursa olsun sonuçları daima aynıdır: Miyokarda yeterli oksijen sağlanamaz ve metabolizmayı devam ettirmeye yetecek miktarda substrat ulaşamaz. İskeminin ilk dakikalarında glikolitik yol büyük ölçüde stimüle olur, fakat daha sonra doku asidozunun gelişmesi, NADH, sitrat ve laktat birikmesi sonucu glikolitik yol inhibe olur.¹⁸ Koroner arter akımının zaman içinde yeniden sağlanması yani reperfüzyon olayı kardiyak hasarın önlenmesi için temel bir yoldur. Deneysel çalışmalar reperfüzyonun akut fazı esnasında bir miktar daha doku hasarının oluştuğunu göstermiştir. Reperfüzyon hasarı olarak bilinen bu olay, mikrosirkülasyondaki endotel hücrelere nötrofil adhezyonunu, intrasellüler enzimlerin salınımını, kalsiyum iyonlarının hücre içine girişini, sarkolemma fosfolipitlerinin bozunmasını ve Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırır. ROS

düzeylerinin artması açıl zincirlerinin peroksidasyonuna neden olur ve sonuç da hücre ölümü gerçekleşir.^{19, 20} Moleküler oksijenin indirgenmesi veya uyarılması sonucu serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Fizyolojik şartlarda mitokondrial elektron transport zincirinden sızma tarzında patolojik süreçlerde ise ksantin oksidaz metabolizmasından, aktive olmuş nötrofillerden, katekolamin oksidasyonundan, endotel hücrelerinden ve prostaglandinlerden serbest radikaller üretilmektedir.¹⁶ İskemi reperfüzyon sırasında, hidrojen peroksidin lipid peroksidasyonuna yol açmasına bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stres, membran hasarına yol açan mekanizmalardan birisidir ve intraselüler kalsiyum artışına ve “stunned” miyokardiyumda miyokard kontraktilesinin disfonksiyona neden olur.²¹⁻²³ Dolayısıyla MI sonrasındaki en önemli biyokimyasal olaylardan biride serbest oksijen radikallerinin artmasıdır.²⁴ Bu serbest oksijen radikallerinin artması sadece iskemi sırasında değil aynı zamanda reperfüzyon sırasında da olmaktadır. Günümüzde yapılan birçok bilimsel çalışmanın amacı iskemi ve/veya reperfüzyon sırasında oluşan serbest oksijen radikallerinin konsantrasyonunu azaltarak doku hasarını minimele indirmektir.²⁵

MI sırasında sadece serbest oksijen radikalleri salınmaz. Miyokarda oksijen temin edilememesi halinde nekroze olduğu zaman, sarkolemmal membranın bütünlüğü bozulur ve intrasellüler makromoleküller ve iyonlar interstisyuma oradan mikrovasküler yapıya ve lenfatiklere, daha sonra da periferik dolaşıma geçer. Periferik dolaşıma geçen bu makromoleküller serum kardiyak belirteçleri olarak adlandırılırlar.²⁶ İdeal bir kardiyak belirtecin optimal düzeyde spesifik kabul edilebilmesi için miyokard dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunması, miyokard dışı dokularda ve serumda bulunmaması gerekir.²⁷ Optimal spesifisiteye sahip olabilmesi için ise miyokard hasarından sonra hızla kana salınabilmeli, ayrıca belirtecin plazma düzeyi ile miyokard hasarının büyüklüğü arasında pozitif bir ilişki bulunmalıdır.²⁸ Klinikte yaygın kullanılabilmesi için, tanı için yeterli bir zaman süresince kanda tespit edilebilir düzeyde kalması, tespit metodun da kolay ve ucuz olması gerekir.

Kreatin Kinaz (CK): Kreatin kinaz kreatinin dönüşümlü fosforilasyonu katalize eden ve kas hücrelerinin sitozol ve mitokondrilere yerleşmiş bir enzimdir. ISO ve kas hastalıklarında yüksek plazma düzeyleri belirlenir. 3 izoformu bulunur; CK-BB, CK-MB, CK-MM. Kalpte baskın formu CK-BB'dir; ancak spesifik olan izoformu CK-MB'dir. CK-MB, miyokard infarktüsü sonrası 3.-12. saatte yükselir; 24 saatte pik yapar; 2.-3. günde normale döner. CK'nın serum zaman aktivite eğrisi reperfüzyondan etkilendiği için

erken reperfüzyon “wash-out” fenomenine neden olarak erken (12.saatten önce) ve yüksek konsantrasyonda pike neden olur.^{5, 28-30}

Serum CK düzeyindeki artış rutinde yaygın olarak kullanılabilmesine ve akut miyokard infarktüsünün sensitif enzimatik bir göstergesi olmasına rağmen; kas hastalıkları, alkol intoksikasyonu, diabetes mellitus, iskelet kası travması, ağır egzersiz, konvülsiyonlar, kas içi enjeksiyonlar, torasik outlet sendromu ve pulmoner embolide yanlış pozitif sonuçlar vermesi en önemli dezavantajdır.^{15, 29}

CK-MB İzoenzimi: Elektroforezde CK'nın üç izoenzimi (MM, BB ve MB) tespit edilmiştir. Beyin ve böbrek BB izoenzimini, iskelet kası temel olarak MM İzoenzimini ihtiva eder, ancak iskelet kasında 1/3 oranında MB izoenzimi de bulunur.³⁰ Kalp kasında hem MM hem de MB izoenzimleri vardır. MB izoenzimi ince bağırsakta, dilde, diafragmada, uterusu ve prostatta düşük düzeyde bulunur. CK-MB izoenzimi kalp dışı dokularda düşük düzeyde bulunduğu için yüksek CK-MB düzeyleri ISO'nın gold standart göstergesi olarak kabul edilir.^{5, 31}

Klinik değerlendirmelerde tek bir CK ve CK-MB ölçümüne güvenilmemeli, bunun yerine bu enzimlerin zaman içerisindeki yükseliş ve düşüşleri dikkate alınmalıdır. İskelet kası tarafından salınan CK-MB kalp kası tarafından salınana göre genellikle daha uzun süre yüksek kalır ve CK-MB'nin günlerce yüksek kaldığı plato paterni denen bir duruma neden olur. Şüpheli durumlarda kalp kası hasarının iskelet kası hasarından daha güvenilir bir şekilde ayırabilme yeteneğine sahip olan kardiyak spesifik troponinlere başvurulabilir. ISO'ye ilaveten miyokardit, travma, kalp kateterizasyonu, şok ve kalp cerrahisinin neden olduğu diğer kalp kası hasarlarında da CK-MB yükselir.³¹

Miyoglobin: Miyoglobin hasar görmüş miyokard hücrelerinden dolaşıma salınan ve infarktüsün başlangıcından sonraki 1-2 saat içerisinde dolaşımda tespit edilebilen düşük molekül ağırlıklı bir hem proteindir. Miyoglobin tüm kas hücrelerinde bulunur ve sitoplazmada lokalizedir. Hasara uğramış kas dokusundan hızla salınır ve küçük molekül ağırlığından dolayı idrarla atılır.³² ISO'da miyoglobin, CK'nın serum pik değerinden belirgin şekilde erken serum pik değerine ulaşır, bu süre 1-4 saat kadardır.³³

Troponinler: Kasın kasılmasında görev alan heteromerik regülatuar proteinlerdir. Troponin kompleksi şeklinde bulunurlar. Bu kompleksin üç değişik bileşeni vardır:

Troponin I: Myozinin ATPaz aktivitesini inhibe eder; kalbe spesifiktir.

Troponin T: Kompleksi tropomyozine bağlar; kalbe spesifiktir.

Troponin C: Kalsiyumu bağlayarak kasılmayı düzenler; kalbe spesifik değildir.

Kardiyak Spesifik Troponinler: Troponin kompleksi çizgili kaslarda kalsiyum tarafından yönetilen kontraksiyon mekanizmasını regüle eden üç altbirim ihtiva eder.³⁴ Bunlar Ca^{+2} ye bağlanan troponin C, aktine bağlanıp aktin-miyozin etkileşimini inhibe eden troponin I ve tropomyozine bağlanıp troponin kompleksini ince filamente bağlayan troponin T dir. Troponin T'nin çoğu troponin kompleksi içinde yer almasına rağmen %6'sı sitozolde bulunur. Troponin I'nın ise %2-3'ü sitozolde yer alır.²⁶

Troponin T ve troponin I kalp kasında ve iskelet kasında bulunmalarına rağmen, farklı genler tarafından kodlanırlar ve aminoasit dizilimleri farklıdır. Bu durum troponinin kardiyak formuna (cTn T ve cTn I) karşı antikör üretilmesine ve cTn T ve cTn I'nın kantitatif olarak ölçülebilmesine olanak sağlar.³⁵

Günümüzde kantitatif cTn T ve cTn I ölçümleri MI'nin tanısında kullanılan biyokimyasal kriterlerin en önemlileri haline gelmişlerdir.³⁶ cTn T ve cTn I'nin immunoassay yöntemleri ile kantitatif olarak ölçülebilmeleri mümkündür. Son zamanlarda kalitatif ve hızlı hasta başı testleri de kullanılmaya başlanmıştır. CK-MB düzeyleri referans değerler üst sınırının 10-20 kat üzerine çıktığı halde, cTn T ve cTn I'daki artış referans değerlerin 20 katından çok daha fazladır. cTn ölçümlerinin bu özellikleri küçük miktarlarda miyokard nekrozu bulunduğunda bile bunu tespit etmeye yarayabilecek şekilde gelişmiş "signal-to-noise" oranının elde edilmesini sağlar.³⁷

cTn T ve cTn I ISO tanısında son derece yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip biyokimyasal belirteçler olmalarına rağmen, ISO'yi takiben kanda uzun süre yüksek seviyede kaldıkları için rekürren infarktüslerin tanısında yetersiz kalmaktadırlar.^{31, 36}

Aspartat Aminotransferaz (AST): AST, ISO hastaların %90-95'inde yükselir.³⁸ Göğüs ağrısı ortaya çıktıktan sonra 8–12 saat içinde yükselmeye başlar, 24–48 saatte pik değerine ulaşır ve 3–4 gün içinde normal değerine döner.⁵ Yaygın doku dağılımı nedeni ile AST klinik tanıda yararı kısıtlı bir enzimdir. Miyokardın yanı sıra karaciğer parankim hasarı, iskelet kası hastalığı, akut pankreatit, perikardit gibi hastalıklarda, intramüsküler enjeksiyonlar, morfin, meperidin, ve warfarin gibi ilaçların kullanımında bulunan bu enzim ISO'de önemli bir tanısız yarar taşımamaktadır.³⁹ Buna rağmen bu enzimin de kardiyak profile eklenmesi yararlı olabilir.⁴⁰

2.6. Biyokimyasal kardiyak belirteçlerin karşılaştırılması

Tablo 1'e göre infarktüsün hangi periyodunda numune alınırsa alınsın birden fazla diyagnostik test bulmak mümkündür. Ancak bu avantajın kullanılabilmesi için bu kadar çok sayıda testin bir laboratuvarında hem de günün her saatinde çalışılabilir durumda olması gerekir. Bu da genellikle imkansızdır. Diğer taraftan, bu geniş kardiyak paneli diyagnostik sensitiflik ve spesifiklik bakımından da sıralamak gerekirse azalan diyagnostik değere göre şöyle sıralanabilir: CK-MB izoformları > CK-MB > TnI > TnT > Mb > Total CK > AST > LDH.⁵

Tablo 1: Kardiyak belirteçlerin kanda ilk görülme, pik düzeye erişme ve kandan kaybolma gibi özellikleri açısından karşılaştırması.⁵

Numune Alınma Zamanı (Diyagnostik pencere)	Yükselmeye Başlayan Testler	Pik yapan Testler	Düşmeye Başlayan Testler	Normal çıkan Testler
0-6. saatler arası	Mb CK-MB izoformları			CK-MB Total CK TnT TnI AST
6-12. saatler arası	CK-MB Total CK TnT, TnI	Mb CK-MB izoformları		AST
12-24. gün arası	AST TnT TnI	CK-MB Total CK TnT, TnI	Mb CK-MB izoformları	Mb CK-MB izoformları
1-2. gün arası	AST Total LDH LDH-1	AST TnT TnI	CK-MB Total CK	Mb CK-MB izoformları
2-3. gün arası	Total LDH LDH-1	AST TnT TnI	AST	Mb CK-MB izoformları CK-MB Total CK
3-10. gün arası		TnT TnI	TnT TnI	Mb CK-MB izoformları CK-MB Total CK TnT, TnI

2.7. Miyokard infarktüs tedavisi

Son otuz yılda tanı ve tedavideki büyük ilerlemelere rağmen, ISO gelişmiş ülkelerde halen en önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. ISO ile ilgili ölümlerin %50'si ilk bir saat içinde olmaktadır ve en sık neden ise gelişen ventriküler aritmilerdir.^{41, 42} Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre 2020 yılında ISO dünyadaki tüm ölümler içinde ilk sırayı alacaktır.⁴³ Modern koroner yoğun bakım ünitelerinin kurulması, hastaların % 54'un ilk 90 dakikada trombolitik tedaviye alınması veya anjiyoplasti ile erken reperfüzyon ISO'dan ölümleri belirgin olarak azaltmasına rağmen halen hastane içi mortalite yaklaşık %7'dir.⁴⁴ İnfarktüsün hızlı ve doğru tanısı sayesinde bu hastaların iyileşme şansı artmaktadır ve artacaktır. Önceleri MI gelişiminde birçok hipotez varken koroner anjiyografilerin gelişiminden sonra MI'nın asıl nedenin vasküler tromboza bağlı tıkanma olduğunda karar birliğine varılmıştır.^{13, 45} Bununla beraber vasküler tromboz gelişimdeki asıl neden ise aterosklerozdur. Ondokuzuncu yüzyılın ortalarından beri aterosklerozdan kolesterol ve kalsiyum öncelikle sorumlu tutulmuştur. Ancak zamanla çok çeşitli faktörlerin olaya katıldığı anlaşılmıştır. Bu kardiyovasküler risk faktörler, (1) **Değiştirilemeyen faktörler** (yaş, cinsiyet ve kalıtsallık) ve (2) **Değiştirilebilen faktörler** (yüksek kan basıncı, yüksek serum kolesterolü, yüksek lipoprotein (a), sigara, şişmanlık, glukoz intoleransı, yüksek fibrinojen, sol ventrikül yetmezliği, kokain, stres, hiperhomosisteinemi, LDL-kolesterol yükselmesi, HDL-Kolesterol azalması, Apo B-100 yükselmesi, Apo A1 azalması) (3) **Diğer faktörler** (Diyabet, Obezite, Homosistein yüksekliği, Sosyal sınıf, Psikososyal çevre, A tipi kişilik, Eksojen östrojenler, Diğer hastalıklar) şeklinde sıralanabilir.⁴⁶

Koroner bakım ünitesi öncesinde, ISO ile karşılaşan bir hekimin uygulayacağı tedavi sırasıyla temel olarak oksijen, nitrogliserin, yeterli analjezik, psikolojik destek, antitrombotik ve antikoagülan tedavi, aspirin ve diğer ilaçları içerir. Antihipertansif ilaçları da içeren diğer ilaçlar ISO'nün erken safhasında veya geç dönemde farklı amaçlarla verilir. Antihipertansif ilaçlar, vazodilatör etkilerini oluşturma mekanizmalarını ve primer etki yerlerini dikkate alarak ayrılabilirler. 1. Adrenerjik reseptör blokörleri, 2. Kalsiyum kanal blokörleri (KKB), 3. Anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ve reseptör blokörleri, 4. Direkt etkili vazodilatörlerdir.⁴⁷

Günümüzde tıp alanında kullanılan birçok ilaç piyasada bulunmakta olup var olan ilaçların farklı etkileri ve yeni geliştirilmekte olan birçok kimyasal ve farmasötik ajanın deneysel çalışması büyük bir hızda devam etmektedir. KKB, Beta reseptör blokörleri ve ACE inhibitörleri de tedavide oldukça yoğun bir şekilde kullanılmakta olup her geçen gün farklı etkileri ve farklı endikasyonları ortaya çıkmaktadır.⁴⁸⁻⁵⁰

Konumuz gereğince MI'da en çok reçete edilen ilaç gruplarından; Kalsiyum kanal blokörleri, Beta reseptör blokörleri ve ACE inhibitörleri hakkında bilgi verip söz konusu gruplardan seçtiğimiz ilaçların önemli özelliklerini devam eden kısımda sunmaya çalışacağız.

Kalsiyum kanal blokörleri: Kalsiyum canlı organizmada sayılamayacak kadar çok yapısal ve fizyolojik görevler üstlenmiş olup uyarılabilir hücreler başta olmak üzere birçok hücre fonksiyonunun sürmesi için olmazsa olmaz bir iyonudur.^{51, 52} Bu iyonun plazmadaki konsantrasyonu oldukça sabit olup 8.5-10.4 mg/dl arası gibi dar bir aralıkta değişerek üç fraksiyon şeklinde bulunur.^{3, 53} Kalsiyumun yaklaşık % 41'i plazma proteinleriyle birleşmiş olarak, % 50' si iyonize durumda, % 9 kadarı da iyonize olmayan bir durumda bağlanmış şekilde bulunur. Hücre dışında bulunan kalsiyum hücre içinde bulunan miktardan yaklaşık 10.000 kat daha fazla yoğunlukta bulunur. Çok düşük konsantrasyonlarda olan hücre içi kalsiyum ya sitoplazmada serbest halde ya da hücre içi organellerde bağlanmış bir şekilde bulunmaktadır.^{3, 47, 54}

Kalsiyum kanal blokörlerinin (KKB) en önemli özelliği voltaja bağımlı kalsiyum kanal proteini veya oligomerik kompleksi üzerinde kendilerine özgü reseptörlere yüksek afiniteli bir şekilde bağlanarak kalsiyum kanalları açık hale geldiğinde, yüklü kalsiyum iyonlarının içe akışını inhibe etmeleridir.⁴⁷ Bu etkiyle damar düz kası ve miyokard hücresine Ca^{+2} girişini azaltır ve böylece sitosolik Ca^{+2} düzeyini düşürerek eksitasyon kontraksiyon ikili ilişkisini bozarlar, sonuçta vasodilatasyon ve negatif inotropik etki meydana gelir.⁵⁵ Kalsiyum kanal blokörlerinin düz kas hücresindeki etkisi venöz yatağa göre arteriyel duvarda çok daha fazladır.⁵⁶ Meydana gelen arteriyel dilatasyon sonucu periferik direncin azalması kalsiyum kanal blokörlerinin başlıca antihipertansif etki mekanizmalarıdır.⁵⁷

Lasidipin: Üçüncü kuşak dihidropiridin (DHP) türevi kalsiyum antagonistidir.⁵⁸ Esas etkisi periferik arteriyelleri genişleterek damar rezistansını azaltıp kan basıncını düşürmektir. Etkisi yavaş ortaya çıkar. Uzun etki sürelidir.⁵⁹ Bu nedenle diğer kalsiyum kanal blokörlerinin kullanımına bağlı olarak gelişen refleks taşikardi sıklığı oldukça azdır. Lasidipin ayrıca, 24 saatlik dönemdeki maksimum ve minimum antihipertansif etki arasındaki farkı da çok azaltır ve böylece gündüz ve gece saatleri arasındaki kan basıncı kontrolünü optimal düzeye çıkarır.^{60, 61} Lasidipin yüksek oranda vazoselektiftir. Yaygın olarak hipertansiyon tedavisinde kullanılır. Antihipertansif etkisine ek olarak hipertansiyona bağlı gelişen sol ventrikül hipertrofisini azalttığı, miyokardiyal kan akımını artırdığı da gösterilmiştir.⁶² Bu son etkiyi kardiyak outputu artırarak, sistolik ve

diastolik kardiyak rezervleri eski haline getirerek oluşturur.⁶² Lasidipinin koroner sistemde belirgin bir gevşetici etkisi vardır.⁶³ Lasidipinin koroner dolaşım üzerindeki yararlı etkileri, birkaç hafta süreyle standart antihipertansif dozlarda tedavi edilen esansiyel hipertansiyonlu hastalarda doğrulanmıştır. Ayrıca lasidipin üç potansiyel doku koruyucu özellik gösterir. ilki hipertansif hastalarda adenozin difosfatın uyardığı trombosit agregasyonunu azaltır, ikinci olarak sıçan kortikal membranlarında öteki kalsiyum antagonistlerinden daha güçlü bir antioksidan etki gösterir, son olarak yine öteki kalsiyum antagonistlerinininkinden daha güçlü antiaterojenik bir etkisi vardır. Lasidipin endotelial nitrik oksit sentaz enzimini aktivasyonunu uyararak nitrik oksit (NO) sağlayarak vazodilatasyona neden olur.⁶⁴

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri: Peptid yapılı otokoidlerden insan ve diğer memelilerde oluşanların başında anjiyotensinler, endotelinler ve plazma kininleridir. Anjiyotensin güçlü bir vazokonstriktördür. Esas olarak hormonal (endokrin) ve parakrin fonksiyon yapar. Vücutta anjiyotensin üreten iki sistem vardır: 1. Hormonal renin-anjiyotensin sistemi (HRAS): Böbreklerde jukstaglomerüler hücrelerin salgıladığı renin dolaşan kanda plazmanın alfa-2 globülin fraksiyonunda bulunan anjiyotensinojen'den anjiyotensin peptidleri oluşur. Bunlar anjiyotensin I,II ve III'tür. Hormonal fonksiyon yapan anjiyotensin, anjiyotensin II'dir; sadece anjiyotensin dendiği zaman bu madde anlaşılır. Böbreklerde sadece HRAS sistemi yoktur aynı zamanda doku renin-anjiyotensin sistemi de vardır. 2. Doku renin-anjiyotensin sistemi (DRAS):Damar endotelin ve damar çeperlerindeki diğer hücrelerde anjiyotensinojen ve dönüştürücü enzim biyosentezini kodlayan genlerin ve mRNA'ların varlığı gösterilmiştir. Ayrıca kalp perfüzyonu yapıldığı zaman venöz dönüşe anjiyotensin salıverildiği bulunmuştur. Bu sistem plazmadan aldığı böbrek kaynaklı renini kullanır. DRAS en yoğun şekilde böbrekte bulunur ve olasılıkla böbrek damar yatağı rezistansının uzun vadeli düzenlenmesinde katkıda bulunur.⁴⁷

Anjiyotensinojen üzerine renin'in etkisi sonucu bir dekapiptid olan anjiyotensin I oluşur, büyük kısmı itibariyle akciğerlerde bulunan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından anjiyotensin II'ye dönüştürülür. Çinko içeren bir enzim olan ACE, esas olarak damar endotel hücresi membranında yerleşmiştir. anjiyotensin II bir proinflamatuvar endojen otokoiddir. Anjiyotensin II aynı zamanda salgısının arttığı yerlerde ROS miktarını artırdığı gösterilmiştir.⁶⁵ Anjiyotensin II ve ROS'un MI sonrası oluşan kardiyak fibrozis gelişiminde çok önemli rolleri bulunmakta olup MI sonrasında ortak roller üstlenmişlerdir.⁶⁶ Bununla beraber doku hasarında anjiyotensin II miktarı

artar buda fibroblastları artırmaktadır. Anjiotensin II dokularda fibrogenezisi tetiklediğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır.⁶⁷ Ayrıca anjiotensin II birçok büyüme faktörünü artırarak sitokinlerin ve doku farklılaşma faktörlerinin artımını sağlamaktadır ve yapılan çalışmalarda MI sonrası oluşan fibroziste Anjiotensin II'nin doku büyüme faktörü olan TGF-Beta'yı artırdığı gösterilmiştir.⁶⁸ Bu bilgiye ek olarak Anjiotensin II'nin reseptörlerinin inhibisyonunun Anjiotensin II ile indüklenen fibrozisi azalttığı gösterilmiştir.⁶⁷ Anjiotensin II yapılan çalışmalarda iskemik dokuda arttığı ve hasar ile anjiotensin II konsantrasyonu arasında bir paralelliğin olabileceğini gösteren birçok çalışma vardır. HRAS'in MI sonrası kardiyak remodelling oluşumunda çok önemli olduğu gösterilmiştir.⁶⁹ Bu bilgiye destekler şekilde anjiotensin II'nin miktarını azaltan ve ISO'nün erken döneminde verilen ACE inhibitörlerinin mortaliteyi azaltma üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir.⁶⁹ Sonuç olarak, ACE inhibitörleri ISO'lu hastalarda, özellikle anterior MI, KKY bulguları olan hastalarda, trombolitik tedavi bittikten ve tansiyon stabilize olduktan sonra başlanmalıdır. Kan basıncı 100 mmHg altında olanlara, bilateral renal arter darlığı ve renal yetersizliği olanlara verilmemelidir. ACE inhibitörlerine düşük doz ile başlanmalı, doz kademeli olarak artırılmalıdır. Başlangıçta kısa etkililer ile başlanmalı, daha sonra uzun etkililere geçilmelidir.

Ramipril, uzun etkili bir anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörüdür. Ramiprilin aktif metaboliti Ramiprilat, bir dipeptidil karboksipeptidaz I (ACE, kininaz II) enzim inhibitörüdür. ACE inhibitörü ile yapılan düşük doz çalışmalarında MI ve diğer iskemik vakaların görülme sıklığını %23'den % 14'e düşürdüğü görülmüştür. Daha sonra yapılan çift körlü çalışmada ise kardiyovasküler hastalıklar ile MI, ölüm ve felç vakalarında ramipril ile risk azalmıştır.⁷⁰

Akut Enfarktüste Ramipril Etkinliği Araştırması, kalp yetmezliği klinik olarak kanıtlanmış, akut Miyokard enfarktüsü sonrası 3-10 gün içinde ramipril ile tedaviye başlanan hastalarda, mortalite riskinin plaseboya göre %27 oranında azaldığını göstermiştir. Yapılan analizler ile tahmin edilen riskler olan ani ölüm oranında %30, ağır/dirençli kalp yetmezliği gelişme oranında ise %23 gerileme olduğu saptanmıştır. Miyokard enfarktüsü sonrası kalp yetmezliği nedeni ile hastanede yatma ise %26 oranında azalmıştır.⁷¹

Anjiotensin II reseptör blokörleri

Anjiotensin Reseptörleri: Anjiotensinler hücrelerin anjiotensin reseptörlerini aktive etmek suretiyle etki oluştururlar. Bunlar 2 tip G proteini ile kenetli heptahelikal

reseptörleridir. Bu reseptörler hücrelerin membranları üzerinde yer alırlar. İlginç olarak beyinde hipotalamus ve diğer bazı bölgelerde reseptör konsantrasyonu, periferik yapılardakinden fazla bulunmuştur. Hücre membranındaki anjiyotensin reseptörlerinin losartan(DuP 753) ve PD 123319 adlı non-peptid reseptör antagonistlerine olan duyarlılıklarına göre iki tipe ayırt edilir.⁴⁷

1) AT₁ Tipi Reseptörler: Losartan'a yüksek afinite gösterirler ve onun tarafından selektif bir şekilde antagonize edilirler. Damar düz kasları, böbrek, kalp ve adrenal kortekste, karaciğer adrenerjik sinir uçlarında ve beyin bazı bölgelerinde egemen olan reseptör tipi AT₁'dir. Bunlar Gq/11 proteini ile kenetlenen reseptörleridir. Anjiyotensin II'nin dokulardaki tüm etkilerini bu reseptör aracılığıyla meydana getirir. Bu reseptörlerin bloke edilmesiyle Anjiyotensin II'nin tüm etkileri antagonize edildiği gösterilmiştir.

2) AT₂ Tipi Reseptörler: Bu tip reseptörler üzerinde A II ve AIII'ün etki gücü eşittir. Fötal dokularda, yaralanma ya da iskemi sonucu yıkıma uğradıktan sonra nedbeleşen dokularda, adrenal medulla, uterus düz kası, overler ve beyinin bazı bölgelerinde fazla bulunan reseptörlerdir. Adrenal korteks'teki anjiyotensin reseptörlerinin yaklaşık 1/4'ü AT₂ tipi, geri kalan ise AT₁ tipidir. AT₂ reseptörler böbrekte bulunmazlar. Bu reseptörün aktivasyonu, protein tirozin fosfatazın inhibisyonuna veya stimülasyonuna, guanilat siklazın ve hücre membranındaki K⁺ kanallarının kapanmasına yol açar.⁴⁷

Diğer antihipertansif ilaçlardan ayrı olarak Anjiyotensin reseptör blokerleri (ARB)'ler diyabetli hastalarda nefropati, koroner damar hastalığı ve inmeleri azaltmada yararlıdır. Diyabete bağlı olan veya olmayan böbrek hastalıklarında, hastalığın ilerlemesinin durması veya gerilemesi üzerine olumlu birçok etkisi gösterilmiş olup bu hastalıklarla yapılan klinik çalışmalar ışığında ARB'ler ilk tercih ilaç haline gelmiştir. Kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği ve daha önemlisi diyabetin eşlik ettiği hipertansiyonlu hastalarda artık ARB kullanılması zorunlu bir endikasyon haline gelmiştir. Ancak klinik olarak yararlı oldukları fark edilse bile, bütün ARB'lerin aynı yararlı etkiye sahip olmadıklarına -özellikle kronik kullanımda- ilişkin kanıtlar da güçlenmektedir.⁷²

Aktive olan ATE-II tip I (ATE-I) reseptörlerinin intrasellüler kalsiyum hemostazının, hücre kasılmasının, proliferasyonunun düzenlenmesinde ve proinflamatuvar sitokinler ile pro-fibrojenik aktivitelerin indüksiyonunda önemli rolleri olduğu düşünülmektedir.^{73, 74} Bu nedenle HRAS'ı reseptörleri bloke ederek inhibe

etmenin kardiyovasküler, renal ve hormonal hastalıklar ile metabolik sendromun tedavisinde yararlı bir yol sağlayacağı düşünülmektedir.⁷⁵⁻⁷⁸

Valsartan: Valsartan oral yoldan aktif, güçlü ve spesifik bir anjiotensin II (Ang II) reseptör blokörüdür. Anjiotensin II'nin bilinen etkilerinden sorumlu olan AT₁ reseptör alt-tipini selektif olarak etkiler. Valsartan ile AT₁ reseptör blokajından sonra yükselen anjiotensin II plazma seviyeleri, bloke olmayan ve AT₁ reseptörlerin etkisini ortadan kaldırıyor gibi görünen AT₂ reseptörlerini stimüle eder. AT₁ reseptöründe hiçbir kısmi agonist aktiviteye sahip olmayan valsartanın bu reseptöre olan ilgisi, AT₂ reseptörüne olan ilgisinden çok daha fazladır (yaklaşık 30 000 misli).⁷⁹

Valsartan, anjiotensin I'i II'ye dönüştüren ve bradikininini parçalayan, kininaz II olarak da bilinen, anjiotensin dönüştürücü enzimi ACE'yi inhibe etmez. ACE üzerinde etkili olmamaları ve ayrıca ne bradikininini, ne de P maddesini güçlendirici etki göstermemeleri nedeniyle, anjiotensin II reseptör blokörlerinin öksürükle ilişkisi yoktur. Miyokard infarktüsünden sonra sol ventrikül yetersizliğine ait belirtiler, semptomlar veya radyolojik kanıtlar ve/veya sol ventrikül sistolik disfonksiyonu gelişen, klinik bakımdan stabil hastaların yaşam süresinin uzatılmasında kullanılır.⁸⁰

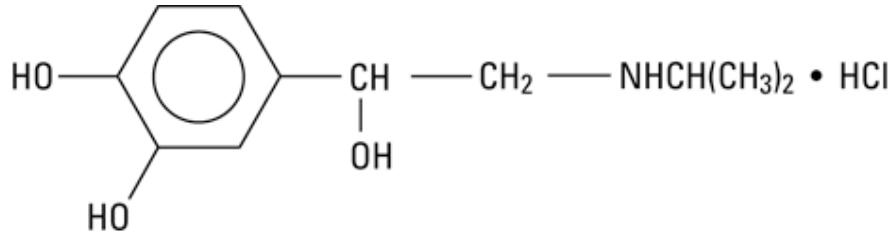
2.8. Deney hayvanlarında deneysel oluşturulan miyokard infarktüs modelleri

ISO hale daha dünyadaki ölümlerin en sık nedeni olmasından dolayı bilim adamları bu konu üzerinde çok yoğun bir şekilde durmasını sağlamıştır. MI deneysel çalışmaları insanlar üzerinde yapılamaması nedeniyle son 50 yılda birçok farklı deneysel hayvan MI modeli geliştirilmiştir.⁸¹ Bu nedenle tavşan, domuz, köpek ve son zamanlarda ratlar sıklıkla kullanılmaktadır. Etik sorunlar nedeniyle günümüzde sadece ratlar kullanılmakta olup bazı çalışmalar köpekler üzerinde devam ettirilmektedir.^{81, 82} Sıklıkla ratlarda oluşturulan MI modelleri ya cerrahi olarak koroner arterlerin bağlanması ya da herhangi bir ilaçla kalbin iş yükünü artırarak MI oluşturmaktır. Cerrahi olarak yapılan uygulamalarda birçok farklı komplikasyonlar oluşmakta ve aynı zamanda hayvanlara bir travma uygulanmakta bu travma sonrası denenecek ilaçlar veya yöntemlerin fayda veya zararı tam olarak kestirilememektedir.⁸³ Çünkü yoğun anestezi, göğüs kafesinin açılması ve cerrahi sonrası oluşabilecek komplikasyonlar aynı zamanda enfeksiyon riski ve cerrahi girişim sonrası oluşan enflamasyon^{84, 85} cerrahi olarak koroner arter bağlanmasını tartışılır hale sokmaktadır. Fakat günümüzde hale daha bu teknik kullanılmaktadır. Cerrahi tekniğin bu dezavantajlarından sonra ilaçla indüklenen MI modelleri daha talep edilir hale gelmiş bu ilaçlardan ise

isoproterenol en çok kullanılan ilaç olmuştur. İsooproterenoldan (ISO) farklı olarak soğukla indüklenen, mikroembolizmle indüklenen ve kateterizasyonla indüklenen MI modelleride bulunmaktadır.⁸⁶⁻⁸⁹

2.9. İsooproterenolün yapısı ve etki mekanizması

ISO, ratlarda deneysel miyokard infarktüsü oluşturmak için yaygın olarak kullanılan sentetik bir katekolamin türevidir.⁹⁰⁻⁹⁵ Sistematik (IUPAC) adı 4-[1-hidroksil-2-(1-metiletilamino) etil] benzen-1,2-diol hidro-klorit olan İsooproterenol Hidroklorid, isoprenaline olarak da bilinir. Kapalı formülü $C_{11}H_{17}NO_3 \cdot HCl$, molekül ağırlığı 242.72 g'dır.⁹⁶ ISO'nun molekül yapısı aşağıda gösterilmiştir Şekil 2.



Şekil 1 : İsooproterenolün moleküler yapısı.

ISO, yapı olarak adrenaline çok benzemektedir.⁹⁷ Ancak adrenalın gibi α reseptörlerini etkilemez. ISO, sitozolik cAMP'yi artırarak etki gösteren β -adreneresepör agonistidir.^{97, 98} Yüksek dozlarda vazokonstriktör, düşük dozlarda vazodilatör etkisi vardır. Adrenalin gibi barsakta inaktive edildiğinden ağız yoluyla kullanılamaz. İskemik koroner hastalığı olanlarda kontrendikedir.⁹⁹ ISO ile miyokard infarktüsü oluşturulmuş sıçan kalbinde meydana gelen patofizyolojik değişikliklerin insanlarda miyokard infarktüsü sonrası oluşan değişikliklere benzerlik gösterdiği bilinmektedir. Bu değişiklikler güçlü kronotrop ve inotrop özelliklerine bağlı olarak miyokard oksijen tüketimini arttırmasına ve aynı zamanda diastolik arter basıncı ve koroner perfüzyon basıncını düşürmesine bağlıdır. Bu özelliklerine ek olarak katekolamin ile uyarılmış nekrozda, siklik adenosin monofosfat (cAMP) düzeylerindeki artışın,¹⁰⁰ intrasellüler kalsiyum artışının ve yüksek enerjili fosfatların tüketilmesinin¹⁰¹ önemli rol oynadığı bildirilmiştir. ISO verilmesi ile intrasellüler kalsiyum miktarını artırarak yüksek enerjili fosfat üretimini engeller çünkü mitokondride kalsiyuma bağlı ATPaz çalışamaz hale gelir ve ATP azalması kalp kasında geri dönüşümsüz hasara yol açan birçok olaya öncülük eder.^{102, 103} Katekolaminler tarafından uyarılan miyokardiyal nekrozun patogenezi multifaktöryel olmasına rağmen oksidatif stresin önemli rolü olduğu

gösterilmiştir.^{104, 105} Ayrıca ISO ile indüklenmiş deneysel MI modellerinde kalp hasarının diğer bir mekanizması ise intrasellüler lizozomal enzimlerin salınmasıdır ki bu hem MI hasarını direkt olarak yaparken hem de serbest oksijen radikallerini artırarak ikincil olarakta hasara yol açar.^{106, 107}

2.10. Antioksidanlar

2.10.1. Serbest radikaller

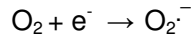
Herhangi bir atom veya molekülün dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektronun bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini artırır. Dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren bu türler **radikal** (veya serbest radikal) diye adlandırılır.^{108, 109} Hücre intrasellüler normal metabolizma sonucu oluşan ve ekstrasellüler olarak ise UV radyasyon, iyonize radyasyon veya kısaca ksenobiyotik etkiler sonucu sürekli olarak serbest radikal türlerinin maruziyeti altındadır. Oksijenden oluşan serbest radikallere Reaktif Oksijen Species (ROS) denir. Başlıca hidroksil radikali $\cdot\text{OH}$, süper oksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksidi (H_2O_2)'yi içerir. Nitrojenden oluşan serbest radikallere ise Reaktif Nitrojen Species (RNS) denir.¹¹⁰ Başlıca RNS türleri arasında nitrik oksit ($\cdot\text{NO}$), nitrit (NO_2^-) ve nitratı (NO_3^-) sayabiliriz. ROS'nin hücre içi oksidatif modifikasyon yapacağı hedefler, DNA, lipit ve proteinleri içerir¹¹¹. Bunun yanı sıra bu modifikasyonların sırası ise; ROS'nin üretim yeri, oksitlenecek molekülün bağlı yeteneğine ve metal iyonlarının varlığı gibi birkaç faktöre bağlıdır. ROS ve diğer serbest radikallerin saldırılarına karşı önlem için hücrelerde birçok savunma sistemi vardır. Bu savunma sistemlerinden en basiti vitamin C ve vitamin E gibi düşük molekül ağırlıklı antioksidan moleküllerdir. Bu moleküller kendi kendine reaktif hale gelmiş az reaktif radikaller olsalar da hücresele biyomoleküllere karşı zararı önlerler. Öte yandan daha kompleks yaklaşımları içeren Süper Oksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon Peroksidaz (GPx) gibi enzimler ise ROS'nin miktarını yavaş bir şekilde sınırlandırır.^{110, 111}

Biyolojik sistemlerdeki en büyük radikal kaynağı oksijendir. Çünkü oksijen atomu orbitallerinde iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken, radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girmesini sağlamaktadır. Oksijen atomu orbitallerindeki elektronların farklı dizilimi ile de süperoksit, peroksit ve singlet oksijen gibi radikallerin oluşumuna da neden olur. Ayrıca serbest oksijen radikali oluşumunun anahtar maddeleri arasında oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalleride yer almaktadır. Oksijenli (Aerobik) solunum yapan

canlılar dışardan aldıkları besin maddelerini oksijeni kullanarak enerjiye çevirirler. Dolayısıyla aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin en fazla olduğu canlı grubudur. Bu yüzden aerobik solunum yapan canlılar serbest radikallerin etkilerine daha fazla maruz kalırlar.^{112, 113}

2.10.1.1. Serbest radikal çeşitleri

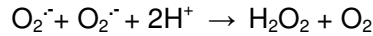
Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$): Oksijen molekülünün içerdiği iki serbest elektrondan bir tanesini dışarıdan bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur.



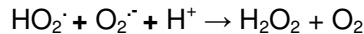
Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) hemen hemen bütün aerobik hücrelerde bulunmaktadır. Süperoksit radikalinin eozinofil, monosit, makrofaj ve nötrofil gibi fagositik hücreler tarafından üretilerek radikal oluşunu artırdığı bilinmektedir.¹¹³

Süperoksit radikali nadir olarak oksidatif hasara neden olurlar. Çünkü SOD enzimi ile hızlı bir şekilde hidrojen peroksite (H_2O_2) çevrilir. Buna ilaveten asidik durumlarda H_2O_2 ve peroksil (HO_2^{\cdot}) radikallerini üreten spontan reaksiyona uğrar. Süperoksit radikallerinin asıl zararları hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır.¹¹⁴

İki süperoksit radikalının bir araya gelmesi sonucu hidrojen peroksit oluşur.



Süperoksit radikali ve peroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu da hidrojen peroksit ve oksijen oluşur.

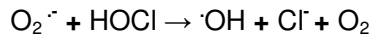


Süperoksit radikalının nitrik oksit radikali ile birer eşleşmemiş elektronlarını kovalent bağ ile bağlamaları sonucu peroksinitrit meydana gelir.¹¹⁵



Hipoklorik asit (HOCl) oksijen metabolitleri ile reaksiyona girme özelliğine sahip olması nedeniyle ilgi uyandırmıştır. Hidroklorik asitin süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda oldukça güçlü oksidan olan $\cdot OH$ radikalının oluştuğu görülmüştür.^{108,}

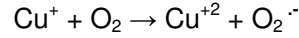
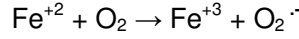
¹¹⁶



Süperoksit anyonu hem indirgeyici hem yükseltgeyici özelliğe sahiptir. Adrenalin, dopamin, askorbat ve hidroksilamini oksitler nitrobluetetrazolium ve sitokrom c'yi indirger. Redükta olarak görev yaptığında ferrisitokrom c'nin redüksiyonunda bir

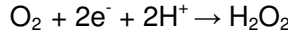
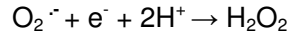
elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Oksidan olarak görev yaptığında ise epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen peroksite indirgenir.^{108, 117}

Diğer taraftan geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucunda da süperoksit radikali oluşabilmektedir.¹¹⁸

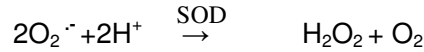


Bu reaksiyonlar geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olup serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasında çok büyük öneme sahiptir.^{112, 117, 119}

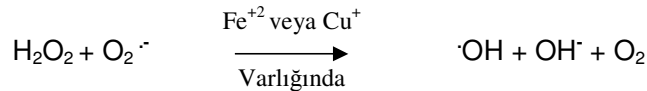
Hidrojen peroksit (H₂O₂): Asidik ortamda moleküler oksijenin ortamdaki iki elektron alması veya süperoksit'in bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit meydana gelir.^{120, 121}



Biyolojik sistemlerdeki hidrojen peroksitin asıl kaynağı herhangi bir sistem tarafından üretilen süperoksit radikalının dismutasyon reaksiyonudur. Ayrıca ürat oksidaz, glukoz oksidaz, ve D-aminoasit oksidaz gibi enzimler iki elektronunu oksijene vererek H₂O₂ oluştururlar.^{118, 121}

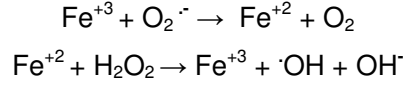


Hidrojen peroksit kendi başına çok zayıf oksidant özelliği gösterir. Çünkü ortaklanmamış bir elektron içermemektedir. Hidrojen peroksit gerektiğinde hücreler tarafından selenyum içeren glutatyon peroksidaz, katalaz ve belirli peroksidazlar tarafından ortadan kaldırılabilir. H₂O₂ serbest bir radikal olmadığı halde, ROS içine girer ve serbest radikaller içerisinde önemli bir rol oynar. Çünkü Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.^{114, 121}

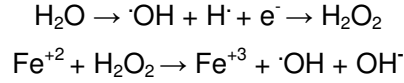


Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber- Weiss reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz olarak meydana gelebilir. Ancak katalizör olmadığı zaman çok yavaş ilerler. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe⁺³) süperoksit tarafından ferro demir'e (Fe⁺²) indirgenir. Daha sonra bu ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonu ile

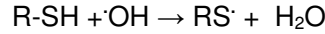
hidrojen peroksitten $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir^{122, 123} reaksiyonun mekanizması aşağıdaki şekildedir.^{112, 118}



Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$): Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında yani fenton reaksiyonu sonucu ve suyun yüksek enerji ile iyonlarına ayrılması ile oluşan son derece reaktif oksidan radikaldir. Hidroksil radikali özellikle biyolojik moleküller üzerine saldıran ve olduğu yerde büyük hasarlara neden olan oldukça hareketli bir oksidandır.¹²⁴



Hidroksil radikali birçok biyolojik molekülden hidrojen atomu koparır. Bunlardan birisi de tiollerdir.



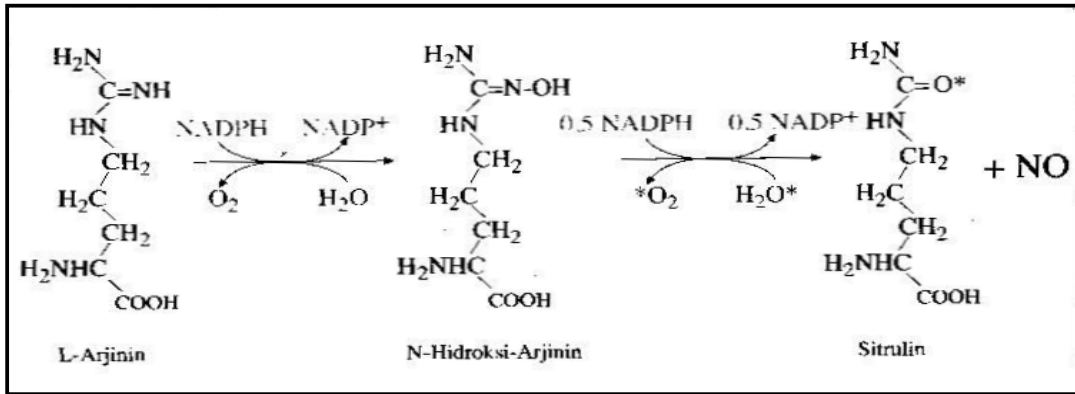
Meydana gelen sülfür radikali oksijenle birleşerek tiyol peroksil (RSO_2) ve sülfenil (RSO^{\cdot}) gibi oksisülfür radikallerini meydana getirir. Bu radikaller de biyolojik moleküllerde hasar yapıcı etkiye sahiptir.

Belki de $\cdot\text{OH}$ en iyi tanımlanmış biyolojik hasarı lipid peroksidasyonunu stimüle etmesidir. Bu durum hidroksil radikallerinin membrana yakın bir yerde üretilmesi ve membran fosfolipit zincirinin yağ asidi tabakasına atak tapması ile meydana gelir.

Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$): Singlet oksijen eşleşmemiş elektron ya da elektronlara sahip olmadığından dolayı bir serbest radikal değildir. Oksijenin eşleşmemiş elektronlardan birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spininin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Ancak orbitalinde içerdiği elektronların aynı yönlü olması singlet oksijenin diğer ROS ile okside olmasını artırmaktadır. Singlet oksijen özellikle fotokimyasal reaksiyonlar için oldukça önemlidir.^{108, 125, 126}

Nitrik oksit ($\cdot\text{NO}$) : NO rensiz bir gaz olup, serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. $\cdot\text{NO}$, L-arginin (Arg) amino asitinden in vivo olarak üretilmektedir. $\cdot\text{NO}$ 'nun Arg'den sentezi Nitrik oksit Sentaz enzimi tarafından iki basamakla gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında Arg'in guanido azotu (Nw) hidrosillenerek Nw-Hidroksi arjinin (N-OH-Arg) oluşur. Bu ara ürün oldukça kararlıdır. Enzime sıkı bağlı olan bu ara

ürün ikinci aşamada sitrullin ve NO'ya çevrilir. Enzimatik 'NO sentezinin her iki aşaması da enzimin birer monooksijenaz aktivitesi sayesinde gerçekleşir. NOS tarafından 1 mol Arg'den 1 mol 'NO sentezi için 2 mol O₂ ve 1.5 mol NADPH kullanılır. Kullanılan oksijenlerin iki atomu suya indirgenirken diğer iki oksijen atomu, 'NO ve sitrullin oluşumunda kullanılır¹¹⁰ (Şekil 3). 'NO yapısındaki oksijen atomunun kaynağı, ilk monooksijenaz aktivitesi ile Arg'e katılan atomdur. Sitrulindeki oksijen atomunun kaynağı ise ikinci monooksijenaz tepkimesi sırasında kullanılan oksijendir.^{40, 51, 110, 127}



Şekil 2: Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen argininden nitrik oksit oluşumu

Son yıllarda, radikal olan nitrik oksit üzerinde oldukça fazla durulmaya başlanmıştır. Nitrik oksit eşleşmemiş elektronları sayesinde süperoksit, tiyol grupları ve nitrojen dioksit ile hızlı reaksiyonlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Diğer radikallerle birlikte diabetes mellitus, septik şok, kalp bozuklukları, Alzheimer hastalığı ve gastrik hasar oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir.^{121, 128, 129}

NO çok yönlü bir biyolojik haberci molekül olup, farklı biyolojik etkilere sahip olabilen bir kimyasal türdür. Başlangıçta çeşitli biyolojik fonksiyonların regülasyonunda görev alan, hücre içi ve hücreler arası bir haberci molekül olarak tanımlanmıştır.¹¹⁰ Bu görevlere tipik örnek olarak sinir sistemindeki nörotransmitter fonksiyonu ve damar düz kaslarının gevşemesine olan etkileri sayılabilir. Daha sonraki çalışmalarda, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmaları ve inflamasyonda olduğu dokuya göç etmesinde, trombosit agregasyonunun inhibisyonunda, damar permeabilitesinin kontrolünde, penis ereksiyonda, immün sistemin fonksiyonlarında, barsak ve böbreklerde tuz ve su emiliminde de NO'un regülatör fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir.¹¹⁰ NO'nun ayrıca hücreleri sitotoksik etkilere karşı koruyucu etkileri de tanımlanmıştır.¹¹⁰

Diğer Serbest Radikaller: Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller (R[•]), peroksil radikalleri (ROO[•]), alkoksil radikalleri (RO[•]), tiyol radikalleri (RS[•]) gibi önemli serbest radikallerde oluşabilir. Bunlardan özellikle polidoymamış yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir. Tiyol radikalleri de tekrar oksijenle reaksiyona girerek sülfenil (RSO[•]) veya tiyol peroksil (RSO₂[•]) vb. gibi radikalleri oluşturabilirler.^{110, 112}

2.10.2. Serbest radikal kaynakları

Serbest radikaller organizmanın normal yaşamını sürdürmesi için gerekli olan metabolik faaliyetlerini devam ettirmesi için gerekli olan reaksiyonların sonunda oluşabildiği gibi stress ve radyasyon gibi çevresel faktörlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Bu nedenle serbest radikal kaynakları endojen ve eksojen radikal kaynakları olmak üzere ikiye ayrılır.¹¹²

2.10.2.1. Eksojen radikal kaynakları

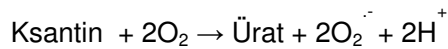
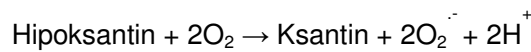
İlaç oksidasyonları, radyasyon, güneş ışığı, UV-ışınları sigara dumanı, egzoz gazları, kükürtdioksit, çevresel ajanlar ve strestir.^{108, 130, 131}

2.10.2.2. Endojen radikal kaynakları

a. Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Normal ortamda tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiopterin gibi pek çok bileşik otooksidasyon reaksiyonları ile serbest radikalleri oluşturur.^{118, 132}

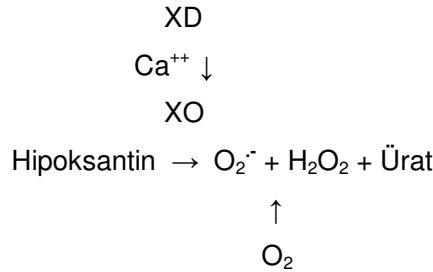
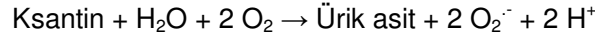
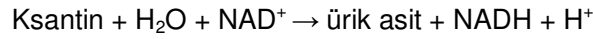
b. Enzimler ve proteinler: Birçok enzimin katalitik siklusları sırasında da serbest radikaller açığa çıkar. Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz ve triptofan dioksijenaz böyle enzimlerden olup, serbest radikal oluşumuna neden olurlar.^{117, 133}

Ksantin oksidaz normalde nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)-bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal üretimine sebep olmaz. Fakat in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine sebep olur. Ksantin oksidaz enzimi oksijen varlığında hipoksantini ksantine veya ksantini ürat'a oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir.^{134, 135}



Hipoksantin- ksantin arasındaki bu tepkime sonucu oluşan süperoksitin yarattığı en büyük hasar vasküler sistemdedir. Fakat yapılan araştırmalar ksantin oksidazın akciğer, karaciğer, böbrek gibi dokularda da hasara neden olduğu gözlenmiştir.^{136, 137}

Normalde NAD, bağımlı dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikal oluşumuna neden olmaz. Ancak ilk iskemi atağından sonra hücre membranı sahte sodyum-kalsiyum pompası oluşturma eğilimine girer. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması proteazların miktarı artsa bile devam eder. Bu sırada hücre ksantin dehidrogenazın (XD) ksantin oksidaz (XO)'a dönüşümüne izin verir. Bu oluşan hücre içi olayların sonunda XD enzimi dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşür ve süperoksit (O_2^-) radikalinin üretimine neden olur. Oluşan süperoksit radikalleri hızlı bir şekilde hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit güçlü bir radikal olmasa da, Fe^{+2} varlığında fenton reaksiyonu oluşturarak güçlü bir radikal olan hidroksil radikalinin oluşmasına neden olur.^{109, 120}



Aldehit oksidaz da yapı itibarıyla ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğunu da aynı şekilde kullanarak süperoksit radikali üretirler.¹³⁸

c. Mitokondriyal elektron taşınması: Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynaklarından biri elektron taşıma sisteminden (ETS) sızan elektronlardır. Mitokondriyal ETS'den elektron iki yerde sızmaktadır. Birincisi, nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat (NADH)-dehidrogenaz basamağında, ikinci olarak koenzim Q ya da ubikinon basamağında elektron sızması görülmektedir. ETS'nin son basamağında elektronların O_2 'e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi, oksijenin %97-99'unu harcayarak suya indirger. Ancak O_2 'nin %1-3'ü, elektron transport zincirinden sızan elektronlarla bir araya gelerek süperoksit radikalinin üretimini artırır. Böylece NAD^+ bağlı substratlar, süksinat, adenosin di fosfat (ADP) ve oksijen gibi endojen faktörler oksidatif fosforilasyonu regüle ederek mitokondriyal radikal üretimine etki eder.¹³⁹

d. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri:

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Membrana bağlı sitokrom P-450 ve b₅, doymamış yağ asitleri ve ksenobiyotikleri redükte ederken dioksijen ve diğer substratları ise okside ederler.

e. Peroksizomlar: Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu organeldeki D-aminoasit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksilizin oksidaz ve yağ asidi açıl- CoA oksidaz gibi oksidazlar O₂⁻ üretmeden, bol miktarda H₂O₂ üretimine sebep olurlar. Ancak katalaz aktivitesi çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H₂O₂ geçtiği bilinmemektedir.¹⁰⁸

f. Plazma membranı: Plazma membranı serbest radikal üretimi için kritik bir yer oluşturmaktadır. Ekstraselüler olarak üretilen serbest radikaller diğer hücre komponentlerine ulaşmadan önce plazma membranını geçmesi gerekir. Bu geçiş sırasında membranda toksik reaksiyonların oluşmasına da neden olabilirler. Membranda yer alan fosfolipitler, glikolipitler, gliseridler ve membran proteinleri serbest radikallerden etkilenirler. Lipit peroksidasyonu veya yapısal proteinlerin oksidasyonu sonucu membran permabilitesinde bozukluklar meydana gelmektedir.^{140, 141}

Hidrojen peroksit membranları neredeyse su kadar kolay geçebilen güçlü oksidandır. Bu nedenle proteinlerin ve Lipitlerin hidrofobik kısımlarını daha iyi parçalayabileceği ve toksik etkisinin daha fazla olacağı tahmin edilmektedir. Serbest radikallerin nonfagositik hücre membranlarında NADPH-oksidad aracılığı ile üretiminin serbest radikal oluşumunun önemli bir kaynağı olarak görülmektedir.¹⁴²

Lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi plazma membranıyla bağlantılı enzimler ile mikrozomlar tarafından serbest radikal üretimi, bu enzimlerin predominant substratı olan araşidonik asit metabolizması ile ilişkili pek çok yeni buluş ve biyolojik açıdan önemli ürünlerin meydana gelmesinden dolayı ilginçtir. Bu ürünler PG'leri, tromboksanları, lökotrienleri ve anafleksinin slow-reakting substratını içerir. Son zamanlarda araşidonat metabolizmasında yer alan bu enzimatik işlemlerin otokatalitik LPO'nun öncülük etmesi bu konuya olan ilgiyi artırmıştır.

2.10.3. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikaller etkilerini özellikle canlı hücreler için yaşamsal öneme sahip olan DNA, yağlar ve proteinlere saldırarak gösterirler. Mitokondride oksijenli solunum sonucunda meydana gelen serbest radikallerin alveolar epitel tabakada ve DNA ya

zarar vererek yapısal ve metabolik çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir.^{143, 144}

2.10.3.1. Membran lipitleri üzerine etkileri

Membranlar üzerindeki birçok bileşik ve molekülün serbest radikallerden etkilenmesine rağmen, radikallerin en belirgin etkileri yağ asitleri üzerine etki ederek Lipit peroksidasyonunu (LPO) başlatmaları olarak bilinir. LPO, polidoymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde devam eden birçok biyolojik yapıda hasarlara neden olan reaksiyon sürecidir. LPO membranlarda oluşturduğu yıkıcı etkisi genellikle reaksiyon sırasında açığa çıkan ·OH radikalının membran yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla oluşur. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.^{108, 145, 146}

Lipit peroksidasyonu başlatan ilk hareket membran ya da polidoymamış yağ asitlerinin içerdiği metilen grubundan (-CH₂-) bir hidrojen (H[·]) atomunun çıkartılması ile başlar. Böylece tek elektron içeren H[·]'nin uzaklaştırılması sonucu karbon merkezli ·CH-Lipit radikali meydana gelir. Oluşan Lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir. Bir dizi değişikliğe uğrayarak molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları ve daha sonra lipit radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksil radikali meydana gelir. Lipit peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer polidoymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H[·] parçacığı ile birleşerek Lipit hidroperoksitlerine dönüşür ve böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam ederek zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur.^{121, 131}

Lipit hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelir. Ayrıca Lipit hidroperoksitleri geçiş metalleri katalizörlüğünde yıkılması sonucu çoğu zararlı olan aldehitler oluşur. LPO sonucunda ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenal (HNE)'dir. MDA ölçümü ile LPO'nun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarlı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar. Lipit radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olarak membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler.^{147, 148}

2.10.3.2. Proteinler üzerine etkileri

Proteinler, lipitlere göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteinlerin etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden daha çabuk etkilenirler. Proteinlerin radikaller ile reaksiyona girmesi sonucu karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden karbonillerin ölçülmesi ile proteinlerde meydana gelen oksidatif hasar ölçülebilir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda proteinlerde parçalanmalar, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelebilir. Birçok biyokimyasal yapının ve özellikle enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin hasar görmesi sonucu hücrenin normal fonksiyonlarında bozukluklar ve enzim aktivitelerinde aksaklıklar meydana gelir.^{108, 149}

2.10.3.3. DNA üzerine etkileri

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır¹⁵⁰. İnsan genomik DNA'sının bütünlüğü farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle ve aynı zamanda hücre metabolizmasının yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA'da farklı mekanizmalar ile; baz ve şekerde lezyonlara, tek ve çift zincir kırıklarına, abazik bölgelere, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım modifikasyonlara neden olur.¹⁵¹⁻¹⁵⁶ Örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde 10^4 kez meydana gelebilmektedir. Deaminasyon ile sitozinden urasil veya 5-metil sitozinden timin oluşabilir. İnsan vücudundaki her hücre DNA'sının günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığını öne süren araştırmacılar da vardır.¹⁵⁷

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. $Fe^{+2/+3}$ ve $Cu^{+1/+2}$ iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H_2O_2 'in hedefi haline getirmektedir.¹⁵⁸ DNA'ya bağlı metal iyonları ile H_2O_2 'in DNA üzerinde reaksiyonlaşmasından oluşan $\cdot OH$ radikalleri, $\cdot OH$ radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, $\cdot OH$ radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir.¹⁵⁹

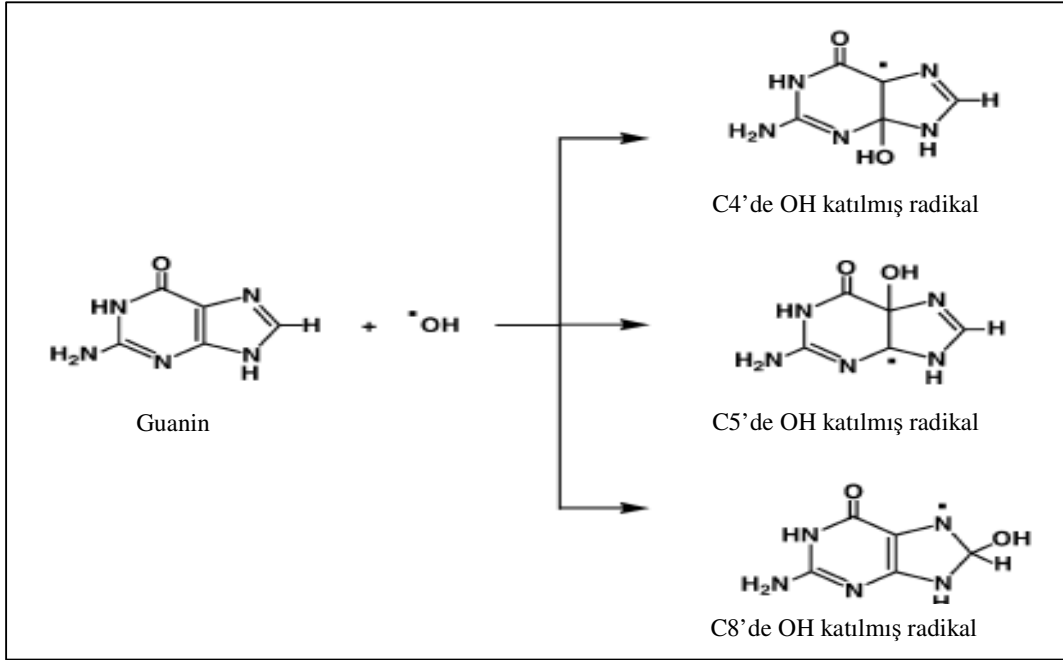
$\cdot\text{OH}$ radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve baz modifikasyonlarına yol açar. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer ve DNA hasarına neden olurlar.¹⁵⁹ Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse mutasyonlara da neden olabilir. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer.^{160, 161} Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir.^{161, 162} ROS, a bağlı olarak DNA'nın oksidatif hasarı sonucu yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklar görülebilir.^{111, 163}

Aynı zamanda RNS'de (NO_2 , ONOOH , N_2O_3 , HNO_2) DNA bazlarının nitrolanmasına veya deaminasyonuna neden olmaktadır. RNS etkisi ile sitozinden urasil, guaninden ksantin ve adeninden hipoksantin oluşmaktadır. ONOO^- guaninden 8-nitroguanin ve hipoksantin oluşturabilir. 8-nitroguanin DNA yapısı içinde dayanıksız olduğundan spontan olarak depürinasyona uğrar ve abazik alanların oluşmasına neden olur.^{164, 165}

DNA'daki oksidatif hasarın mekanizması ve oluşan ürünler: Katılma veya ayrılma tepkimeleriyle organik bileşiklerle en çok reaksiyon veren $\cdot\text{OH}$ radikali en reaktif serbest radikaldir. Hidroksil radikali çift zincirli heterosiklik DNA zincirindeki bazlara kolayca eklenir, timinin metil grubundan ve 2'deoksiribozun C-H bağından bir H koparır.¹⁶⁶ Aynı zamanda bu reaksiyonlar sonucunda DNA bazlarında N veya C merkezli radikallerin oluşumunun yanı sıra az miktarda da şekerlerin C merkezli radikalleri de oluşur.¹¹¹

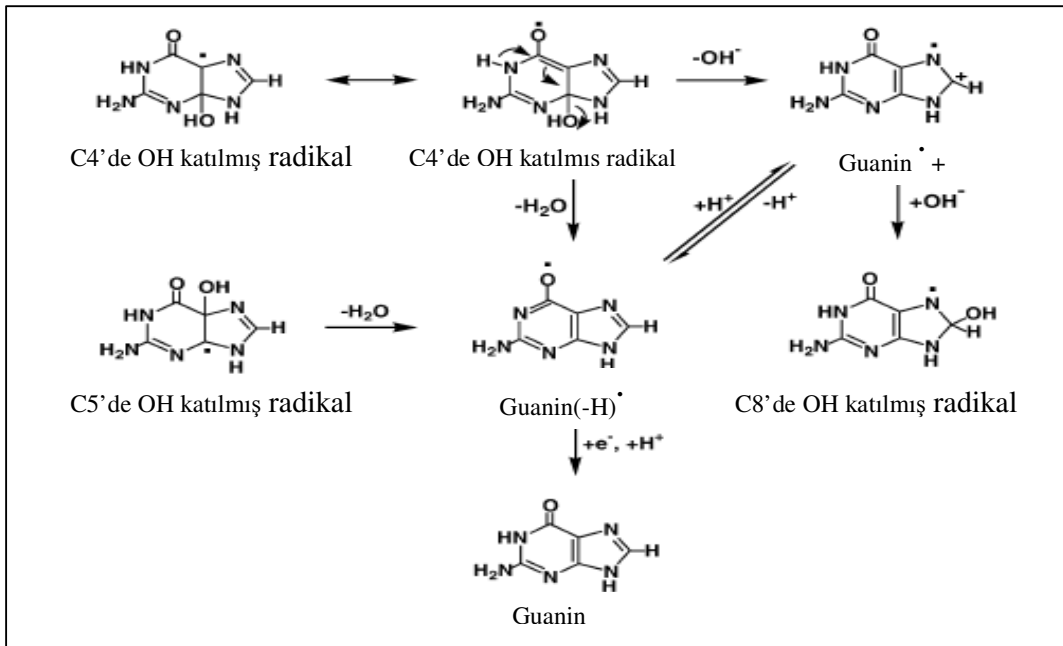
$\cdot\text{OH}$ Radikalinin saldıracağı yer, saldırılacağı bölgedeki elektron yoğunluğuna bağlıdır.¹¹¹ $\cdot\text{OH}$ radikali elektron yoğunluğu en fazla olan bölgeye bağlanarak bir H koparır. Örneğin sitozinde 5 nolu karbona % 87 oranında oysa 6 nolu karbona % 10 oranında $\cdot\text{OH}$ radikali eklenir. Timinde ise 5 nolu C'ye % 60 oranında, 6 nolu C'ye %30, timindeki metil grubuna ise % 10 oranında $\cdot\text{OH}$ radikali eklenir.^{167, 168} Böylece 5 ve 6. C'lere $\cdot\text{OH}$ eklenmiş timin ve sitozin radikal haline dönüşmüş olur.

Pürin bazı olan guaninin $\cdot\text{OH}$ radikali ile olan reaksiyonu ise Şekil 4'deki gibidir. $\cdot\text{OH}$ radikali guanindeki pürin bazına etki ederek pürindeki elektron yoğunluğuna göre 4, 5 ve 6 nolu pozisyonlarda serbest radikaller oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir¹⁶⁹⁻¹⁷¹ (Şekil 4).

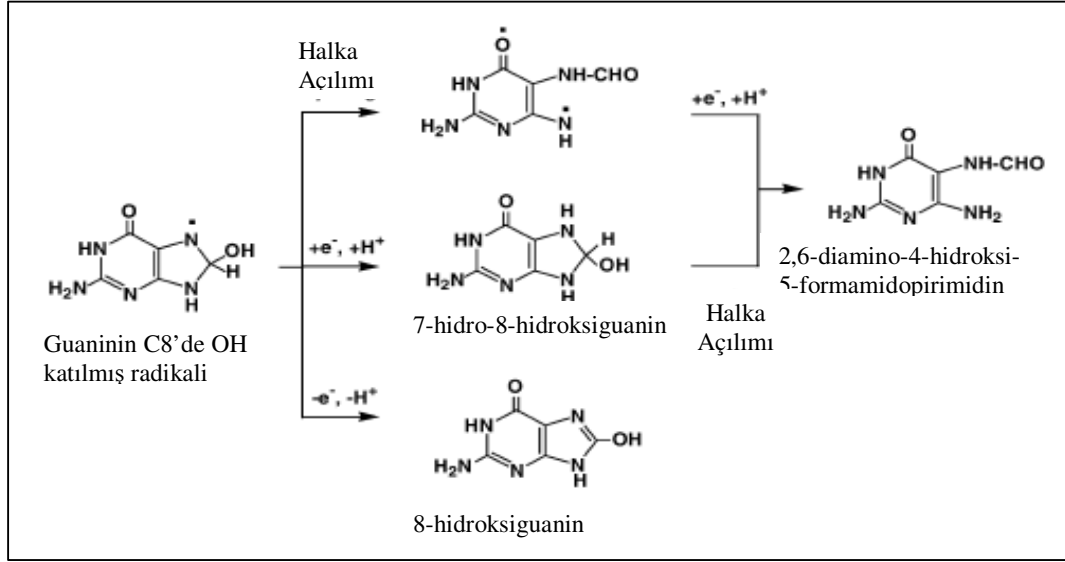


Şekil 3: Pürinlerin $\cdot\text{OH}$ radikali ile Reaksiyonları

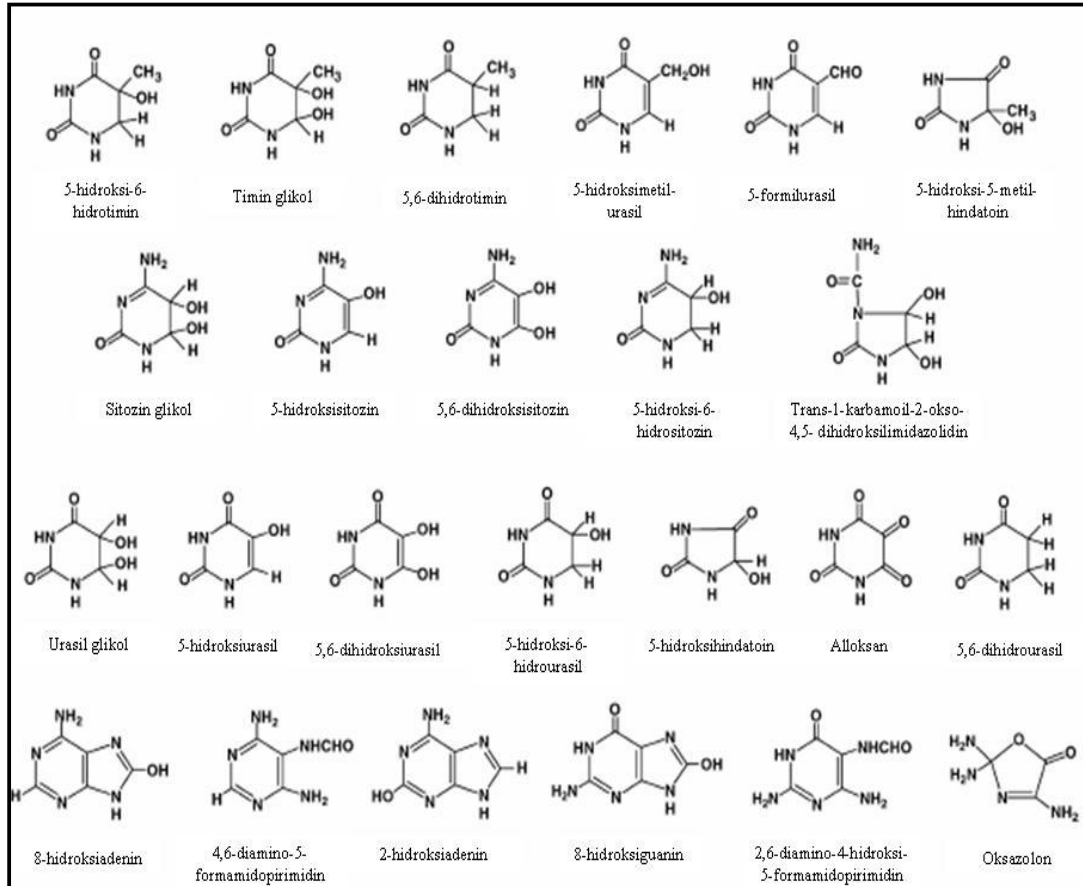
4 ve 5 numaralı karbonda kararsız olan bu radikaller en kararlı hali almak için kendi içerisinde düzenlenmesi ile ortam şartlarına göre katılma reaksiyonları ile oluşan ürünler Şekil 5 ve 6'da gösterilmiştir. Diğer bir pürin olan adeninin ise 4 ve 8 nolu C'lerine OH radikallerinin katılma reaksiyonlarıyla yeni radikal ürünler oluşur.¹⁷⁰⁻¹⁷²



Şekil 4: Guaninin 4 ve 5 nolu karbonunda hidroksillenmiş radikallerinin reaksiyonları



Şekil 5: Oksijen yokluğunda Guaninin 8 nolu karbonunda hidroksillenmiş radikalinden ürünlerin oluşum mekanizması.



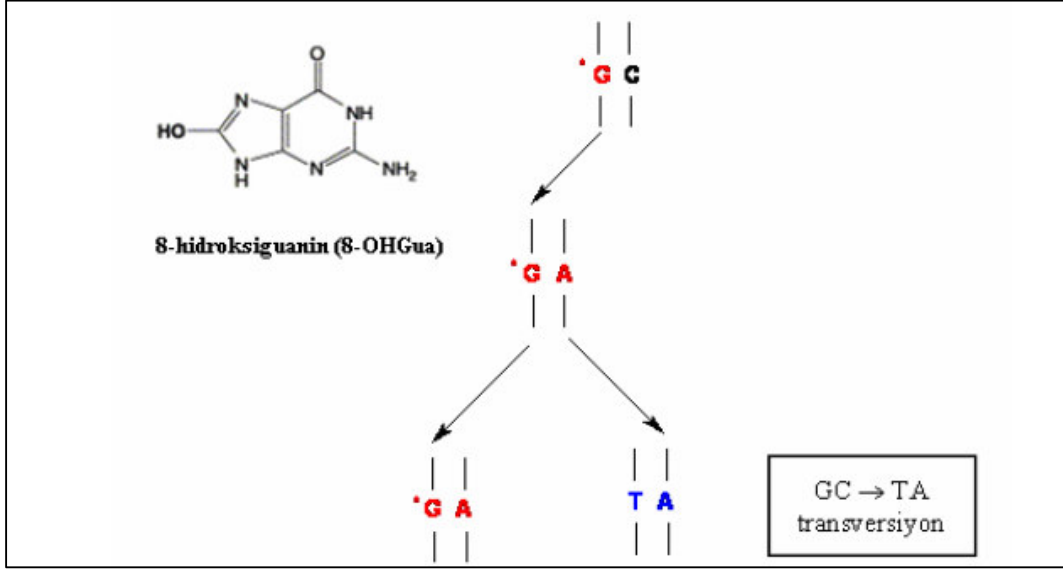
Şekil 6: DNA bazlarından oluşabilecek major oksidatif hasar ürünleri

Serbest radikallerin bazlarla etkileşimiyle oluşan radikaller, reaksiyon partneri, redoks potansiyeli, radikal üreten sistem, indirgeyici ajanların bulunabilirliği ve oksijenin mevcudiyeti gibi reaksiyon şartlarına bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir.^{173, 174} Yukarıdaki şekil 7’de ise ROS tarafından üretilen 23 adet oksidatif baz hasar ürünü verilmiştir.¹¹¹ Bunlardan 8-OHGua(8-Hidroksiguanin) ve 8-OHdG (8-hidroksi deoksi guanozin) en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinen DNA baz hasarı ürünleridir.

2.10.3.3.1. 8-Hidroksi deoksiganin oluşumu ve önemi

Şekil 7’de gösterilen DNA baz hasar ürünlerinin bir çoğu ve bunların şeker bağlı nükleozit halleri (8-OHdG gibi) literatürde oksidatif stresin DNA’ya olan etkilerini göstermek amacıyla çalışılmıştır. ROS tarafından üretilen başlıca DNA baz hasarı ürünlerinden biride 8-Hidroksiguanin (8-OHGua)’dir. 8-OHGua oksidatif stresin biyo-belirteci olarak kabul edilmiş ve memelilerde *in vitro* DNA sentezi sırasında bir kalıp olarak kullanıldığı zaman yanlış okumaya ve GC-TA mutajenezine yol açtığı gösterilmiştir (Şekil 8).^{175, 176} 8-OHGua’nin deoksiriboz’a bağlanmış hali olan bir modifiye nükleoziti olan 8-OHdG,¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ ekzonukleazlar olarak adlandırılan enzimlerin okside olmuş DNA’yı onardığında ekstrakte edilen bir baz modifikasyonudur.¹⁸⁰⁻¹⁸² ROS üretiminin artmasına sebep olan tüm etkenler, 8-OHdG oluşumuna yani oksidatif DNA hasarına katkıda bulunur.^{161, 183} DNA bazlarından Cu⁺² iyonlarınca en çok G-C’ce zengin bölgelerde bulunduğundan, en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz guanindir. Bu iyonların polianyonik karakterde olan DNA’nın özellikle guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlandığını ve H₂O₂ ile etkileşime girerek DNA hasarını başlattığı gösterilmiştir. Oluşan hasar, vücuttaki onarım sistemi tarafından tamir edilir. Fakat ROS üretiminin artmış olduğu durumlarda 8-OHGua kanda ve dokularda yüksek oranda tespit edilebilir. Bu nedenle Literatürde 8-OHGua’nın vücut sıvılarında ölçüldüğü pek çok araştırmaya rastlanmıştır. Bilhassa kanda ve idrarda oksidatif stresin önemli bir belirteci olarak kabul edilmiştir.^{176, 184} DNA’da normal baz eşleşmesi Guanin-Sitozin, Adenin-Timin’dır.⁵¹

Kan, idrar ve doku’da 8-OHGua’yi ölçmeye yönelik olarak pek çok yöntem vardır. Bunların başlıcaları arasında HPLC-EC, LC-MS, LC-MS-MS, GC-MS, tek hücre jel elektroforezi (Comet assay), ³²P post-labelling, ELİSA’dır.^{143, 185-191} 8-OHGua ölçümünde HPLC-ECD çok sık kullanılan yüksek derecede duyarlı bir yöntemdir. 8-OHGua, DNA elde edildikten sonra genellikle asit veya enzimatik hidroliz ile serbestleştirilir. DNA hidrolizatında bulunan 8-OHGua yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ayrılır ve elektrokimyasal dedeksiyon ile kantitatif olarak tespit edilir.^{143, 187-192}



Şekil 7: Hasarlı bazın yanlış eşleşmesi

2.10.3.3.2. DNA hasar tamiri

Modifiye olmuş lipitler ve proteinler normal protein turnoveri yoluyla çıkarılabilirken, DNA'ya olan hasar tamir edilmesi gerekebilir. Mark ve arkadaşlarının çalışmasına göre bu fonksiyon pek çok biyokimyasal yol ile gerçekleşir.¹¹¹ Lipitlerin ve proteinlerin aksine DNA modifiye olur olmaz yenilenemez ve birçok araştırmacının üzerinde durduğu pek çok spekülasyona neden olan birçok hastalığın patogenezi olarak gösterilmiştir.¹¹¹

DNA hasarı hücrede, ya hasarla başa çıkabilecek veya bunu gerçekleştiriyorsa programlı hücre ölümünü sağlayacak birçok hücresel olayı tetikler. Hücrede DNA hasarına karşı dört önemli yanıt oluşur:¹⁹³

1. Hasarlı DNA'nın çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması (DNA onarımı),
2. DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi, bu şekilde hasarlı genetik materyalin tamirine imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,
3. Hücredeki gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi (transkripsiyonel cevap),
4. Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin elenmesi (programlı hücre ölümü, apoptoz).¹⁹⁴

Bu yanıtlardan herhangi birinin işlev görmemesi hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır.¹⁹⁴

Hücre içinde DNA onarımı mekanizmaları ise:^{111, 193}

- a. Direkt DNA onarımı mekanizması,
 - b. Nükleotid eksizyon (kesip – çıkarma) ve baz eksizyon (kesip – çıkarma) onarım mekanizmaları,
 - c. Çift zincir kırık onarım mekanizması
 - d. Rekombinasyonel onarım ve SOS onarımı
 - e. Çapraz bağların onarım mekanizması,
 - f. Yanlış eşleşim onarım mekanizması (Mistmach Onarımı)
- gibi çeşitli DNA onarım mekanizmaları bulunmaktadır.^{111, 193}

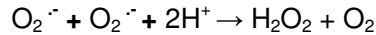
2.10.4. Antioksidan savunma sistemleri

Canlılar serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için hem hücre içerisinde hem de hücre membranının da etki gösteren birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar gerek radikal üretimini engelleyerek gerekse oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için tasarlanmıştır. İşte canlı organizmaların oluşturduğu bu sisteme antioksidan savunma sistemi veya kısaca antioksidanlar denilmektedir. Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olarak ikiye ayrılmakla beraber serbest radikal oluşumunu engelleyen ve mevcut radikalleri etkisiz hale getirenler veya enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler.

2.10.4.1. Endojen (Doğal) antioksidanlar

2.10.4.1.1. Primer antioksidanlar (Enzimler)

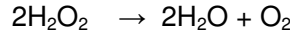
SOD Enzimi: Bu enzim süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. SOD'nin aktivitesi yaş artışıyla beraber artar. SOD yaklaşık olarak bütün canlılarda bulunmaktadır. Memelilerde üç tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden Cu-ZnSOD, ekstraselular etki gösteren CuZn SOD ve mitokondri de bulunan tetramerik Mn ihtiva eden Mn-SOD izomerlerdir. SOD'nin Fe ihtiva eden izomeri Fe-SOD ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. SOD'nin tüm çeşitleri süperoksitin dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilirler.^{196, 197}



Serbest radikallerin oluşturduğu yıkıcı etkinin önlenmesinde SOD enziminin katalaz enzimi ile birlikte incelenmesi gerektiği ve hatta iki enzimin bir kompleks haline getirilip fenton reaksiyonu sonucu oluşan radikallerin giderilmesinde daha etkili olacağı düşünülmektedir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan hidrojen peroksit oksijenin toksik türlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir.¹⁹⁸

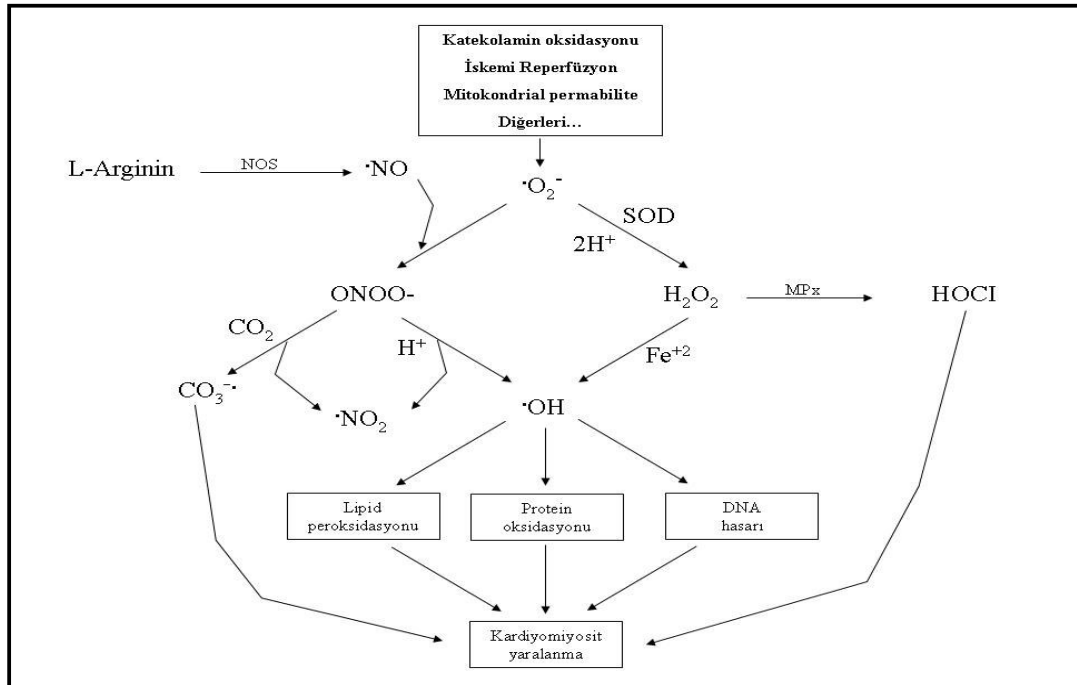
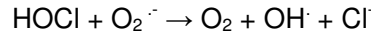
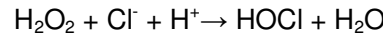
Katalaz Enzimi (CAT): Katalaz, tüm canlı hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört tane alt grup içeren ve her bir alt grubu 60,000 dalton ağırlığında olan enzimdir. Bu enzimin en önemli görevi hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya katalizlemektir.¹⁹⁹

CAT



Katalaz enzimi daha çok peroksisomlarda lokalizedir. CAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük molekülü Lipit hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır.¹⁰⁸

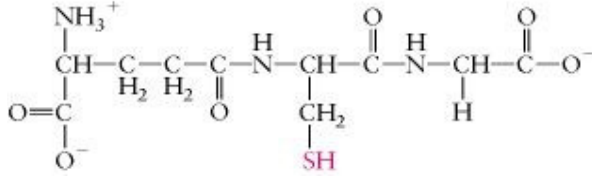
Miyeloperoksidaz Enzimi (MPx): Nötrofil granüllerde bol miktarda bulunan MPx enzimi H_2O_2 'den hipoklorik asit (HOCl) oluşturmak üzere etki eder. Asidik pH oluşumuna bağlı olarak MPx aktivitesi artmakta ve membranı kolayca geçen H_2O_2 bakteriyeye toksik etki yapmakta ya da hidroksil ($\text{OH}\cdot$) radikaline dönüşmektedir. Bu tepkimede HOCl yer almaktadır. H_2O_2 ile MPx Cl^- iyonlarını kullanarak H_2O_2 'yi HOCl'ye dönüştürmektedir. Çok reaktif olan HOCl birçok biyolojik molekülü oksitlemektedir.^{4, 51}



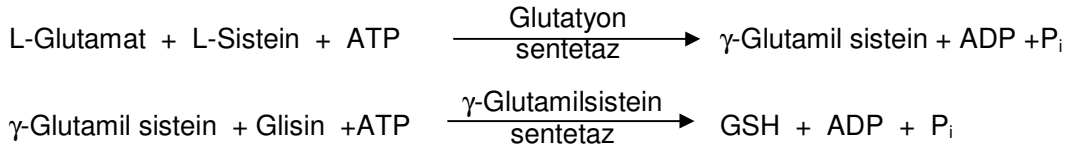
Şekil 8: Kardiyomiyositlerde ROS/RNS tarafından oluşan hasarın antioksidanlarla ilgili mekanizması

2.10.4.1.2. Sekonder antioksidanlar

Glutasyon (GSH): GSH (şekil 10), birçok hücrede bulunur ve bir tripeptiddir. GSH L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenir.



Şekil 10. Glutasyon'un molekül yapısı



GSH, hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür. İndirgenmiş glutasyon yani GSH, aktif bölgesinde selenyum iz elementini içeren bir enzim olan GPx enzimi katalizörlüğünde H_2O_2 ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidan etki sergiler ve H_2O_2 'yi alyuvarlardan uzaklaştırır. H_2O_2 birikmesi hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını artırarak alyuvarların yaşama süresini azaltabildiğinden bu tepkime çok önemlidir. Ayrıca alyuvarlarda hemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu ile süperoksit oluşurken diğer dokularda ise bu sitokrom P 450 redüktaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerle oluşur.^{51, 52}

GSH, hidrojen peroksidi veya organik oksitleri kimyasal olarak detoksifiye edebilir. GSH peptid bağından dolayı düşük enerjili bileşikler arasında kabul edebiliriz. GSH, hücre proteinlerini indirgemiş şekilde tutan disülfid-sülfidril değişimi tepkimelerinde etki gösterir. Belirli oksidaz tepkimeleriyle oluşan hidrojen peroksidi uzaklaştıran enzim GPx'e substratlık yaparak proteinlerin sülfidril gruplarını da korur. GSH yokluğunda hidrojen peroksit birikir. GSSG, GR tarafından sürekli GSH'ye indirgenerek GSH miktarı düzenlenir.²⁰⁰

Moleküler oksijenden türeyen oksidatif radikaller iki mekanizmayla uzaklaştırılır. Birincisi, toksik radikallerin enzimatik inaktivasyonudur. Örneğin GPx ve CAT, reaktif oksijen ara ürünlerini suya indirger. İkinci mekanizma ise oksijen radikallerini kimyasal olarak inaktive eden askorbik asit, α -tokoferol ve B-karoten gibi diyetle alınan antioksidanlarla ilgilidir.²⁰¹

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deneyleerde Kullanılan Kimyasallar

Deneyleerde kullanılan bütün kimyasal malzemeler Sigma Chemicals Company (Germany)'den, ilaçlar; lasidipin (Lacipil 4 mg tb) Glaxo-Smith Kline, İstanbul, Ramipril (Delix 10 mg tb) Aventis, İstanbul, Valsartan (Diovan 80 mg tb), Novartis, İstanbul-Türkiye'den temin edilmiştir.

3.2. Deneyleerde Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj	: Hettich Universal 32 R
UV-Visible Spektrofotometre	: Thermo Spectronic-HELIOS β
pH metre	: Schott CG 842
Hassas terazi	: Scaltec SPB 31
Derin dondurucu	: Sanyo MDF - 235
Magnetik karıştırıcılar	: Boeco MSH 300
Otomatik pipetler	: Eppendorf
Buzdolabı	: Profilo
Distile su cihazı	: GFL 2012
Çalkalayıcı su banyosu	: Memmert
Homojenizatör	: Ika-Werke
Elisa	: Biotech
HPLC cihazı	: HP agilent 1100
Otoanalizör	: Olympus 2700

3.3. Deneyleerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

1. *CAT Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, %1 Triton x-100 içeren Fosfat Tamponu)*: 1.7 g KH_2PO_4 ve 2.5 ml Triton x-100 alınarak 200 ml distile suda çözüldü. pH, bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandı ve son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.
2. *CAT Ölçüm Karışımı (40 mM, pH 7'de H_2O_2 içeren 50 mM Fosfat Tamponu)*: 1020 μl H_2O_2 ve 1.7 g KH_2PO_4 200 ml distile suda çözüldü ve pH bir pH metre kullanılarak 7'ye ayarlandıktan sonra son hacim 250 ml'ye tamamlandı.
3. *SOD Homojenat Tamponu (50 mM pH 7.8, 10 mM EDTA içeren Fosfat Tamponu)*: 1.7 g KH_2PO_4 ve 0.73 g EDTA alınarak 200 ml distile suda çözüldü ve pH bir pH metre kullanılarak 7.8'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

4. SOD Ölçüm Karışımı:

A - 0.3 mM Ksantin: 0.0018 g Ksantin alınarak bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 40 ml'ye tamamlandı.

B - 0.6 mM EDTA: 0.0035 g EDTA alındı ve bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi distile su 20 ml'ye tamamlandı.(2 damla 5 M NaOH ile çözünür)

C – 150 µM NBT (Nitro blue tetrazolium) : 0.0024 g NBT alınarak bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 20 ml'ye tamamlandı.

D – 0.4 M Na₂CO₃: 0.5088 g alınarak bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 12 ml'ye tamamlandı.

E – 1.2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine): 0.0061 g tartıldı bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 6 ml'ye tamamlandı.

5. SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (167 U/L Xanthine oksidaz):

Orijinal ambalajından (1 ml'sinde 32 mg protein ve 0.3 U enzim ihtiva eden enzim) 34.79 µl alındı ve üzerine 2 ml soğuk 2 M (NH₄)₂SO₄ çözeltisi eklendi.

6. SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (2 M (NH₄)₂SO₄):

0.7928 g (NH₄)₂SO₄ alındı ve bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 3 ml'ye tamamlandı. (bu çözelti her seferinde taze olarak hazırlandı ve +4°C 'de saklanarak soğuk olarak kullanıldı).

7. SOD enziminin aktivitesini ölçmek için gereken çözelti (0.8 mM CuCl₂):

0.0108 g CuCl₂ alındı, bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

8. GSH Homojenat Tamponu (50 mM, pH 7.4, Tris - HCl Tamponu):

1.514 g Tris-HCl alınarak 200 ml distile suda çözüldü ve pH, bir pH metre kullanılarak 7.4'e ayarlandıktan sonra son hacim 250 ml'ye distile su ile tamamlandı.

9. GSH Ölçüm Tamponu (200 mM pH 8.2, 0.2 mM EDTA içeren Tris-HCl Tamponu):

6.05 g Tris-HCl ve 0.0146 g EDTA alınarak 200 ml distile suda çözüldü ve pH, bir pH metre kullanılarak 8.2'ye ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

10. GSH miktarını ölçmek için gereken çözelti (10 mM DTNB):

0.03963 g DTNB alındı ve bir miktar metanolde çözülerek hacmi metanol ile 10 ml'ye tamamlandı.

11. LPO Homojenat Tamponu (% 10 KCl):

10 g KCl alınarak bir miktar distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

12. LPO Ölçüm karışımı:

A - % 8 Sodyum lauril sülfat (SLS): 0.8 gr SLS alınıp bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 10 ml'ye tamamlandı.

B - % 0.08 Tiyobarbütirik (TBA): 0.48 gr TBA alınarak 1-2 damla 1 M NaOH ilavesi ile bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 60 ml'ye tamamlandı.

C – % 20 Asetik asit: 13 ml glasiyel asetik asit alındı ve üzerine 65 ml distile su eklendi.

13. *MPx Homojenat Tamponu (50 mM pH 6.0, % 0.5 HTAB (MA, 364.5-hexadecy three methyl ammonium bromide) içeren Fosfat Tamponu:* 1.02 g KH_2PO_4 ve 0.75 g HTAB alınarak 125 ml distile suda çözüldü. pH, bir pH metre kullanılarak 6.0 yapılarak, hacim distile su ile 150 ml'ye tamamlandı.

14. *MPx Ölçüm karışımı 50 mM KH_2PO_4 pH 6'sı (MA, 136.09) olan 0.167 mg/ml o-dianizidin-HCl ve % 0.0005 H_2O_2 içeren 45 ml ölçüm karışımı):*

A– 0.167 mg/ ml o-dianizidin-HCl 45 ml: (MA, 317.2), 7.5 mg o-dianizidin-HCl

B– % 0.0005 H_2O_2 (%30'luk tan) 45 ml için: 83.3 μl % 30'luk H_2O_2 'den alınır 500 ml'ye tamamlandı ve ardından bundan 4,5 ml alındı.

C– 50 mM KH_2PO_4 pH 6: 0.3062 gr KH_2PO_4 alındı.

7,5 mg o-dianizidin-HCl, 4,5 ml H_2O_2 , 0.3062 gr KH_2PO_4 alınıp 40 ml distile suda çözümlülerek pH bir pH metre kullanılarak 6.0 'a ayarlanıp 45 ml'ye destile su ile tamamlandı.

15. *Nitrik Oksit ölçümü çözeltileri*

A- %30'luk Çinko sülfat (ZnSO_4) çözeltisi: 30 gr ZnSO_4 bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

B- Griess reaktifi: 0,5 gr sülfanilamid +12,5 gr fosforik asid+0,05 gr naphthylethylendiamin 500 ml distile su içinde çözüldü.

C- 50 $\mu\text{mol/L}$ NADPH + 5 $\mu\text{mol/L}$ FAD + 200 U/L Nitrat Redüktaz Karışımı; 0,002 gr NADPH, 0,0002 gr FAD ve 1 kutu Nitrat Redüktaz (10 U, 17 mg) alınıp bir miktar distile suda çözünüp son hacmi distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

D- 10 mg/L Laktat Dehidrogenaz: 10 mg LDH 10 ml suda çözünerek hazırlandı.

E- 10 mM Sodyum Piruvat: Piruvik asitin sodyum tuzundan 1,1 gr alınarak bir miktar distile suda çözünüp 10 ml'ye tamamlandı.

F- 200 μM Sodyum Nitrit (NaNO_2) çözeltisi: 0,0035 gr Sodyum Nitrit bir miktar distile suda çözüldükten sonra 250 ml'ye distile su ile tamamlandı.

G- 200 μM Potasyum nitrat çözeltisi: 0.005 gr potasyum nitrat bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

16. Kandan DNA izolasyon Çözeltileri

A- RBC Parçalama Tamponu: 8.74 gr Amonyum Klorür, 1 gr Potasyum Bikarbonat ve 0.2 ml 0.5 molarlık EDTA 900 ml ddH₂O'da çözülüp ve pH'sı 1 N NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Balon jojeye aktarılarak son hacmi 1 litreye tamamlanıp. Manyetik kanştırıcı yardımıyla iyice çözünmesi sağlandı. 120 °C 'de 15 dk otoklavlanarak steril edilip ve +4 °C'de saklandı.

B- 0.5 M EDTA (pH 8.0): 186.1 gr EDTA yaklaşık 800 ml ddH₂O de çözülüp ve pH'sı 1 N NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Balon jojeye aktarılarak son hacmi 1 litreye tamamlandı. Manyetik kanştırıcı yardımıyla iyice çözünmesi sağlanıp, 120 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi ve +4 °C'de saklandı.

C- 4M NaCl: 233.6 gr NaCl yaklaşık 800 ml ddH₂O de çözülüp ve balon jojeye aktarılarak son hacmi 1 litreye tamamlandı. Manyetik kanştırıcı yardımıyla iyice çözünmesi sağlanıp, 120 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi

D- WBC Parçalama Tamponu: 25 ml 4 M NaCl ve 50 ml 0.5 M EDTA balon jojeye aktarılarak son hacmi hacmi 1 litreye tamamlanıp, 120 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

E- 1 M Tris Tamponu: 121.1 gr Tris baz yaklaşık 800 ml ddH₂O de çözüldü ve üzerine 42 mikrolitre konsantre HCl ilave edildi. Balon jojeye aktarılarak son hacmi 1 litreye tamamlandı. Manyetik kanştırıcı yardımıyla iyice çözünmesi sağlanıp, 120 °C 'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

F- 9.5 M Amonyum Asetat: 73.22 gr Amonyum Asetat 80 ml ddH₂O de çözüldü. Balon jojeye aktarılarak son hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek steril edilip ve +4 °C'de saklandı.

G- %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 10 gr SDS 80 ml ddH₂O de çözülüp ve pH'sı 7.2'ye ayarlandı. Balon jojeye aktarılarak son hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek steril edilip oda sıcaklığında saklandı.

H- Proteinaz K (20 mg/ml): 20 mg proteinaz K steril bir kapaklı godeye konuldu ve steril ddH₂O ile son hacmi 1 ml'ye tamamlanıp ve -20 °C'de saklandı.

3.4. Deney Hayvanları

Tez çalışmamızda 180–220g ağırlıkta toplam 48 adet erkek Wistar rat kullanıldı. Deney hayvanları, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarından temin edildi. Deney Tıp Fakültesi, Farmakoloji A.B.D'de yapıldı. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde standart şartlar altında barındırılmış ve beslenmiştir. Çalışmalarımızın tüm aşamaları Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi etik

kurulu tarafından 25 Haziran 2007 tarih ve B.30.2.ATA.0.A1.00.00/601 sayılı yazısı ve Atatürk Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu (AÜHADYEK) 28 Haziran 2007 tarih ve B.30.2.ATA.070/94 sayı ile etik kurallara uygun olduğu onaylanmıştır.

3.5. Deneyde Kullanılan İlaçların Dozları

Deneyimizde lasidipin 3 mg/kg²⁰² Ramipril 3 mg/kg²⁰³ ve Valsartan 30 mg/kg²⁰⁴ dozlarında 1 ml % 0.9 izotonikde çözülerek bir sonda yardımıyla oral yolla 30 gün boyunca verildi.

3.6. Ratlarda miyokard infarktüs modelinin oluşturulması

ISO ilaçların kardiyak fonksiyonlar üzerine olan etkilerini incelemeye yarayan standart bir sentetik katekolamindir.²⁰⁵ Ratlarda deneysel katekolamin uygulaması miyokardiumda nekroza neden olduğu bilinmektedir.²⁰⁶ Ratlarda ISO ile indüklenen MI'da gelişen DNA hasarı, oksidatif stres ve biyokimyasal doku hasar parametreleri üzerine lasidipin, ramipril ve valsartanın etkilerini araştırmak üzere yapılan bu çalışma Rona ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirildi.⁸⁷ Literatürde ratlarda 40 mg/kg'dan başlayıp 200 mg/kg'a kadar varan dozlarda ISO uygulaması ile MI modeli oluşturulmuştur.^{87, 90, 91, 207} Ayrıca ISO ile oluşturulan MI modelinde denenecek maddeler ise ISO uygulamasından 1 gün öncesinden başlayıp 60 güne varan uygulamalar tespit edildi.^{93, 94, 208} Bizde ilaç gruplarımıza 30 gün boyunca ilaç uygulaması ve 180 mg/kg ISO uygulaması ile modelimizi yaptık. MI sonrası gelişen DNA hasarı, oksidatif stres ve biyokimyasal doku hasar parametrelerini incelemek için oluşturduğumuz ISO kontrol grubuna ISO 180 mg/kg dozunda 1 ml % 0.9'luk izotonik çözülerek subkutan (SK) olarak 24 saat aralıklarla 2 kez verilir, ilk dozdan 72 saat sonra yüksek doz anestezisi (tiopental sodyum-50 mg/kg) altında hayvanlar ötanazi edilmiştir.

3.7. Deney grupları ve ilaç uygulaması

Deneyimizde her bir grupta 6 şar rat olmak üzere toplam (8 grup) 48 adet rat kullanılmıştır. **Grup 1;** Sağlıklı rat grubu olup, herhangi bir ilaç muamelesi yapılmamıştır. Bu gruba 30 gün boyunca sonda yardımıyla oral olarak 1 ml % 0.9 izotonik ve son 2 gün 24 saat arayla 2 kez 1 ml % 0.9 izotonik solusyonu SK olarak verildi. Son SK izotonik uygulamasını takip eden 24. saatte gruptaki tüm ratlar yüksek doz anestetik maddeyle ötanazi edildi. **Grup 2;** Yukarıda tarif ettiğimiz MI sonrası biyokimyasal parametreleri inceleyeceğimiz ISO grubu olup 30 gün boyunca sonda yardımıyla oral olarak 1 ml % 0.9 izotonik solusyonu ve son 2 gün 24 saat arayla 2 kez 1 ml % 0.9 izotonikte çözülmüş 180 mg/kg ISO SK olarak verildi. Son ISO uygulamasını takip eden 24. saatte yüksek doz anestetik maddeyle gruptaki tüm ratlar

ötanazi edildi. **Grup 3;** Lasidipin sağlıklı kontrol grubu; **Grup 4;** Ramipril sağlıklı kontrol grubu; **Grup 5;** Valsartan sağlıklı kontrol grubu olarak belirlendi. Grup 3, 4 ve 5 için her bir grupta bulunan ratlara sırasıyla 3, 3, 30 mg/kg dozda Lasidipin, Ramipril ve Valsartan'ın 1 ml % 0.9 izotonikde çözülerek bir sonda yardımıyla oral yolla 30 gün boyunca verildi. İlaç uygulamasının 31. gününde yüksek doz anestezi maddeyle gruptaki tüm ratlar ötanazi edildi.

MI sonrası gelişen akut hasar üzerine Lasidipin, Ramipril ve Valsartanın etkilerinin incelenmesi: Lasidipin, Ramipril ve Valsartanın MI sonrası oluşan biyokimyasal parametreleri üzerine olan etkilerini inceleyeceğimiz ilaç gruplarımızı ise **Grup 6;** Lasidipin + ISO grubu; **Grup 7;** Ramipril + ISO grubu; **Grup 8' ise Valsartan + ISO grubu olarak adlandırdık. Grup 6, 7, 8, için her bir grupta bulunan ratlara sırasıyla 3, 3, 30 mg/kg dozda Lasidipin, Ramipril ve Valsartan'ın 1 ml % 0.9 izotonikde çözülerek bir sonda yardımıyla oral yolla 30 gün boyunca verildi. İlaç uygulamasının 29. gününden başlayarak 24 saat arayla 2 kez 1 ml % 0.9 izotonik solusyonda çözülmüş 180 mg/kg İSO SK olarak verildi. Son ISO uygulamasını takip eden 24. saatte yüksek doz anestezi maddeyle gruptaki tüm ratlar ötanazi edildi.**

Tablo 2: Rat Çalışma Protokolü

GRUPLAR		1-28.gün	29.gün	30.gün	31.gün
1	Sağlıklı Kontrol	Oral İzotonik	S.K. İzotonik	Oral İzotonik	i.P. Tiopental Disodyum-50 mg/kg
			Oral İzotonik		
2	ISO Kontrol	Oral İzotonik	S.K. ISO 180 mg/kg	Oral İzotonik	
			Oral İzotonik		
3	Sağlıklı Lacidipine	Oral Lacidipine 3 mg/kg		i.P. Tiopental Disodyum-50 mg/kg	
4	Sağlıklı Ramipril	Oral Ramipril 3 mg/kg			
5	Sağlıklı Valsartan	Oral Valsartan 30 mg/kg			
6	Lacidipine + ISO	Oral Lacidipine 3 mg/kg	S.K. ISO 180 mg/kg		
			Oral Lacidipine 3 mg/kg		
7	Ramipril + ISO	Oral Ramipril 3 mg/kg	S.K. ISO 180 mg/kg		Oral Ramipril 3 mg/kg
			Oral Ramipril 3 mg/kg		
8	Valsartan + ISO	Oral Valsartan 30 mg/kg	S.K. ISO 180 mg/kg		Oral Valsartan 30 mg/kg
			Oral Valsartan 30 mg/kg		

3.8. Örneklerin Alınması

3.8.1. Kan örneklerinin alınması

Yüksek doz anestezi ile ötenazi edilen ratların göğüs kafesi sternum hizasından açıldı. Perikard ayrıldıktan sonra kanlar intrakardiyak olarak alındı. Herbir rattan alınan yaklaşık 5 ml kanın 3 ml'si serum elde etmek için vakuteinirli tüplere, kalan 2 ml'si DNA izolasyonu yapmak üzere EDTA'lı tüplere alındı. EDTA'lı olanlar DNA izolasyonu için 5 °C'ye ayrıldı. Vakuteinirli olanlar ise kanların tamamen pıhtılaşması beklendikten sonra 4 °C de, 4000 g de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte kalan serum kısımları ayrılarak ependorf tüplere alikoatlanarak ayrıldı ve analizin yapılacağı güne kadar -80 °C de derin dondurucuda saklandı.

3.8.2. Doku örneklerinin alınması

Yüksek doz anestezi verildikten sonra ratların batinları orta hat boyunca açılarak kalpler çıkartıldı ve serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra biyokimyasal analizler için -80 °C'ye konuldu.

3.9. Analizler

3.9.1. EDTA'lı tam kandan DNA izolasyonu

EDTA'lı tüpe alınan 2 ml kan örneği 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 5 °C'de numuneler ertesi gün modifiye edilmiş metoda göre DNA izolasyonu aşağıdaki gibi yapıldı.²⁰⁹

- 1- Mor kapaklı hemogram tüpüne alınan 2 ml EDTA'lı kan üzerine 3 ml RBC Lysis Buffer ilave edildi. Aralıklarla alt-üst edilerek 5 dakika buzda bekletildi.
- 2- 3000 Rpm'de 5 dk santrifüj edilip, süpernatant kısmı dikkatlice döküldü. Vorteksenerek dipteki pellet kaldırıldı.
- 3- Pellet üzerine 5 ml RBC Lysis Buffer ilave edilip, aralıklarla alt-üst edilerek 5 dakika buzda bekletildi.
- 4- 3000 Rpm'de 5 dk santrifüj edilip, süpernatant kısmı dikkatlice döküldü. Yüksek hızda vorteksenerek dipteki lökosit pelleti resüspanse edildi.
- 5- Resüspanse pellet üzerine sırasıyla 0.1 ml % 10'luk SDS, 40 µl proteinaz K ve 1.9 ml WBC Lysis Buffer eklenip ve yüksek hızda 10 sn kadar vortekslendi. 65 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- 6- İnkübasyon sonrası tüpler buz içerisine konarak soğuması sağlandı. Üzerine 0.8 ml 9.5 M'lık amonyum asetat ilave edilip, en az 20 kez tüpler alt-üst edilerek ve

- daha sonra da kuvvetlice vortekslenerek iyice karıştırıldı.
- 7- 3500 Rpm'de 25 dk santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü (berrak bir süpernatant ve dipte beyazımtırak bir çökelti oluştu).
 - 8- Süpernatant kısmından dikkatlice 2 ml alınıp yeni bir steril tüpe aktarıldı. Üzerine 4 ml % 100'lük etanol ilave edilip, tüpün kapağı kapatılarak alt-üst edildi ve DNA'nın yoğunlaşarak görünür hale gelmesi sağlandı.
 - 9- 4000 Rpm'de 5 dk santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve alkol kısmı dökülerek uzaklaştırıldı. Hafifçe vortekslenerek dipteki DNA kaldırıldı.
 - 10- Üzerine, 0.1 ml % 70'lik etanol konulup, vortekslenerek DNA'nın alkolde yıkanması sağlandı. 4000 Rpm'de 5 dk santrifüj edilerek alkol kısmı döküldü. Tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek alkolün tamamen uzaklaşması sağlandı.
 - 11- DNA üzerine 250 µl ddH₂O pipetlenip ve 37°C'de 1 saat bekletilerek DNA'nın çözünmesi sağlandı.
 - 12- İzole edilen DNA örnekleri 8-OHG miktar analizi için alikotlanarak -80°C 'de saklandı.

3.9.2. CK-MB, CK, AST ve Tnl ölçümü

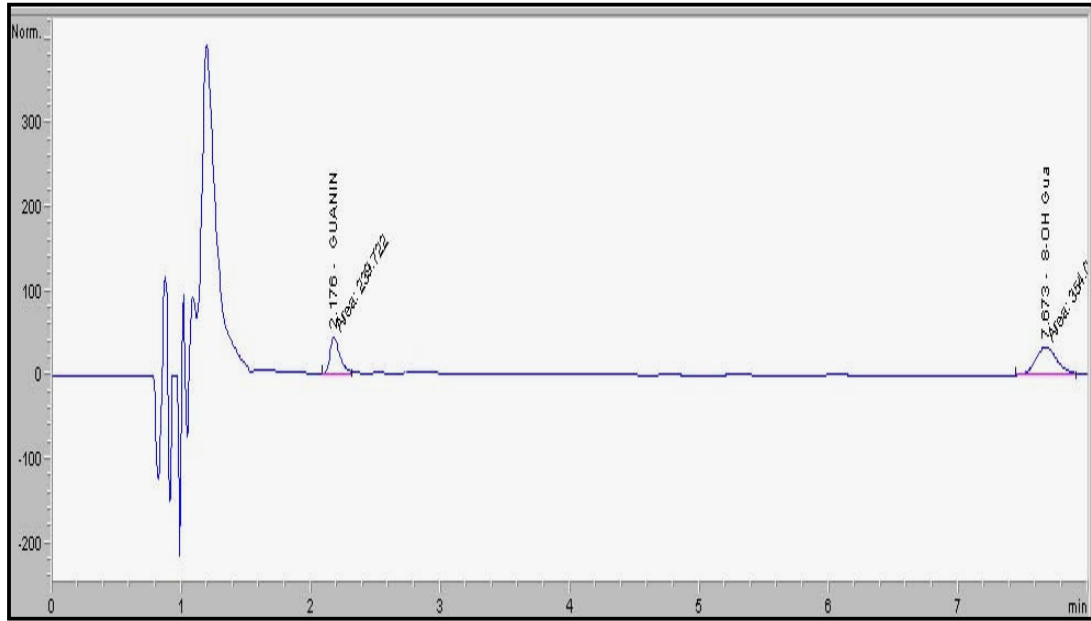
Antikoagülansız vakuteinerli tüpe alınan kanların tamamı pıhtılaşdıktan sonra kanlar, 4000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı. Ayrılmış serum örnekleri godelere aktarıldı, "Comas C-501" oto analizörde analiz edilmek üzere cihaza yerleştirildi ve AST²¹⁰, CK²¹¹, CK-MB²¹¹ aktivitesi cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

Antikoagülansız tüpe alınan kanların tamamen pıhtılaşması beklendikten sonra kanlar, 4000 G'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı. Ayrılmış serum örnekleri godelere aktarıldı. "Vidas" oto analizöründe analiz edilmek üzere cihaza yerleştirildi ve Tnl²¹² aktivitesi cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

3.9.3. Kanda DNA 8-OHGua miktarı analizi

EDTA'lı kanlardan yukarıdaki prosedürle DNA izolasyonu yapıldıktan sonra numuneler -80 °C'den çıkarılıp oda sıcaklığına getirildi. 8-OHGua düzeyi belirlenmeden önce DNA'nın saflığını kontrol etmek amacıyla 260 nm ve 280 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. A₂₆₀/A₂₈₀ kabul edilebilir sınırı 1,7 olduğu gözlemlenmiştir. Sonra 8-OHGua düzeyi HPLC yöntemiyle Elektro Kimyasal Detektörle (ECD) ile Floyd¹⁹² ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle göre tayin edildi. Bunun için her bir numuneden 200

μl alınarak viallere konuldu. İzole edilen DNA formik asit²¹³ ile hidroliz edildi. Hidroliz işlemi izole edilen DNA örneklerinin üzerine 100 μl ml formik asit eklenip (%60 v/v) ve 45 dakika 150 °C'de bekletilerek yapıldı. Daha sonra örnekler HPLC ölçüm için hazır hale getirildi. Hidrolitik basamaklar sonucunda DNA'dan 8-OHGua ile birlikte hidroliz ortamına serbestleşen Gua miktarının ölçülerek 8-OHGua'nin Gua'ya oranlandı.¹⁹² Standart olarak 200 μl 25 pmol/dL 8-OHGua ve 25 pmol/dL Gua kullanıldı. Her bir numunenin analizi 17,5 dakikada tamamlandı. 8-OHGua piki 7,6 dakika, Gua piki ise 2,1 dakika civarı görüldü. Sonuçlar pmol/L cinsinden 8-OHGua/Gua. 10^{-5} olarak verildi.



Şekil 10: 8-OHGua ve Gua'ya ait HPLC-ECD ile alınmış örnek kromatogram

3.9.3.1. Kromatografik koşullar

HPLC cihazı: HP agilent 1100 modüler serisi

Detektör: Elektrokimyasal detektör (HP 1049 A). Ölçüm 80 V da yapıldı

Basınç: 90 \pm 10 bar

Kolon: Supelco LC-18-S ters faz C-18 kolon (25 cm x 4.6mm)

Kolon sıcaklığı: 30 °C

Mobil faz: 0.05 M fosfat tamponu pH: 5.5 içersinden asetonitril (97:3 v/v)

Pompa akış hızı: 1.0 ml/ dakika

3.9.4. Serumda Nitrik oksit (NO) Ölçümü

Ölçüm Prensi: Oldukça kısa ömürlü olan NO radikali hızla NO_2^- ve NO_3^- 'a okside olmaktadır. Bu nedenle NO miktarı belirlenirken NO_2^- ve NO_3^- miktarları belirlenmektedir. Özellikle NO_2^- 'in Griess reaktifi ile etkileşmesi sonucu oluşan rengin absorbansının belirlenmesi oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mevcut NO_3^- , nitrat redüktazla NO_2^- 'e indirgendikten sonra ölçülmektedir.

NO ölçümü: Antikoagülansız vakuteinerli tüpe alınan kanların tamamen pıhtılaşması beklendikten sonra kanlar, 4000 G'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı. Ayrılmış serum örneklerinde Biotech Elisa'da NO miktarı ölçüldü. Moshage ve Bories arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi. NO_3^- ve NO_2^- ' miktarı Elisa ile 540 nm'de ölçülerek toplam serum total NO seviyesi ($\mu\text{mol/mL}$) hesaplandı.^{214, 215}

Nitrat tayini: -80°C den alınan serumlar önce -20°C 'de daha sonrada 4°C de bir süre beklendikten sonra iyice çözülmesi sağlandı. Daha sonra Griess reaktifi kullanılarak aşağıdaki işlemler yapıldı.

Numune tüpü	
Numune	100 μL
Distile su	400 μL
Çinko sülfat	25 μL
Vortekslenir, 1000g de 15 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı alındı	
Süpernatant	100 μL
Griess reaktifi	100 μL

10 dk oda sıcaklığında renk oluşumu için beklendi. 540 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

b) Nitrat tayini

Nitrat, önce nitrat redüktaz ile enzimatik olarak nitrite dönüştürülür. Aşağıda verilen şekilde ölçüm yapılır.

	Numune tüpü
Numune	100 µL
Deiyonize su	400 µL
Çinko sülfat	25 µL
Vortekslenir, 1000 g de 15 dk santrifüj edilir ve süpernatant kısmı alınır	
Süpernatant	100 µL
NADPH	100 µL
FAD	100 µL
Nitrat redüktaz	20 µL
Vortekslenir, 37 °C de 20 dk inkübe edilir	
Laktad dehidrogenaz	10 µL
Sodyum pirüvat	10 µL
Vortekslenir, 37 °C de 5 dk inkübe edilir	
Griess reaktifi	100 µL

10 dk oda sıcaklığında bekletilir, 540 nm dalga boyunda absorban okutulur.

NO miktarının hesaplanması: NO₃⁻ ve NO₂⁻ miktarı Elisa ile 540 nm'de ölçülerek toplam serum total NO seviyesi hesaplandı. Aşağıdaki formüle göre numunelerin NO miktarları, *µmol/ml* olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verildi.

$$\text{Toplam nitrik oksid : } \mu\text{mol/ml} = \frac{\text{Abs} \times \text{DF}}{0,0395}$$

DF: Dilisyon faktörü

Abs : 540 nm dalga boyunda tespit edilen absorban

3.9.5. Kalp dokusunun biyokimyasal incelenmesi

Ratların kalp dokuları biyokimyasal incelemeler için -80 °C'de saklandı. Dokuların enzim aktivitelerini ölçmek için kalp dokusu homojenatları hazırlandı. Kalp dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda CAT, SOD, MPx enzim

aktiviteleri ve GSH, LPO miktarları literatürlere dayalı, uygun metotlar kullanılarak ölçüldü²¹⁶⁻²²⁰. Tüm ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

3.9.5.1. Doku homojenatlarının hazırlanması

Kalp dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildikten sonra, 0.5 g tartılarak üzerine 4.5 ml tampon çözeltiler (her parametre için farklı bir tampon sistemi kullanılarak) ilave edildi ve sonra da 10 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Homojenatlar bir süzgeç kağıdından süzöldükten sonra soğutmalı santrifüj kullanılarak her enzim için literatürlerde belirtilen hızlarda 4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatantta enzim aktiviteleri ölçüldü.

3.9.5.1.1. CAT aktivitesinin ölçümü

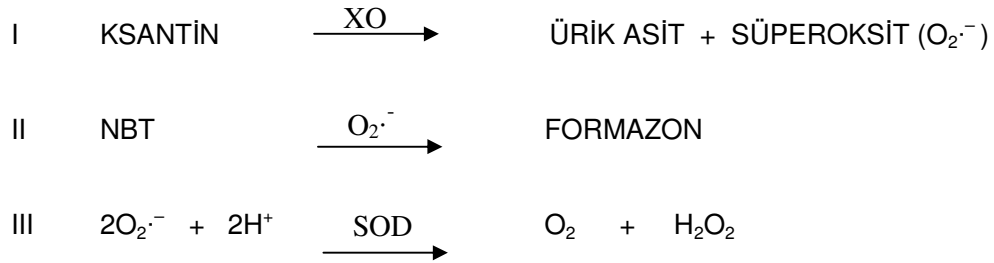
Ölçüm prensibi: Aktivite ölçüm ortamındaki H₂O₂'nin CAT vasıtasıyla H₂O'ya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbands azalmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Harcanan H₂O₂ miktarından CAT aktivitesi aşağıda bahsedilen yöntemle göre hesaplanmıştır.

CAT ölçümü: CAT'ın aktivitesi Aebi (1984) 'nin belirttiği kurallar uygulanarak ölçüldü.²¹⁶ 0.5 g doku alınarak üzerine 4.5 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7.8) ilave edilerek homojenize edildi.²²¹ Oluşan homojenat 18000 g'de 4°C'de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar katalaz aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde H₂O₂ çözeltilerinden 1,5 ml konularak numune çözeltilerinden 1,5 ml ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Kuvartz küvet alt üst etme sonrası spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 15 saniye aralıklarla 3 dakika süreyle ölçülerek absorbands azalması köre karşı kaydedildi.

CAT aktivitesi'nin hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbands azalması olan aralıktan dakika başına absorbands azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, azalma katsayısı (ϵ H₂O₂), 0.00394 (mmol⁻¹ x mm⁻¹) alınarak $A = A.b.c$ formülünden 240 nm'de, dakikada 1 mmol H₂O₂'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı (=EÜ) hesaplandı.²¹⁶ Formül pratik olarak mmol/min= A/39,4 x 30 şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbands değerlerinden hesaplandı. CAT aktivitesi, dilüsyon faktörleri dikkate alınarak *mmol/dakika/mg doku* olarak tarif edildi. Deneyler 3 paralel tekrar halinde yapıldı.

3.9.5.1.2. SOD aktivitesinin ölçümü

Ölçüm prensibi: Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik aside dönüştürülürken meydana gelen süperoksit radikalleri, şayet ortamda NBT (nitrobluetetrazolium) mevcutsa, NBT ile reaksiyona girerek formazon boyası oluştururlar. Bu bileşik 560 nm dalga boyunda maksimum absorbands verir. Şayet ortamda SOD enzimi varsa süperoksit radikalleri bu enzim tarafından H_2O_2 'ye dönüştürüldüğü için, formazon oluşumu azalacak ve buna bağlı olarak da 560 nm'de ölçülen absorbands azalacaktır. Absorbandaki azalmanın miktarı SOD aktivitesini göstermektedir.²²² Özetle; SOD aktivitesi aşağıda verilen II nolu reaksiyonun inhibe edilme derecesiyle ölçülebilmektedir.



SOD ölçümü: SOD aktivitesi Sun ve arkadaşları (1988) tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçüldü.²²² Kalp dokuları homojenize edildikten sonra 18000 g'de 1 saat santrifüj edildi.²¹⁷ Cam bir spektrofotometre küvetine 2450 µl ölçüm karışımı (0.3 mM ksantin, 0.6 mM EDTA, 150 µM NBT, 0.4 M Na_2CO_3 , 1.2 g / L BSA), 500 µl supernatant, 50 µl ksantin oksidaz eklendikten sonra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkubasyon bırakıldı ve 100 µl 0.8 mM CuCl_2 ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı.

SOD aktivitesi'nin hesaplanması: Oluşan formazon miktarları 560 nm'de 3 ml'lik quartz küvetler kullanılarak okundu ve dilüsyon yada sulandırma katsayıları dikkate alınarak aşağıdaki geliştirilen formülden aktivite değerleri (EU) elde edildi ve SOD aktivitesi *mmol /dakika/mg doku* olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 kez tekrar yapılarak değerlendirildi.

$$\text{EU/mg doku} = \left(\frac{A_{\text{Kör}} - A_{\text{numune}}}{A_{\text{Kör}}} \right) \times 100$$

3.9.5.1.3. MPx aktivitesinin ölçümü

Ölçüm prensibi: MPx enzimleri nötrofillerin solunum patlaması esnasında H₂O₂ vasıtası ile hipoklorik asit üretirler ve kofaktör olarak Hem'e ihtiyaç duyarlar. Aktivite ölçüm ortamındaki H₂O₂, MPx vasıtasıyla harcanırken oluşan hipoklorit absorbansta bir artışa sebep olur. Ölçüm prensibi, meydana gelen absorbans artışının 460 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. Oluşan hipoklorit miktarından MPx aktivitesi hesaplanabilir.

MPx ölçümü: MPx aktivitesi Bradley'in belirttiği yöntem esas alınarak ölçüldü.²¹⁸ 0,1 g doku alınarak üzerine 10 ml 50 mM fosfat tamponu (pH 6.0) ilave edilerek homojenize edildi.

Oluşan homojenat 3500 rpm 4°C'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar MPx aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine 2,8 ml ölçüm tamponu, 0,12 ml homojenat tamponu ve 0,12 ml numune çözeltisinden ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Kuvartz küvet spektrofotometrede 460 nm dalga boyunda 30 saniye aralıklarla ve 5 dakika süreyle ölçülerek absorbans azalması köre karşı kaydedildi.

MPx aktivitesi'nin hesaplanması: Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Işık yolu (b)= 10mm, ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon_{H_2O_2}$), 0,00394 ($\mu\text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$) alınarak $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ formülünden 460 nm'de, dakikada 1 mmol H₂O₂'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı (EÜ) hesaplandı. Formül pratik olarak $\text{mmol}/\text{min} = A/39,4 \times 30$ şekline getirildi ve bütün aktiviteler bu formülde yerine konulan absorbans değerlerinden hesaplandı. MPx aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak $\mu\text{mol}/\text{dakika}/\text{mg doku}$ olarak tarif edildi. Deneyler 3 paralel tekrar halinde yapıldı.

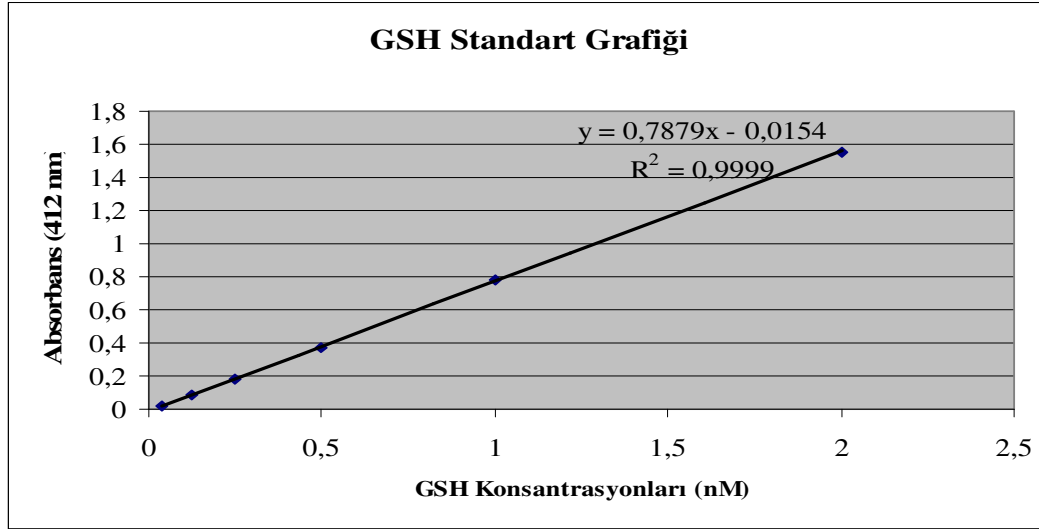
3.9.5.1.4. Total glutatyon (GSH) miktarı ölçümü

Ölçüm prensibi: Ölçüm ortamındaki DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] disülfid bir kromojendir ve sülfhidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenir. Meydana gelen sarı renk 412 nm spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

GSH miktarının ölçülmesi: Sedlak ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi.²¹⁹ 0.5 g doku üzerine 4.5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ilave edilerek homojenize edildi.²¹⁷ Homojenatlar, 12000 g 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar, GSH miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri

içerisine 1500 µl ölçüm tamponu (0.2 mM EDTA içeren 200 mM Tris-HCl, pH = 8.2), 500 µl süpernatant, 100 µl DTNB ve 7900 µl metanol pipetlenerek vorteksledi. Karışım 37 °C'ta 30 dakika inkubasyona bırakıldı ve sonra ölçümleri alındı.

GSH miktarının hesaplanması: Oluşan sarı renk miktarları 412 nm'de 3 ml'lik quartz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi ile oluşturulan standart grafikten (Şekil 16) yararlanarak ölçümler yapıldı. Numunelerin GSH miktarları, *nmol/mg doku* olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 kez tekrar yapılarak belirlendi.



Şekil 11: GSH miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

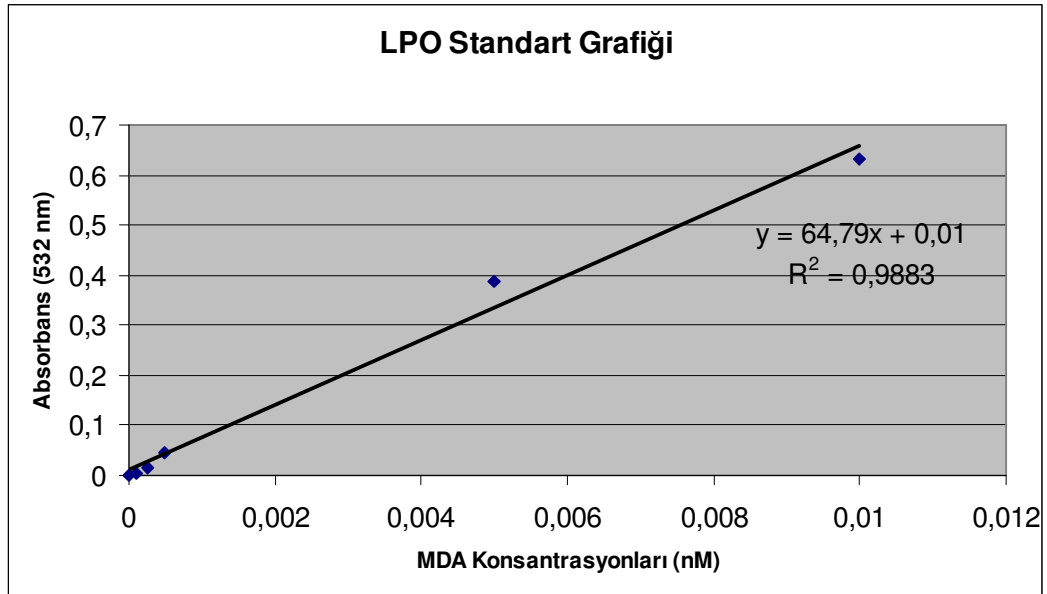
3.9.5.1.5. Lipit peroksidasyon (LPO) miktarı ölçümü

Ölçüm prensibi: Serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu LPO'nun son ürünlerinden olan MDA²²⁰ düzeyini belirlemek için kullanılan yöntemlerin çoğu MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği reaksiyonu temel alır. Bir molekül MDA iki molekül TBA ile sabit kırmızı renk oluşturmak üzere reaksiyona girer. LPO ölçümü, Ohkawa ve arkadaşlarının metoduna göre MDA'nın asidik ortamda TBA'le oluşturduğu rengin 532 nm'de ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı²²⁰.

LPO ölçümü: Ohkawa ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi.²²⁰ 0.5 g doku üzerine 4.5 ml %10 KCl ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar, 5000 g 4°C'de 20 dakika santrifüj edildi ve bu süpernatantlar, LPO

miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl %8 sodium lauryl sulphate (SLS), 750 µl %20 asetik asit, 750 µl %0.08 TBA ve 150 µl distile su pipetlenerek vortekslendi. Karışım 100 °C'ta 60 dakika inkubasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2,5 ml *n*-bütanol ilave edildi ve ölçüldü.

LPO miktarının hesaplanması: Oluşan pembe renk miktarları 532 nm'de 3 ml'lik cam küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan MDA stok çözeltisi ile oluşturulan standart grafikten yararlanarak ölçümler yapıldı (Şekil 17). Numunelerin LPO miktarları, *nmol MDA/g doku* olarak tarif edildi. Her bir faktörün etkisi 3 tekrar yapılarak verildi.



Şekil 12. LPO miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

3.10. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS 13.0 yazılım programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri one-way variance analyzes (ANOVA) testi ile belirlendi. Post-hoc değerlendirmeler için Scheffe testi kullanıldı. $P < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Materyal ve Metod kısmında belirtildiği gibi 220 ± 20 gr olan Albino Wistar cinsi ratların, deney protokolünden sonra alınan kanlarında miyokard hasarının biyokimyasal belirteçleri AST, CK, CK-MB ve Tnl incelendi. Ayrıca DNA hasarı seviyesi (8-OHGua/Gua), NO seviyesi ve kalp dokusunda SOD, CAT, MPx enzim aktiviteleri ve GSH, LPO miktarları literatürlere dayalı uygun metodlar kullanılarak tespit edildi. Çalışma gruplarına ait ortalama değerler (X) ve standart hata (SH), $X \pm SH$ olarak Tablo 3-7'lerde verildi.

Tablo 3: Tez çalışma protokolü gruplarında serumdan elde edilen AST, CK enzim aktiviteleri değerleri

Gruplar	AST (U/L)	CK(U/L)
Sağlıklı Kontrol	161,17 \pm 1,47	860,50 \pm 38,90
ISO Kontrol	190,17 \pm 3,76 +	1530,33 \pm 20,70 +
Sağlıklı + Lacidipine	162,80 \pm 2,95	850,40 \pm 29,70
Sağlıklı + Ramipril	161,17 \pm 1,83	810,17 \pm 23,20
Sağlıklı + Valsartan	162,83 \pm 3,43	880,17 \pm 16,60
Lacidipine + ISO	161,00 \pm 2,00 *	1140,00 \pm 25,30 *
Ramipril + ISO	162,20 \pm 2,86 *	1050,40 \pm 36,50 *
Valsartan + ISO	166,50 \pm 2,43 *	1090,67 \pm 31,40 *

İstatistiksel analizler Scheffe'nin Post-hoc Anova- testi kullanılarak ISO kontrol grubuna göre ilaç+ISO grupları ve sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol ve sağlıklı+ilaç grupları mukayesesi yapılmış olup $P < 0,05$ seviyesinde sonuçlar anlamlı kabul edilmiş sırasıyla * ve + ile gösterilmiştir. Sonuçlar her bir gruptaki 6 rat için ölçümün ortalaması [\pm standart hata(SH)] olarak gösterilmiştir.

4.1. AST aktivitesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kanlarından elde edilen serumlardaki AST sonuçları Tablo 3'den görüldüğü üzere kontrol gruplarından; Sağlıklı kontrol grupta 161.17 ± 1.47 , ISO kontrol'de 190.17 ± 3.76 belirlendi. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında AST değerleri sırasıyla 162.80 ± 2.95 , 161.17 ± 1.83 , 162.83 ± 3.43 belirlendi. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 161.00 ± 2.00 , 162.20 ± 2.86 , 166.50 ± 2.43 , olarak belirlendi. Numunelerin AST aktivitesi U/L olarak tarif edildi.

Tablo 3'de görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO grubundaki AST değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ($P < 0,05$).

Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız her 3 ilaç gruplarının AST seviyeleri sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak herhangi bir değişikliğe yol açmadığı görüldü ($P>0,05$). ISO kontrol grubunda artmış olan AST seviyeleri, ISO uygulanmış Lasidipin, Ramipril ve Valsartan ilaç gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüş olduğu gözlemlendi ($P<0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını sağlıklı kontrol grupla karşılaştırdığımız zaman ise AST seviyelerinde ilaç gruplarında istatistiksel olarak bir değişme olmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını kendi aralarında karşılaştırdığımız zaman ise her 3 ilacın AST seviyeleri üzerine olan etkileri arasında istatistiksel olarak bir fark tespit edilmedi.

4.2. CK aktivitesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kanlarından elde edilen serumlardaki CK sonuçları Tablo 3'den görüldüğü üzere kontrol gruplarından; Sağlıklı kontrol grupta 860.50 ± 38.9 , ISO kontrol'da ise 1530.33 ± 20.7 olduğu belirlendi. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında CK değerleri sırasıyla 850.40 ± 29.7 , 810.17 ± 23.2 , 880.17 ± 16.0 olarak belirlendi. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 1140.00 ± 25.3 , 1050.40 ± 36.5 , 1090.67 ± 31.4 olduğu belirlendi. Numunelerin CK aktivitesi U/L olarak tarif edildi.

Tablo 3'den görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO grubundaki CK değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlendi ($P<0,05$). Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız ilaç gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlenmedi ($P>0,05$). ISO kontrol grubunda artmış olan CK seviyeleri, ISO uygulanmış Lasidipin, Ramipril ve Valsartan ilaç gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu belirlendi ($P<0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını sağlıklı kontrol grupla karşılaştırdığımız zaman ise CK seviyelerinde her üç ilaç grubunda da istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek kaldığı belirlendi ($P<0,05$). ISO ilaç gruplarını kendi aralarında karşılaştırdığımız zaman her 3 ilacın CK seviyeleri üzerine olan etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi ($P>0,05$).

Tablo 4. Tez çalışma protokolü gruplarında serumdan elde edilen CK-MB enzim aktivitesi ve Tnl değerleri

Gruplar	CK-MB (U/L)	Tnl (ng/ml)
Sağlıklı Kontrol	118,33 ± 2,07	0,96 ± 0,17
ISO Kontrol	235,33 ± 6,65 +	7,37 ± 0,26 +
Sağlıklı + Lacidipine	123,00 ± 4,30	1,22 ± 0,09
Sağlıklı + Ramipril	119,50 ± 3,94	1,25 ± 0,10
Sağlıklı + Valsartan	127,17 ± 3,37	1,29 ± 0,15
Lacidipine + ISO	121,50 ± 8,48 *	1,79 ± 0,06 *
Ramipril + ISO	119,80 ± 6,38 *	1,97 ± 0,08 *
Valsartan + ISO	128,17 ± 4,17 *	2,01 ± 0,16 *

İstatistiksel analizler Scheffe'nin Post-hoc Anova- testi kullanılarak ISO kontrol grubuna göre ilaç+ISO grupları ve sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol ve sağlıklı+ilaç grupları mukayesesi yapılmış olup $P<0,05$ seviyesinde sonuçlar anlamlı kabul edilmiş sırasıyla * ve + ile gösterilmiştir. Sonuçlar her bir gruptaki 6 rat için ölçümün ortalaması [\pm standart hata(SH)] olarak gösterilmiştir.

4.3. CK-MB aktivitesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kanlarından elde edilen serumlardaki CK-MB sonuçları Tablo 4'den görüldüğü üzere kontrol gruplarından; Sağlıklı kontrol grupta 118.33 ± 2.07 , ISO kontrol'da 235.33 ± 6.65 olarak bulundu. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında CK-MB değerleri sırasıyla 123.00 ± 4.30 , 119.50 ± 3.94 , 127.17 ± 3.37 olarak bulundu. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 121.50 ± 8.48 , 119.80 ± 6.38 , 128.17 ± 4.17 olarak belirlendi. Numunelerin CK-MB aktivitesi U/L olarak tarif edildi.

Tablo 4'de görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO grubundaki CK-MB değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlendi ($P<0,05$). Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız ilaç gruplarını sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe yol açmadığı belirlendi ($P>0,05$). ISO uygulanmış kontrol grubunda artmış olan CK-MB seviyeleri, ISO uygulanmış Lasidipin, Ramipril ve Valsartan ilaç gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu belirlendi ($P<0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını sağlıklı kontrol gruba karşılaştırdığımız zaman ise CK-MB seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişiklik belirlenmedi ($P>0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını kendi aralarında karşılaştırdığımız zaman ise istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$).

4.4. Tnl aktivitesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kanlarından elde edilen serumlardaki Tnl sonuçları Tablo 4'den görüldüğü üzere kontrol gruplarından; Sağlıklı kontrol grupta 0.96 ± 0.17 , ISO kontrol grupta 7.37 ± 0.26 olduğu bulundu. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında Tnl değerleri sırasıyla 1.22 ± 0.09 , 1.25 ± 0.10 , 1.29 ± 0.15 olduğu bulundu. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril ve Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 1.79 ± 0.06 , 1.97 ± 0.08 , 2.01 ± 0.16 olarak belirlendi. Numunelerin Tnl aktivitesi U/L olarak tarif edildi.

Tablo 4'de görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol grubundaki Tnl değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlendi ($P < 0,05$). Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız her üç ilaç grubunda Tnl seviyelerini sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe yol açmadığı belirlendi ($P > 0,05$). ISO kontrol grubunda artmış olan Tnl seviyeleri, ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril ve Valsartan ilaç gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüş olduğu belirlendi ($P < 0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını sağlıklı kontrol gruba karşılaştırdığımız zaman ise Tnl seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olmadığı belirlendi ($P > 0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını kendi arasında karşılaştırdığımız zaman her 3 ilacın Tnl seviyeleri üzerine olan etkileri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı ($P > 0,05$).

4.5. Antioksidan parametrelere ait sonuçlar

Tablo 5. Tez çalışma protokolü gruplarında Kalp dokusundan elde edilen SOD, CAT ve MPx enzim aktiviteleri değerleri

Gruplar	SOD	CAT	MPx
	<i>mmol/mg doku</i>	<i>mmol/dk./mg</i>	<i>µmol/dk./mg doku</i>
Sağlıklı Kontrol	$104,91 \pm 0,60$	$112,92 \pm 9,51$	$0,90 \pm 0,20$
ISO Kontrol	$58,18 \pm 0,90 +$	$67,12 \pm 6,14 +$	$2,28 \pm 0,52 +$
Sağlıklı + Lacidipine	$101,56 \pm 0,54$	$108,91 \pm 2,58$	$0,79 \pm 0,20$
Sağlıklı + Ramipril	$104,07 \pm 0,31$	$108,53 \pm 1,02$	$0,90 \pm 0,20$
Sağlıklı + Valsartan	$104,05 \pm 0,71$	$110,18 \pm 3,31$	$1,02 \pm 0,18$
Lacidipine + ISO	$103,24 \pm 0,35 *$	$111,00 \pm 2,22 *$	$1,35 \pm 0,44 *$
Ramipril + ISO	$99,91 \pm 0,54 *$	$104,34 \pm 4,42 *$	$1,23 \pm 0,20 *$
Valsartan + ISO	$99,91 \pm 0,18 *$	$103,21 \pm 6,84 *$	$1,35 \pm 0,35 *$

İstatistiksel analizler Scheffe'nin Post-hoc Anova- testi kullanılarak ISO kontrol grubuna göre ilaç+ISO grupları ve sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol ve sağlıklı+ilaç grupları mukayesesi yapılmış olup $P < 0,05$ seviyesinde sonuçlar anlamlı kabul edilmiş sırasıyla * ve + ile gösterilmiştir. Sonuçlar her bir gruptaki 6 rat için ölçümün ortalaması [\pm standart hata(SH)] olarak gösterilmiştir.

4.5.1. SOD aktivitesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kalplerinde elde edilen dokulardaki SOD sonuçları Tablo 5'den görüldüğü üzere kontrol gruplarından; Sağlıklı kontrol grupta 104.91 ± 0.60 , ISO kontrol grupta 58.18 ± 0.90 olarak bulundu. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında SOD değerleri sırasıyla 101.56 ± 0.54 , 104.07 ± 0.31 , 104.05 ± 0.71 olarak bulundu. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 103.24 ± 0.35 , 99.91 ± 0.54 , 99.91 ± 0.18 olarak belirlendi. Numunelerin SOD aktivitesi mmol/mg doku olarak tarif edildi.

Tablo 5'de görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol grubundaki SOD değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlendi ($P < 0,05$). Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız her üç ilaç grubunda SOD seviyeleri sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olmadığı görüldü ($P > 0,05$). ISO kontrol grubunda azalmış olan SOD seviyeleri, ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril ve Valsartan ilaç gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlendi ($P < 0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırdığımız zaman ise SOD seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi ($P > 0,05$). ISO ilaç gruplarını kendi arasında karşılaştırdığımız zaman ise istatistiksel olarak bir fark görülmedi ($P > 0,05$).

4.5.2. CAT aktivitesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kalplerinden elde edilen dokulardaki CAT sonuçları Tablo 5'den görüldüğü üzere kontrol gruplarından; Sağlıklı kontrol grupta 112.92 ± 9.51 , ISO kontrol grupta 67.12 ± 6.14 olarak bulundu. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında CAT değerleri sırasıyla 108.91 ± 2.58 , 108.53 ± 1.02 , 110.18 ± 3.31 olarak belirlendi. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 111.00 ± 2.22 , 104.34 ± 4.42 , 103.21 ± 6.84 , olarak belirlendi. Numunelerin CAT aktivitesi mmol/dk./mg olarak tarif edildi

Tablo 5'de görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol grup CAT değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu gözlemlendi ($P < 0,05$). Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız her üç ilaç grubunda CAT seviyelerini sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel değişiklik olmadığı gözlemlendi ($P > 0,05$). ISO kontrol grubunda azalmış olan CAT seviyeleri, ISO uygulanmış Lasidipin, Ramipril ve Valsartan ilaç gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlendi ($P < 0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını sağlıklı kontrol grupla karşılaştırdığımız

zaman ise CAT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olmadığı belirlendi ($P>0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını kendi arasında karşılaştırdığımız zaman ise istatistiksel olarak bir fark görülmedi ($P>0,05$).

4.5.3. MPx aktivitesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kalplerinden elde edilen dokulardaki MPx sonuçları Tablo 5'den görüldüğü üzere kontrol gruplarından; Sağlıklı kontrol grupta 0.90 ± 0.20 , ISO kontrol grupta 2.28 ± 0.52 olarak bulundu. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında MPx değerleri sırasıyla 0.79 ± 0.20 , 0.90 ± 0.20 , 1.02 ± 0.10 olarak belirlendi. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 1.35 ± 0.44 , 1.23 ± 0.20 , 1.35 ± 0.10 olarak belirlendi. Numunelerin MPx aktivitesi $\mu\text{mol/dk/mg}$ doku olarak tarif edildi.

Tablo 5'de görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol grupta MPx değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ($P<0,05$). Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız her üç ilaç grubunda MPx seviyelerini sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark olmadığı belirlendi ($P>0,05$). ISO kontrol grupta yükselmiş olan MPx seviyeleri, ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril ve Valsartan ilaç gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu belirlendi ($P<0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını sağlıklı kontrol grupla karşılaştırdığımız zaman ise MPx seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olmadığı gözlemlendi ($P>0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını kendi arasında karşılaştırdığımız zaman ise istatistiksel olarak bir fark görülmedi ($P>0,05$).

Tablo 6. Tez çalışma protokolü gruplarında Kalp dokusundan elde edilen LPO, GSH değerleri

Gruplar	LPO nmol /g doku	GSH nmol/mg doku
Sağlıklı Kontrol	45,20 \pm 0,55	4,26 \pm 0,06
ISO Kontrol	76,10 \pm 3,60 +	2,31 \pm 0,03 +
Sağlıklı + Lacidipine	49,97 \pm 1,08	3,78 \pm 0,08 +
Sağlıklı + Ramipril	45,91 \pm 1,64	3,74 \pm 0,06 +
Sağlıklı + Valsartan	44,49 \pm 0,53	3,48 \pm 0,16 +
Lacidipine + ISO	45,91 \pm 2,92 *	3,52 \pm 0,05 *
Ramipril + ISO	56,67 \pm 2,82 *	3,16 \pm 0,15 *
Valsartan + ISO	57,78 \pm 1,29 *	3,40 \pm 0,18 *

İstatistiksel analizler Scheffe'nin Post-hoc Anova- testi kullanılarak ISO kontrol grubuna göre ilaç+ISO grupları ve sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol ve sağlıklı+ilaç grupları mukayesesi yapılmış olup $P<0,05$ seviyesinde sonuçlar anlamlı kabul edilmiş sırasıyla * ve + ile gösterilmiştir. Sonuçlar her bir gruptaki 6 rat için ölçümün ortalaması [\pm standart hata(SH)] olarak gösterilmiştir.

4.5.4. LPO aktivitesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kalplerinden elde edilen dokulardaki LPO sonuçları Tablo 6'dan görüldüğü üzere kontrol gruplarından; Sağlıklı kontrol grupta 45.20 ± 0.55 , ISO kontrol grupta 76.10 ± 3.60 olarak belirlendi. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında LPO değerleri sırasıyla 49.97 ± 1.08 , 45.91 ± 1.64 , 44.49 ± 0.53 olarak belirlendi. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 45.91 ± 2.92 , 56.67 ± 2.82 , 57.78 ± 1.29 olarak belirlendi. Numunelerin LPO aktivitesi nmol MDA/g doku olarak tarif edildi.

Tablo 6'da görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol grubundaki LPO değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlendi ($P < 0,05$). Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız her üç ilaç grubunda LPO seviyeleri sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark belirlenmedi ($P > 0,05$). ISO kontrol grubunda yükselmiş olan LPO seviyeleri, ilaç grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu belirlendi ($P < 0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını sağlıklı kontrol gruba karşılaştırdığımız zaman ise LPO seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişiklik olmadığı belirlendi ($P > 0,05$). ISO oluşturulmuş ilaç gruplarını kendi arasında karşılaştırdığımız ise zaman istatistiksel olarak farklı olmadığını belirlendi ($P > 0,05$).

4.5.5. GSH aktivitesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kalplerinden elde edilen dokulardaki GSH sonuçları Tablo 6'dan görüldüğü üzere kontrol gruplarından; sağlıklı kontrol grupta 4.26 ± 0.06 , ISO kontrol'da 2.31 ± 0.03 olarak bulundu. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında GSH değerleri sırasıyla 3.78 ± 0.08 , 3.74 ± 0.06 , 3.48 ± 0.16 tespit edildi. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 3.52 ± 0.05 , 3.16 ± 0.15 , 3.40 ± 0.18 olarak belirlendi. Numunelerin GSH aktivitesi nmol/mg doku olarak tarif edildi.

Tablo 6'da görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol grubundaki GSH değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu gözlemlendi ($P < 0,05$). Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız her üç ilaç grubunda GSH seviyeleri sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak düşük olduğu belirlendi ($P < 0,05$). ISO kontrol grubunda azalmış olan GSH seviyeleri, ISO uygulanmış Lasidipin, Ramipril ve Valsartan ilaç gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği belirlendi ($P < 0,05$). ISO uygulanan ilaç gruplarını sağlıklı kontrol gruba karşılaştırdığımız zaman ise GSH seviyeleri istatistiksel olarak düşük olduğu

belirlendi ($P<0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını kendi arasında karşılaştırdığımız zaman istatistiksel olarak bir fark görülmedi ($P>0,05$).

Tablo 7. Tez çalışma protokolü gruplarında tam kandan elde edilen 8-OHGua/Gua ve serumdan elde edilen NO değerleri

Gruplar	N	8-OHGua/Gua($\mu\text{mol/L}$)	NO ($\mu\text{mol/ml}$)
Sağlıklı Kontrol	6	0,98 \pm 0,10	42,12 \pm 0,25
ISO kontrol	6	1,66 \pm 0,07 +	20,18 \pm 0,47 +
Sağlıklı+Lacidipine	6	1,05 \pm 0,02	39,63 \pm 1,15
Sağlıklı+Ramipril	6	1,06 \pm 0,02	39,90 \pm 1,81
Sağlıklı+Valsartan	6	1,04 \pm 0,04	40,11 \pm 1,16
ISO+Lacidipine	6	1,04 \pm 0,02 *	34,34 \pm 1,27 *
ISO+Ramipril	6	1,09 \pm 0,01 *	33,81 \pm 1,15 *
ISO+Valsartan	6	1,10 \pm 0,01 *	35,74 \pm 1,14 *

İstatistiksel analizler Scheffe'nin Post-hoc Anova- testi kullanılarak ISO kontrol grubuna göre ilaç+ISO grupları ve sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol ve sağlıklı+ilaç grupları mukayesesi yapılmış olup $P<0,05$ seviyesinde sonuçlar anlamlı kabul edilmiş sırasıyla * ve + ile gösterilmiştir. Sonuçlar her bir gruptaki 6 rat için ölçümün ortalaması [\pm standart hata(SH)] olarak gösterilmiştir.

4.6. NO seviyesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kanlarından elde edilen serumlardaki NO sonuçları Tablo 7'den görüldüğü üzere kontrol gruplarından; sağlıklı kontrol grupta 42.12 ± 0.25 , ISO kontrol'da 20.18 ± 0.47 olarak bulundu. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında NO değerleri sırasıyla 39.63 ± 1.15 , 39.90 ± 1.81 , 40.11 ± 1.16 olarak bulundu. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 34.34 ± 1.27 , 33.81 ± 1.15 , 35.74 ± 1.14 olarak bulundu. Numunelerin NO seviyesi $\mu\text{mol/ml}$ olarak tarif edildi.

Tablo 7'den görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO grubundaki NO değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu gözlemlendi ($P<0,05$). Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız her üç ilaç grubunda NO seviyelerini sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik görülmedi ($P>0,05$). ISO kontrol grubunda azalmış olan NO seviyeleri, ISO uygulanmış Lasidipin, Ramipril ve Valsartan ilaç gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği belirlendi ($P<0,05$). ISO uygulanmış ilaç gruplarını sağlıklı kontrol gruba karşılaştırdığımız zaman ise NO seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük

olduğu gözlemlendi. ISO uygulanmış ilaç gruplarını kendi arasında karşılaştırdığımız zaman ise istatistiksel olarak bir farklılık görülmedi ($P>0,05$).

4.7. 8-OHGua/Gua seviyesi üzerine deney protokolü değerleri

Deney protokolü tamamlandıktan sonra ratların kanlarından elde edilen 8-OHGua/Gua sonuçları Tablo 7'den görüldüğü üzere kontrol gruplarından; Sağlıklı kontrol grupta 0.98 ± 0.10 , ISO kontrol grupta 1.66 ± 0.07 olarak bulundu. Sağlıklı ratlara uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan ilaç gruplarında 8-OHGua/Gua değerleri sırasıyla 1.05 ± 0.02 , 1.06 ± 0.02 , 1.04 ± 0.04 olarak bulundu. ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril, Valsartan verilen gruplarda sırasıyla 1.04 ± 0.02 , 1.09 ± 0.01 , 1.10 ± 0.01 olarak belirlendi. Numunelerin 8-OHGua/Gua seviyesi pmol/L olarak tarif edildi

Tablo 7'de görülebileceği üzere sağlıklı kontrol grubuna göre ISO kontrol grupta 8-OHGua/Gua değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görüldü ($P<0,05$). Sağlıklı rat gruplarımıza uyguladığımız her üç ilaç grubunda 8-OHGua/Gua seviyelerini sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi ($P>0,05$). ISO kontrol grubunda artmış olan 8-OHGua/Gua seviyeleri, ISO uygulanan Lasidipin, Ramipril ve Valsartan ilaç gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu belirlendi ($P<0,05$). ISO uygulanan ilaç gruplarını sağlıklı kontrol gruba karşılaştırdığımız zaman ise 8-OHGua/Gua seviyelerinde istatistiksel olarak değişiklik olmadığı belirlendi ($P>0,05$). ISO uygulanan ilaç gruplarını kendi arasında karşılaştırdığımız zaman ise istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlenmedi ($P>0,05$).

5. TARTIŞMA

MI günümüzde hem mortalite hem de morbidite açısından en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Aynı zamanda sağlık harcamalarının büyük bir kısmı kardiyovasküler sistem hastalıklarının tanı ve tedavilerine harcanmaktadır. MI'ı diğer hastalıklardan ayıran en önemli farkları ise mutlaka ani başlangıçlı olması ve ölümlerin büyük çoğunluğunun ilk saatlerde yaşanıyor olmasıdır. Eğer kişi MI'ın akut evresini atlattırsa, MI'a bağlı birçok komplikasyonlarla da karşı karşıya gelir. Bunlar içinde belki de en önemlisi MI'a sekonder gelişen fibrozis sonucu oluşan ventrikül yetmezliğidir ki klinik olarak karşımıza değişik derecelerde kalp yetmezliği olarak ortaya çıkar. Bu nedenle son elli yıldır birçok bilim adamı MI'ın önlenmesi veya MI sonrası oluşabilecek komplikasyonları azaltmak için sayısız çalışma yapmaktadırlar. Bu çalışmaların sonucunda MI sonrasında kullanılmak üzere birçok yeni ilaç geliştirilmiş olup hangi ilacın daha etkin olduğu hala daha tartışılmaktadır. MI sonrası en yaygın kullanılan ilaç grupları ACE inhibitörleri, ATE inhibitörleri, Kalsiyum kanal blokörleri ve diüretiklerdir. Bu ilaç grupları içinde de sayısız ilaç bulunmaktadır. Birbirleri arasındaki etkinlikleri konusunda ise tartışmalar hala devam etmektedir. Bu bilgilerden yola çıkılarak mevcut çalışmamızın amacı sıçanlarda İSO ile oluşturulan MI modelinde gelişen oksidatif stresin ve oksidatif strese bağlı DNA hasarının şiddetini belirleme ve lasidipin, ramipril ve valsartan'ın sıçanlarda ISO ile oluşan MI'da oluşan DNA hasarı, doku hasarı ve oksidatif stresi üzerine olan etkileri karşılaştırmaktır.

Bilindiği gibi insanlar üzerinde çalışmaların yapılması içerdiği riskler ve etik nedenlerden dolayı oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle çeşitli deneysel hayvan modelleri oluşturulmuştur. Bunlar içinde en yaygın olarak kullanılanı ratlarda cerrahi olarak koroner arter ligasyonu veya katekolaminlerle indüklenen MI modelidir. Genel bilgilerde bu iki model arasındaki fark oldukça geniş bir şekilde anlatıldığı için burada tekrar bahsedilmemiştir. Çalışmamızda ISO ile indüklenen MI modeli kullanıldı. Bir katekolamin olan ISO, hızlı bir şekilde otooksidasyon yaparak miyokardiyumda oksidatif ürünlerin ortaya çıkmasına neden olur.²²³ ISO verilmesi kardiyak kas hücrelerinde enerji rezervini azaltarak kompleks biyokimyasal ve yapısal değişikliklere neden olur ki buda nekrozis ile sonlanır.²²⁴ Wexler ve Greenberg'in⁹¹ bir çalışmada ratlarda yüksek doz ISO uygulamasının insanda oluşan MI'daki patofizyolojik değişikliklerle aynı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Kısacası ratlara yüksek doz ISO uygulaması insanlarda oluşan MI'ın tüm biyokimyasal, fizyopatolojik ve histopatolojik değişiklikleri ile birebir örtüşmektedir.²²⁴ Bu nedenle ISO ile indüklenen MI modeli

standardize edilmiş bir model olup birçok ilacın yararlı etkilerini veya kardiyak fonksiyonlar üzerine olan etkisini araştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır.²²⁵

Bizim çalışmamızdaki bulgulardan da diğer çalışmalara benzer olarak ISO ile MI oluşturulmuş kontrol grubundaki ratların kan biyokimyasal kardiyak doku belirteçlerinden olan AST, CK, CK-MB ve TnI seviyelerinin anlamlı derecede artmış olduğunu tespit edildi. CK, CK-MB ve TnI MI'da bu makro moleküllerin hasarlı dokudan salındığını ve doku hasarını gösteren en iyi diyagnostik belirteçler olduğu bildirmiştir.⁵ CK ve AST içeren miyokardiyal hücreler oksijen veya glukoz eksikliğine bağlı olarak hasarlanır veya yok olursa hücre membranları daha geçirgen olur veya parçalanır. Sonuçta ise bu enzimlerin salınımı artar yani periferik dolaşıma geçer.^{5, 33} AST, ISO uygulanmış hastaların %90-95'inde yükselir.³⁸ Göğüs ağrısı ortaya çıktıktan sonra 8-12 saat içinde yükselmeye başlar, 24-48 saatte pik değerine ulaşır ve 3-4 gün içinde normal değerine döner. Yaygın doku dağılımı nedeni ile AST'de ALT gibi klinik tanıda yararı kısıtlı bir enzimdir. Miyokardın yanı sıra iskelet kası ve karaciğer gibi dokularda da yüksek konsantrasyonlarda bulunabilen bu enzim MI'da önemli bir tanısız yarar taşımamaktadır. Buna rağmen bu enzimin de kardiyak profile eklenmesinin yararlı olduğu belirtilmiştir.⁴⁰ Serum CK aktivitesi MI'nin başlangıcından sonra 4-8 saat içinde yükselmeye başlar ve 2-3 gün içerisinde normale döner. CK yaklaşık 24. saatte pik yapmasına rağmen trombolitik tedavi veya mekanik rekanalizasyon uygulamalarıyla reperfüzyon yapılan hastalarda ve erken spontan trombolizis vakalarında daha erken pik düzeye ulaşır. Serum CK düzeyindeki artış rutinde yaygın olarak kullanılabilmesine ve ISO'nin sensitif enzimatik bir göstergesi olmasına rağmen; kas hastalıkları, alkol intoksikasyonu, diabetes mellitus, iskelet kası travması, ağır egzersiz, konvülsiyonlar, kas içi enjeksiyonlar, torasik outlet sendromu ve pulmoner embolide yanlış pozitif sonuçlar vermesi en önemli dezavantajdır.^{15, 29, 33}

Elektroforezde CK'nın üç izoformu (MM, BB ve MB) tespit edilmiştir. Kalp kasında hem MM hem de MB izoenzimleri vardır. Klinik değerlendirmede tek bir CK ve CK-MB ölçümüne güvenilmemeli, bunun yerine bu enzimlerin zaman içerisindeki yükseliş ve düşüşleri dikkate alınmalıdır. İskelet kası tarafından salınan CK-MB ve TnT kalp kası tarafından salınana göre genellikle daha uzun süre yüksek kalır ve CK-MB'nin günlerce yüksek kaldığı plato paterni denen bir duruma neden olur.³¹ Şüpheli durumlarda kalp kası hasarının iskelet kası hasarından daha güvenilir bir şekilde ayırabilme yeteneğine sahip olan kardiyak spesifik troponinlere başvurulabilir. Günümüzde kantitatif Tn I ölçümü MI'nin tanısında kullanılan biyokimyasal kriterlerin en önemlisi haline gelmiştir.^{6, 31, 36} MI'da Tn I göğüs ağrısının başlangıcından 3 saat sonra

referans değerin üst sınırının üzerine çıkmaya başlar. Tn I yaklaşık 12 saat sonra pik düzeye ulaşır. Nekrotik miyokard dokusundaki dejenere olmuş kontraktıl aparatından sürekli salınımına bağlı olarak, cTn I'deki yükseklik MI'den sonra 7-10 gün devam eder.²⁶ Tn I MI tanısında son derece yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip biyokimyasal belirteçler olmalarına rağmen, MI'yi takiben kanda uzun süre yüksek seviyede kaldıkları için rekürren infarktüslerin tanısında yetersiz kalmaktadırlar.^{31, 36, 37, 226, 227} Mevcut çalışmamızda hem lasidipin hem ramipril hem de valsartan ISO ile indüklenen MI'da artmış olan AST, CK, CK-MB ve TnI seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı belirlendi ($p < 0.05$). Bu azaltma sağlıklı kontrol grubunda bulunan enzim seviyelerine göre yüksek kalmıştır. Bu sonuçlar bize her üç ilacın da ISO ile indüklenen MI'da oluşan doku hasarını azalttıklarını yalnız tam olarak durduramadıklarını göstermektedir. Çalışmamızda her üç ilacı da ISO ile indüklenen MI oluşturulmamış sağlıklı ratlara vererek bu ilaçların sağlıklı kalp dokusuna olan etkisini de inceledik. Sonuçlarımıza göre bu üç ilaçtan kardiyak doku hasar belirteçlerinin sağlıklı ratlarda artırmamış olup kalp dokusu üzerine toksik etki göstermemişlerdir. Her üç ilacı MI'da gelişen doku hasarını gösteren biyokimyasal kardiyak belirteçler üzerinden kıyaslırsak CK, ve CK-MB'yi ramipril istatistiksel olarak anlamlı olmasada sayısal veri bakımında daha fazla azalttığı belirlendi. Bu sonuçlar bize her üç ilacın da ISO ile indüklenen MI sonrası oluşan doku hasarını etkin olarak azalttığını göstermektedir. Her üç ilacı ISO ile indüklenen MI sonrası doku hasarını gösteren biyokimyasal kardiyak belirteçler üzerinden kıyasladığımızda her üçünün de birbirleri arasında anlamlı bir üstünlüklerinin olmadığı görüldü.

MI sonrası birçok patolojik mekanizma çalışmaktadır. Koroner arterlerin akut tıkanmasına bağlı olarak dokuda iskemi gelişmektedir. İskemi esnasında beslenemeyen dokular kendileri için gerekli olan oksijeni miyoglobinden sağlarlar. Miyoglobin ise yeteri derecede oksijen sağlayamamaktadır. İskeminin süresi uzadıkça dokular gerekli olan enerjiyi aneorobik yoldan sağlamaya başlamaktadır. Aneorobik solunumun son ürünü olan laktik asit ise hücre içi pH'yı azaltır.^{4, 32} Hem hücre içi pH'nın değişmesi hem de hücre bütünlüğünün sağlanması için gerekli olan ATP'nin sentez edilememesi hücre membranlarını geçirgen hale getirerek Ca'un hücre içine girmesine neden olur. Ca'nın hücre içine girmesi ve aynı zamanda asidoz hücre içi lizozomal enzimleri serbestleştirir.^{2, 4} Hücreler hasara uğramaya, sonunda da ölmeye başlar. İşte iskeminin bu evresinde gerekli olan oksijenin temin edilemediği her durumda doku hasara uğrayacaktır. Bu nedenle MI'nin akut evresinde tıkanmış olan damarı açmak en etkin çözümdür. Çalışmamızda denediğimiz her üç ilacın MI'nin akut evresinde

kardiyak hasar belirteçlerini sağlıklı kontrol grubuna yaklaştıramamasının sebebi kullanılan ilaçların iskemik dokuya yeterli derecede ulaşamaması veya etkilerinin iskemik hasarın oluşma hızına yetişememesinden kaynaklanmış olabilir. Fakat her üç ilacımızda ISO uygulanmış kontrol grubuna göre kardiyak belirteçleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltması ($p<0.05$), iskemik doku etrafında bulunan sağlam dokulara etki ederek iskeminin yayılmasını ve şiddetini önlediği düşünüldü.

MI sonrası kronik periyotta iskemik alan etrafında kollateral dolaşım oluşmakta olup, bu iskeminin hasarını sınırlayan doğal bir savunma mekanizmasıdır.²²⁸ Aynı zamanda iskemik epizoddan sonra çevre dokularda antioksidan sistemin pozitif yönde arttığını Moss ve Benhorin göstermiştir.²²⁹ Bizim bulgularımızda da ISO ile indüklenen MI sonrası kontrol grubumuzdaki kardiyak belirteçlerinin azalması bu sistemlerin aktif halde olduğunu göstermektedir.

MI' da oluşan temel fizyopatoloji iskemidir. İskemi, organa gelen kan akımının yetersizliği veya dokunun bozulmuş perfüzyonu olup, uzayan iskemi durumunda hücrelerin bütünlüğü kaybolup miyokarda yeterli oksijen ve metabolizmayı devam ettirmeye yetecek miktarda substrat ulaşamaz.²³⁰ İskeminin ilk dakikalarında glikolitik yol büyük ölçüde uyarılır, fakat daha sonra doku asidozunun gelişmesi, NADH, sitrat ve laktat birikmesi sonucu glikolitik yol inhibe olur.¹⁸ Koroner arter akımının zaman içinde yeniden sağlanması yani reperfüzyon olayı kardiyak hasarın önlenmesi için temel bir yoldur. Deneysel çalışmalar reperfüzyonun akut fazı esnasında bir miktar daha doku hasarının oluştuğunu göstermiştir. Reperfüzyon hasarı olarak bilinen bu olay, mikrosirkülasyondaki endotel hücrelere nötrofil adhezyonunu, intraselüler enzimlerin salınımını, kalsiyum iyonlarının hücre içine girişini, sarkolemma fosfolipitlerinin bozunmasını ve ROS oluşumunu artırır. ROS düzeylerinin artması açıl zincirlerinin peroksidasyonuna neden olur ve sonuç da hücre ölümü gerçekleşir.^{19, 20, 231} Moleküler oksijenin indirgenmesi veya uyarılması sonucu serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Fizyolojik şartlarda mitokondrial elektron transport zincirinden sızma tarzında, patolojik süreçlerde ise ksantin oksidaz metabolizmasından, aktive olmuş nötrofillerden, katekolamin oksidasyonundan, endotel hücrelerinden ve prostaglandinlerden serbest radikaller üretilmektedir.¹⁶ İskemi reperfüzyon sırasında, hidrojen peroksidin lipid peroksidasyonuna yol açmasına bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stres, membran hasarına yol açan mekanizmalardan birisidir ve intraselüler kalsiyum artışına ve "stunned" miyokardiyumda miyokard kontraktilitesinin disfonksiyona neden olur.²¹⁻²³ Dolayısıyla MI sonrasındaki en önemli biyokimyasal olay serbest oksijen radikallerinin artmasıdır. Bu serbest oksijen radikallerinin artması sadece iskemi sırasında değil aynı

zamanda reperfüzyon sırasında da olmaktadır.²³² Hücreler oksidatif hasarı önleyen ya da kısmen azaltan mekanizmalara sahiptir. Doku hasarının tetiklemesi ile gelişen biyokimyasal olaylarda antioksidan sistem yetersiz kalmaktadır. İskemik dokuda oksidanlara bağlı olarak iskemi süresince glutatyon miktarının azaldığı ve SOD, CAT ve GPx gibi enzimlerin inhibisyonunun hızlandığı ve buna bağlı olarak hücrelerin reperfüzyon sırasında hızla oluşan oksijen radikallerinin etkisine daha duyarlı hale geldiği rapor edilmiştir.²³³

Bizim çalışmamızda da diğer çalışmalara benzer olarak ISO ile MI oluşturulmuş kontrol grubumuzdaki ratların kalp doku örneklerinden elde ettiğimiz antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GSH seviyelerinin istatistik olarak anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Oksidatif stresin diğer göstegelerinden biri olan MPx ve LPO antioksidan enzimlere ters olarak artmış olduğu tespit edildi. ISO ile indüklenmiş MI'da doku savunma sistem aktivitesinin azaldığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır.^{234, 235} Azalmış olan SOD ve CAT aktivitesi diğer yapılan çalışmalarla örtüşmektedir.^{236, 237} ROS'nin zararlı etkilerinden en çok etkilenen hücre elemanları membran lipitleridir. Oksidatif atak özellikle poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu ile kendisini gösterir. Lipit peroksidasyonu sonucu poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'ndan H atomunu kopararak lipit radikallerinin oluşturmasını sağlar.²³⁷ Bu radikaller biraraya gelerek konjuge dien'leri yaparlar. Devam eden oksidasyonla bu diene'ler de parçalanır, malondialdehit bu zincir sırasında bir ara ürün olarak oluşur. Bu nedenle malondialdehit düzeyi oksidatif PUFA hasarının bir göstergesi olarak kabul edilir. Lipit peroksidasyonu PUFA'dan oluşan bu ürünün malondialdehit miktarının artması ise hasar göstergesi olarak kabul edilmiştir.²³⁸ MI esnasında oluşan miyokardiyal hücre hasarını göstermede MDA seviyesi de çok önemli rol oynar. ISO ile oluşan miyokardiyum hasarı lipit peroksidasyonu sonrası oluşan serbest radikaller nedeniyle meydana geldiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.²³¹ Ayrıca lipit peroksidasyonu MI'nın şiddetini ve onunla ilgili komplikasyonlarıyla doğrudan orantılı olabilir.²³⁹ Bizim çalışmamızda da ISO ile indüklenen kardiyak hasar da LPO'da önemli rol oynamış olabilir. SOD, süper oksit radikallerini daha zararsız olan H₂O₂ radikaline dönüştürmektedir. GPx' de H₂O₂'yi azaltmakla görevlidir.^{121, 240} Bizim çalışmamızda da bu bilgileri destekler şekilde hem SOD hem de CAT aktivitesi azalmıştır. Bu enzimlerin azalması süperoksit ve H₂O₂ oluşumunu artırarak daha toksik olan ·OH radikallerinin oluşmasına neden olabilir. Belki de çalışmamızda oluşan bu enzimlerin aktivitesinin azalması miyokardiyal hasara neden olmuş olabilir. Zaten iskemi sonrasında oluşan serbest radikaller SOD ve CAT aktivitesini değiştirirler.²⁴¹ GSH, H₂O₂ gibi radikalleri

H₂O'ya çevirerek koruyucu bir etki gösterir.²⁴² GSH'a bağlı enzimler ise serbest oksijen radikallerine bağlı hasarı önleyen ikincil önemli savunma hattını oluşturur. GPx enzimi H₂O₂'yi detoksifiye ederken GSH seviyesini azaltır. GST enzimi de toksik ürünleri daha az toksik ürünlere dönüştürürken GSH bağlayıcı olarak kullanır. Bizim çalışmamızda da ISO uyguladığımız ratların GSH seviyesinin azalması H₂O₂'lerin artmasına bağlı olarak GPx ve GST enzimlerinin aktivitesi de bir artışa neden olabilir.^{243, 244} MI olmuş ratlarda GSH seviyelerinin azalması belki de SH grubu ihtiva eden proteinleri S-serbest oksijen radikallerinden korumuş olabilir.²⁴⁵ Hücrelerde veya dokularda oluşan oksidatif stres ROS'ların üretimine ve/veya antioksidan sistemlerin azalmasına, bu da prooksidan/antioksidan sistemin dengesinin bozulmasına yol açar. Antioksidan sistemin olumsuz etkilenmesi LPO indüksiyonu ile çok yakından ilişkilidir.²⁴⁶ Bu bilgilerden yola çıkarak üç farklı ilaç grubunu temsil eden lasidipin, ramipril ve valsartanın etkilerini ISO ile indüklenen MI'lı ratlarda oksidan ve antioksidan sisteme olan etkilerini incelersek kontrol grubumuza göre her üç ilacın da antioksidan sistem üzerine olumlu yönde etki ettiğini ve serbest radikalleri azalttığı söylenebilir. MI ile artan LPO seviyesi ve MPx enzim aktivitesi her üç ilaç grubunda da istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (p<0.05). Öyle ki lasidipin alan grupta LPO miktarı sağlıklı gruptaki LPO seviyesine kadar inmiştir. Ramipril ve valsartanın LPO üzerine olan etkileride birbirine benzerdir. MPx üzerine olan etki de ise lasidipin ve valsartan aynı derecede olduğu, ramiprilin ise MPx aktivitesini daha fazla azalttığı gözlemlendi.

Her üç ilacımızın da antioksidan sistemlere olan etkileri benzerdir. Her üç ilacımız ISO ile indüklenen MI'da azalmış olan SOD aktivitesini sağlıklı kontrol grubuna yaklaştırmıştır (p<0.05). CAT aktivitesinde de sonuçlar aynı iken lasidipinin azalmış olan CAT aktivitesine olan etkisi diğer ilaçlara göre çok daha fazladır.

Süperoksit anyonunun indirgenmesiyle oluşan H₂O₂ metabolizmasında iki önemli enzim vardır. Biri miyokarda bulunan CAT, diğeri miyokard sitozolündeki GPx'dir. Büyük ölçüde pentoz fosfat yolu ile glukoz 6 fosfat oksidasyonu yolu ile oluşan NADPH, glutatyon redüktazı aktive ederek GSH oluşumunu sağlar. İndirgenmiş GSH'de GPx tarafından GSSG'ye çevrilir. Bu zincir ile oksidatif strese neden olan peroksitlerin miktarı azaltılmış olur. Burada ortaya çıkan GSH hücrel oksidatif olaylar hakkında bilgi veren önemli bir belirteçtir. Dokudaki ya da koroner dolaşımdaki GSH seviyesinin artması hücrelerin oksidatif stresten korunduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir.²⁴⁷ Bizim çalışmamızda da ISO ile indüklenen kardiyak hasarın GSH seviyelerine baktığımız zaman ise her üç ilacın da GSH seviyesini artırdığını fakat sağlıklı kontrole göre GSH seviyesini yakalayamadığı görülmüştür. Bu da bize her üç

ilacın da GSH üzerine olumlu etki oluşturmalarına rağmen GSH kullanan GPx ve GST enzimlerinin serbest oksijen radikalleri ile yoğun bir şekilde savaştığını göstermektedir. GSH seviyesinin normalleşmemesinin nedeni iskemiye bağlı serbest oksijen radikallerinin üretiminin devam ettiğini gösteriyor da olabilir. Üç ilacın GSH üzerine olan etkisi benzerdir. Bu da bize kalp dokusunun yeteri derece GSH üretmediğini veya GSH bağımlı enzimlerin hala daha aktif olduğunu gösteriyor olabilir.

Kalp ve damar fonksiyonları üzerine önemli bir etkisi olduğu saptanan NO, NO sentaz aracılığıyla L-arg'den endotelde ve endokardda sentezlenip salgılanan bir vazodilatatördür.¹¹⁰ Bunun yanısıra trombosit agregasyonunu ve adezyonunu inhibe eder.¹¹⁰ Retiküloendotelial hücreler veya polimorfonükleer lökositler, sitokinler tarafından aktive edildiğinde yüksek konsantrasyon da nitrik oksit ve süperoksit üretebilirler.²² NO üretimi ortamda bulunan oksijen miktarı ile doğru orantılı artarken, yüksek ve sabit bir hızda radikal sonlandırma reaksiyonu ile hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip daha toksik bir oksidan olan peroksinitrit ($\cdot\text{ONOO}$) oluşturmak üzere süperoksit ile reaksiyon verir.^{22, 110} Böylece NO, oksijen serbest radikallerinin etkileri ile oluşan endotel harabiyeti sonucunda üretimi azalmakta ve direkt olarak oksijen serbest radikalleri ile büyük bir hızla reaksiyona girerek bloke olmaktadır.^{248, 249} Artmış serbest radikal düzeyleri SOD enziminin inhibisyonunda rol oynamakla birlikte, peroksinitrit oluşumu yoluyla hem daha toksik bir radikal oluşturmakta hem de NO'in yararlanımını azaltmaktadır. Artmış NO üretiminin koruyucu olarak etki göstermesinin beklenmesine rağmen Bouloumie ve ark.²⁵⁰ ratlarda yaptıkları bir çalışmada, indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS)'daki artışın aort endotel fonksiyonlarında gelişmeden ziyade gerileme ile korele olduğunu gözlemişlerdir. Bu, NOS'ın L-arginin ve/veya tetrahydrobiopterin azlığında süperoksit üretebilmesi ile açıklanabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, NO sinyal yolunun, in vivo ve in vitro kalp kasının kasılma özelliklerini düzenlemede doğrudan bir role sahip olduğuna dair ipuçları vermektedir.²⁵¹ Ayrıca süperoksit ve $\cdot\text{NO}$ ile oluşan peroksinitrit, Ca^{+2} transport sistemini bozarak ve miyokard kontraktil proteinlerinin fonksiyonunu zayıflatarak Ca^{+2} akışını arttırabilir ve mitokondrial ATP sentaz ve akonitaz gibi hücrel enzimlerin aktivitesini inhibe edebilir.²⁵²

Bizim çalışmamızda da diğer çalışmalara benzer olarak ISO ile MI oluşturulmuş kontrol grubumuzdaki ratların kalp doku örneklerinden elde ettiğimiz antioksidan enzimlerden SOD ile serumdan elde edilen NO değerleri arasında anlamlı bir ilişki gözlemlendi. ISO grubunda azalmış SOD enziminin aktivitesi ($p < 0.05$), artmış serbest radikal üretiminin bir işareti olarak kabul edilebilir. ISO kontrol grubunda LPO düzeyinin artması da bunu doğrulamaktadır. Artmış serbest radikal düzeyleri, SOD enziminin

inhibisyonunda rol oynamakla birlikte, peroksinitrit oluşumu yoluyla hem daha toksik bir radikal oluşturmakta hem de NO'ı tüketerek yararlanımını azaltmaktadır. Çalışmamızda ISO verilen rat grubunda azalmış NO değerlerinin ilaçla tedavi edilmiş gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu veriler aynı zamanda ilaç gruplarındaki SOD aktivitesinin artmasıyla da paralellik göstermektedir. Artmış SOD aktivitesi ile birlikte ilaç gruplarında NO miktarındaki artışların bu ilaçların ISO ile indüklemiş MI modelinde pozitif etkilerinin olduğunu göstermektedir. Sadece ilaç uygulanan kontrol ilaç gruplarında ise NO miktarında sağlıklı gruba benzer sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlar bize istatistiksel bir anlam katmamakla birlikte aynı zamanda bu ilaçların tek başına uygulamalarında NO seviyesi üzerinde değişiklik yapmadığını göstermiştir. İlaç gruplarını kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında bazı azalma ve yükselmeler tespit edilse de bu değişimlerin istatistiksel olarak değiştirmedikleri belirlendi. Yani ilaçlar arasında NO seviyeleri bakımından birbirleri arasında üstünlük görülmemiştir.

Normal metabolizma sırasında sürekli olarak oluşan ROS ve RNS; DNA, protein, lipit ve karbonhidrat gibi biyomoleküllerde oksidatif hasar meydana getirir.¹⁸⁷ DNA'nın çok stabil bir molekül olmasına rağmen hasara uğradığı saptanmıştır. Normal koşullarda DNA'da oksidatif hasar ve onarımı arasında denge mevcuttur ama çok düşük düzeylerde hasar sağlıklı bireylerde de saptanır.¹⁸⁷ DNA baz hasarı ölçümlerinde elektron yoğunluğunun daha fazla olması nedeniyle daha çok serbest radikallerin etkisine maruz kalan baz olan Guanine ait baz modifikasyonları çalışılmıştır.^{160, 161} Özellikle 8-OHGua bazı ve onun şeker bağlı nükleozit hali olan 8-OHdG, HPLC ve LC-MS gibi enstrümental cihazlarla ölçülmüştür. Her ikisinde ölçüm sonuçları DNA hasarı belirteci olarak kabul edilmektedir.¹⁶¹ Bu iki DNA hasar ürününün moleküler açıdan birbirinden farklı olmasına rağmen ikisinin de bir arada ölçüldüğü bir çalışmada her iki ürünün de aynı oranda DNA hasarını yansıttığı gösterilmiştir.²⁵³ Buradaki önemli bir fark DNA elde edildikten sonra formik asit ile hidroliz edildiğinde elde edilen ürün 8-OHGua, enzimatik hidroliz ile elde edilen ürünün ise 8-OHdG olmasıdır.^{156, 253, 254} Burada 8-OHGua'nın ölçümü günümüzde daha çok kabul görmektedir.²⁵⁴ Çünkü, DNA elde edildikten sonra yapılan ekstraksiyon işlemlerinde enzimatik hidrolizle birlikte 2 saate varan sürenin uzunluğu ve enzimlerin değişik pH aralıklarında çalışması dolayısıyla oksidasyonların olacağına dikkat çekilmiştir.²⁵⁵ Elde edilen sonuçların ise gerçeği yansıtmayacağı düşünülmüştür. Formik asit ile olan hidrolizde ise hidroliz süresinin kısa olmasıyla beraber sadece belli bir pH'da DNA'daki baz ile şeker grubu arasındaki glikozidik bağın parçalanması ile 8-OHGua ortaya çıkmıştır ve bu ürün

oksidasyona maruz bırakılmadan ölçülmüştür.^{156, 213, 254, 255} Aynı zamanda ölçülen gerek baz (8-OHGua) olsun gerekse nükleozit olan 8-OHdG olsun her ikisinin de benzer oranda DNA oksidasyonunu yansıması her ikisinin de ölçülmesinin doğru olacağını göstermektedir.²⁵³ Ancak ortamdaki oksidasyona çok dikkat edilmelidir.

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, DNA'da oksidatif baz modifikasyonunun (8-OHdG) yeni doğan sıçanlarda bile olduğu saptanmıştır.²⁵⁶ Nükleer DNA gibi mitokondriyal DNA da oksidatif stres altındadır. 8-OHdG mitokondrial DNA'da, nükleer DNA'dan 16 kat daha fazla bulunduğu ve mitokondrial DNA'nın nükleer DNA'ya göre 5-10 kez daha hızlı mutasyona uğradığı saptanmıştır.^{257, 258} Her geçen gün sayısı artmakla beraber 23 kadar oksidatif DNA baz hasarı tanımlanmıştır.^{111, 258} Yukarıda bahsettiğimiz DNA hasarı ürünlerine ilave olarak çok ölçülen timin glikol, sitozin glikol, FAPyGuanin ve FAPyAdenini sayabiliriz. Bu lezyonların DNA'da çeşitli mutasyonlara neden olabildiği gösterimıştır.¹⁴³ Örneğin Cu^{+2} iyonları DNA'da en fazla G-C 'ce zengin bölgelerde bulunduğundan, en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz guanindir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçümlenen baz hasarı 8-OHdG'dir.^{179, 256, 258} 8-OHdG ve 8-OHGua içeren DNA'nın, in vitro DNA sentezi sırasında bir kalıp olarak kullanıldığı zaman yanlış okumaya ve GC →TA mutajenezine yol açtığı gösterilmiştir.^{175, 176, 259} Bu tez çalışmasında amaçlarından biri de, oksidatif DNA hasarının göstergesi kabul edilen 8-OHGua'nın duyarlı bir yöntemle analizlenmesi ve antioksidan enzim sistemi arasındaki bağlantının ortaya çıkarılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda 8-OHGua'nın ölçümünde çok duyarlı bir özgün teknik seçmek için literatür araştırması yapıldı. Nükleer DNA'da baz modifikasyonu çok düşük düzeylerde olmasına rağmen, (< 1 lezyon / 10^5 - 10^6 normal baz) mevcut koşullarda modifiye DNA bazlarının ölçümü duyarlı ve özgün teknik olan Floyd ve arkadaşlarının tekniği seçildi.^{192, 260} Floyd ve arkadaşlarının¹⁹² 1986'da nukleozid türevlerinin saptanması için HPLC-ECD tekniğini geliştirmesinden sonra en sık çalışılan DNA baz hasarı 8-OHdG'dir. Bu teknik ile yapılan bazı modifikasyonlardan sonra yüksek özgünlük ve duyarlılıkta (fmol - pmol düzeyinde) 8-OHGua kantite edilebilmektedir.^{156, 213, 254, 255, 188, 192, 257}

ISO ile indüklenen MI modelinde serbest radikallerin arttığı, bununla beraber antioksidan sisteminin inhibe olabileceği bildirilmiştir.²⁰⁸ Bizim çalışmamızda da benzer şekilde ISO ile indüklenen MI modelinde serbest radikallerin artışına paralel olarak 8-OHGua seviyesinin de artmış olduğu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde belirlendi ($p < 0.05$). Bununla beraber ISO ile indüklenen MI modelinde serbest radikallerin artmasıyla beraber bu radikallerin DNA'ya da sıçrayarak DNA hasarına neden olabileceği ilk olarak bizim tez çalışmalarımız esnasında bulunmuştur. İlaç gruplarında

ise DNA hasarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kontrol grubuna göre düşük olduğu bulunmuştur. Bu etkinin ilaçların pozitif etkileriyle beraber antioksidan sistemi iyileştirdiği kanaatine varılmıştır. Böylece ilaçlar tarafından serbest radikallerin çevre dokuya ve hücrelere daha fazla zarar vermeden oluşumlarının azaltılarak veya oluşan radikallerin antioksidan moleküllerle etkilerini azaltarak DNA hasarını önlediğini düşünüyoruz. Sağlıklı ilaç grupları arasında ise diğer parametrelerde olduğu gibi önemli bir fark gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak; insan ve hayvanlar yaşamları boyunca sürekli olarak, hem normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen ROS'un, hem de eksojen kaynakların neden olduğu ROS'un tahribatlarına maruz kalmaktadır. ROS organizmada lipit, protein ve DNA gibi makromolekülleri etkilemekte ve bu moleküllerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere yol açmaktadır. Bu değişiklikler çeşitli yöntemlerle gösterilmektedir. Lipitlerdeki hasarı göstermek için genellikle lipit peroksidasyon ölçümü, protein hasarını belirlemek için protein karbonil grupları ölçümü kullanılmaktadır.²⁶¹ DNA hasarı için ise DNA baz hasar ürünleri ölçülmektedir. Normal koşullarda oluşan hasarın büyük bir kısmının onarılmasına rağmen, bir kısım okside bazlar birikir. Bizim çalışmamızda ISO ile indüklenen MI modelinde kontrol gruplarında ROS oluşumunun arttığı antioksidan sistemdeki SOD ve CAT enzimlerinin aktivite azalışı, MPx enziminde aktivite artışı, GSH seviyesinde azalış, LPO seviyesinde artış ve DNA baz hasarı belirteci olan 8-OHGua'nın seviyesinde ki artış ile belirlenmiştir. Bu parametrelerdeki artış ve azalışlar ROS'nin oluşumunun artışına atfedilmiştir. Ayrıca MI'nin biyokimyasal göstergeleri olan AST, CK-MB, CK ve Tnl ölçülmesiyle kontrol gruplarında artış belirlenmiş, antioksidan sistem ve DNA hasarı arasındaki orantı gözlemlenmiştir. Çalışmamız gereği kontrol gruplarıyla beraber uygulanan lasidipin, ramipril ve valsartan ilaç grupları ISO ile indüklenen MI modelinde koruyucu etki göstererek ROS oluşumunu, yukarıda bahsedilen biyokimyasal parametrelerin aktivitesini artırmak veya azaltmak suretiyle azalttığı belirlendi. Enzimlerin aktivitesindeki artışlar ve azalışlar ile birlikte GSH seviyesinde artış, LPO, NO ve 8-OHGua'nın seviyesinde ise azalış belirlenmiştir. Böylece ISO ile indüklenen MI modelinde bu ilaçların antihipertansif özelliklerine ilaveten serbest radikalleri yok edici etkilerinin de olduğunu bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak düşünülebiliceği gerektiği kanaatindeyiz. Üç farklı gruptan seçtiğimiz bu ilaçların birbirlerine dair üstünlüklerini görülmedi. Aynı zamanda bu ilaçların sağlıklı hayvanlarda kan biyokimyasal ve oksidatif stres parametrelerini değiştirmedeğini ve DNA hasarına yol açmadığı da gözlemlendi. Bilindiği gibi ACE inhibitörleri MI sonrasında gelişen kalp yetmezliğinde ve MI sonrasında kardiyak remodelling yaptığı

için en sık kullanılan ilaçlardandır. ATE inhibitörleri ise yeni jenerasyon bir ilaç grubu olup oldukça pahalıdır. Yaptığımız çalışmada ATE inhibitörlerinin kan biyokimyasal, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine olan etkilerinde ACE inhibitörlerine anlamlı bir üstünlüğü görülmedi. Ayrıca çalışmamızda MI sonrasında kullanılıp kullanılmayacağı oldukça tartışılan kimi çalışmada mortaliteyi azalttığı kimi çalışmada ise mortaliteyi artırdığı söylenen kalsiyum kanal blokörlerinden lasidipinin ACE inhibitörleri kadar ISO ile oluşturulan MI sonrasında kan biyokimya, oksidatif stres ve DNA hasarına yararlı etkilerini göstermiş olup yaptığımız deneysel çalışmada lasidipinin de MI sonrasında doku hasar belirteçlerini oldukça anlamlı düzeyde azalttığı görüldü. Çalışmamızın ışık tutacağı ve öncülük edeceği klinik çalışmalar ile her üç ilacın MI sonrası artan biyokimyasal doku hasar belirteçleri üzerine olan etkileriyle beraber kardiyak remodelling üzerine olan etkilerinin ekokardiyografik inceleme ile gösterilmesi bu üç grup ilacın MI sonrası tercih sırasını ve önemini değiştireceğini düşünüyoruz.

6. KAYNAKLAR

1. Vannini V, Dianzani U, Rosa E.D. Nomina Anaotomica. Feridun Vural, Anatomi Atlası, İstanbul Birol Yayın A.Ş. 2001; 93-103.
2. Burtis C.A, Ashwood E.R. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler Aslan D, Ankara Palme Yayıncılık 2005; 682-698.
3. Guyton AC, Hall JE. Medical Textbook Of Physiolgy Çavusoglu H., Tıbbi Fizyoloji Nobel Tıp Kitabevleri Onuncu Edisyon 2001; 96-916.
4. Smith C, Marks AD, Lieberman M, Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası İnal ME, Atik U, Aksoy N, Haşimi A. Güneş Tıp Kiyabevleri İkinci Baskı 2007; 862-879.
5. Bakan E, Klinik Biyokimya Laboratuar El kitabı, Aktif Yayınevi, Erzurum 2001; 26-41.
6. Ryan TJ, Anderson JL, Antman EM, et al. ACC/ AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). Circulation 1996; 94: 2341–50.
7. Lowe HC, Neill BD, Van de Werf F, et al. Pharmacologic reperfusion therapy for acute myocardial infarction. J Thromb Thrombolysis 2002; 14: 179–96.
8. Robbins, Patghologic Basis of Disease Alan A, İnan Y, Yıldırım M Patoloji Özeti Ankara Nobel Tıp Kitabevleri 2001; 1-9: 89-103.
9. Reimer K, Lowe J, Ramussen M, et al. The wave front phenomenon of iscliemic celi death. Myocardial infarct size versus duration of coronary occlusion in dogs. Circulation 1977; 56: 786-794.
10. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling, Physiol. Rev. 79 1999; 1: 215–262.
11. Fallon JT. Pathology of myocardial infarction and reperfusion. In Fuster V, Ross R, Topol EJ. Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia Lippincott-Raven 1996; 791-796.
12. Rentrop KP. Restoration of anterograde flow in acute myocardial infarction. The first 15 years. J Am Coll Cardiol 1995; 25:15.
13. Dewood MA, Spores J, Notske RN. Prevalance of total coronary artery occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. NEJM 1980; 303:897.

14. Lee TH, Rovin GW, Weisberg MC. The Chest Pain Study Group Sensitivity of Routine Clinical Criteria for diagnosing myocardial infarction within 24 hours of hospitalization. *Ann Intern Med* 1987; 106: 181-186.
15. Lee TH, Goldman L. Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann Intern Med* 1986; 105: 221-233.
16. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59: 612-9.
17. Van Der Vusse GJ, Bilsen MV, Reneman RS. Ischemia and reperfusion induced alterations in membrane phospholipids. An overview. In: Das DK ed. *Cellular, Biochemical and molecular aspects of reperfusion injury*. Ann NY Acad Sci 1994; 723: 1-14.
18. Neely JR, Whitmer JI and Rovetto MJ. Effects of coronary blood flow on glycolytic flux and intracellular pH in isolated rat hearts. *Circ Res* 1975; 37: 733-741.
19. Flaherty JT, Zweier JL. Role of oxygen radicals in myocardial reperfusion injury. Experimental and clinical evidence. *Wien Klin Wochenschr* 1991; 69: 1061-1065.
20. Mohanlal RW, Mauve I, Zoet Acm. Reperfusion induced enzyme release washout effect or manifestation of reperfusion damage. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 603-610.
21. Dhalla NS, Golfman L, Takeda S, Takeda N, Nagano M. Evidence for the role of oxidative stress in acute ischemic heart disease a brief review. *Can J Cardiol* 1999; 15: 587-93.
22. Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* 1997; 272: 2327-36.
23. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology And Medicine*. 2nd ed. Oxford. Oxford University Press, 1989.
24. Keles MS, Demirci N, Yildirim A, Atamanalp SS, Altinkaynak K. Protective effects of N-acetylcysteine and Ginkgo biloba extract on ischaemia-reperfusion-induced hepatic DNA damage in rats. *Clin Exp Med*. 2008; 8-4: 193-198.
25. İlhan N, Şahin Ş, Seçkin D, İlhan N. Deneysel Kardiyak İskemi Reperfüzyon Hasarı Sonrası Eritrosit Antioksidatif Enzim Düzeyleri F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi 2002; 16 (3-4): 251-255.
26. Antman ET, Braunwald E. Acute myocardial infarction. In: Braunwald E, Zipes DP, Libbi P, eds. *Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine*. 6th ed. Philadelphia WB Saunders Company 2001: 1114-1219.

27. Ellis AK. Serum protein measurements and diagnosis of acute myocardial infarction. *Circulation* 1991; 83: 1107-1109.
28. Sacks DB. Troponin T. A cardiac specific marker in Goldman and Khalus HA, eds. *Cardiac troponin T for the diagnosis of myocardial injury*. Deerfield IL. Discovery International 1994: 3.
29. Adams JE, Bodor GS, Davila-Roman VG, et al. Cardiac troponin i a marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993; 88: 101-106.
30. Tsung JS, Tsung SS. Creatine kinase izoenzymes in extracts of various skeletal muscles. *Clin Chem* 1986; 32: 1568-1570.
31. Varoğlu E. Miyokardiyal iskemik hasarın belirlenmesinde kardiyak troponin i ve troponin t Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Doktora tezi. Erzurum 2002.
32. Calbreath DF. *Clinical Chemistry a fundamental textbook*. Philadelphia WB Saundercrc Company 1992: 199-207.
33. Apple FS. Creatine kinase izoforms and miyoglobin early detection of myocardial infarction and reperfusion. *Coron Artery Dis* 1999; 10: 75-79.
34. Katus HA, Scheffold T, Remppis A, et al. Proteins of the troponin complex *Lab Med* 1992; 23: 311-317.
35. Wu AH, Apple FS, Gibler WB, et al. National academy of clinical biochemistry standarda of laboratory practice recommondations for the us of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chcm* 1999; 45: 1104-1121.
36. Ryan TJ, Antman EM, Brooks NH, et al. 1999 update: ACC/AHA guidclines for the managemnt of patients with acute myocardial infarction. Executive summary and reconımentations a report of the American College of Cardiology / American Heart Association task force on practice guidelines. (committee on the management of acute myocardial infarction). *Circulation* 1999; 100: 1016-1030.
37. Antman EM, Gruidzcn C, Sacks DB, et al. Evaluation of rapid bedside assay for detection of serum cardiac troponin T. *JAMA* 1995; 273: 1279-1282.
38. Ravel R. *Cardiac Diseases.* Clinical Laboratuary Medicine sixth Ed, Ed S Manning Mosby St.Louis Missouri 1995; 331-341.
39. İbrahim F. H. Akut Myokard İnfarktüsünün erken tanısında Kreatinin Kinaz CKMB, Troponin-T ve miyoglobin diagnostik değeri (yüksek lisans tezi). İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul 1999.
40. Kutay F. Enzimler. In Onat T, Emerk K, Sözman EY, eds. *İnsan biyokimyası*. Ankara Palme Yayıncılık 2002; 197-220: 439.

41. Verheugt FWA. Early phase of acute myocardial infarction. in Crawford MH, DiMarco JP. Cardiology St Louis Mosby International Ltd. 2001; 14-1: 14-10.
42. Waldo AL, Biblo LA, Carlson MD. Ventricular arrhythmias in perspective. A current review. Am Heart J 1992; 123: 1140-7.
43. Lopez AD, Murray CCJL. The global burden of disease 1990-2020. Nature Med 1998; 4: 1241-3.
44. Alexander RW, Pratt CM, Ryan TJ. Diagnosis and management of patients with acute myocardial infarction. V. Fuster, R. Alexander RW, O'Rourke RA, editors. Hurst's The Heart. 10th edition. New York McGraw Hill Companies inc. 2001; 1275-1360.
45. Davies MJ, Robertson WB, Woolf N, et al. Pathogenesis of myocardial infarction. Am Heart J 1978; 96: 561-3.
46. Jamrozik K (Çeviri: T.Ülker). Atherosklerotik hastalığın epidemiyolojisi. Crawford MH, DiMarco JP (Eds). Kardiyoloji'de. 1. Baskı. 1. Cilt. İstanbul AND Danışmanlık Yayıncılık Ltd Şti. 2003; 1-14.
47. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 8. Baskı Ankara: Hacettepe Taş Yayınevleri, 2002; 424-464: 820-890.
48. Abernethy DR, Schwartz JB. Calcium-antagonist drugs. N Engl J Medicine 1999; 341-19: 1447-1457.
49. Opie LH. Pharmacological difference between calcium antagonists. Eur Heart J.1999; 18 : 71-79.
50. Michel T. in Godman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. ed. Brunton, L. Mc Graw Hill NewYork 2006; 832-838.
51. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry 25th edition Mc Graw Hill company USA 2000: 254-258.
52. Keha EE, Küfrevioğlu Öİ. Biyokimya, Erzurum Aktif yayınevi 2000; 348-470.
53. Kesim Yüksel, Dökmeci İ. (editor). Kalsiyum Metabolizması Hormonal Kontrolü içinde. Farmakoloji Temel kavramlar İzmir Saray Kitabevleri 2. Cilt 1996; 665-674.
54. Godfraind T, Miller R, Wibo M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. Pharmacological Review 1986; 38-4: 324-346.
55. Remme Wj, Krauss H, Van Hoogenhuyze DCA, et al. Hemodynamic torelability and anti-ischemic efficacy of high dose intravenous diltiazem in patients with normal versus impaired ventricular function. J AM Coll Cardiol 1993; 21: 709-720

56. Kushiro T, Watanabe N, Takahashi A, Koike M, Saito F, Otsuka Y, Kanmatsuse K. J Different effects of L-type and L+N-type calcium channel blockers on hamster cheek pouch venules. *Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44-6: 672-675.
57. Grossman, Meserli FH. Calcium antagonists. *Prog Cardiovasc Dis.* 2004; 47-1: 34-57.
58. Haller H, Cosentino F, Luscher. TF. Endothelial dysfunction, hypertension and atherosclerosis. A review of the effects of lacidipine. *Drugs R D.* 2002; 3-5: 311-323.
59. Toyo-Oka T, Nayler WG. Third generation calcium entry blockers. *Blood Press* 1996; 5: 206-208.
60. Kaufman JA, Oelschlager BK. Treatment of Achalasia. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2005; 8-1: 59-69.
61. Kohara K. Calcium channel blockers as therapeutic agents except for cardiovascular diseases. *Clin Calcium* 2004;14-4: 639-43.
62. Kuschnir E. Impact of calcium antagonists on the cardiovascular system: experience with Lacidipine. *Drugs* 1999; 57: 11-17.
63. Asanuma H, Kitakaze M. Calcium channel blockers increasing coronary blood flow via NO-dependent mechanism. *Nippon Rinsho* 2004; 62-9: 567-572. .
64. Krenek P, Salomone S, Kyselovic J, Wiblo M, Morel N, Godfraind T. Lacidipine prevents endothelial dysfunction in salt-loaded stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension.* 2001; 37: 1124–1128
65. Sorescu D. and Griendling K.K. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure *Congest Heart Fail* 2002; 8-3: 132–140. .
66. Rosenkranz, A.C, Hood, S.G, Woods, R.L, Dusting, G.J, Ritchie, R.H. Acute antihypertrophic actions of bradykinin in the rat heart importance of cyclic GMP. *Hypertension* 2002; 40-4: 498–503.
67. Kurisu, S. Ozono, R. Oshima, T. Kambe, M. Ishida, T. Sugino, H. Matsuura, H. Chayama, K. Teranishi, Y. Iba, O. Amano, K. Matsubara, H. Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension* 2003; 41-1: 99–107. .
68. Matsusaka, T. Katori, H. Homma, T. Ichikawa. I. Mechanism of cardiac fibrosis by angiotensin. New insight revealed by genetic engineering. *Trends Cardiovasc. Med.* 1999; 9-7: 180–184. .

69. M. Paul, P. Stock, M. Langheinrich, L. Liefeldt, G. Schonfelder and M. Bohm, Role of the cardiac renin-angiotensin system in human heart failure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; 377: 279–283.
70. Warner GT, Perry CM. Ramipril a review of its use in the prevention of cardiovascular outcomes. *Drugs.* 2002; 62-9: 1381-405.
71. Frampton JE, Peters DH. Ramipril. An updated review of its therapeutic use in essential hypertension and heart failure. *Drugs.* 1995 Mar; 49-3: 440-66.
72. Miura Y, Yamamoto N, Tsunekawa S, Taguchi S, Eguchi Y, Ozaki N, Oiso Y. Replacement of valsartan and candesartan by telmisartan in hypertensive patients with type 2 diabetes metabolic and antiatherogenic consequences. *Diabetes Care.* 2005; 28-3: 757-8.
73. Leung PS, Suen PM, Ip SP, Yip CK, Chen G, Lai PB. Expression and localization of AT1 receptors in hepatic Kupffer cells its potential role in regulating a fibrogenic response. *Regul Pept.* 2003; 116(1-3): 61(69- 41).
74. De Gasparo M. Angiotensin II and nitric oxide interactions. *Heart Fail. Rev.* 2002; 7: 347–358.
75. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Metabolic Syndrome and Endothelial Fibrinolytic Capacity in Obese Adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294-1: 39-44.
76. Paras E, Mancini GB, Lear SA. The relationship of three common definitions of the metabolic syndrome with sub-clinical carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007 Oct. 22
77. Adler M, Verset C, Moreno G. How to prevent complications of liver cirrhosis? *Rev Med Brux.* 2007; 28-4: 270-275.
78. Waeber B, Feihl F. Stratification of global cardiovascular risk according to the ESH/ESC guidelines *Rev Med Suisse.* 2007; 3-124: 1992-1994.
79. McInnes GT. Angiotensin II antagonism in clinical practice experience with valsartan. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999; 33-11: 29-32; discussion 41-3.
80. Croom KF, Keating GM. Valsartan a review of its use in patients with heart failure and/or left ventricular systolic dysfunction after myocardial infarction. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2004; 4-6: 395-404.
81. Wayman NS, McDonald MC, Chatterjee PK, et al. Models of coronary artery occlusion and reperfusion for the discovery of novel antiischemic and antiinflammatory drugs for the heart. *Methods Mol Biol* 2003; 225: 199–208.

82. Liu YH, Yang XP, Nass O, et al. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997; 272: 722–727.
29. Chimenti S, Carlo E, Masson S, et al. Myocardial infarction: animal models. *Methods Mol Med* 2004; 98: 217–26.
83. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, et al. Mouse cardiac surgery comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004; 16: 349–60.
84. Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein MP, et al. A murine model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive ischemia and reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 52: 305–11.
85. Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, et al. A chronic mouse model of myocardial ischemiareperfusion essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: 1049–55.
86. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 513–22.
87. Rona G, Chappel CI, Balazs T, et al. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol* 1959; 67: 443–55.
88. Medvedev OS, Gorodetskaya EA. Systemic and regional hemodynamic effects of perindopril in experimental heart failure. *Am Heart J* 1993; 126: 764–9.
89. Urasawa K, Sakai H, Saito T, et al. Wire-induced myocardial ischemia a novel approach to create myocardial ischemia in rats. *Circ J* 2004; 68: 371–5.
90. Sree Priya M, Saravanan N, Devaki T, Nayeem M. Protective effects of L-arginine on experimental myocardial injury induced by-adrenergic stimulation in rats. *J Clin Biochem Nutr* 1999; 27: 19–26.
91. Wexler, B.C, Greenberg, B.P. Protective effect of clofibrate on isoproterenol induced myocardial infarction in arteriosclerotic and nonarteriosclerotic rats. *Atherosclerosis* 1978; 29: 373– 76.
92. Teerlink JR, Pfeffer JM, and Pfeffer MA Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res* 1994; 75: 105–113.
93. Rajadurai, M. Stanely Mainzen Prince, P. Preventive effect of naringin on lipids, lipoproteins and lipid metabolic enzymes in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2006; 20: 191–197.

94. Gupta SK, Mohanty I, Talwar KK, Dinda A, Joshi S, Bansal P, Saxena A, Arya DS. Cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury by *Withania somnifera*: A haemodynamic, biochemical and histopathological assessment. *Mol Cell Biochem* 2004; 260: 39–47.
95. Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Co K, Weber KT, Clarc WA. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res* 1989; 65: 657-70.
96. The Merck Index, 12th ed. Entry 1188.
97. Isoproterenol. <http://www.en.wikipedia.org/wiki/Image:isoproterenol.prg>.
98. Sigma-Aldrich Inc. Information Sheet DL-Isoproterenol hydrochloride Product Number I5627.
99. Tipnis UR, He GY, Li S, Campbell G, Boor PJ. Attenuation of isoproterenol-mediated myocardial injury in rat by an inhibitor of polyamine synthesis. *Cardiovasc Pathol* 2000; 9-5: 273-80.
100. Bhagat B, Sullivan JM, Fischer VW, Nadel EM, Dhalla NS. cAMP activity and isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 1976; 12: 465-70.
101. Fleckenstein A, Janke J, Doring HJ, Leder O. Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload—a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 1974; 4: 563-80.
102. Janke J, Fleckenstein A, Doring HJ, Leder O. Key role of intracellular calcium overload in acute necrosis of the myocardium. Cardioprotection with verpamil. *Minerva Med* 1975; 66: 1846–58. .
103. Stelzner TJ, Welsh CH, Berger E, McCullough RG, Morris K, Repine JE, Weil JV. Antiarrhythmic agents diminish thiourea-induced pulmonary vascular protein leak in rats. *J Appl Physiol* 1987; 63-5: 1877-83.
104. Banerjee SK, Sood S, Dinda AK, Das TK, Maulik SK. Chronic oral administration of raw garlic protects against isoproterenol-induced myocardial necrosis in rat. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003; 136-4: 377-86. .
105. Kumari SS, Menon VP. Changes in levels of lipid peroxides and activities of superoxide dismutase and catalase in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Indian J Exp Biol* 1987; 25-6: 419-23.
106. Ravichandran LV, Puvanakrishnan R, Joseph KT. Influence of isoproterenol induced myocardial infarction on certain glycohydrolases and cathepsins in rats. *Biochem Med Metab Biol* 1991; 45: 6–15.

107. Hoffstein S, Gennaro DE, Weissmann G, Hirsch J, Streuli F, Fox AC. Cytochemical localization of lysosomal enzyme activity in normal and ischemic dog myocardium. *Am J Pathol* 1975; 79: 193–206.
108. Akkuş T. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya Mimoza Yayınları. 1995; 1: 80.
109. Dündar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon AKÜ. Yayın. 2000; 1: 35.
110. Kilinc A, Kilinc K. Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme Yayıncılık. İstanbul 2003.
111. Evans M.D, Dizdaroglu M, Cooke M.S. Oxidative DNA damage and disease induction, repair and significance. *Mutation Research* 2004; 567: 1–61.
112. Bayir Y. Usnea Longissima Ach. Liken Türünden İzole Edilen Difraktaik Asit'in İndometazin Ülseri Üzerine Koruyucu Etkisi ve İn-Vivo Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi - Biyokimya ABD, Yüksek Lisans Tezi. Erzurum 2004.
113. Halliwell B. and Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; 219: 1-14.
114. Weis SJ, LoBuglio AF. Biology of disease Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 5-18.
115. Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Med.* 2007; 1-9.
116. Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoot K. and Xın W. Nutritional aspects of free radicals. *Pro. Nutr. Soc.* 1987; 46: 1-12.
117. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Rad. Biol. Med.* 1985; 1: 3-25.
118. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 412-426.
119. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 1-85.
120. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England J. Med.* 1985; 312: 159-163.
121. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995; 41-12: 1819-1828.

122. Szabo S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum time sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand J Gastroenterol.* 1987; 127: 21-8.
123. Afanas'ev IB. Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions . *Mol. Biotechnol.* 2007; 37: 2–4.
124. Auroma O. Free radicals, antioxidants and international nutrition review. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 1999; 8: 53-63.
125. Halliwell B. Tell me about radicals, doctor
a review. *J. Royal Society of Med.* 1989; 82: 747-752.
126. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90: 7915-7922.
127. Nelson DL, Cox MM. Lehninger, Principles of Biochemistry, Third edition, New York 2000; 784-787.
128. Aslan R, Dündar Y. Bir fizyolojik eleman ve radikal olarak azot oksit. *Hay. Araş. Derg.* 1998; 8: 34-38.
129. Lohinai ZM, Szabo C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. *Med. Sci. Monit.* 1998; 4: 1089-1095.
130. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem.* 1991; 37: 1932-7.
131. Georgieva NV. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – A Review. *Bulgarian J. Vet. Med.* 2005; 8-1: 11.
132. Baccanari DP. Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Biochem. and Biophys.* 1978; 191: 351-357. .
133. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Office J. Turk. Nephrol. Assoc.* 1997; 3-4: 92-95.
134. Prichard M, Ducharme NG, Wilkins PA, Erb HN, Butt M. Xanthine Oxidase Formation during Experimental Ischemia of the Equine Small Intestine. *Can. J. Vet. Res.* 1991; 55: 310-314. .
135. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free Radicals The Pros and Cons of Antioxidants. *J. Nutr.* 2004; 134: 3143–3163.
136. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklundi S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 4985–4994.

137. Doctor RB, Mandel LJ. Minimal role of xanthine oxidase and oxygen free radicals in rat renal tubular reoxygenation injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1991; 1: 959-969.
138. Hirata F, Hayaishi O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3 -dioxygenase reaction. *J. Biol. Chem.* 1971; 25: 7825.
139. Hung-Hai K, Brunk UT, Sohala RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad. Biol. Med.* 1993; 15: 621-627.
140. Ersoy A, Dilek K. Hemodiyaliz Hastalarında Eritrosit Membran Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidatif Homeostazis Değişiklikleri. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Derg.* 1999; 1: 1-4.
141. Jana AK, Agarwal S, Chatterjee SN. Membrane lipid peroxidation by ultrasound Mechanism and implications. *J. Biosci.* 1990; 15: 211–215.
142. Li JM, Shah AM. ROS Generation by nonphagocytic NADPH oxidase Potential relevance in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14: 221–226.
143. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Letter.* 1991; 281: 9-19. .
144. Panduri V, Weitzman SA, Chandel NS, Kamp DW. Mitochondrial-derived free radicals mediate asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004; 286: 1220–1227.
145. Davies KJA, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 8220-8226.
146. Thomas CE, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. *Ann. Emerge Med.* 1986; 15: 1075-83.
147. Marnett LJ. Lipid peroxidation DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 1999; 424: 83–95.
148. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993; 57: 715-25. .
149. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik öemi. *Cerrah Paşa Tıp Derg.* 2004; 35: 140-149. .
150. Friedberg EC. DNA Repair, Freeman WH and Company, New York 1984; 1-2
151. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B et.al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996; 347: 444-5.

152. Dizdaroglu M, Karakaya AE, *Advances in DNA damage and repair*. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. Newyork. 1999; 67-87.
153. Teoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Rad Biol* 1987; 51: 573-89.
154. Senturkler S, Dizdaroglu M. The effect of experimental conditions on the levels of oxidatively modified bases in DNA as measured by GC/MS. How many modified bases are involved?Prepurification or not? *Free Radic Biol.&Med.* 1999; 27: 3/4 370-80.
155. Dizdaroglu M. Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Free Rad Res* 1998; 29: 551-63.
156. Dizdaroglu M. Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods in Enzymology* 1994; 234: 3-16.
157. Halliwell, B. Effect of diet on cancer development: Is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 32: 968-974.
158. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press. Inc, London 1999.
159. Milligan JR, Ward JF. Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals. *Radiat Res* 1994; 137: 295-299. .
160. Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem. J.* 1998; 335: 85-94. .
161. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA Damage mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB J.* 2003; 17: 1195-1214.
162. Knaapen AM, Gungör N, Schins RPF, Borm PJA, Schooten FJV. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis a review. *Mutagenesis.* 2006; 21: 225–236.
163. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA Damage. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 361-370.
164. Aust AE, Eveleigh JF. Mechanisms of DNA oxidation. *PSEBM* 1999; 222: 246-252. .
165. Burçak G, Andican G. Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 159-169.
166. Sonntag C.V. *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, New York, 1987.

167. S. Fujita, S. Steenken, Pattern of OH radical addition to uracil and methyl- and carboxyl-substituted uracils. Electron transfer of OH adducts with N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine and tetranitromethane, *J. Am. Chem. Soc.* 1981; 103: 2540–2545. .
168. D.K. Hazra, S. Steenken, Pattern of OH radical addition to cytosine and 1-, 3-, 5-, and 6-substituted cytosines, *J. Am. Chem. Soc.* 1983; 105: 4380–4386. .
169. Neill P. O, Pulse radiolytic study of the interaction of thiols and ascorbate with OH adducts of dGMP and dG implications for DNA repair processes, *Radiat. Res.* 1983; 96: 198–210.
170. Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox Chemistry and transformation reactions of their radical cations and e⁻ and OH adducts, *Chem. Rev.* 1989; 89: 503–520.
171. Candeias L.P. Steenken S. Reaction of HO* with guanine derivatives in aqueous solution formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)*, *Chemistry* 6 2000: 475–484.
172. Vieira A.J.S.C, Steenken S. Pattern of OH radical reaction with adenine and its nucleosides and nucleotides. Characterisation of two types of isomeric OH adduct and their unimolecular transformation reactions, *J. Am. Chem. Soc.* 1990; 112: 6986–6994.
173. Steenken S. Addition–elimination paths in electron-transfer reactions between radicals and molecules, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1987; 83: 113–124.
174. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin, *Mutat. Res.* 1992; 275: 331–342.
175. Kasai, H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation. Research* 1997; 387: 147-163.
176. Grollman. A. P. and Moriya. M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends. Genet.* 9 1993; 246-249.
177. Halliwell B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants. The biomarker concept. *Nutrition Reviews* 1999; 57- 4: 104-13.
178. Calderon GL, Wen-wang L, Zhang YJ. Rodriguez AA. et.al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ Health Perspect* 1999; 107-6: 469-74.

179. Shigenaga MK, Ames BN. Assay for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol&Med* 1991; 10: 211-6.
180. Halliwell B, Zentella A, Erika OG. Antioxidants and human disease. A general introduction. *Nutrition Reviews* 1997; 55: 44-54.
181. Cadet J, d'Ham C, Douki T, et al. Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Radic Res* 1998; 29: 541-50.
182. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjonneland A, Overvad K, Poulsen HE. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 1992; 13-12: 2241-7.
183. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays* 2004; 26: 533-542.
184. Cooke M.S, M.D. Evans, J. Lunec, Urinary analysis of oxidative DNA damage lessons from lesions, *G Ital. Dermatol. Venerol.* 2002; 137: 239-256. .
185. Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine redox regulation of DNA repair in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2002 Oct 1; 33-7: 875-85.
186. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA mechanisms and measurement *Free Radic Biol Med.* 2002 Jun 1; 32-11: 1102-15.
187. Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to DNA. Do we have a reliable biomarker ? *Environmental Health Perspectives* 1996; 104-13: 465-469.
188. Floyd RA, West MS, Eneff KL, Schneider JE, Wong PK, Tingey DT, Hogsett WE. Conditions influencing yield and analysis of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in oxidatively damaged DNA. *Analytical Biochemistry* 1990; 188: 155-158.
189. Halliwell B, Dizdaroglu M. Commentary the measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/ MS techniques. *Free Rad. Res. Comms* 1992; 16-2: 75-87.
190. Nakae D, Mizumoto Y, Kobayashi E, Noguchi O, Konishi Y. Improved genomic / nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amounts of rat liver tissue. *Cancer Letters* 1995; 97: 233-239.
191. Park JW, Cundy KC, Ames BN. Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis* 1989; 10-5: 827-832.

192. Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic Res Commun.* 1986; 1-3: 163-72. .
193. Kulaksız G, Sancar A Nucleotide Excision Repair and Cancer Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem 2007; 32-3: 104–111.
194. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of Mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. [2004] *Annu Rev Biochem.* 2004; 73: 39-85.
195. Baer De J, Hoeijmakers JHJ. [2000] Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis.* 2000; 21-3: 453-460.
196. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 1995; 64: 97-112.
197. Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers VGJ, Schafer FQ. A new paradigm manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Rad. Biol. Med.* 2006; 41: 1338–1350.
198. Mao GD, Thomas PD, Lopaschuk GD, Poznansky MJ. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 416-420.
199. Amorim AM, Gasques MDG, Andreaus J, Scharf M. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2002; 74: 433-436.
200. Montgomery R, Conway TW, Specter AA. *Biochemistry, Türkçe Atlan N., Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım, Ankara, Palme Yayıncılık* 2000; 84-450.
201. Champe PC, Harvey RA. *Lippincott's Illustrated Review, Türkçe Tokulligil A, Dirican M, Ulukaya E. Lippincott's Illustrated Reviews serisinden Biyokimya, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi* 1997: 300-350.
202. Kyselovic J, Krenek P, Wibo M, Godfraind T. Effects of amlodipine and lacidipine on cardiac remodelling and renin production in salt-loaded stroke-prone hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001 Dec; 134-7: 1516-22.
203. Wölkart G, Pang X, Stessel H, Kirchengast M, Brunner F. Chronic endothelin-A receptor antagonism is as protective as angiotensin converting enzyme inhibition against cardiac dysfunction in diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 2007 Aug; 151-8: 1187-97. Epub 2007 Jun 18.
204. Yu CM, Wing-Hon Lai K, Li PS, Lam KY, Leung JC, Lai KN. Normalization of renal aquaporin-2 water channel expression by fosinopril, valsartan, and combination

therapy in congestive heart failure: a new mechanism of action. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Mar; 36-3: 445-53.

205. Karthikeyan K, Sarala Bai B.R. Niranjali Devaraj S. Grape seed proanthocyanidins ameliorates isoproterenol-induced myocardial injury in rats by stabilizing mitochondrial and lysosomal enzymes: An in vivo study *Life Sciences* 2007; 81: 1615–1621.

206. Knufman, N.M. Van Der Laarse, A., Vliegen, H.W., Brinkman, C.J. Quantification of myocardial necrosis and cardiac hypertrophy in isoproterenol-treated rats. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 1987; 57: 15–32.

207. Ramesh CV, Jayakumar R, Puvanakrishnan R. Effect of a novel tetrapeptide derivative in a model of isoproterenol induced myocardial necrosis. *Mol Cell Biochem* 1998; 187: 173-182.

208. Sathish V, Ebenezer KK, Devaki T. Biochemical changes on the cardioprotective effect of nicorandil and amlodipine during experimental myocardial infarction in rats. *Pharmacol Res.* 2003 Dec; 48-6: 565-70.

209. Adeli K, Ogbonna G. Rapid Purification of Human DNA from Whole Blood for Potential Application in Clinical Chemistry Laboratories *Clin. Chem.* 1990; 36-2: 261-264 S.A.Miller, D.D.Dykes and H.F.Polesky. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 3

210. ECCLS. Determination of catalytic concentration in serum of L-aspartate aminotransferase (E.C. 2.6.1.1, ASAT) *Klin Chem Mitt* 1989; 20: 198-204.

211. Lott JA, Stang JM. Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis. *Clin Chem* 1980; 26: 1241-1250.

212. Wu AH, Feng YJ, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, Bodor G. Characterization of cardiac troponin subunit release into serum after acute myocardial infarction and comparison of assays for troponin T and I. American Association for Clinical Chemistry Subcommittee on cTnI Standardization. *Clin Chem.* 1998 Jun; 44-6 Pt 1): 1198-208.

213. Kaur H, Halliwell B. Measurement of oxidized and methylated DNA bases by HPLC with electrochemical detection. *Biochem J.* 1996 Aug ;15-318 (Pt 1): 21-3.

214. Moshage H, Kok B, Huizenga J.R. and Peter L.M. Jansen. Nitrite and Nitrate Determinations in Plasma A Critical Evaluation. *Clin. Chem.* 1995; 41-6: 892-896.

215. Bories P.N. Bories C. Nitrate Determination in Biological Fluids by an Enzymatic One-Step Assay with Nitrate Reductase. *Clin. Chem.* 1995; 41-6: 904-907.
216. Aebi H. Catalase. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
217. Alarcón de la Lastra C, Nieto A, Martín MJ, Cabré JF, Herrerías M, Motilva V. Gastric toxicity of racemic ketoprofen and its enantiomers in rat: oxygen radical generation and COX-expression. *Inflamm. Res.* 2002; 51: 051–057.
218. Bradley, PP, Priebat, DA, Christensen, RD, Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 206-209. .
219. Sedlak J, Lindsay RHL. Estimation of total, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968; 25: 192-205. .
220. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-358. .
221. Itoh M, Guth PH. Role of oxygen derived free radicals in hemorrhagic shock induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterol.* 1985; 88: 1165–1167.
222. Sun Y, Larry WO, Ying LA. simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 34-3: 497-500.
223. Yates, J.C, Dhala, N.S, Induction of necrosis and failure in the isolated perfused rat heart with oxidized isoproterenol. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1975; 7: 807–816.
224. Rona, G. Catecholamine cardiotoxicity. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1985; 17: 291–300.
225. Thompson J.A, Hess M.L. The oxygen free radical system a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis. *Progress in cardiovascular disease* 1986; 28: 449-462.
226. Katruka AG, Berznikova AV, Esakova TV, et al. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complete. *Clin Chem* 1997; 43: 1379-1385.
227. Zimmerman J, Fromm R, Meyer D, et al. Diagnostic marker cooperative study for diagnosis of myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99: 1671-1677.
228. Elayda MA, Mathur VS, Hall RJ, Massumi GA, Garcia E, de Castro CM. Collateral circulation in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1985; 55: 58-60.
229. Moss AJ, Benhorin J. Prognosis and management after a first myocardial infarction. *N Engl J Med* 1990; 322: 743-53. .
230. Cohen MV. The functional value of coronary collaterals in myocardial ischemia and therapeutic approach to enhance collateral flow. *Am Heart J* 1978; 95: 396-404. .

231. Mohanthy, I. Arya, D.S. Dinda, A. Talwark, K.K. Joshi, S. Gupta, S.K. Mechanisms of cardioprotective effect of *Withaniasomnifera* in experimentally induced myocardial infarction. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2004; 94: 184–190.
232. Bolli R. Mechanism of myocardial “stunning”. *Circulation* 1990; 82: 723-38. .
233. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 2000; 109: 655-678. .
234. Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SK, Chen HSV, Hartman J, Sucher NJ: Effect of nitric oxide formation on the redox modulatory site of NMDA receptor channel complex. *Neuron* 1992; 8: 1087–1088. .
235. Seigfreid MR, Erhardt J, Rider T, Ma XL, Lefer AM Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischaemia- reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260: 668–675.
236. Sreepriya M, Porckodi M, Devaki T, Nayeem M: Anti-oxidant effects of L-arginine against isoproterenol-induced myocardial stress in rats. *Med Sci Res* 1998; 26: 587–593.
237. Sushamakumari S, Menon VP: Changes in levels of lipid peroxides and activities of superoxide dismutase and catalase in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Ind J Exp Biol* 1987; 25: 419–423.
238. Janeiro DR, Burghardt B. Cardiac membrane Vitamin E and malondialdehyde levels in heart muscle of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Lipids*.1989; 24: 33-38. .
239. Hamberg, M. Svensson, J. Wakabayashi, T. Samuelsson, B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1974; 71: 345–359.
240. Izuka, Y. Sakurai, E. Hikichi, N. Effects of selenium on the serum glucose and insulin levels in diabetic rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1992; 100: 51–154. .
241. Padmanabhan M. Stanely Mainzen P. Preventive effect of S-allylcysteine on lipid peroxides and antioxidants in normal and isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats: A histopathological study *Toxicology* 2006; 224: 128–137.
242. Martensson J, Meister A. Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in new born rats ascorbate spares glutathione and protects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4656–4660.
243. Gumieniczek A. Effects of rapaglinide on oxidative stress in tissues of diabetic rabbits. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 68: 89–95.

244. Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascoca A. Oxidative stress at onset and in early stages of type I diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 1998; 21: 1736–1742.
245. Sheela Sasikumar C, Shyamaladevi CS. Protective effect of Abana- a polyherbal formulation, on isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Indian J Pharmacol* 2000; 32: 198–201.
246. Jagetia, G.C. Rajanikant, G.K. Rao, S.K. Baliga, M.S. Alteration in glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated gamma radiation. *Clin. Chim. Acta* 2003; 332: 111–121.
247. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, et al: Oxygen free radicals and myocardial damage; Protective role of Thiol-containing agents. *Am J Med* 1991; 91: 95-105 (suppl 3C).
248. Ricardo F, Susana L, Jose M, Domingo S. Assessment of myocardial oxidative stress in patients after myocardia revascularization. *Am Heart J* 1988; 15: 307-12.
249. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leucocyte dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107: 395-9.
250. Bouloumie, A. Bauersachs, J. Linz, W. Schölkens, B.A. Wiemer, G. Fleming, I. Busse, R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension* 1997; 30: 934-941. .
251. Balligand, J.L. Ungureanu-Longrois, D. Simmons, W. Pimental, D. Malinski, T.A. Kapturczak, M. Taha, Z. Lowenstein, C.J. Davi-doff, A.J. Kelly, R.A. Smith, T.W. Michel, T. Cytokine- indu-cible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 27580-27588.
252. Oyama, J. Shimokawa, H. Momii, H. Cheng, X. Fukuyama, N. Aral, Y. Egashira, K. Nakazawa, H. Takeshita, A. Role of nitric oxide and peroxynitrite in the cytokine induced sustained myocardial dysfunction in dogs in vivo. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 2207-2214. .
253. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res.* 2003 Oct 29; 531(1-2): 5-23.
254. Shigenaga MK, Aboujaoude EN, Chen Q, Ames BN. Assays Of Oxidative Dna-Damage Biomarkers 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine And 8-Oxoguanine In Nuclear-Dna And Biological-Fluids By High-Performance Liquid-Chromatography With Electrochemical Detection. *Methods In Enzymology* 1994; 234: 16-33.

255. Evans MD, Cooke MS, Podmore ID, Zheng Q, Herbert KE, Lunec J. Discrepancies in the measurement of UVC-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine: implications for the analysis of oxidative DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jun 7; 259-2: 374-8.
256. Randerath K, Zhou GD, Monk SA, Randerath E. Enhanced levels in neonatal rat liver of 718-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion. *Carcinogenesis* 1997; 18-7: 1419-1421.
257. Kasai H, Nishimura S. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. in Sies H. ed. *Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants.*, London: Academic Press 1991; 99-116.
258. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1989; 86: 9697-9701.
259. Kasai H, Nishimura S, Kurokawa Y, Hayashi Y. Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis* 1987; 8-12: 1959-1961.
260. Herbert KA, Evans MD, Finnegan MTV, Farooq S, Mistry N, Podmore ID, Farmer P, Lunec J. A novel HPLC procedure for the analysis of 8-oxoguanine in DNA. *Free Radical Biology Medicine.* 1996; 20-3: 467-473.
261. Sattler W, Malle E, Kostner GM. Methodological approaches for assessing lipid and protein oxidation and modification in plasma and isolated lipoproteins. *Method Mol Biol* 1998; 110: 167-191.