



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA UZUN SÜRELİ İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE N-ASETİL  
SİSTEİN VE TRİMETAZİDİN'İN S100B, OKSİDATİF STRES VE APOPTOZİS  
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**Tunay ŞENTÜRK**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Bursa-2013**



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA UZUN SÜRELİ İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE N-ASETİL  
SİSTEİN VE TRİMETAZİDİN'İN S100B, OKSİDATİF STRES VE APOPTOZİS  
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Tunay ŞENTÜRK

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Sinan ÇAVUN

Bursa-2013

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	IV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
1. Akut miyokard infarktüsünün patofizyolojisi	3
2. Miyokard substrat metabolizması	5
3. İskemi sırasında miyokard enerji metabolizması	8
4. İskemi reperfüzyona bağlı miyokard hasarı	9
5. Apoptozis için tedavi yaklaşımları	23
6. Serum M30 ve M65 düzeyleri	23
7. S100B	24
8. İskemi sırasında enerji metabolizmasının farmakolojik olarak düzenlenmesi	25
GEREÇ ve YÖNTEM.....	35
1. Genel	35
2. Cerrahi işlemler	35
3. Verilerin kaydedilmesi	35
4. Uzun dönem iskemi-reperfüzyon prosedürü	36
5. Miyokardiyal apoptozisin değerlendirilmesi	38
6. İlaçlar	40
7. Ölçümler	40
8. İstatistiksel değerlendirme	41
BULGULAR.....	42
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR.....	61
TEŞEKKÜR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	79

## ÖZET

Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarının etyolojisinde reaktif oksijen radikalleri önemli rol oynar. İskemi reperfüzyona bağlı kardiyak miyosit ölümü kabaca nekroz ve apoptosis olarak sınıflandırılmıştır. İnfarkt gelişmiş miyokardda erken dönemdeki başlıca ölüm şekli apoptozistir. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda miyokardiyal iskemi reperfüzyon modelinde N-asetil sistein ve trimetazidinin tek başına ya da kombinasyonunun oksidatif stres, infarkt alanı ve apoptozis üzerindeki üzerindeki etkisinin incelenmesiydi. Miyokard iskemisi, sol ön inen koroner arter ligasyonu ile gerçekleştirildi. İskemik periyodun ortasında tuzlu su (1 ml/kg) veya NAS (50, 150 mg/kg) TMZ (3, 5 mg/kg) intravenöz yolla uygulandı. Sıçanlarda deney boyunca kardiyovasküler parametreler kaydedildi. Reperfüzyon döneminden sonra sıçanların kalpleri çıkarıldı, apoptosis ve nekroz incelemeleri için boyama yapıldı. İnfarkt büyüklüğü, infarkt alanının risk alanına oranlanmasıyla değerlendirildi. Apoptozis aktivasyonu, kaspaz 3 ve TUNEL yöntemleriyle değerlendirildi. Serum M30, M65, S100b ve malondialdehid ölçümleri için sıçanlardan kan örnekleri alındı. Hem TMZ, hemde NAS'ın, tuzlu su grubuna göre oksidatif stresi ve infarkt alanını anlamlı olarak azalttığı saptandı ( $p<0.001$ ). Bunun yanında TMZ'in her iki dozunda, NAS'e göre oksidatif stres ( $p<0.05$ ) ve infarkt alanında daha belirgin azalmaya neden olduğu izlendi ( $p<0.001$ ). Ayrıca, NAS ve TMZ'in benzer şekilde apoptotik aktivitede azalmaya neden olduğu, NAS ve TMZ kombinasyonunun apoptotik aktiviteyi, sadece TMZ kullanan gruplara göre daha anlamlı şekilde azalttığı izlendi ( $p<0.05$ ). Çalışma grupları arasında, serum S100B düzeyleri ile apoptozis belirteci olan serum M30, M65 düzeylerinde ise arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Çalışmanın sonuçları sıçanlarda uzun süreli iskemi reperfüzyon modelinde İV yolla verilen NAS ve TMZ'in oksidatif stresi azalttığı ve apoptotik aktiviteyi azalttığını göstermiştir. Apoptotik aktivitedeki en belirgin azalma NAS ve TMZ'in birlikte verildiği grupta izlenmiştir. Miyokardiyal reperfüzyonu sağlamaya yönelik mekanik girişimler yanında farklı

noktaları hedefleyen hücre koruyucu ajanların kullanımı reperfüzyon hasarının, reperfüzyona bağlı morbiditenin azaltılmasına yarar sağlayabilir.

**Anahtar kelimeler:** Miyokard, reperfüzyon hasarı, apoptosis, oksidatif stress, S100b

## SUMMARY

### **EFFECT OF N-ACETYL CYSTEIN AND TRIMETAZIDINE ON S100B, OXIDATIVE STRESS, APOPTOSIS AND INFARCT SIZE IN A RAT MODEL OF MYOCARDIAL ISCHEMIA AND REPERFUSION INJURY**

Reactive oxygen species (ROS) play an important role in the etiology of myocardial ischemia reperfusion (IR) injury. IR-induced cardiac myocyte death has been broadly classified as occurring by either necrosis or apoptosis. Apoptosis is the early and predominant form of cell death in infarcted myocardium. The aim of the study was to investigate the effect of trimetazidine and N-acetylcysteine, used alone or in combination, on oxidative stress, infarct size, and IR-induced cardiomyocyte apoptosis in a rat model of myocardial IR. Myocardial ischemia was established by ligating the left anterior descending artery (LAD). Saline (1 ml/kg) or NAC (50, 150 mg/kg), TMZ (3, 5 mg/kg) were intravenously injected in the middle of the ischemic period. Cardiovascular parameters were recorded throughout the experimental period. At the end of the reperfusion, the hearts were removed and heart sections were subsequently stained to determine necrosis and apoptosis. The infarct size was evaluated as the ratio of the infarct area to the risk area. Apoptotic activation was assessed by a caspase-3 immunostaining and TUNEL assay. In addition, blood samples were collected from the animals to measure serum M30, M65, S100b and malondialdehyde levels. Both TMZ and NAC significantly reduced oxidative stress and infarct area compared to the saline group ( $p < 0.001$ ). In addition, both TMZ doses reduced oxidative stress ( $p < 0.05$ ) and infarct area to a higher extent compared to NAC ( $p < 0.001$ ). Similarly, the combination of NAC and TMZ reduced apoptotic activity; the combination of NAC and TMZ reduced apoptotic activity more significantly compared to TMZ-only group ( $p < 0.001$ ). There was no significant difference in serum S100B levels, and serum M30 and M65 levels, which are apoptotic markers ( $p > 0.05$ ).

Intravenous NAC and TMZ administration decreased oxidative stress and apoptotic activity in a long-term IR model in rats. The most significant decrease in apoptotic activity was observed in the NAC+TMZ-treated group. In addition to mechanical attempts to secure myocardial reperfusion, using cell-protective agents may help to decrease reperfusion injury and reperfusion-associated morbidity.

**Keywords:** Myocardium, reperfusion injury, apoptosis, oxidative stress, S100b

## GİRİŞ

Koroner arterdeki hassas plağın aniden rüptüre olması koroner damarın tıkanmasına neden olarak akut miyokard infarktüsü (AMİ) ile sonuçlanır. Bu durumda ortaya çıkan miyokard hasarı, oksijen istem ve sunumu arasındaki dengeyle ilişkilidir. Miyokard infarktüsü dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından birisi olup, batı dünyasında ölümlerin başlıca sebebinin kardiyovasküler sistem hastalıkları oluşturmaktadır. ABD’de yılda yaklaşık 875.000 vaka izlenmektedir ve hastane mortalitesi % 6-7 oranındadır, taburculuk sonrası hastaların % 15’inde ilk 6 ay içerisinde kardiyovasküler olay izlenir (1). Çeşitli kardiyovasküler hastalıklar arasında, iskemi-reperfüzyona bağlı miyokard hasarı, gelişmiş ülkelerde kalple ilgili ölümlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (2).

Akut koroner sendromlu hastaların kısa ve uzun dönem prognozlarının belirlenmesinde ve kalp yetmezliği gelişiminin engellenmesinde en önemli adım akut miyokard infarktüsünün önlenmesi ya da geliştiğinde infarkt boyutunun sınırlandırılabilmesidir. Tıkalı damarın invaziv ve/veya farmakolojik yöntemlerle açılmasını amaçlayan reperfüzyon tedavisinin infarkt alanının azalttığı ve sağkalımı düzelttiği gösterilmiştir (3). Ancak koroner kan akımının sağlanamaması veya geç sağlanması durumunda miyosit kaybı ve ventriküler yeniden şekillenmeye bağlı olarak hastaların % 40’ında kalp yetersizliği gelişmektedir (4). Miyokardı kurtarma anlamında faydalı olsa da reperfüzyon sürecinin, reperfüzyon hasarı olarak tanımlanan patolojik sonuçlara neden olduğu ilk olarak 1960 yılında Jennings ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür (4). Braunwald ve Kloner (6) tarafından ve ardından gelen üç dekad boyunca varlığı dahi tartışılan bu kavram son dönemlerde elde edilen verilerle yeniden güçlenmiştir. Deneysel çalışmalarda, reperfüzyon hasarının infarkt hacminin % 50’sinden fazlasına katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (7). Hücresel düzeyde oksidatif stres, hücre içi kalsiyum disregülasyonu, inflamasyon ve hücre içi pH’ın hızlı bir şekilde normale gelmesi patofizyolojide rol oynayan faktörler arasındadır (7).

İskemik miyokarda reperfüzyonun sağlanması her zaman olumlu klinik sonuçlara neden olmamaktadır. Miyosit kaybının önlenmesine yönelik



yaklaşımlar, AMİ sonrası kalp yetersizliği gelişimini ve prognozu olumlu yönde etkileyebilecektir. Klasik bilgi, miyokard hücresi ölümünün karşımıza çıkan patolojik görüntüsünün nekroz olduğu şeklindedir, ancak son zamanlarda apoptozisin miyokard infarktüsü sonrası hücre ölümüne anlamlı şekilde katkı sağladığı izlenmiştir (8).

İskemi sırasında miyokardın oksijen alımının azalması mitokondrilerde enerji üretimini durdurarak ATP ve fosfokreatin düzeylerini düşürmektedir. Hücreler gereksinimleri olan enerjiyi anaerobik glikoliz yoluyla sağlamaya başlarlar ve sitoplazmada laktat ve H<sup>+</sup> iyonları birikir. Anaerobik glikoliz yoluyla üretilen enerji oldukça azdır ve bu durumun sürmesi hücrenin enerji rezervini hızla azaltır. Hücrenin oksijen kaynaklarının maksimum kullanımı sağlanarak aerobik glikolizin olabildiğince sürdürülmesi için yağ asitlerinin glikoz oksidasyonu üzerindeki inhibe edici etkisi baskılanmalıdır. Trimetazidin (TMZ) başlıca etkisini, uzun zincir 3-ketoasil CoA tiyolaz enzimini inhibe ederek, iskemik miyokardın mevcut enerji substratlarını kolaylaştırarak göstermektedir. N-asetil sisteinin ise başlıca özelliği antioksidan olmasıdır ve özellikle iskemik miyokardın reperfüzyonu sonrası hasarın önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Kardiyomiyosit apoptozisinin önlenmesi en önemli tedavi hedeflerinden birisini oluşturmaktadır. Bu amaçla, uyarıların inhibisyonu, hücre ölümünü belirleyen düzenleyici mekanizmaların inhibisyonu veya apoptozise giden yolların inhibisyonu gibi farklı hedefler seçilebilir. Bu bakımdan elde edilecek sonuçlar, trombolitik tedavi, anjioplasti ve koroner “by-pass” gibi iskemi reperfüzyon (İR) olayının sık olarak izlendiği durumlarda, tedavide alternatifler sağlayabilecektir.

Bu çalışmanın amacı, iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak gelişen miyosit apoptozisinin önlenmesinde antioksidan etkisi bilinen N-asetil sistein ve antioksidan ve iskemi sırasında miyosit metabolizmasını düzenleyen bir ajan olan trimetazidinin, S100B düzeyleri, oksidatif stres, infarkt alanı ve apoptozis üzerindeki etkilerinin incelenmesidir.

## GENEL BİLGİLER

### 1. Akut Miyokard İnfarktüsünün Fiziopatolojisi

Koroner iskemi semptomları çoğunlukla kan akımının hemodinamik olarak ciddi şekilde engellenmesi ile oluşmasına rağmen AMİ'lerinin çoğunluğu hemodinamik olarak önemli olmayan lezyonlardaki plak bütünlüğünün bozulması sonucu oluşur (9). Miyokard infarktüsü sıklıkla sabahın erken saatlerinde görülmektedir (10). Bunun nedenleri vasküler tonüste değişiklikler, katekolaminler, koagülabilitate, trombolize dirençte sirkadiyen değişiklikler ve artan fizik aktivitedir. Hiperlipidemi, hipertansiyon, diyabet, sigara içme, obezite, ileri yaş, fiziksel inaktivite gibi bilinen kardiyovasküler risk faktörleri inflamatuvar hücrelerin arter duvarına girişini ve aktivasyonlarını değişik mekanizmalarla aktive ederler (11). Makrofajlara dönüşen monositler ve lenfositler arteriyel subendotelyumuna giren başlıca inflamatuvar hücrelerdir. Bu hücreler damar duvarında hasarı başlatan ve artıran sitokin ve büyüme faktörleri için zengin birer kaynak durumundadırlar. Devam eden inflamatuvar olayın yarattığı kompleks aterosklerotik plaklar AMİ için potansiyel oluşturmaktadır. Fibröz kapsülü ince, lipit içeriği plağın % 40'ından fazlasını oluşturan, aktif inflamatuvar reaksiyonun bulunduğu plaklar, rüptür gelişimi yüksek olan hassas plaklardır (11). İnflamasyonun serum belirteçlerinde (C-reaktif protein, serum amiloid A, interlökin-6, fibrinojen, homosistein, lipoprotein A) görülen yükselme ile akut koroner sendrom riski arasında pozitif bir korelasyondan söz edilmektedir (12). Koroner arter hastalığının bir de genetik komponenti vardır. İnflamatuvar olayların genetik regülasyonundaki değişiklikler benzer özelliklere sahip bireylerde gözlenen farklı klinik tabloları açıklayabilir. Sınırlı verilere göre tümör nekroz faktör, "transforming" büyüme faktörü, interlökin-1, CD14 ve adezyon proteinlerinin gen polimorfizmleri ile koroner arter hastalığı riski arasında ilişki bulunmaktadır (13).

Koroner arter içinde trombüs oluşumu için plak erozyonu veya rüptür gereklidir. Fibröz başlık sıklıkla normal damar-fibröz başlık sınırında yırtılmaktadır. Bunun nedeni muhtemelen bu noktadaki stres artışıdır. Rüptüre

duyarlı plaklarda bulunan makrofajlar fibröz başlığı zayıflatan litik enzimler salgırlar (14). Miyokard infarktüsü, ciddi darlık oluşturan koroner lezyondan ziyade, hafif–orta dereceli darlık oluşturan plaklar üzerinde gelişmektedir, bu nedenle distal kollateral gelişimi genellikle iyi değildir. Rüptür oluştuğunda açığa çıkan kollajen ve lipid içerikli matrikse trombositler yapışır ve trombotik olay başlar. Arteriyel hasar sırasında açığa çıkan doku faktörü doğrudan ekstresek koagülasyon zincirini aktive eder ve fibrin oluşumunu tetikler. Doku tipi plazminojen aktivatörü, plazminojen aktivatör inhibitörü gibi trombotik belirteçler ile koroner olaylar arasında bağlantı bulunmaktadır (15).

Damarı tam olarak tıkayan trombüs oluşursa ve ilgili miyokardın zengin kollateralleri yoksa hastada akut ST segment yüksekliği olan Mİ gelişir. Trombüs tam tıkaçıcı değilse veya total tıkanmadan sonra spontan reperfüzyonla hemen açılıyorsa, gelişmiş kollateral dolaşım bulunuyorsa kararsız angina veya ST segment yüksekliği görülmeyen Mİ ortaya çıkar (16).

Arter duvarındaki bütünlüğün kaybı, arterdeki akımı durdurarak miyokard iskemi ve hasarına neden olur (17). Nekrozun yaygınlığı kollateral akımın fonksiyonuna miyokard iskemisinin süresine ve yaygınlığına göre değişir. Vazomotor tonus veya spazm ile infarktla ilişkili arterde akım paterninde dinamik değişiklikler, muhtemelen endotel fonksiyonlarının kaybı ve aktifleşen trombositlerden salınan vazoaktif aminlerle ilişkilidir (18).

Koroner arteri tıkayan trombüs beyaz (trombositlerden zengin) ve kırmızı (fibrin ve eritrositlerden zengin) pıhtıların bir karışımıdır. Bazı hastalarda trombositlerin rolü daha fazladır, bazılarında ise arteriyel zedelenme yerinde fibrinden zengin trombüs ön plandadır. Trombüs nedeniyle infarktla ilişkili arterde kan akımının engellenmesi, tıkanan yerin proksimalinde kırmızı trombüsün birikimine yol açar (19).

ST segment yüksekliği olmayan Mİ’de mural trombüs trombositlerden zengin olma eğilimindedir ve koroner kan akımında sürekli bir kesinti söz konusu değildir. İskeminin yaygınlık ve süresine bağlı olarak miyokard nekrozu olmaz veya miyokard hasarı oluşur. Aterosklerotik plak içeriği ve trombositlerden zengin trombüsün distal emboli oluşturma potansiyeli de vardır (20).

Miyokard infarktüsü gelişim zamanı ile ilgili önemli değişimler bulunmakla birlikte, plak fissür ve rüptürlerinin sıklıkla günün erken saatlerinde oluşmasında

trombosit agregasyonu ve plasminojen aktivatör inhibitör seviyesinde artışa bağlı azalan fibrinolitik aktivitenin rolü vardır (21).

Miyokard infarktüsü, etkilenmiş arterin bölgesini içine alan bölgesel bir oluşumdur. Kan akımının sonlanmasından bir iki dakika sonra kasılmada azalma başlar, olay genelde endokarddan başlayıp epikarda doğru yayılır. Yirmi-kırk dakika sonra geri dönüşümsüz hücre hasarı oluşur. Miyokarddaki hasar 4-6 saat sonra maksimum olur, ama hasarın en çoğu ilk 2-3 saatte oluşmaktadır (22).

## **2. Miyokard substrat metabolizması**

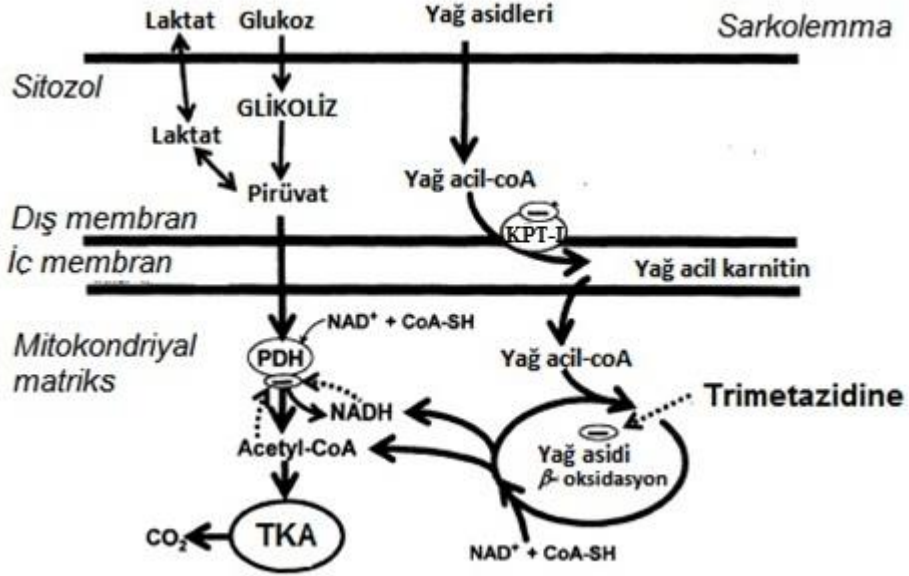
Miyokardiyal hasarının daha iyi anlaşılabilmesi için miyositlerdeki substrat metabolizmasının, uzun süreli iskemi ve reperfüzyona bağlı olarak miyositlerde ortaya çıkan değişikliklerin bilinmesi yararlı olacaktır.

### **2.1. Normal kardiyak miyosit metabolizması**

Kalp yüksek oranda oksidatif bir doku olup kardiyak metabolizmanın > % 90 fazlasının aerobik olması şartıdır değildir (23, 24). Bunun için miyositler çok sayıda mitokondriye sahiptir ve hücre hacminin % 25-35'ini oluşturmaktadır (23). Kalp kasında, yerleşimine göre subsarkolemmal ve intermyofibriller olmak üzere 2 çeşit mitokondri saptanmıştır (25). Subsarkolemmal mitokondriler, iyonların aktif transportu için gerekli adenosin trifosfatı (ATP) sağlarken intermyofibriller mitokondriler, kasılma için gereken ATP'ın üretiminden sorumludur (24). ATP yıkım hızı çok yüksektir, kardiyak ATP havuzu her 10-15 saniyeden tamamen yenilir. Sağlıklı kalplerde, kalp hızı ve kan basıncı arttığında miyokardiyal kan akımı ve oksijen tüketimi artar, ATP ve adenosin difosfat konsantrasyonu sabittir (26). Miyositlerde hidrolize uğrayan ATP'ın 2/3'ü kasılma için kullanılırken geriye kalan 1/3'ü ise iyon dengesinin devamını sağlanması için kullanılır (24). Miyositlerde ATP'a gereksinimi olan başlıca aktif transport sistemleri sarkoplazmik retikulum  $Ca^{2+}$  ATPaz ve sarkolemmal  $Na^+/K^+$  ATPaz sistemleridir (27).

Miyokardın mekanik gücü, yüksek oranda oksijen tüketimi, başlıca yağ asitleri, daha az oranda glukoz ve laktat olmak üzere karbon yakıtların metabolizması ile sağlanmaktadır (28). Mekanik güç oluşumu, oksijen tüketim

hızı ile orantılıdır. Sağlıklı kalpte bu yollar, hücrenin ATP gereksinimi ile bağlantılı olup hız ve basınç bileşenleri ile belirlenmektedir.



**Şekil-1:** Aerobik koşullarda miyokard enerji metabolizması

## 2.2. Yağ asidi metabolizması

Kalpte aerobik koşullar altında, enerjinin yaklaşık % 60-90'ı serbest yağ asitlerinden sağlanmaktadır (Şekil 1) (29). Kullanılan yağ asitlerinin başlıca komponentini uzun zincirli serbest yağ asitleri oluşturmaktadır. Uzun zincirli serbest yağ asitleri çeşitli enzimlerin etkisinde kolaylaştırılan yollarla miyokard hücrelerine girmektedir. Hücre içerisine alınmasının ardından karnitin palmitoil transferaz (KPT) I ve II yardımıyla uzun zincirli yağ asitleri mitokondriler içerisine alınmaktadır (Şekil 1). Beta oksidasyon sonrası ortaya çıkan asetil-CoA, trikarboksilik asit siklüsüne girerek ATP üretimine neden olmaktadır (30). Esterifiye olmamış uzun zincirli yağ asitleri, CD36 yağ asidi transport protein kompleksi tarafından alınır ve sitozolde açil-CoA'ya dönüştürülür (31). Kalpte az miktarda hücre içi trigliserid yağ olarak depolanır, ancak dönüşüm hızı yüksektir. Kalbe gelen yağ asitlerinin yaklaşık % 30'u intrakardiyak trigliserid havuzuna katılır, kalan % 70 ise CO<sub>2</sub>'e okside olur (30). Kalpteki mitokondriler, dışarıdan

gelen yağ asitleri ile endojen trigliserid depolarından gelen yağ açıl-CoA'yı okside eder.

Mitokondriler, uzun zincirli yağ asitlerini veya yağ açıl-CoA'yı direkt olarak alamaz, yağ açıl, karnitin ile esterifiye olduktan sonra karnitin taşıyıcı sistemi ile mitokondriye girer. Yağ açıl-CoA'nın açıl karnitine dönüşümü karnitin palmitoil transferaz (KPT-I) enzimi ile sağlanır, bu enzim miyokardiyal yağ asidi oksidasyonunun düzenlenmesinde anahtar noktayı oluşturur. Mitokondriye giren açıl karnitin tekrar açıl-CoA'ya geri dönüştürülür, oksidasyon işlemi sırasında 2 karbonlu asetil-CoA üniteleri tekrarlayacak şekilde koparılır ve NADH ve FADH<sub>2</sub> meydana gelir (30).

Yağ asidi oksidasyonunda 4 reaksiyon vardır, her basamakta uzun, orta ve kısa zincirli yağ asitleri için spesifik enzimler aracılık eder. Açıl-CoA dehidrojenaz ilk enzimdir, bunu 2-enoil-CoA hidrataz, 3-hidroksiaçıl-CoA dehidrojenaz ve 3 ketoaçıl-CoA tiyolaz enzimi takip ederek sitrik asit siklüsünde asetil-CoA oluşturur. Açıl-CoA dehidrojenaz ve 3-hidroksiaçıl-CoA dehidrojenaz, sırasıyla FADH<sub>2</sub> ve NADH oluşturur. Oksidasyondan elde edilen asetil-CoA'larda ilave NADH ve FADH<sub>2</sub> sağlar (30). Yağ asidi oksidasyonunun kısmen inhibe edilmesinin kardiyoprotektif ve antianjinal etkileri olduğu gösterilmiştir. Trimetazidin, 3- ketoaçıl CoA tiyolaz enzimini inhibe etmektedir (32).

Yağ asidi oksidasyon hızı, plazma serbest yağ asidi konsantrasyonu, yağ asitlerinin mitokondriye transferi, yağ asidi beta oksidasyonunda rol oynayan çeşitli enzimler tarafından kontrol edilmektedir (28). Akut miyokard infarktüsü sonrası sempatik sinir sistemi aktivitesinde artış vardır, bunun sonucu olarak plazma insülin konsantrasyonu azalırken yağ asidi konsantrasyonu artar (33).

### **2.3. Karbohidrat metabolizması**

Sağlıklı kalpte üretilen ATP'nin % 10-40'ı karbohidratların (laktat ve glukoz) oksidasyonundan sağlanır (34). Hücre dışından glukoz "uptake"i, membrandaki glukoz gradiyenti, konsantrasyonu ve plazma membranındaki glukoz taşıyıcılarının aktivitesi ile düzenlenir. Miyokarda, iki çeşit glukoz taşıyıcı ailesi belirlenmiştir (GLUT 1 ve GLUT 4) (35), her ikisinde sarkolemma membranında ve hücre içi mikrozomal veziküllerde bulunur (36). Kalpte, glikojen depolanır,

hayvan çalışmalarında glikojen depolarının sadece iskemi ve aşırı egzersiz sırasında kullanıldığı gösterilmiştir (37).

Glikolitik yol, oksijene gereksinim göstermez ancak mitokondrilerdeki aerobik ATP üretimi ile karşılaştırıldığında düşük ATP üretimi ile sonuçlanır (normal sağlıklı kalplerde miyokarda üretilen toplam ATP'nin < % 2). Pirüvat oksidasyonu, mitokondriyal pirüvat dehidrojenaz (PDH) ile düzenlenir (38). Pirüvat, PDH ile asetil-CoA'ya okside olur ve NADH oluşturur. Sağlıklı kişilerde kalbin glukoz ve laktat "uptake"i ve oksidasyonu, yüksek plazma yağ asidi konsantrasyonu ve miyokarddaki yağ asidi oksidasyonu tarafından inhibe edilir (38). Oksidatif glikoliz ve laktat oksidasyonu sitozolde pirüvat oluşturur, normal şartlarda pirüvat oluşumu her işlemde eşit ölçüde sağlanır (29). Sağlıklı miyokard, özellikle fiziksel egzersiz (29) ve adrenarjik stres (39) olmak üzere tüm koşullarda laktat tüketicisidir. PDH, PDH kinazın fosforilasyonu ile inaktive edilirken, PDH fosfatazın defosforilasyonu ile aktive edilmektedir (40). Kalpte, karbohidrat metabolizmasının başlıca düzenleyicisi, yağ asidi oksidasyon hızıdır (Şekil 1) (34). Bu regülasyon, yağ asidi oksidasyonunun yüksek NADH/NAD<sup>+</sup> ve asetil-CoA/serbest CoA oranları ile PDH inhibe ettiği mitokondride gerçekleşir (41). Yüksek NADH/NAD<sup>+</sup> ve asetil-CoA/serbest CoA oranları, PDH kinazı uyarır ve PDH'nin fosforilasyonuna ve inhibisyonuna neden olur (Şekil 1). Deneysel çalışmalarda, yağ asidi oksidasyonunun farmakolojik olarak inhibe edilmesinin, PDH aktivitesinde hızlı bir artışa neden olduğu, kalbin daha fazla laktat ve glukozu okside ettiği gösterilmiştir (42).

### **3. İskemi sırasında miyokard enerji metabolizması**

Kardiyak miyositler, yüksek oranda aerobik hücrelerdir ve normal koşullarda enerji üretimlerinin tamamına yakını oksidatif fosforilasyon ile gerçekleşmektedir (24). Kan akımı kesintiye uğradığında aerobik enerji üretimi durur ve hücrel hasara neden olan patolojik olaylar ortaya çıkar.



**Şekil-2:** Normal koşullarda ve iskemik koşullarda miyokardiyal enerji metabolizması

Normal erişkin kalbinden farklı olarak fetal kalbin başlıca enerji kaynağı glukozdur. Erken post natal dönemde glukozdan serbest yağ asitlerine geçiş olur (43). İskemi sırasındaki tüm metabolik adaptasyon mekanizmaları, substrat kullanımının glukozla kayması şeklindedir. Yağ asidi oksidasyonu ile üretilen ATP, glikoliz ile üretilene göre daha fazladır (substratın gramı başına düşen ATP), ancak tüketilen oksijen miktarında daha fazladır. Yağ asitleri, glikoz ile karşılaştırıldığında eşit miktarda ATP üretimi için % 10-15 daha fazla oksijene gereksinim duymaktadır (40). Subtotal iskemi sırasında miyokard enerjisini büyük kısmını oksidatif metabolizma ile sağlamaktadır. Orta-şiddetli miyokard iskemisi durumlarında ise miyokardın glukoz kullanımını artırır (44). Ancak yine de iskemik kalpte yağ asidi oksidasyonu başlıca substrat olmaya devam etmektedir (Şekil 2) (40). İskemi sırasında yüksek düzeyde serbest yağ asidi “uptake”i ve katabolizmasının miyokard üzerinde zararlı etkileri vardır ve daha fazla oksijene gereksinim duyar (45).

#### 4. İskemi reperfüzyona bağlı miyokard hasarı

Reperfüzyon, kan akımının ve bununla birlikte O<sub>2</sub>'nin hipoksik dokuya tekrar geri sağlanmasıdır. Uzun süreli iskemiye takiben kan akımının yeniden sağlanması iskemi reperfüzyona bağlı miyokard hasarını ortaya çıkarmaktadır. Reperfüzyon, iskeminin tek başına oluşturduğu hasardan çok daha fazla hasar oluşturabilir (46). İskemi, çoğu durumda, koroner damar lümenindeki aterosklerotik plağın trombotik oklüzyonundan kaynaklanmaktadır. Postmortem



çalışmalarda hasara uğramış aterosklerotik plak ile ilişki intrakoronar trombüs gösterilmiştir (20). İlginç olarak, plak rüptürü ve koronar trombozun hafif düzeydeki darlıklarda gelişebildiği de gösterilmiştir (20). Nadiren koronar arter hastalığı olmasa bile uzamış koronar spazma bağlı olarak miyokard infarktüsü gelişebilir, genellikle kokain kullanımı ve emosyonel stres ile ilişkili bir durumdur.

İskemiye verilen metabolik yanıt oldukça karışık olup iskeminin tipine bağlıdır. İskemi ve reperfüzyonun süresine bağlı olarak 3 düzeyde İR hasarı tanımlanmıştır (47).

**Hafif derece iskemi:** Deneysel çalışmalarda, koronar kan akımının % 20-30 azalması, mekanik için hızlı azalmasına, ATP ve kreatin fosfat konsantrasyonlarının azalmasına ve miyokardda laktat üretiminde net bir artış ile sonuçlanır. 30-90 dk içerisinde laktat üretimi azalır (48), miyokardiyal ATP düzeyleri kısmen düzelir (49), fakat kontraktil güç normale dönmez. Kan akımının normale dönmesiyle, miyokard kontraksiyonu normalleşir. Bu düzeydeki iskemi ile ortaya çıkan kontraksiyon bozukluğu “hibernasyon” olarak adlandırılmaktadır (50), azalan miyokardiyal kan akımına bağlı olarak miyokard canlılığını sürdürmek için oksijen sunumuna paralel olarak mekanik güç sınırlanır.

**Orta derece iskemi:** Kontraktil disfonksiyon gelişir ve miyokardın başlıca enerji kaynağı yağ asitleridir (51).

**şiddetli iskemi:** Koronar kan akımının > % 70 azalması, daha fazla laktat üretimine, glikojen yıkımına, şiddetli kontraktil disfonksiyona neden olur, eğer iskemi süresi yeterli olursa miyokard nekrozu ve infarktüsüne yol açabilir (51). Bu koşullar altında, dokuya glukoz sağlayacak kan akımı olmadığında ana glikolitik substrat glikojendir. Laktat çıkışı olmaz, hücre içi pH azalır, daha sonra fosfofruktokinaz (FFK) inhibisyonu nedeniyle glikoliz hızı azalır.

#### 4.1. İskemi reperfüzyon hasarında gelişen hücrenel olaylar

Miyokard iskemisiyle birlikte ortaya çıkan yetersiz oksijen sunumu ATP’ın yeniden sentez hızını destekleyemez, ATP azalırken ADP, inorganik fosfatlar ve

adenozin düzeyleri artış gösterir. Elektron transport zincirinde akım hızında ve NADH'den NAD<sup>+</sup> oluşumunda azalma vardır (37).

Aerobik ATP üretiminin azalması, kasılma ve sarkoplazmik retikulumda Ca<sup>2+</sup> pompası için gerekli ATP hidrolizinin azalması anlamına gelmektedir. ATP/ADP azalması, siklik adenzin monofosfat (cAMP), inorganik fosfat ve sitozolik Ca<sup>2+</sup> artışı glikolizi, glukoz "uptake"ini ve glikojen yıkımını uyarır (34, 37). Yüksek orandaki serbest yağ asidi oksidasyonu PDH aktivitesi üzerinde direkt inhibisyona (52) neden olarak glukoz oksidasyonunu baskılar ve iskemik hücrelerde laktat ve proton birikimine yol açar. Artan laktat ve proton içeriği ile birlikte hücre içeriğinde pH'ın düşmesi miyokardın kasılma fonksiyonunun bozulmasına yol açar (53). İskemi sırasında, glikoliz ile üretilen pirüvat mitokondride okside edilemez ve sitozolde laktata dönüşür, dokuda laktat birikimi hücre içi pH'da azalmaya neden olur. Otuz dakikalık iskemi sonrası hücre için H<sup>+</sup> iyon konsantrasyonu belirgin olarak artar ve pH 5.5-6.0 düzeyine kadar geriler, glikolitik enzimlerin aktivitesi baskılanır ve glikolitik akış azalır (24, 54). Hücre içi pH'ın azalması, kalp kasının Ca<sup>2+</sup> dengesini sürdürme yeteneğini ve kontraktıl güç için ATP yıkımından gelen enerjinin kullanılmasını bozar. Bu durumda sarkoplazmik retikulumdaki Ca<sup>2+</sup> pompası için ATP gereksinimi artar (55) ve iskemi sırasında benzer düzeyde kontraksiyon için gereken Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu artış gösterir (61). Düşük pH'da, miyositlerde Na<sup>+</sup> değişiminde daha fazla H<sup>+</sup> çıkışı olması sarkolemmal membranda Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> değiş tokuşunu tetikler ve Ca<sup>2+</sup> dengesinin sağlanması için daha fazla ATP harcanmasını gerekli kılar (56). Ayrıca beta oksidasyon sırasında uzun zincirli yağ asitlerinin birikiminin ventriküler aritmi eşiğini düşürdüğü (57) ve iskemi sırasında diyastolik fonksiyon bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir.

İskemiye bağlı olarak NADH düzeyleri yükselirken, iskemi sırasında hücrede NADPH düzeyleri azalır ve NADPH/NADP oranının anlamlı olarak azalmasına neden olur (24). İskemik miyositlerde NADPH düzeylerindeki azalma, oksidatif stres durumlarında okside glutasyon düzeylerinin sağlanmasında rol oynayan glutasyon peroksidaz için NADPH gereksimi olmasına bağlanabilir (24).

Miyositlerde sitozolik Ca<sup>2+</sup> artışının zararlı etkileri vardır. Yüksek Ca<sup>2+</sup> düzeyleri, kalbin normal kontraktıl aktivitesinden önce miyositlerin kasılmasına

neden olabilir. Ayrıca, kalpain ve katepsin gibi çeşitli proteazları aktive ederler (58).

Kalpain ve katepsin aktivasyonu, miyositlerin apoptotik ve nekrotik yolla kaybına neden olduğu için önemlidir (59).

#### **4.2. İskemi reperfüzyon hasarının mekanizmaları**

İskemi reperfüzyon hasarının altta yatan patofizyolojik mekanizmaları tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Reperfüzyonun ilk dakikalarında serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimi (60) ve hücre içi kalsiyum yüklenmesi gibi faktörleri suçlanmıştır (61). Reperfüzyon hasarının patofizyolojisinde, trombosit ve nötrofil aracılı hasar, renin anjiyotensin sistemi ve kompleman aktivasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir.

##### **4.2.1. Serbest oksijen radikalleri**

Oksijen; sekiz atom numaralı, doğada dioksijen ( $O_2$ ) olarak bulunan kararsız bir elementtir ve kararsız durumu enerji düzeylerinde bulunan elektronların yapısına bağlıdır. Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip son orbitali önemlidir (62). Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönlerde döndüğünde “singlet” oksijen oluşur. Orbitalden birine ters dönüşlü bir elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron gelirse ‘oksijen radikali’ elde edilir (63).

Kalpte, mitokondriyal solunum, aktive nötrofiller ve bazı türlerde ksantin oksidaz aktivitesine bağlı olarak serbest oksijen radikalleri ortaya çıkabilir. Reperfüzyonun erken döneminde oksijen radikallerinin ortaya çıkması ile birlikte antioksidan aktivitenin azalması miyokardı hasara hassas hale getirir (63). Membranlar, çoğunlukla fosfolipid ve proteinden oluşur.

Serbest radikallerin proteinler, lipidler, nükleik asitler ve DNA üzerine etkileri vardır. Serbest radikallerin en iyi tanımlanmış etkileridir. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve membranda bulunan poliansatüre yağ asidlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır (63). Süperoksid radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerdir (64). Lipid peroksidasyonu bir zincir

reaksiyonu olup daha ileri peroksidasyonunu başlatan serbest radikaller için sürekli bir kaynak sağlar. İşlevleri başlatan moleküler ön madde genelde hidroksi peroksid ürün ROOH olduğundan, lipid peroksidasyonu potansiyel olarak yıkıcı etkilerle dallanan bir zincir reaksiyonudur (65). Lipid peroksidasyon reaksiyonları genel olarak iki tiptir;

a) Non enzimatik lipid peroksidasyonlar; Poliansatüre yağ asidindeki metilen karbonundan hidrojen atomunun uzaklaştırılması reaksiyonlarını kapsar.

b) Enzimatik lipid peroksidasyonu; Siklooksijenazlar ve lipoksijenaz reaksiyonları sonucunda oluşan hidroksi peroksid ve endoperoksidler, enzimatik reaksiyon ürünleridir. Reaksiyon ısıık veya metal iyonları ile başlatılır. Malondioksit sadece omega-3 veya daha fazla çift bağlı yağ asitleri tarafından oluşturulur ve omega-6 yağ asitlerinin son kısmındaki 5-karbondan meydana gelen pentanla birlikte lipid peroksidasyonunun ölçümünde kullanılır. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak malondialdehit (MDA) oluşur. MDA hücre zarından kolay difüze olur (66).

Büyük miktardaki serbest oksijen radikalleri, vücudun endojen antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aşar. Membran lipidlerinin peroksidasyonuna, membran bütünlüğünün kaybına ve nekroz ile hücrenin ölümüne yol açar (67). İskemiye reperfüzyon izlemiyorsa veya oksijen radikalleri spesifik “scavenger”lar ile inaktive ediliyorsa lipid peroksidasyonu izlemez (68). Antioksidan ajanların kullanımı lipid peroksidasyonuna engel olur. Glutatyon, N-asetil sistein ve merkaptopropionil glisin gibi tiyol moleküller, hipoklorik asit (HOCL) tarafından kolayca okside olurlar ve oksidatif hasara karşı proteinleri etkili biçimde korumuş olurlar.

Serbest oksijen radikalleri, endotelden trombosit aktive edici faktör salınımına neden olarak nötrofilleri aktive eder (69) ve radikallerin üretimine ve reperfüzyon hasarının şiddetlenmesine neden olur.

#### 4.2.2. Kalsiyum yüklenmesi

Hücre içi kalsiyum dengesindeki değişiklikler, reperfüzyon hasarı gelişiminde önemli role sahiptir. Shen ve Jennings, (70) ilk kez tavşanlarda geçici koroner arter oklüzyonu sonrası miyokardiyal reperfüzyonun dokuda  $Ca^{2+}$  birikimine

neden olduğunu göstermiştir. İskemi ve reperfüzyon, hücre içinde kalsiyum birikimi ile ilişkilidir. Bu etki, hücre içi sodyum birikimine bağlı olarak L tipi kalsiyum kanallarından artmış sarkolemmal kalsiyum girişi ile ilişkilidir (71).

Reperfüzyon hasarında, hücre içi kalsiyum artışının miyofilamanların kalsiyuma duyarlılığında değişikliğe neden olduğu saptanmıştır. Reperfüzyonun ilk dakikalarında, miyokardiyum kontraktür gelişimi ile hasara uğrayabilir ve kontraktür kalbin tamamını etkiler. Reperfüzyona bağlı kontraktür, kalsiyum yüklenmesine bağlı olabileceği gibi rigor tipi kontraktür de olabilir (72).

Ayrıca hücre içinde kalsiyum artışı ile fosfolipaz A<sub>2</sub> gibi enzimleri indüklenmesi sonucu hücre membranı lipidleri yıkılmakta ve hücre hasarı oluşmaktadır (73).

#### 4.2.3. Renin anjiyotensin aracılı hasar

Yapılan çalışmalar anjiyotensin II'nin miyositler ve düz kas hücrelerinde hücre içi kalsiyum düzeylerini artırdığı ve bunun sonucunda diyastolik fonksiyon bozulması ile koroner vazokonstriksiyon oluşturarak patofizyolojik koşullar altında miyokard hasarına sebep olduğunu göstermiştir (74).

#### 4.2.4. Nötrofil aracılı hasar

Reperfüzyondan kısa süre sonra hasarlı miyokard alanında polimorfonükleer nötrofil aktivasyonu ve birikimi meydana gelir (75). Nötrofiller, serbest oksijen radikalleri, proteazlar ve diğer nötrofillerin infiltrasyonunu arttıran proinflamatuvar mediyatörlerin salınımına neden olarak hasarına katılır (76).

#### 4.2.5 Trombosit aracılı hasar

İskemi-reperfüzyon sonrası trombosit aktivasyonu meydana gelmektedir. Bu aktivasyon sonrası oluşan mikroemboliler özellikle mikrovasküler dolaşım bozukluğuna sebep olmaktadır. Trombositlerden salınan tromboksan A<sub>2</sub> ve serotonin, trombozis ile mikrovasküler konjesyona yol açarak koroner akımı bozmaktadırlar (77).

#### 4.2.6. Kompleman Sistemi

İskemi reperfüzyon sırasında kompleman sistemi aktive olur. Bu durum, anafilotoksinler olarak adlandırılan C3a, C4a ve C5a gibi kompleman

kompleksinin terminal kısmının oluşmasına yol açar ve hücre membranında depolanırlar. Kompleman faktörleri, hücre permeabilitesini artırarak veya histamin, trombosit aktive edici faktörlerin salınımına neden olarak hücreyi hasara uğratabilirler. Özellikle, C5a, nötrofiller ve süperoksit üretimi için güçlü bir uyarandır (70).

#### 4.2.7. Apoptozis

Apoptozis, programlı hücre ölümü anlamına gelmektedir. Hücre membranındaki ölüm reseptörlerinin (FAS, TNFR1, DR3,4,5) aktive olmasını takiben sitoplazmada bulunan faktörlerin (Bcl 2 ailesi, p53) aktifleşerek mitokondriyi etkilemesi, mitokondriden salınan sitokrom c sayesinde kaspazlar aktifleşmesine bağlı olarak DNA fragmentasyonu ile hücre ölümü meydana gelmesidir (78). Miyokardiyal İR modellerinde reperfüzyon döneminden itibaren apoptozisin artarak devam ettiği (79), kaspazların aktivasyonu (80), p53' ün rolü (81) ortaya konmuştur.

#### 4.3. İskemi reperfüzyona bağlı miyosit ölümü

İskemi reperfüzyona bağlı hücre ölümü, nekroz veya apoptozis şeklinde ortaya çıkar (82, 83).

a) Nekroz: Organel/hücre şişmesi ve membran rüptürüne bağlı hücre ölümü şeklindedir.

b) Apoptozis: Kaspaza bağlı veya kaspazlardan bağımsız şekilde kromatin yoğunlaşması ve hücre büzüşmesinin izlendiği programlı hücre ölümü şeklindedir. İskemi reperfüzyona bağlı hücre ölümünün her iki şekilde de ortaya çıktığı gösterilmiştir (84, 85).

İskemi reperfüzyona bağlı olarak, serbest oksijen radikalleri (SOR) üretimi, kalsiyum yüklenmesi, iyonik dengesizlik, ATP üretiminin azalması ve hücre içi pH azalması hücre hasarına katkıda bulunan önemli faktörlerdir. Mitokondriler sadece ATP üreten organeller olmayıp nekroz ve apoptozisin tetikleyicisidir (86). Mitokondrileri hücre ölümüne bağlayan ana faktör, mPTP açılmasıdır. Bunlar, multiprotein kompleksler olup iç mitokondri membranında selektif olmayan porlar oluştururlar. İskemi reperfüzyon sırasında, asidoz, Ca<sup>2+</sup> yüklenmesi, SOR üretimi mPTP açılma riskini artırır (85).

Bu porların uzun süre açık kalması mitokondri matriksine su girişine, mitokondrinin şişmesine ve dış mitokondriyal membranın rüptürüne neden olur (85). Ayrıca bu porların uzun süre açık kalması ve/veya dış mitokondriyal membranın rüptürü sitokrom c ve apoptozis indükleyici faktör (AIF) gibi proapoptotik moleküllerin salınımına yol açar (86). Her iki molekül, apoptotik süreçte miyosit ölümüne neden olabilir (85, 86).

#### **4.3.1. Kardiyovasküler sistemde apoptozis**

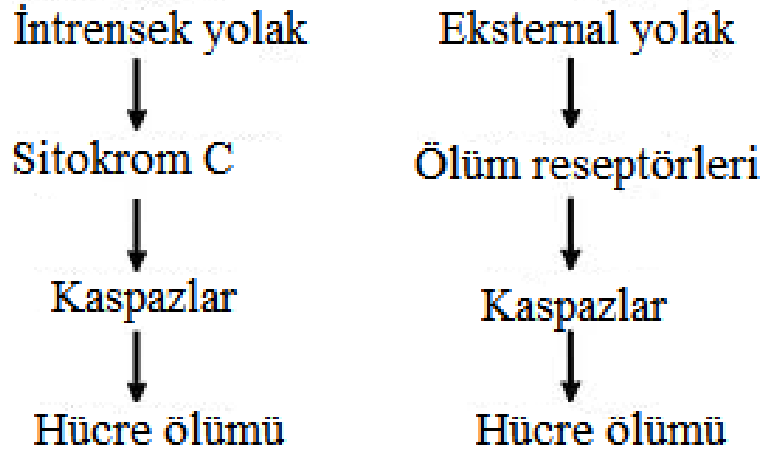
Apoptozis, patolojik veya fizyolojik uyaranlara cevap olarak tamamen sağlıklı hücrelerin veya subletal hasara uğramış hücrelerde ortaya çıkan ileri derecede kontrol altında olan bir hücre ölümü şeklindedir. Burada kompleks biyokimyasal olaylar serisini takip ederek, inflamasyon olmaksızın hücrenin ölümü gerçekleşir (82). Nekroz ise apoptozisten farklı olarak fatal dış uyaranlarla ortaya çıkar ve hücre içeriğinin dışarı çıkışı ve inflamasyon ile sonuçlanır (87). Nekroz, iskemik hücre ölümünün prototipidir, klinik olarak miyositlerin sitozolik içeriğinin salınımının (CK-MB, troponinler ve diğer proteinler) saptanmasıyla tespit edilebilir, apoptozis ise özellikle son dekada kardiyovasküler sistemin etkiler çeşitli akut ve kronik durumların patogeneğinde vurgulanmıştır (88).

#### **4.3.2. Apoptozisin düzenlenmesi**

##### **Ölüm reseptörleri yoluyla**

Çok sayıdaki uyaran apoptozisi tetikleyebilir, ancak damar hastalıklarında hücre içerisindeki değişiklikler uyaranlara karşı hassasiyeti değiştirebilir. Kan akımının azalması sonrasında NO ve “shear” strese bağlı olarak yeniden şekillenme apoptozisi tetikleyebilir. Buna karşın, aterosklerozda veya anevrizmada damar düz kas hücrelerindeki apoptozis, yüzey ölüm ligandları veya proapoptotik sitokin sekrete eden inflamatuvar hücreler tarafından oluşturulur. Uyaran ne olursa olsun, apoptozisi oluşturan sinyal yolağı benzerdir. Apoptozisin düzenlenmesi internal ve eksternal yolak olmak üzere başlıca 2 major yola ayrılabilir (Şekil- 3) (89).

# APOPTOZİS



Şekil-3: Apoptozisin düzenlenmesi

### 4.3.3. İskemik ve reperfüze olan miyokardda apoptozis

Miyokard iskemisi, koroner kan akımının azalmasına bağlı olarak miyokardın oksijen isteminin, miyokarda oksijen sunumunu aştığı durumda ortaya çıkar (90). Reperfüzyon, iskemik vasküler yatakta kan akımının tekrar sağlanmasıdır. İskemik miyokard veya reperfüze miyokarda izlenen apoptozis, özellikle reperfüzyona bağlı olarak gelişir. Gottlieb (91), ilk kez deneysel miyokardiyal İR modelinde apoptozisi değerlendirdi ve tavşanlarda 30 dakika iskemiye takiben 4 saatlik reperfüzyon uygulandığında miyosit ve endotel hücrelerinde apoptozis geliştiğini gösterdi. Endotel hücrelerinin kaybı daha önce gerçekleşir ve miyosit apoptozisine zemin hazırlar (92). Bu nedenle endotel hücrelerinin kurtarılması hayati öneme sahiptir. Fliiss ve Gattinger (79), sıçanlarda 45 dakikalık miyokard iskemisini takiben 60 dakika reperfüzyon oluşturulduğunda reperfüzyonun apoptozisi artırdığını göstermiştir, iskeminin devam ettiği dokularda apoptozisin daha yaygın olduğu, reperfüzyonun apoptotik hücre sayısını azalttığı da belirlenmiştir. Freude (93), köpeklerde 90 dakikalık sonrası 6 saat reperfüzyon sağlandığında apoptozisin ortaya çıktığını bildirmiştir. Doku kesitlerinde apoptozisin tespiti için TUNEL yöntemi kullanılmıştır, bu yöntemde apoptozis için spesifik olan parçalanmış DNA'nın serbest 3 – hidroksi uçları enzimatik yolla modifiye nükleotidlerle işaretlenir (94). Ancak DNA parçalanması geç bir olay olduğu için İR durumunda kalplerdeki bazı miyositlerde henüz apoptotik süreç



tamamlanmamış olduğu için apoptozis belirlenemeyebilir. Apoptozisin doğru olarak tespiti için TUNEL yöntemine ilave olarak DNA fragmentasyonundan önceki değişiklikleri gösterecek yöntemler daha yararlı olabilir. Bu açıdan kaspaz aktivasyonu, apoptozisin saptanması için önemli bir basamaktır (95). Bir çalışmada, iskemi sonrasında miyositlerde sadece kaspaz-3 parçaları saptanırken (96), reperfüzyon sonrası ise TUNEL pozitifliği ile birlikte kaspaz-3 parçalarının belirlenmiştir (92). İskeminin apoptozisi başlatmak için yeterli olduğu, reperfüzyonun ise DNA parçalanmasına giden sürecin tamamlanması için gerekli olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

#### 4.3.4. Hücre ölümünün değerlendirilmesi üzerindeki tartışmalar

Apoptozis ve nekrozun miyokardiyal İR hasarına katkılarının belirlenmesi tedavinin yönlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Apoptozis ilgili farklı araştırmacılardan farklı sonuçlar gelmektedir. Deneysel çalışmaların sonuçları farklı hayvan türlerinden gelmektedir. Ayrıca apoptotik değişikliklerin ortaya çıkması için yeterli bir sürenin geçmesi gereklidir. Suzuki'nin erişkin miyosit kültüründe yaptığı çalışmada miyositlerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e maruz bırakılmasından DNA parçalanmasına kadar geçen sürenin 14 saati bulduğu gösterilmiştir (97). Çalışmalarda değerlendirme zamanı nedeniyle apoptozis beklenenden daha düşük oranda saptanabilir. İskeminin şiddetine göre belirlenen ve oluşturulan ATP eksikliği hücre ölümünü belirleyen başlıca faktördür (98). Enerjinin tama yakın olarak sağlanmadığı durumda nekroz izlenirken, daha az düzeydeki durumlarda apoptozis tetiklenir (99). Doku kesitlerinde apoptotik hücre ölümünün düşük bulunmasının sebeplerinde birisi de pozitif hücrelerin belirlenmesi için sadece parçalanmış DNA saptanmasına yönelik tetkiklerin kullanılmasıdır. Takemuro, TUNEL yönteminin negatif olduğu durumlarda diğer tetkiklerle apoptozisi gösteren morfolojik özelliklerin saptanabileceğini göstermiştir (100). Buna karşın TUNEL yönteminin pozitif olduğu çeşitli durumlarda miyositlerin onkotik olabileceği veya DNA replikasyonu gösteren hücrelerin saptanmış olabileceği de gösterilmiştir (101).

#### 4.3.5. İskemi reperfüzyonda miyokard disfonksiyonu

Kalpdeki programlı hücre ölümü, diğer hücre tiplerinde ortaya çıkanlarla benzer özellikler taşır. Reseptöre bağlı sinyal yolağı ile mitokondriyal yolun ölüme katkıda bulunduğu gösterilmiştir (102). Hücrede enerji gereksiniminin sağlanmasında mitokondrilerin rolü düşünüldüğünde kardiyak fonksiyonların korunmasında mitokondrilerin ne kadar önemli olduğu ortaya çıkar. Normal şartlarda mitokondriler ATP sağlarken, kalsiyum dengesinin sağlanmasında da rol alır. Ancak iskemi durumunda mitokondriler önemli bir SOR kaynağı haline gelir ve kaspaz 9 aktivasyonu için gerekli olan sitokrom c salınımına neden olabilir (113).

#### 4.3.6. Devamlı şiddetli iskemi durumunda apoptozis

Hücre membranında fosfotidil serinin membranın iç kısmından dış kısmına translokasyonu, apoptozise giden hücrelerin iyi tanımlanmış immünolojik bir özelliğidir, spesifik fosfotidil serin reseptörüne sahip fagositik hücreler, apoptozise giden hücreleri fagosite ederler (104). Hücre içi cisimlerin birikimi nedeniyle, apoptozis ve nekroz kolaylıkla ayırd edilmesine karşın apoptotik cisimlerin fagositler tarafından yavaş uzaklaştırılması veya uzaklaştırılmasındaki defekt, saatler içinde bu cisimlerin sekonder nekroze gidişi ile sonuçlanır. Bu durum uzun süreli şiddetli iskemiye maruz kalan miyositlerde gerçekleşir. Kajstura (105), sıçanlarda Mİ modelinde 20 dakikadan 7 güne kadar devam eden koroner oklüzyon sonrası apoptozis ve nekrozun infarkt büyüklüğüne etkisini değerlendirmiştir ve ilk kez apoptozisten nekroze geçişi göstermiştir. 2 saatlik iskemi sonrasında, sol ventriküldeki infarkt alanında 2.7 milyon hücre apoptotik hale gelir, buna karşın sadece 90.000 hücre nekrotik durumdadır. Apoptotik hücrelerin sayısı 4.5 saatte zirve düzeyine ulaşır, nekroz ise koroner ligasyondan 1 gün sonra en üst düzeye çıkar. Apoptotik hücre ölümünün infarkt hacmine katkısının % 86'ya kadar ulaştığı gösterilmiştir, infarkt alanında apoptotik hücrelerin özellikle iskeminin geç dönemlerinde nekroza ait özellikler gösterdiği de vurgulanmıştır. Akut Mİ ile kaybedilen hastalarda otopsilerde, kalp dokusunda apoptozis ve nekrozun geçiş dönemine ait bulgular izlenmiştir (106). Apoptotik hücre ölümü sadece infarkt alanının merkezinde izlenmez, hipoperfüze infarkt sınır alanları (santral infarkt alanı ile canlı miyokard dokusu arasındaki alan) ile

infarktın uzak normal miyokard dokusunda da saptanır (8, 107). İnfarkt sınırındaki miyositlerin % 12'sinde TUNEL yöntemi ile kantitatif olarak apoptozis gösterilmiştir, uzak miyokard alanlarındaki hücrelerin ise % 1'inde apoptozis saptanmıştır, apoptozisin, akut koroner oklüzyon sonrası, miyosit ölümünün yayılmasına neden olarak AMİ'nü komplike hale getiren önemli bir durum olduğu anlaşılmıştır (8).

Hayvanlarda İR modellerinden elde edilen veriler, iskemik ventrikülün canlı kısımlarında görülen apoptotik hücre ölümünün iskeminin süresine ve infarkt büyüklüğüne bağlı olduğunu göstermektedir. Köpeklerde, mikrosfer injeksiyonu ile küçük koroner arterlerin embolisine bağlı oluşturulan multipl infarktlar (108) ve sıçanlarda koroner oklüzyon ile oluşturulan büyük infarktüsler ciddi kalp yetersizliğine neden olur, eski infarkt alanını çevreleyen canlı miyokard bölgesinde TUNEL pozitif miyositlerin varlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Tavşanlarda, 30 dakikalık iskemi sonrası reperfüzyon sağlandığında kısmen ufak miyokard infarktüsünün ortaya çıktığı ve kalp yetersizliği bulgusunun olmadığı saptanmıştır. Kurtarılmış miyokard alanlarında TUNEL pozitif hücrelere seyrek olarak rastlanmıştır (109).

#### **4.3.7. Miyokard infarktüsü sonrası yeniden şekillenme ve apoptozis**

Miyokard infarktüsünü takiben akut inflamatuvar yanıt sırasında, nekrotik alan nötrofil ve makrofajları içeren çeşitli inflamatuvar hücreler tarafından işgal edilir. Bu hücreler, miyofibroblast, makrofajlar ve endotel hücrelerinden oluşan granülasyon dokusu ile yer değiştirir ve kalıcı skar oluşumu ile sonuçlanır.

Miyokard infarktüsü sonrası kalbin iyileşmesine yol açan histolojik olayların gelişimi insanlarda ve hayvanlarda ortaya konmuştur (110). Takemura (111), hasarlı miyokardın onarımının akut ve subakut döneminde ortaya çıkan çeşitli hücre gruplarının ortadan kaldırılmasında apoptotik hücre ölümünün önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak endotel apoptozisinin, damarların progresif olarak kaybına neden olduğu ve iyileşen miyokard alanına kan akımının azalmasına katkıda bulunduğu izlenmiştir, miyofibroblast apoptozisinin sonuçları tartışmalıdır. Miyofibroblastlar, fibroblastlar ve düz kas hücresi özellikleri gösteren insanlarda ve sıçanlarda saptanmış hücrelerdir. Başlıca özellikleri

kollajen sentezi olmasına rağmen, kontraksiyon özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir (112).

Miyokard infarktüsü sonrası, sol ventrikülün yeniden şekillenmesinde miyosit apoptozisi araştırılmıştır ve apoptozis hızının yeniden şekillenme ile korele olduğu belirlenmiştir. Palojoki (112), sıçanlarda koroner oklüzyon sonrası (1-4 hafta sonra), infarktten uzak miyokard alanlarındaki sol ventrikül diyastolik çapları ile miyosit apoptozisi arasında korelasyon olduğunu bildirmiştir. İnsanlarda küçük sayıda bir hasta popülasyonunda, Mİ sonrası 10-62 gün içinde ölen hastalarda yapılan postmortem çalışmada infarkt alanı ve uzak alanlardaki miyosit apoptozisinin sol ventrikül dilatasyonu ve infarktten uzak miyokardın incilmesiyle ilişkili olduğu saptanmıştır (113).

#### **4.3.8. İskemi reperfüzyon hasarında in vivo olarak miyosit apoptozisinin gösterilmesi**

Apoptotik hücreler, iki tabakalı lipid membranın iç kısmından dış kısmına doğru fosfotidil kalıntılarının yeniden dağılımı göstermektedir (104). Apoptotik hücrelerdeki bu olay DNA parçalanmasından daha erken ortaya çıkan bir işlemdir. İn vitro (104) ve in vivo (114) çalışmalarda insan anneksin V proteininin, fosfotidil serine yüksek afinite ile bağlandığı gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında, apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesi için, sıçanda akut kardiyak allogreft rejeksiyonu modelinde anneksin V tek başına veya teknisyum 99m bile birlikte injekte edilmiştir (115). Sintigrafik görüntüleme radyoaktif işaretli anneksin V “uptake”inde belirgin artış izlenirken, antianneksin V immün boyama nekroz ve apoptozis ile ilişkili olarak çok sayıda miyositte pozitif olarak saptanmıştır. Bu bulgular, anneksin V’in apoptozise spesifik olmadığını, anneksin V’in nekrotik hücrelerin hasarlanmış membranından geçerek hücre içinde yerleşen fosfotidil serin kalıntılara bağlandığını göstermiştir. Dumont, sıçanlarda İR modelinde miyosit ölümünün belirlemek için etiketli insan rekombinant anneksin V’i ilk kez kullanmıştır (116). On beş dakikalık iskemi ve 30 dakikalık reperfüzyon sonrasında kardiyak hücrelerin % 1.4’ünde anneksin V pozitif saptanmış, reperfüzyon süresi 90 dakikaya çıktığında oranın % 411 oranında arttığı görülmüştür. Önemli bir günlük klinik durumlarda in vivo olarak apoptotik hücre ölümünün saptanmasıdır. Hofstra ve arkadaşları (117), AMİ geçiren ve primer

anjyoplasti uygulanan 7 hastadan 6'sında reperfüzyon sağlamıştır ve reperfüzyonun erken evrelerinde infarkt alanında teknisyum 99m işaretli anneksin V "uptake"inin arttığını göstermiştir.

#### 4.3.9. Kalpte apoptozisin fonksiyonel sonuçları

İskemi reperfüzyonu takiben, kalpte ortaya çıkan hasarın oluşumunda apoptozisin rolü ayrıntılı olarak incelenmiştir. Kaspaz inhibisyonu (118), selektif sistein proteaz inhibitörleri (102), primer ve sekonder kaspaz aktivasyonunun farmakolojik modülasyonu, antiapoptotik bcl-2 gen over ekspresyonu ile mitokondriyal koruma (119), TNF-a inhibisyonu ile ölüm reseptörleri aracılı yolun azaltılması (120), apoptotik sinyal yollarında genetik mutasyonların oluşturulması (121) ile İR hasarında apoptozisi inhibe ettiği ve iskemi sonrası dönemde miyokardın iyileşmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Apoptozisin erken evrelerinde, işlemin tamamlanmasından bağımsız olarak kardiyak disfonksiyon gelişebilir. Örneğin kaspaz aktivasyonu, TUNEL (130) yöntemi ile DNA parçalanmasının saptanmasından evvel, miyofibriller protein yıkımı, ATPaz aktivitesinin azalması ve kontraktıl disfonksiyon ile ilişkilidir. Kısa süreli iskemi dönemlerinde kaspaz aktivasyonu saptanır (92, 96). Apoptotik sürecin tamamlanmasından önce ve nekrotik hücre ölümünden bağımsız olarak miyofilaman yıkımı ile kontraktıl disfonksiyona yol açar. Kalpte, mitokondriyal ATP üretiminin önemi düşünüldüğünde kaspaz aktivasyonunun mitokondriyal solunumu ve enerji üretimini etkileyeceği ortaya çıkar (122).

#### 4.3.10. Artan apoptozis/nekroz oranı iskemi sonrası inflamatuvar yanıt düzenler

Nekroz ve apoptozis, biyokimyasal, morfolojik ve etkilenen dokudaki özellikler açısından tamamen farklı olaylardır. Bir hücrenin nekroza gitmesiyle hücre membranı hasarı sonucu sitozolik içereğin salınması lökosit ve fagosit infiltrasyonu ile karakterize inflamatuvar reaksiyona yol açar (96, 103). Buna karşın apoptozis membrana bağlı apoptotik cisimlerin oluşumu ile karakterizedir, makrofaj ve komşu hücreler tarafından çevrelenir ve inflamatuvar reaksiyona neden olmaz. Reperfüze miyokard alanında inflamatuvar yanıtın ortaya çıkması

miyokard hasarını arttırabilir. Lökositlerden salgılanan preteolitik enzimler, normal hücreleri hasara uğratar, nekrotik alanda doku kaybına neden olarak konnektif dokunun zayıflamasına sebep olur (93, 103). Fibrotik doku gelişiminden evvel infarkt alanının orantısız incilmesi ve dilatasyonu, infarkt ekspansiyonu olarak adlandırılan komplikasyonun gelişimiyle sonuçlanır (123).

## **5. Apoptozis için tedavi yaklaşımları**

Miyositlerde apoptozisin önlenmesi önemli bir tedavi yaklaşımıdır. Pek çok ajan hücre ölümünü engellemeksizin apoptozisin biyokimyasal ve morfolojik olarak önlenmesinde etkili olmaktadır. Hücre ölümünü geciktirmek, hücrenin daha sonra nekroza ve eşlik eden inflamasyona neden olmasıyla zararlı olabilir. Buna karşın bazı çalışmalarda apoptozisin önlenmesinin yeniden şekillenmeyi ve infarkt sonrası kontraktiletiyi düzelttiği gösterilmiştir (124).

Apoptozis, sinyal yolağındaki pek çok noktada kesintiye uğratılabilir. Apoptotik hücre ölümünün önlenmesi;

- a. Uyarının inhibe edilmesi/önlenmesi,
- b. Ölüme neden olan düzenleyici mekanizmaların inhibe edilmesi,
- c. Apoptozise giden yolların inhibe edilmesi ile sağlanabilir.

İskemi sırasında çok sayıda sinyal yolağı aktive edilir. Tek yolun inhibisyonu apoptozisin önlenmesinde yeterli olmayabilir, diğer yollar apoptozisi indükleyebilir. Çok sayıda noktayı etkileyen mediyatörler, apoptozisin önlenmesi için daha iyi bir hedef olabilir. Özellikle kalbi etkileyen apoptotik uyarının selektif olarak inhibe edilmesi daha efektif olacaktır.

## **6. Serum M30 ve M65 düzeyleri**

Apoptozis sırasında, çeşitli hücre içi proteinleri kaspaz adı verilen enzimler tarafından yıkılır. Sitokeratin 18 (M30 antijeni) olarak adlandırılan filaman, apoptozis sırasında erken dönemde yıkılır, canlı ve nekrotik hücrelerde saptanmamaktadır (125). Monoklonal bir antikör, M30, yıkıma uğratan sitokeratin 18'i spesifik olarak tanıır. Buna karşın yıkıma uğramayan sitokeratin18 (M65 antijeni) nekroz sonrasında sitozolik havuzdan salınır. Çeşitli çalışmalarda farklı hücre ölümü şekillerinin belirlenmesinde sitokeratin 18'in farklı formlarının (M30, apoptozis antijeni ve M65 nekroz antijeni) klinik yararını

göstermektedir (126). İlginç olarak sitokeratin 18, endotel hücrelerinde, kardiyak mikrovasküler yapıda saptanmıştır ve iskemik kalp hastalığı olan kişilerde bu moleküle karşı yüksek titrede antikolar saptanmıştır (127, 128). Yakın zamanda, Adlbrecht ve arkadaşları (129), miyokard infarktüsü geçirmiş hastalarda, koroner oklüzyon düzeyinde M30 düzeylerini anlamlı olarak arttığını göstermiştir.

## 7. S100B

S100B, 20 kDa ağırlığında, spesifik dokular tarafından eksprese edilen kalsiyum bağlayıcı bir proteindir (130, 131). Santral sinir sistemini oluşturan astrositler, nöronal alt gruplar ile iskelet kası hücrelerinde eksprese edilir (131). S100B, hücreler arasındaki etkileşimle parakrin (mikroglia) veya otokrin (astrositler) olarak salınabilir ve düzeyine bağlı olarak trofik veya apoptotik sonuçlara yol açar (122). Normal şartlarda S100B, miyokarda eksprese edilmez. Tsoporis ve arkadaşları (130) tarafından miyokard infarktüsünü takiben kalpte S100B sentez edildiği gözlenmiştir. Bu özellikle trofik uyarılara miyositlerin cevap verdiği periinfarkt alanında saptanmıştır, sebebi de hücre çoğalmasını sınırlayan negatif “feedback” mekanizması olabilir (133). Miyokard infarktüsünün yapısal ve fonksiyonel sonuçları, yeniden şekillenme olarak adlandırılan sol ventrikül geometrisinin değişmesi ile ilişkilidir. Bu değişiklikler, nekroz, apoptozis, skar oluşumu, ventrikül dilatasyonu, infarktten uzak miyokard alandaki miyokardın hipertrofisi sonucunda ortaya çıkar. Uzak miyokard alandaki hipertrofi, alfa1 adrenarjik agonistler, Ag II, peptit büyüme faktörlerinin pozitif etkileri ve kalsinörin ile etkileşen protein, “mitojen activated protein kinaz-fosfataz-1”, S100B’nin negatif etkileri ile düzenlenir (133, 143). S100B’nin miyosit hipertrofisi üzerindeki etkileri bilinmemektedir, bu protein çok sayıdaki hücre içi hedeflere bağlanma yeteneğine sahiptir, hücre içindeki S100B’nin kinaz substratlarının fosforilasyonunu inhibe etme yeteneği olduğu gösterilmiştir (131, 135). Hücre dışı S100B, sıçanlarda miyoblastların miyojenik farklılaşmasını, miyozin ağır zinciri içeren (p38 kinaz inaktivasyonu ile) çeşitli miyojenik farklılaşma belirteçlerini inhibe eder (136). S100B, MI sonrasında miyokarda apoptozisin düzenlenmesinde hasara uğrayan miyositlerden salınımından sonra RAGE ile etkileşimi sonrası sitokrom c salınımı ve proapoptotik kaspaz kaskadının aktivasyonu rol oynayabilir (137). İnfarkt sonrası durumda, oksidatif

stresle aktive olan yollarla etkileşim gösterebilir (137). Ayrıca RAGE'den bağımsız olarak belirlenmemiş bir reseptörü ile etkileşerek miyoblastlarda reaktif oksijen türlerinin üretimini uyararak ve prosurvival kinaz ERK1/2 inhibisyonu neden olarak apoptozisi indükleyebilir (138).

Ayrıca serum S100B düzeylerinin miyokard hasarıyla ilişkisi de değerlendirilmiştir. Kardiyak cerrahi sonrasında troponin I ile serum S100B düzeyleri arasında korelasyon izlenmiştir (139). Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde serum S100B düzeyleri ile miyokard hasarı arasında ilişki olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, izole kalp perfüzyonu modelinde, iskemik kalpten S100B salındığı gösterilmiştir. Bu salınımın, aşırı ekspresyona mı bağlı olduğu yoksa hasara uğrayan miyosit ve fibroblastlardan mı salındığı açık değildir. Bu deney modeli, iskemik kalbin, beyin dışında S100B kaynağı olabileceğini göstermiştir. Missler ve arkadaşları (140), yaptıkları çalışmada kardiyopulmoner bypass operasyonuna giden hastalarda erken dönemde S100B düzeyleri ile kardiyak hasarın belirteçleri arasında ilişki olduğunu göstermiştir.

## **8. İskemi sırasında enerji metabolizmasının farmakolojik olarak düzenlenmesi**

Geleneksel olarak miyokard iskemisi tedavisinde mitokondri fonksiyonlarının düzenlenmesi amaçlanmaktadır:

1. Arteriyel kan basıncı, kontraktilite, kalp hızının azaltılması ile kalbin iş yükünün böylece, miyokardiyal ATP üretimi ihtiyacının azaltılması ( $Ca^{2+}$  kanal blokerleri, B- reseptör blokerleri, nitratlar),
2. Vazodilatör ilaçlar ile miyokarda oksijen sunumunun artırılması
3. Revaskülarizasyon işlemleri ile gerçekleştirilir.

Bu yaklaşımlar, oksijen sunumu ile mitokondriyal ATP üretimi arasındaki dengesizliği indirekt olarak etkiler.

Reperfüzyon hasarının önlenmesinde çeşitli ajanlar kullanılmıştır. İn vitro ve invivo çalışmaların sonuçları, reperfüzyonun başlangıcında verilen tedavilerin yararlı olduğunu göstermiştir.

Alternatif bir yaklaşım, yağ asidi oksidasyonu inhibisyonu (trimetazidin) (141), ile iskemiye bağlı pirüvat oksidasyon bozukluğunun azaltılması, CPT-I inhibisyonu ile yağ asitlerinin mitokondriye girişinin engellenmesi (perfeksilin,



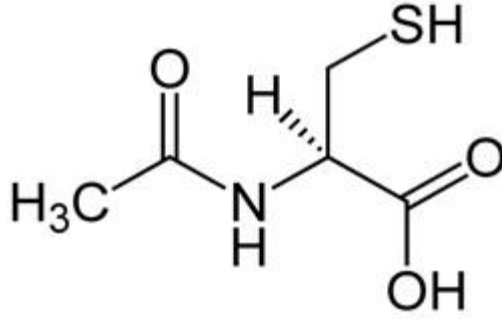
oksfenisin) (32) veya mitokondrilerde pirüvat oksidasyonunun uyarılmasıdır (142). Bu ajanların pirüvat oksidasyonunu artırdığı, iskemi ve/veya iskemi sonrası reperfüzyon döneminde laktat üretim hızını azalttıkları gösterilmiştir. Mitokondride NADH/NAD<sup>+</sup> ve asetil-CoA/serbest CoA oranlarını azaltarak PDH üzerinde inhibisyona neden olmaktadır. En büyük klinik tecrübeye sahip olunan trimetazidin, 3 keto açıl CoA-tiyolaz enzimini inhibe ederek, substrat kullanımını yağ asidinden glukoz kullanımına çevirmektedir (141). Trimetazidinin, kalp hızı, kontraktilite üzerinde etkisi olmadığı gibi koroner veya periferik vazodilatasyona neden olmaz ve anlamlı hemodinamik değişiklik oluşturmaz. Fizyolojik, patolojik veya ilaçlarla serbest yağ alımının ve/veya oksidasyonunun baskılanması miyokardın glukoz kullanımının artmasına neden olur (143). Miyokardın substrat kullanımını glukoz metabolizmasına yönlendiren tedavi girişimlerinin iskemik kalp hastalığında yarar sağlaması beklenmektedir.

### **8.1. Serbest oksijen radikali tutucuları ve antioksidanlar**

Deneyssel şartlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i yıkan enzim katalaz, süperoksit dismutaz, ksantin oksidaz inhibitörü allopürinol, demir şelasyonu yapan ferrokksamin, yanında C, E vitamini ve melatonin gibi antioksidan ajanlar çalışılmıştır. Canbaz ve arkadaşları (144) koroner “by-pass” ameliyatı sırasında aortik kros klamp sonunda intrakoroner E vitamini (100 mg) uygulamasının yararlı etkilerini göstermiştir. Buna karşın Lassnigg ve arkadaşları (145) tarafından kardiyak cerrahi sonrası 12. saat ile 2. gün arasında intravenöz E vitamini verilmesinin etkisi olmadığı saptanmıştır. Guan ve arkadaşları (146) allopürinolün (400 mg), kurtarıcı PTCA sonrasında İR hasarının önlenmesinde yararlı etkileri olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada allopürinol reperfüzyondan yaklaşık 60 dakika önce başlanmıştır, serbest oksijen radikallerinin oluşumunun inhibisyonunda ve sol ventrikül fonksiyonlarının korunmasında yarar sağlamıştır

### **8.2. N Asetil Sistein**

N-asetil sistein (NAS), glutatyon öncüsü olup, 30 yıldan uzun bir süredir mukolitik ajan olarak kullanılmaktadır. Mukolitik etkisine ilave olarak glutatyon düzeylerinin azaldığı, oksidatif stres ile karakterize çeşitli hastalık durumlarında da kullanılmıştır (147).



**Şekil-4:** N-asetil sisteinin kimyasal yapısı

N-asetil sistein, tiyol içeren bir bileşiktir, kimyasal formülü C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S'dir (Şekil-4) ve oral alımı takiben hızlı bir şekilde absorbe edilir. İnce bağırsak ve karaciğerde uğradığı ilk geçiş etkisi, NAS'ın çeşitli peptit zincirlerine bağlanmasına ve NAS metabolitlerinin ortaya çıkmasına neden olur (147). NAS molekülünün çok ufak bir kısmı plazmaya ve dokulara ulaşabilir. Oral alımı takiben 1 saatten kısa bir süre içerisinde zirve konsantrasyonuna ulaşır, plazma yarılanma ömrü 2.15 saattir (148). NAS'ın metabolik aktivitesinin büyük kısmı sülfidril gruplarına bağlıdır, amino grupları ise oksidasyona karşı daha stabil olmasını sağlar. Deneysel çalışmalar, NAS'ın oral biyoyararlılığının % 4-10 arasında olduğunu göstermiştir (148). NAS'ın biyoyararlılığını etkileyen en önemli faktörler, proteinler ile disülfid bağlar yapması ve intestinal mukoza ve lümende deasetilasyondur (149). Oral yolla alınan NAS'ın büyük kısmı metabolitlere dönüşür, serbest ve total NAS'e ilave olarak plazmadaki protein dışı, protein sülfidril gruplarını, düşük molekül ağırlıklı proteine bağlanan tiyol gruplarını artırır (148). NAS'ın aktivitesinin ve koruyucu etkisinin büyük bir kısmını NAS'ın bu metabolitleri meydana getirir.

Oral olarak uygulanan NAS'ın yararlı etkileri intraselüler sistein konsantrasyonunu ve önemli bir endojen antioksidan olan indirgenmiş glutatyonu artırmaya bağlıdır. NAS, sülfidril grubu kaynağı olarak glutatyon sentezini uyarır, glutatyon S transferaz aktivitesini artırır, detoksifikasyonu sağlar ve reaktif oksijen radikalleri üzerine direkt etkisi de vardır (150).

İnvitro ve invivo çalışmalar, NAS'ın hücre içi glutatyon biyosentezini arttırabilme yeteneği olduğunu göstermiştir. Hücre kültürü çalışmalarında, NAS'ın hücre içi glutatyon biyosentezi için kültür ortamından sistein "uptake"ini

sağladığı gösterilmiştir (151). İn vivo, NAS eritrositler, akciğer ve karaciğer (152) hücrelerinde glutatyon düzeylerini arttırabilir.

Sülfidril grupları, reaktif oksijen türevlerine karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır. NAS, güçlü bir hipoklorik asit tutucusudur ve hidrojen radikalleri ve hidrojen peroksidi indirgeme yeteneğine sahiptir (153).

NAS'ın çeşitli kardiyovasküler sistem hastalıklarında olası etkisi gösterilmiştir. Özellikle homosistein ve lipoprotein a (Lp a) düzeyleri üzerinde etkileri vardır, İR hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve nitrogliserinin etkinliğinin arttırdığı gösterilmiştir. Yüksek Lp a ve homosistein düzeyleri kardivasküler hastalık riski ile ilişkilidir. Gavish ve Breslow (154), Lp a düzeyleri yüksek olan hastalara 4 hafta boyunca 2 gram/gün, daha sonraki 4 haftada ise 4 gram/gün dozunda NAS verdiklerinde, Lp a düzeylerinde % 70 azalma olduğunu göstermiştir. Hücre kültüründe ise NAS'ın hücre içi homosistein seviyelerini azalttığı izlenmiştir (155). Wiklund ve arkadaşları (156), NAS'ın homosistein düzeylerini % 45 oranında azalttığını göstermiştir, ancak bu çalışmada NAS'ın Lp a düzeyleri üzerinde etkisinin olmadığı görüldü.

Deneysel çalışmalarda ve ilk klinik gözlemlerde NAS'ın AMİ'nde iskemi ve reperfüzyon hasarının tedavisinde yararı olabileceği saptanmıştır. Miyokard iskemisi genellikle hücre içi sülfidril gruplarının azalması ile karakterize bir durumdur, reperfüzyon oksidatif hasara neden olabilir. Deneysel koşullarda iskemiden 60 dakika önce başlanan NAS infüzyonunun dokudaki glutatyon içeriğini % 38 oranında arttırdığını göstermiştir (157). Akut miyokard infarktüsü geçiren hastalarda, NAS'ın streptokinaz ile birlikte verildiğinde oksidatif stresi azalttığı, daha hızlı reperfüzyon sağladığı ve sol ventrikül fonksiyonlarını koruduğu görülmüştür (158). Sochman ve arkadaşları (159), streptokinaz ve NAS (100mg/kg) ile tedavi edilen hastalarda tek başına streptokinaz ile tedavi edilen hastalara göre daha anlamlı sonuçlar elde etmiştir. Başka bir çalışmada (160) ise AMİ geçiren hastalar streptokinaz ile birlikte 15 gram NAS infüzyonu alan ve almayan olacak şekilde 2 gruba ayrılmıştır. NAS alan grupta, 4. ve 24. saatte oksidatif stresi gösteren plazma MDA düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu ve sol ventrikül fonksiyonlarının korunduğu izlenmiştir.

NAS'ın nitrogliserinin (NTG) koroner damarları dilate (161) edici etkisi ile antiplatelet etkisini güçlendirdiği (162), nitrogliserine tolerans gelişimini önlediği

de izlenmiştir. Horowitz ve arkadaşları, randomize çift kör bir çalışma da standart tedaviye yanıt vermeyen kararsız angina pectorisli hastalarda NTG ve NAS'ın birlikte verilmesinin AMİ sıklığını azalttığını belirledi (163). Bu kombinasyonun etkili olmasına rağmen % 35 oranındaki başağrısı bu tedavi stratejisinin kullanımını sınırlamaktadır.

### 8.3. NO-donörleri

İskemi reperfüzyon, eNOS ve NO'in azalmasıyla karakterizedir. Fizyolojik düzeylerdeki NO düzeylerinin sağlanması için organik nitratlar, sidininimler gibi NO donörü benzerler ve sistein içeren NO donörlerinin verilmesi mantıklı bir tedavi yaklaşımıdır. NO, vazodilatör, antioksidan, antiplatelet ve antinötrofil etkileri olan kardiyoprotektif bir moleküldür. Ancak NO'in koruyucu mu olacağı yoksa zararlı etkiler mi göstereceği çeşitli faktörlere bağlıdır. eNOS'den kaynaklanan kısa süreli düşük dozlardaki NO yararlı etkiler gösterirken, iNOS'den kaynaklanan sürekli ve yüksek dozdaki NO ise zararlıdır (164).

Reperfüzyon sırasında NO donörlerinin etkisini değerlendiren 2 büyük çalışma vardır (165, 166). Ancak bu çalışmalarda AMİ sonrası survinin iyileştirilmesi üzerinde yararlı etkiler gösterilememiştir.

İn vivo modellerde (167), NO substratı L-argininin infarkt büyüklüğünü azalttığı, miyokard performansını (168) ve endotel fonksiyonlarını düzelttiği izlenmiştir. Sadece bir klinik çalışmada ön kolda iskemi reperfüzyona bağlı endotel disfonksiyonunun önlenmesinde L-argininin (20 mg/dk, 15 dk intravenöz [İV] infüzyon) yararlı olduğu izlenmiştir (169).

Tetrahydrobiopiterin (BH4), NO sentetatazın kofaktörüdür. Yamashiro ve arkadaşları (170), deneysel koşullarda BH4'in iskemi reperfüzyonda yararlı etkilerini göstermiştir. Ancak bu sonuçlar klinik çalışmalarda doğrulanmamıştır.

### 8.4. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> “exchanger” inhibitörleri

Normal koşullarda H<sup>+</sup>, ATP üretimi için (Na<sup>+</sup>/ATP “exchanger”) gereklidir. Miyokard iskemisi sırasında anaerobik metabolizma ile hücre içi asidoz ortaya çıkar. Hücre içi asidoz, pH'yı düzenleyen iyon taşıyıcıları ile Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> “exchanger”ı aktive eder (71). Neticede ATP üretimi için gereken protonlar azalırken, Na<sup>+</sup> birikimi meydana gelir. ATP eksikliği, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP'az inhibisyonu ile hücre içerisinde Na<sup>+</sup> birikimini artırır. Na<sup>+</sup> yüklenmesi, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> “exchanger” aktive eder, hücre içinde Ca<sup>+2</sup> yüklenmesine ve hiperkontraktür ve hücre ölümüne yol

açar (71).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  “exchanger” inhibitörleri, hücre içine  $\text{Na}^+$  girişi ve buna bağlı olarak  $\text{Ca}^{+2}$  girişini ve  $\text{Ca}^{+2}$  yüklenmesini azaltır. Aynı zamandan miyositlerden  $\text{H}^+$  çıkışını azaltır, bu protonlar, ATP üretiminde kullanılır (71).

Kariporid, doza bağımlı olarak infarkt alanını azaltır, reperfüzyona bağlı ventriküler fibrilasyon sıklığını da azaltabilir (171). Kariporid ile  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  exchanger inhibisyonu miyokardiyal iskemi sırasında iskemik hasarın yayılımını yavaşlatır. GUARDIAN çalışmasında (11590 hasta) kariporidin koroner by-pass sonrası ilk 6 ayda miyokard infarktüsü ve tüm nedenlere bağlı ölüm üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Operasyondan 1 saat önce başlanan IV kariporid infüzyonu (120 mg) başlanmış ve 2-7 günler arasında her 8 saatte bir uygulanmıştır. İlk 6 ayda % 25’lik bir risk azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (172) .

### **8.5. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ “exchanger” inhibitörleri**

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  exchanger inhibitörleri, hücreye  $\text{Ca}^{+2}$  girişini önler.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  inhibitörlerinden farklı olarak  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  inhibitörleri, reperfüzyon sırasında verildiğinde etkilidir. Ancak bu etkiler klinik çalışmalarda gösterilememiştir (71).

### **8.6. Kontraktilite inhibitörleri**

Reperfüzyonun ilk dakikalarında kontraktilitenin geçici blokajı ile hiperkontraktür önlenabilir ve infarkt büyüklüğü azaltılabilir (173). Ancak tam bir blokaj blokerin (BDM, 2,3-butanedion, aktin miyozin “cycling” inhibitörü) bölgesel, intrakoronar uygulanmasını gerektirir. Hiperkontraktür 2 farklı şekilde sağlanabilir. İlki, geçici kontraktil inhibisyon, reperfüzyon sırasında lokal intrakoronar infüzyon şeklinde verildiğinde etkili bir yaklaşımdır. İkinci yaklaşım ise cGMP modülasyonu veya sitozolik kalsiyum içeriğinin azaltılması ile kontraktil miyofilamanların desensitizasyonudur.

cGMP modülasyonu ile kontraktilitenin inhibisyonu atriyal natriüretik peptidin kullanımıyla olasıdır. Uzamış iskemi sonrasında miyositlerde cGMP düzeyleri azalır (174). cGMP, soluble veya membrana bağlı guanil siklaz ile sentez edilebilir. NO biyoyararlılığının direkt olarak arttıran NO donörleri veya indirekt olarak NO sentezi için substrat olan L-arjinin desteği sağlanması ile solubl guanil siklaz uyarılabilir. Membrana bağlı guanilat siklaz ANP ile bir peptit olan ürodilatin ile uyarılabilir. AMİ geçiren hastalarda intrakoronar ve intavenöz

ürodilatin uygulamasının İR bağlı aritmileri ve sol ventrikül duvar hareketlerini iyileştirdiği gösterilmiştir (175).

### **8.7. Adenozin reseptör antagonisti**

Adenozin A2 reseptörleri, serbest radikal oluşumunun ve nötrofil fonksiyonlarının inhibisyonundan sorumludur (176). Ayrıca adenozin mitokondriyal K<sup>+</sup> ATP kanallarının açılmasıyla antiiskemik etkiye sahiptir. ADMIRE-2 çalışmasında (177), akut ST elevasyonlu Mİ geçiren ve primer anjiyoplasti uygulanan hastalarda A1 ve A2 reseptör blokeri olan AMP579'un etkileri değerlendirilmiştir. AMP579'un infarkt alanı üzerinde etkisi olmadığı izlenmiştir. AMISTAD çalışmasında, anterior Mİ geçiren hastalarda adenozin reperfüzyon tedavisine eklendiğinde infarkt alanında azalmaya neden olmuştur (178).

### **8.8. Metabolik kardiyoproteksiyon**

Glukoz, insülin ve potasyumdan oluşan GİK solüsyonu, AMİ sonrası mortalitenin azaltılmasında yarar sağlar (179). Reperfüzyon tedavisi olmaksızın uygulandığında yarar eğilimi gösterir. GİK solüsyonu, % 25 glukoz, insülin (50 IU/l) ve KCl (80 mmol/l) den oluşur, 24 saate 1 ml/kg/saat dozunda verilir.

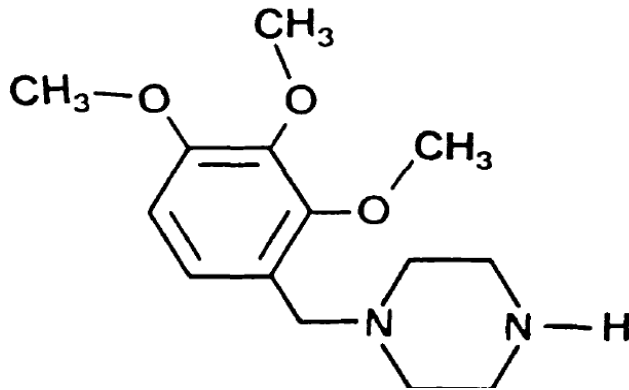
### **8.9. Magnezyum**

Magnezyum, sarkoplazmik retikulumda kalsiyum transportunu ve transmembran kalsiyum akımını düzenleyen fizyolojik bir kalsiyum blokeridir. ST elevasyonlu Mİ hastalarında İV Mg'un yararı tartışmalıdır. LIMIT-2 çalışmasında, magnezyumun (8-65 mmol/24 saat) total mortalite üzerinde anlamlı etkisi olduğu saptanmıştır (180). ISIS-4 çalışmasında ise negatif etkiler ön plana çıkmıştır (165). Günümüzde ST elevasyonlu Mİ'de rutin İV magnezyum uygulamasının yeri yoktur.

### **8.10. Trimetazidin**

Trimetazidin, piperazin türevidir (1-[2,3,4-trimetoksibenzil-piperazine) (Şekil-5). TMZ, yağ asidi beta oksidasyonunda son enzim olan, uzun zincir 3-keto açıl koenzim A tiyolaz (3-KAT) enzimini selektif olarak bloke eder. Yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonu, glukoz oksidasyonunu artışıyla enerji substratında değişikliğe neden olur (181). Ayrıca, PDH aktivitesini arttırarak iskemi sırasında bozulan glikoliz, glukoz oksidasyonu eşleşmesinin düzelmesini sağlar. Netice de hidrojen üretimi, hücre içi asidoz ve kalsiyum birikimi azalır.

TMZ, miyositlerin sitoplazmasında kalsiyum ve sodyum birikimini önler, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltır ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder (182). Bu ilacın en önemli özelliği, reperfüzyon sırasında sarkolemanın mekanik direncinin arttırılmasıdır. Bu mekanizma, miyokard infarktüsünde infarkt alanının sınırlanmasında önemli rol oynar. TMZ'in mitokondrilerdeki bağlanma noktaları belirlenmiştir ve TMZ'in iskemiye bağlı bozulan fonksiyonları düzelttiği gösterilmiştir (183). TMZ'in diğer bir etkisi kardiyomiyositlerde apoptozisi inhibe etmesidir (183), iskemiden 10 dk önce uygulanan TMZ'in miyositlerde apoptozisi inhibe ederek (kaspaz 3 ile ilişkili olarak) anlamlı olarak İR hasarından miyokardı koruduğunu gösterilmiştir. Deneysel MI modellerinde TMZ infarkt büyüklüğünü azalttığı bildirilmiştir (184, 185), akut Mİ'de TMZ ile yapılan iki klinik çalışma da (EMIP-FR ve LIST) karışık sonuçlar elde edilmiştir (186, 187). EMIP-FR çalışmasında, MI sonrası ilk 24 saatte verilen TMZ'in reperfüze olmayan hastalarda sağkalımı düzelttiği ancak reperfüze olan hastalarda etkili olmadığı gösterilmiştir (186), bu farklılık etki mekanizması düşünüldüğünde anlaşılabilir. LIST çalışmasında ise hastalar primer anjiyoplasti öncesi plasebo ve TMZ kollarına randomize edilmiştir, TMZ ST segment rezolüsyonunun daha erken olmasını sağlamıştır ancak infarkt büyüklüğü yada global veya bölgesel sol ventrikül fonksiyonları üzerinde etki göstermemiştir (187). Ruixing ve arkadaşları (188), tavşanlarda İR modelinde trimetazidinin kardiyomiyosit apoptozisini önlediğini göstermiştir.



**Şekil-5:** Trimetazidinin kimyasal yapısı

### **8.11. Statinler**

Son yıllarda statinlerin lipid düşürücü etkileri dışında İR hasarında rolü olduğu gözlenmiştir. Sıçanlarda (189) ve farelerde (190) akut miyokard iskemisi modelinde statinlerin doza bağlı olarak infarkt büyüklüğünü azalttığı saptanmıştır. Statinler reperfüzyon sırasında akut olarak hasara uğrayan kalpte nötrofillerin damar dışına çıkışını ve aktivasyonunu da önler (191). P13K/Akt sinyal yolağının aktive olmasına neden olur. Ayrıca İR bağlı endotel disfonksiyonu ve kardiyak kontraktıl disfonksiyonun üzerinde yararlı etkileri vardır (191, 192).

### **8.12. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri**

ACE inhibitörleri, AMİ sonrası kardiyak fonksiyonların düzeltilmesi için verilir. Ancak giderek artan bulgular ACE inhibitörlerinin İR hasarındaki yararlı etkilerini ortaya koymuştur. Deneysel çalışmalarda, ventriküler fibrilasyon (VF) eşiğini yükselttiği, VF ve ventriküler taşikardi (VT) epizodlarının sayısında azalmaya neden olduğu saptanmıştır (193). Miyokardiyal infarkt alanı büyüklüğünü azaltırlar (188). ACE inhibitörlerinin koruyucu etkilerinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ramiprilat infarkt büyüklüğünü azaltırken, HOE 140 bu etkiyi tersine çevirmektedir, ramiprilatın kardiyoprotektif etkisinin kinin aracılığıyla olduğunu göstermektedir (194). Kininler, endotelden NO ve prostoglandin salınımı için güçlü uyarınlardır. NO salınımı, superoksit tutulmasını güçlendirir (195) ve polimorfonükleer nötrofiller üzerinde inhibitör etkisi vardır (196).

### **8.13. Trombosit inhibitörleri**

İskemi reperfüzyon hasarında trombositlerin rolü ve asetil salisilik asidin kullanımını konusunda bir şüphe yoktur. Son yıllarda çok sayıda çalışmada GP IIb/IIIa antagonistlerinin yararlı etkileri gösterilmiştir (197).

### **8.14. Diğerleri**

Ufak bir randomize çalışmada elektif perkütan koroner girişim sonrasında B6 vitamini olan piridoksal 5 fosfatın (MC-1) miyokard nekrozu üzerindeki yararlı etkileri belirlenmiştir. MC-1, ATP reseptör blokajı ile iskemik miyositlerde kalsiyum girişini inhibe eder (198).

Reperfüzyondaki önemli faktörlerden birisi nötrofillerdir, önemli bir oksijen radikali kaynağı olması yanında çeşitli preteolitik enzimlerde salgırlar. Ancak, antiinflamatuvar ilaçlar, adenosin, lökosit filtrelerinin kullanılması ve nötrofil



adhezyonunu önleyen çeşitli inhibitörlerin infarkt büyüklüğü üzerinde tutarlı etkisi gösterilememiştir.

Literatürler incelendiğinde, iskemi-reperfüzyon modelinde, farklı noktaları etkileyen ajanlar olan N-asetil sistein ve trimetazidinin apoptozis üzerine etkilerini birlikte değerlendiren çalışmanın olmadığı izlendi. Bu çalışmanın amacı, İR hasarına bağlı olarak gelişen miyosit apoptozisinin önlenmesinde N-asetil sistein ve trimetazidinin, S100B, oksidatif stres ve apoptozis üzerindeki etkilerinin belirlenmesidir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Genel

Çalışmada Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden sağlanan 250-300 gr ağırlığında Wistar türü erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, sıcaklığı 20-24 C° olan ve 12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırma döngüsü bulunan bir odada yem ve su alımları serbest olacak şekilde, 4-6 sıçan bir kafeste bakıldılar.

Çalışmadaki tüm cerrahi ve deneysel işlemler, Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Etik Komitesi tarafından onaylanmıştır.

### 2. Cerrahi İşlemler

Sıçanlar periton içine verilen üretan (1.25 g/kg) ile anestezi edildikten sonra sol juguler ven (ilaç enjeksiyonu için) ve sol karotid arter (kan basıncı ölçümü için) içleri heparinli tuzlu su (250 IU/ml) dolu olan PE 50 tüp ile kanüle edildi. Takiben elektrokardiyografi (EKG) kaydı için deri altına EKG elektrotları ve vücut sıcaklığını ölçmek için rektuma sıcaklık probu yerleştirildi.

Trakea kanülasyonu da yapıldıktan sonra sol 4. ve 5. kaburgalar arasından toraks boşluğu açıldı ve hayvan hemen suni solunum pompasına (SAR-830 Küçük Hayvan Ventilatörü, PA, A.B.D.) bağlanarak pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> ve pH'ı normal düzeylerde tutacak şekilde pozitif basınçlı suni solunum (1.5 ml/100g hacim ve 70 atım/dakikalık hız) uygulanmaya başlandı. Kalp, perikardiyum sıyrıldıktan sonra, kaburgalara yapılan hafif bir basınçla göğüs kafesinden dışarı doğru çekilerek sol ana koroner arterin altından 10 mm'lik atravmatik yuvarlak iğne ile 6/0 ipek iplik geçirildi ve kalp göğüs kafesi içine yavaşça geri yerleştirildi.

### 3. Verilerin Kaydedilmesi

Hazırlık süresince ve deney boyunca elektrokardiyografi (EKG), kan basıncı, kalp hızı ve vücut sıcaklığı verileri kaydedildi. EKG; EKG modülünün (ECG 100C), kan basıncı ve kalp hızı; volumetrik basınç transducerinin (BPT 300), vücut sıcaklığı; sıcaklık modülünün (SKT 100C) genel amaçlı transducer yükselticisine (DA100B, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) bağlanmasıyla ve MP100 sistem,

AcqKnowledge software (BIOPAC Systems Inc., CA, A.B.D.) kullanılarak bir bilgisayarda kaydedildi.

#### 4. Uzun dönem iskemi-reperfüzyon prosedürü

Kalp, göğüs kafesi içine geri yerleştirdikten sonra 20 dakika stabilizasyon için beklendi. Oklüzyon öncesinde kan basıncı 60 mm Hg'nın altına düşen hayvanlar deney dışında bırakıldı. 20 dakikalık stabilizasyon periyodu sonunda damarın altından geçirilmiş olan ipliğin her iki ucu bir plastik boru içinden geçirildi ve bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak damarın kapatılması (oklüzyon) sağlandı. İskeminin 15. dakikasında TMZ, NAS veya tuzlu su (TS) İV uygulandı. Otuz dakikalık iskemi süresi tamamlandığında klemp açılarak tüp içinden geçen ip gevşetildi ve reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon süresi üç saat olarak uygulandı (Şekil-6).

Hayvanlar deney süresince vücut sıcaklıkları  $37\pm 0.2$  °C olacak şekilde ısıtıcı bir platform üzerinde tutuldular. Bu seride, iskemi ya da reperfüzyon esnasında VF gelişen sıçanlar (kontrol grubunda iki, tedavi grubunda bir hayvan) değerlendirme dışı bırakıldılar.



**Şekil-6:** Uzun dönem iskemi-reperfüzyon deney prosedürü

Uzun dönem iskemi-reperfüzyon çalışmasında, NAS ve trimetazidinin farklı dozlarının ve yüksek doz kombinasyonlarının İR sonucu gelişen miyokardiyal nekroz üzerine olan etkisi araştırıldı. Cerrahi işlemlerin bitiminden sonra stabilizasyon için 20 dakika beklendi. Stabilizasyon süresinin bitiminden sonra hayvanların kontrol kan basıncı, kalp hızı ve EKG'si kaydedildi. Kontrol değerlerin alınmasını takiben sol ana koroner arter kapatılarak iskemi-reperfüzyon prosedürüne başlandı. İskemi süresinin ortasında (oklüzyonun 15. dakikasında)

TMZ, NAS ya da tuzlu su intravenöz yol ile hayvanlara verildi. Deney grupları aşağıdaki gibi belirlendi her grupta 8 sıçan vardı:

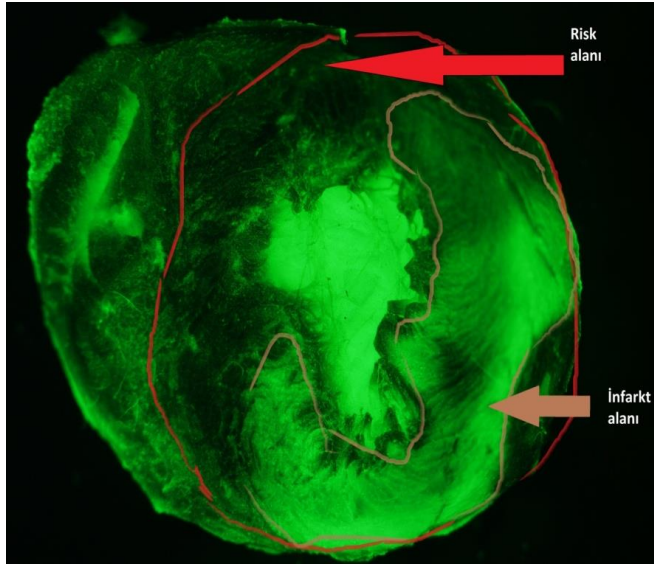
1. Kontrol grubu: Herhangi bir cerrahi müdahale yapılmayan sıçanlar
2. Sham grubu
3. 30 dakika iskemi+3 saat reperfüzyon+salin
4. 30 dakika iskemi+3 saat reperfüzyon+NAS (50 mg/kg)
5. 30 dakika iskemi+3 saat reperfüzyon+NAS (150 mg/kg)
6. 30 dakika iskemi+3 saat reperfüzyon+TMZ (3 mg/kg)
7. 30 dakika iskemi+3 saat reperfüzyon+TMZ (5 mg/kg)
8. 30 dakika iskemi+3 saat reperfüzyon+NAS (150 mg/kg) ve TMZ (5 mg/kg)

Deney sonunda, kalpler hızlıca yerlerinden çıkarılarak Langendorff düzeneğine asıldı ve arterlerin içinde kalan kanın uzaklaştırılması için, aortaya yerleştirilen bir kanül vasıtasıyla, % 0,9 tuzlu su ile perfüze edildiler. Daha sonra, risk alanını belirlemek amacıyla, koroner arterin çevresinde bulunan ipek sütür yeniden bağlanarak 1 mg/ml dozunda tuzlu suda çözülerek hazırlanan Acridine Orange (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya) 1 ml kadarı yaklaşık bir dakika süre içinde verildi. Deney sonunda, kalp dilimleri floresan mikroskop altında incelendiğinde Acridine Orange tutmayan alan sol ana koroner arterin kanlandığı alan yani risk alanı olarak tanımlandı. Takiben kalpler Langendorff düzeneğinden alınarak korunaklı bir şekilde -50 C°'de donduruldu.

Nekroz alanını belirlemek için 'trifenil tetrazolium klorid ile boyama tekniği' kullanıldı (199). Bu amaçla tetrazolium boyası, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tampon (pH:7.4) içerisinde % 1'lik (1 g/100 ml) olarak çözüldü. Hazırlanan solüsyon 37 C°'ye ısıtılmış su banyosuna konuldu. Bu esnada derin dondurucudan çıkarılan donmuş kalpler keskin bir jilet yardımıyla kalınlıkları yaklaşık 2 mm olacak şekilde dilimlendiler. Takiben kalp dilimleri, % 1'lik tetrazolium içeren, pH'sı 7.4 olan ve sıcaklığı önceden 37 C°'ye getirilmiş tampon içerisinde 20 dakika inkübe edildiler. Dilimler tampon içerisine konulduktan sonraki ilk bir dakika boyunca çalkalanarak tüm yüzeylerin boya ile teması sağlandı. İnkübasyon süresi sonunda

tampon içerisinde çıkarılan kalp dilimleri % 10'luk formalin içerisinde kondu ve 10 dakika bekletildi. Bu sayede renklerin ayrımı daha iyi gözlemlenebilir hale geldi.

Dokuda, canlılığını koruyan alanlar tetrazolium ile boyanarak koyu kırmızı renk alırken nekrotik alanlar soluk sarımsı bir renkte gözlemlendi. Bu işlemlerin sonrasında, kalp dilimleri aralarında 2 mm kalınlık olan iki lamel arasında konularak bir kısıpç aracıyla sıkıştırıldı. Hazırlanan kalp dilimlerinin Olympus BX 50 floresan araştırma mikroskopi yardımıyla x1,25 (Olympus) büyütme merceği kullanılarak fotoğrafları çekildi ve bilgisayar ortamına aktarıldı. Alanlar, bilgisayar programı (Scion Image, Maryland, A.B.D.) destekli planimetrik yöntem ile nekroz alanları ve risk alanı, sonrasında nekroz hacmi ve risk hacmi olarak hesaplandı (Şekil-7). Devamında, her bir kalp için, bütün dilimlerin hacimleri toplanarak total nekroz hacmi ve risk hacmi hesaplandı. Son olarak nekroz hacminin risk hacmine bölünüp yüz ile çarpılmasıyla nekroz hacmi/risk hacminin yüzdesi hesaplandı.



**Şekil-7:** Sol ventrikül kesitinde infarkt alanı ve risk alanı

### **5. Miyokardiyal apoptozisin değerlendirilmesi**

Miyokardiyal apoptotik aktivasyon, myozit çekirdeklerindeki DNA fragmentasyonlarını değerlendirmek amacıyla kullanılan TUNEL tekniği ile kantitatif olarak, miyosit sitoplazmasında kaspaz 3 enzim aktivasyonunu

değerlendirmek amacıyla kaspaz 3 immünohistokimyasal işaretleme yapılarak kalitatif olarak değerlendirildi. İskemi reperfüzyon sonrası vasküler perfüzyon fiksasyon tekniği uygulanarak, kalbin apeksinden girilerek aorta içine yerleştirilen kateter yardımıyla ilk 5. dk %0.9 NaCl ile, ardından %4 'lük paraformaldehid (PBS içinde, pH 7.4) ile 20 dk perfüzyon fiksasyon uygulandı. Apekten itibaren kalp dokusundan 1 mm kalınlığında 4 doku kesiti alındı. Doku kesitleri gece boyu %4 parafolmaldehit içinde immersiyon fiksasyona tabi tutuldu. Doku takibinin ardından yükselen konsantrasyonlarda sükröz solüsyonunda bekletilen her bir doku kesitinden 15 adet seri kriyostat kesitler (20 µm kalınlığında) alındı.

### **5.1. TUNEL (Terminal deoksinükleotidil “nick-end” labeling) yöntemi**

Apoptotik miyositler TUNEL yöntemi kullanılarak saptandı. TUNEL boyama üretici firma tarafından önerilen protokole göre “In situ Cell Death Detection Kit” (Roche Molecular Biochemicals, U.S.A.) kullanılarak gerçekleştirildi. TUNEL tekniğinde digoksinin-conjugated dUTP, terminal deoksinükleotidil transferaz tarafından parçalanmış DNA'nın uç kısımlarına bağlanır. Kalitatif değerlendirme işaretlenen DNA uç kırıklarının sayımı ile gerçekleştirildi. Her bloktan randomize olarak seçilen kesitler, apoptotik hücrelerinin sayısının ve yüzdesinin belirlenmesi için immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Her kesitte randomize olarak 5 alan belirlendi. Her alandaki apoptotik miyositlerin sayısı hesaplandı (x20 büyütmede). Bu alanlardaki toplam kardiyomiyosit sayısının belirlenmesi için seri kesitleri hematoksilin ve eozin ile boyandı ve aynı alanlardaki kardiyomiyositler hesaplandı. Apoptotik indeks (pozitif boyanan apoptotik miyosit sayısı/toplam miyosit sayısı X %100) olarak hesaplandı. Tüm değerlendirmeler çift kör olarak gerçekleştirildi.

### **5.2. Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması**

Kaspaz 3 aktivitesi immünohistokimyasal boyama ile değerlendirildi. İmmünohistokimyasal yöntemde üretici firmanın önerileri doğrultusunda standart tekniklerle ABC metodu kullanıldı. Kesitler oda ısısında 1:200'lük tamponda “Cell Signaling Cleaved caspase-3 (D175) (5A1E) Rabbit mAb #9664S” primer antikoruna içerisinde inkübe edildi. Daha sonra 1 saat boyunca Teksas kırmızısı ile konjuge edilmiş donkey anti-rabbit Ig G (1:100, Jackson ImmunoRes Lab) sekonder antikoruna maruz bırakıldı. Sitoplazması kahverengi boyanan hücreler kaspaz 3 immünreaktivitesi gösteren hücreler olarak değerlendirildi. Tüm kesitler

Olympus BX-50 ve Olympus DP 71 CCD fotomikroskop ile incelendi ve görüntülendi.

## **6. İlaçlar**

Çalışmada kullanılacak ilaçlar; Trimetazidin (Aldrich) ve N-asetil sistein (Sigma-Aldrich) tuzlu su (% 0.9 NaCl) içinde hazırlandılar. İntravenöz ilaç ve tuzlu su enjeksiyonları 1 ml/kg hacimde yapıldı.

## **7. Ölçümler**

Kan örnekleri deney sonunda ve 1.5 ml olarak toplandı. Akabinde soğuk zincire tabi olarak santrifüje edildi ve serumları ayrılarak -80 °C buzdolabında saklandı.

### **7.1. M30 ve M65 parametresi ölçümleri:**

Total CK18, proliferasyon halindeki hücrelerde bol miktarda üretilen ve nekroz sırasında membran bütünlüğü bozulunca dolaşıma salgılanan bir proteindir. Apoptoz esnasında hücre iskeletinin önemli bir bileşeni olan CK18 sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak kırılmış CK18'i (CK18-Asp396) oluşturmaktadır (134).

M30 monoklonal antikor, özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (135). M65 ELISA kiti, ile nativ solubl CK18 (M65 antijeni) ölçümünü yapılırken, M30 apoptosense ELISA kiti CK-18-Asp396 ölçümü gerçekleştirildi. Örnekler, fare monoklonal antikoruna ile kaplı yüzeylere yerleştirildiler. Yıkama sonrası değerlendirme için M30 ve M65 antikorları (horseradish peroxidase-conjugated antibody) kullanıldı. Kalibrasyon için, M30 ve M65 antijeninin referans konsantrasyonları kullanıldı. M30 Apoptosense ELISA (PEVIVA, İsviçre) ve M65 ELISA kitleri ile kit prospektüsüne uygun olarak çalışılarak gerçekleştirildi. Oluşan renk şiddeti spektrofotometrik olarak 450 nm'de okundu.

### **7.2. Malondialdehid ölçümü**

Serum MDA konsantrasyonları (nmol/ml), yüksek performanslı likit kromatografisi ile Young ve Trimble tekniği (207) kullanılarak gerçekleştirildi (Shimadzu LC-10AT) (intra-assay CV 4.2 %, inter-assay CV 6.8 %) (200).

### **7.3. S100B protein ölçümü**

Protein S100B düzeyleri, S100 proteinin  $\beta$ -subünitine özgü olan ve proteinin hem  $\beta\beta$  ve hem de  $\alpha\beta$  izoformlarında  $\beta$ -subünit konsantrasyonlarını ölçen bir enzim immünoassay test kiti (BioVendor, Laboratori medicina a.s. Czech Republic) ile belirlendi. Örnekler önce distile su ile dilüe edildi (dilüsyon oranı 1/20) ve dilüe örneğin 50  $\mu$ l.si protein S100B ölçümü için kullanıldı.

### **8. İstatistiksel değerlendirme**

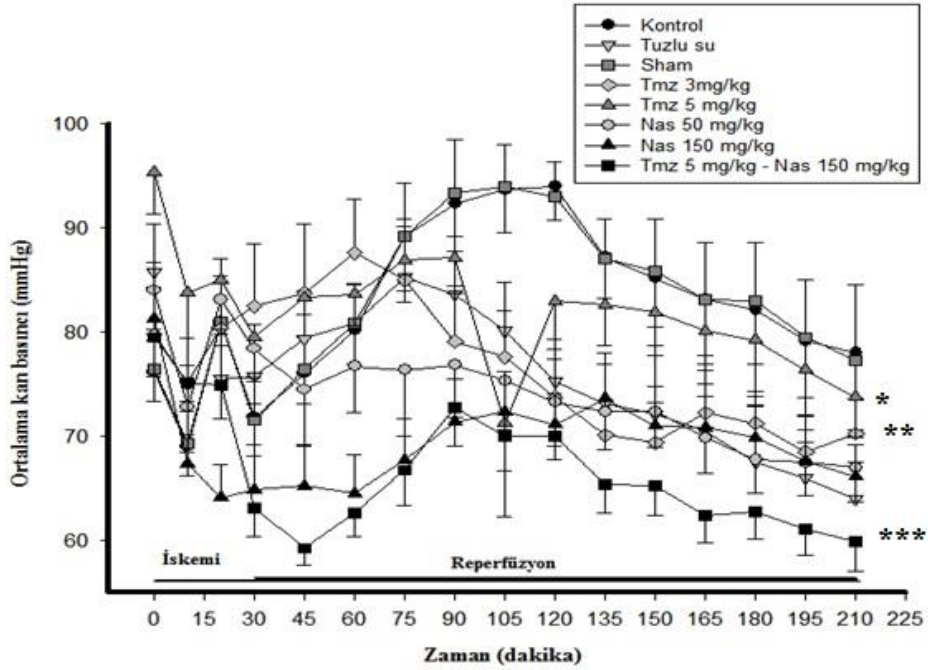
Kan basıncı ve kalp hızı değerleri ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Grupların karşılaştırılmasında two-way ANOVA testi ve anlamlı farklılık olan gruplarda posterior test olarak Tukey test kullanıldı. İnfarkt alanı, infarkt alanı/risk alanı karşılaştırmaları, serum M30, M65, malondialdehid, S100B düzeyleri one-way ANOVA testi ile değerlendirildi. Posteriyor test olarak Holm-Sidak testi kullanıldı.  $P < 0.05$  olan değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.



## BULGULAR

### Tuzlu su, TMZ ve NAS tedavilerinin ortalama kan basıncına etkisi

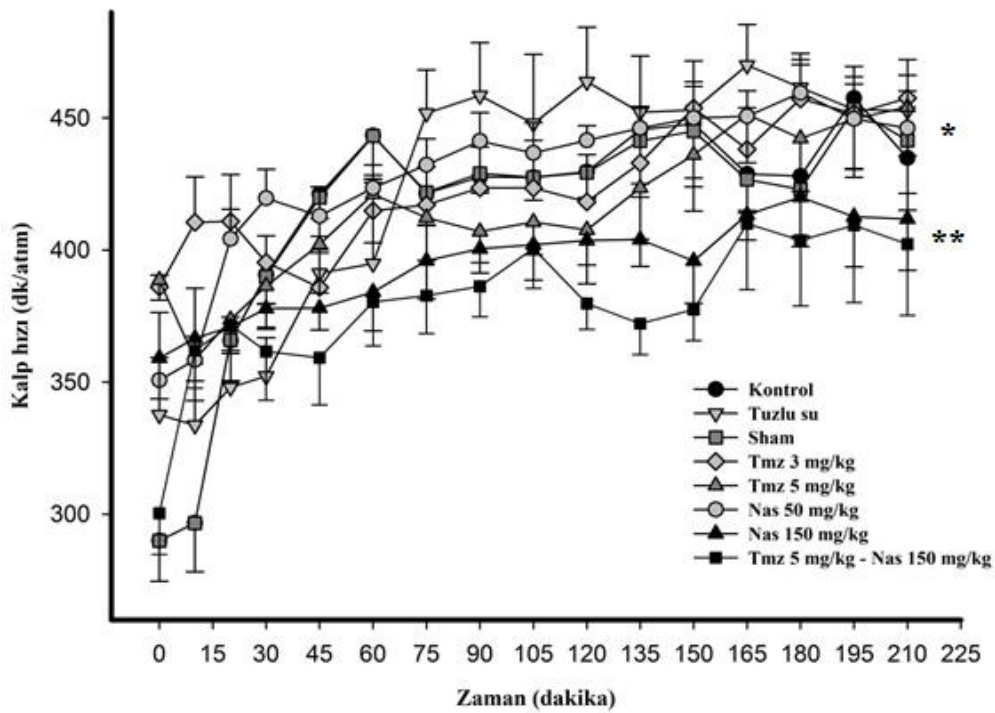
Deney başlamadan stabilizasyon sırasında grupların ortalama kan basıncı  $76 \pm 5$  mmHg olarak ölçüldü. İskemi periyodunun başlaması ile birlikte ortalama kan basıncı 8-10 mmHg düştü. İskemi ile birlikte ortalama kan basıncında azalma izlendi. Özellikle, TMZ - NAS, NAS 50 mg/kg grubunda reperfüzyonun erken döneminde ilave kan basıncı azalmasına neden olduğu görüldü. TMZ 3 ve 5 mg/kg dozlarında tuzlu su grubuna göre ortalama kan basıncı daha yüksek seyretti ( $p < 0.001$ ), NAS (150 mg/kg) ve TMZ (5 mg/kg) - NAS (150 mg/kg) grubunda tuzlu su grubuna göre ortalama kan basıncı anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0.001$ ) (Şekil-8).



**Şekil-8:** İntravenöz yol ile enjekte edilen trimetazidin (3 mg/kg, 5 mg/kg), N-asetil sistein (50 mg/kg, 150 mg/kg) ve tuzlu su tedavilerinin ortalama kan basıncı üzerindeki etkileri. \*:  $p < 0.001$ , TMZ 5 mg/kg ve tuzlu grubu, \*\*:  $p < 0.001$ , TMZ 3 mg/kg ve tuzlu grubu, \*\*\*:  $p < 0.001$ , TMZ 5 mg/kg – NAS 150 mg/kg

### Tuzlu su, TMZ ve NAS tedavilerinin kalp hızına etkisi

Çalışma gruplarının ortalama kalp hızı değişimleri Şekil-9'da gösterilmiştir. TMZ (5mg/kg) – NAS (150 mg/kg) grubunda kontrol ve sham gruplarına göre ortalama kalp hızı anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0.001$ ). Aynı zamanda kombinasyon grubunda NAS (50 mg/kg) dozunda göre de ortalama kalp hızı daha düşük seyretti ( $p<0.001$ ).

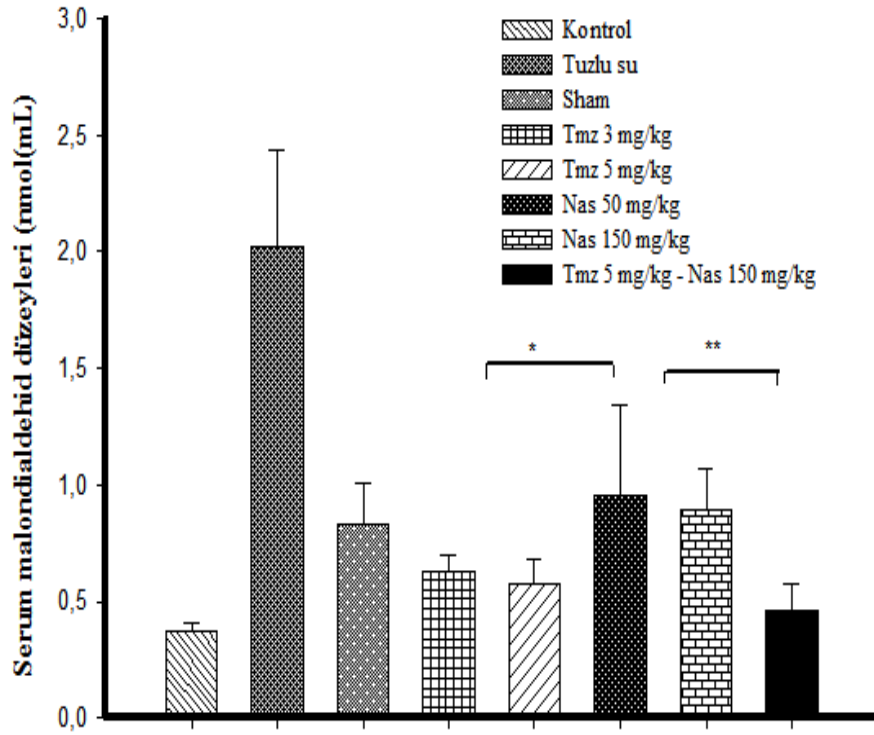


**Şekil-9:** İntravenöz yol ile enjekte edilen trimetazidin (3 mg/kg, 5 mg/kg), N-asetil sistein (50 mg/kg, 150 mg/kg) ve tuzlu su tedavilerinin ortalama kalp hızı üzerindeki etkileri. \*:  $p<0.001$ , NAS 50 mg/kg ve TMZ 5 mg/kg – NAS 150 mg/kg grubu, \*\*:  $p<0.001$ , TMZ 5 mg/kg – NAS 150 mg/kg grubu ile kontrol ve sham grupları arasında

### Tuzlu su, TMZ ve NAS tedavilerinin oksidatif stres üzerine etkisi

Çalışma gruplarındaki serum MDA düzeyleri Şekil-10'da gösterilmiştir. TMZ 3 mg/kg ve 5 mg/kg dozları arasında anlamlı farklılık yoktu ( $p=0,666$ ). Benzer şekilde NAS 50 mg/kg ve 150 mg/kg dozlarında serum MDA düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=0,612$ ). TMZ 3 mg/kg grubunda NAS

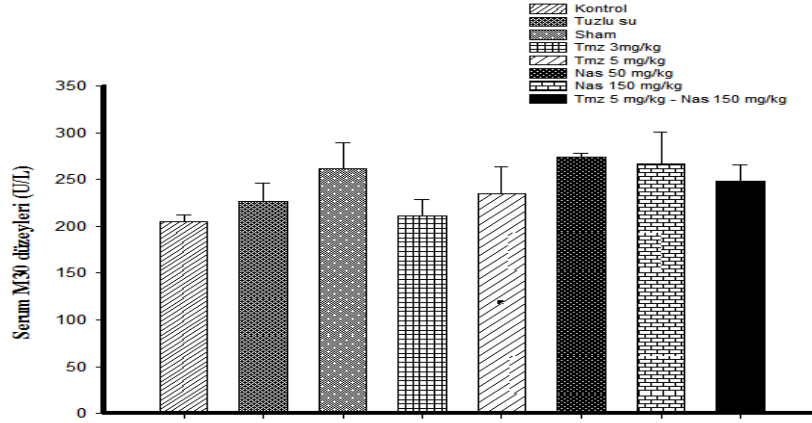
(50 mg/kg) ve NAS (150 mg/kg) gruplarına göre serum MDA düzeyleri anlamlı olarak daha düşüktü (sırasıyla  $p=0.007$  ve  $p=0.025$ ). Benzer şekilde TMZ 5 mg/kg dozunda serum MDA düzeyleri, NAS (50 mg/kg) ve NAS (150 mg/kg) gruplarına anlamlı daha düşüktü (sırasıyla,  $p=0.002$  ve  $p=0.008$ ). TMZ (3mg/kg) ve (5mg/kg) gruplarındaki oksidatif stres düzeyi ile TMZ - NAS grubundaki oksidatif stres düzeyi benzerdi (sırasıyla  $p=0.151$  ve  $p=0.312$ ). TMZ (5 mg/kg) - NAS (150 mg/kg) grubundaki serum MDA düzeyleri, NAS 50 mg/kg ve 150 mg/kg gruplarına göre anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ).



**Şekil-10:** İntravenöz yol ile enjekte edilen trimetazidin (3 mg/kg, 5 mg/kg), N-asetil sistein (50 mg/kg, 150 mg/kg) ve tuzlu su tedavilerinin serum malondialdehid düzeylerine etkisi, Gruplar arası karşılaştırmalarda  $p < 0.001$ , İkili karşılaştırmalarda, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$

### Tuzlu su, TMZ ve NAS tedavilerinin serum M30 düzeylerine etkisi

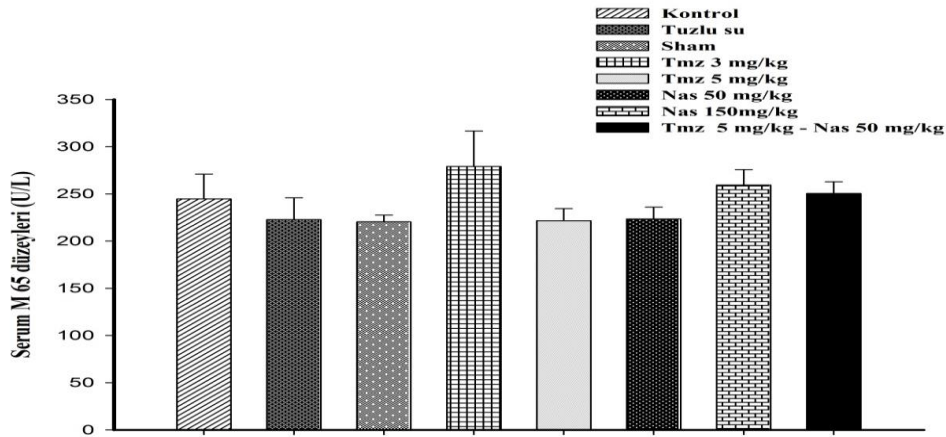
Gruplar arasında serum M30 düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.525) (Şekil-11)



**Şekil-11:** İntravenöz yol ile enjekte edilen trimetazidin (3 mg/kg, 5 mg/kg), N-asetil sistein (50 mg/kg, 150 mg/kg) ve tuzlu su tedavilerinin serum M30 düzeylerine etkisi (p>0.05)

### Tuzlu su, TMZ ve NAS tedavilerinin serum M65 düzeylerine etkisi

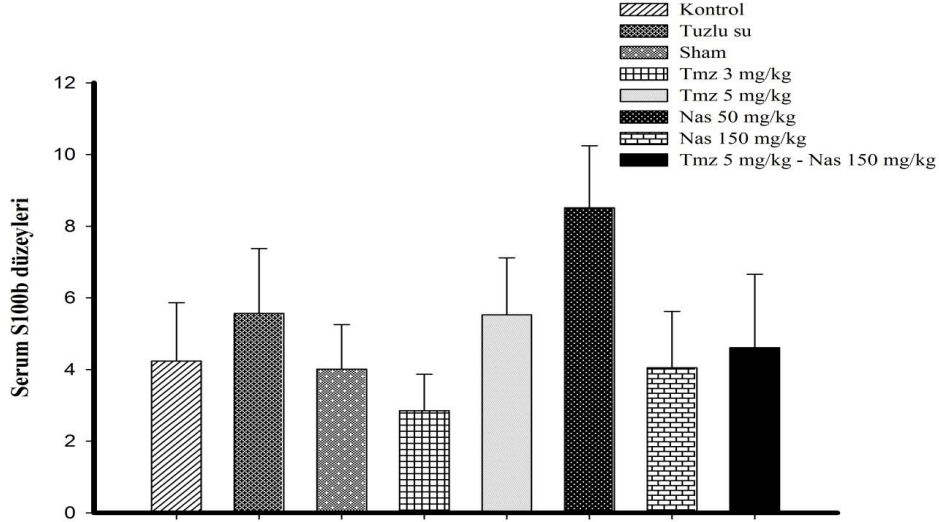
Gruplar arasında serum M65 düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.312) (Şekil-12)



**Şekil-12:** İntravenöz yol ile enjekte edilen trimetazidin (3 mg/kg, 5 mg/kg), N-asetil sistein (50 mg/kg, 150 mg/kg) ve tuzlu su tedavilerinin serum M 65 düzeylerine etkisi, (p>0.05)

### Tuzlu su, TMZ ve NAS tedavilerinin serum S100B düzeylerine etkisi

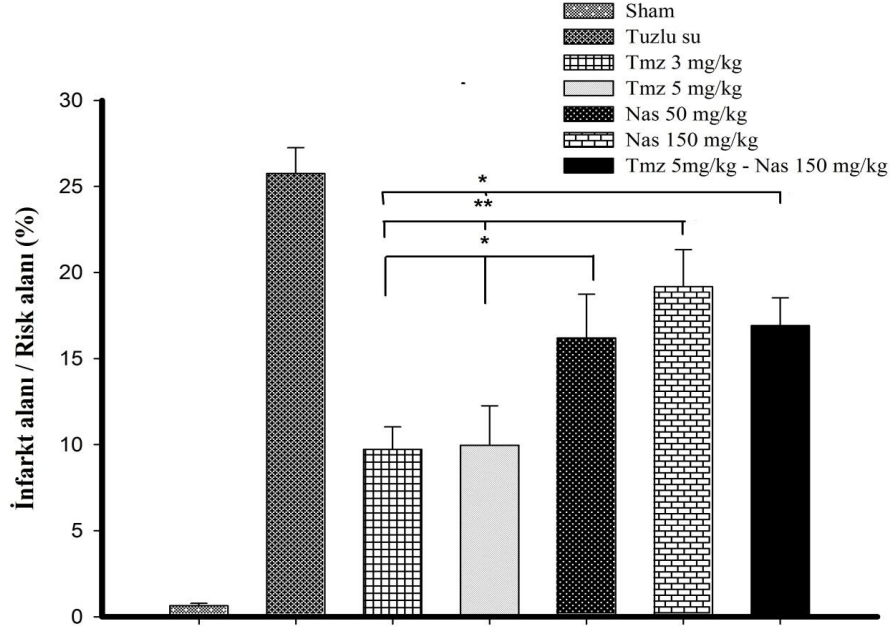
Gruplar arasında serum S100B düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.332) (Şekil-13)



**Şekil-13:** İntravenöz yol ile enjekte edilen trimetazidin (3 mg/kg, 5 mg/kg), N-asetil sistein (50 mg/kg, 150 mg/kg) ve tuzlu su tedavilerinin serum S100B düzeylerine etkisi (p>0.05)

### Tuzlu su, TMZ ve NAS tedavilerinin infarkt alanı üzerindeki etkisi

Deney gruplarındaki infarkt alanı/risk alanı Şekil-14'de gösterilmiştir. Tüm ilaç grupları, tuzlu su grubuna göre infarkt alanında anlamlı azalma sağladı (p <0.001). TMZ 3 mg/kg ve 5 mg/kg dozları arasında infarkt alanı açısından anlamlı farklılık izlenmedi (p=0.926). NAS 50 mg/kg ve 150 mg/kg dozları arasında da anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.25). TMZ 3 mg/kg grubunda NAS 50 mg/kg ve 150 mg/kg dozları ile karşılaştırıldığında infarkt alanında anlamlı azalma saptandı (sırasıyla p<0.001 ve p=0.007). TMZ 5 mg/kg dozunda da infarkt alanı NAS 50 mg/kg ve 150 mg/kg gruplarına göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla p<0.001 ve p=0.009). Ayrıca NAS grupları ile TMZ - NAS grubu arasında infarkt alanı benzer olarak bulundu.



**Şekil-14:** İntravenöz yol ile enjekte edilen trimetazidin (3 mg/kg, 5 mg/kg), N-asetil sistein (50 mg/kg, 150 mg/kg) ve tuzlu su tedavilerinin infarkt alanı üzerindeki etkisi. Gruplar arası karşılaştırmalarda  $p < 0.001$ , İkili karşılaştırmalarda, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$

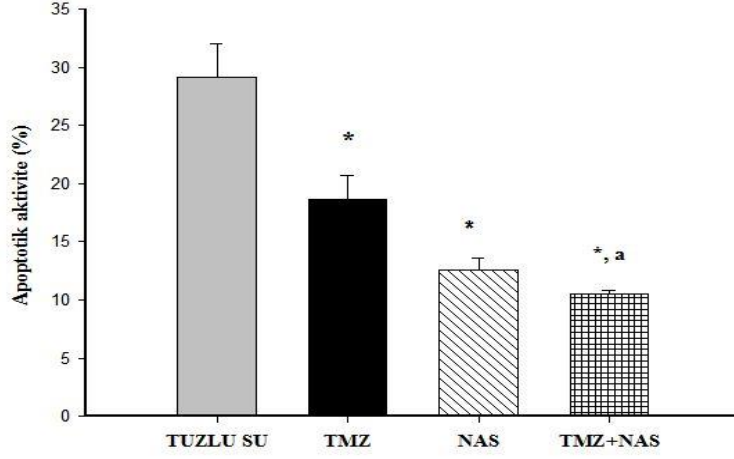
#### **Tuzlu su, TMZ ve NAS tedavilerinin apoptotik aktivite üzerindeki etkisi** Çalışma sonuçları neticesinde apoptozisin değerlendirilmesi için ilave 5 grup

belirlendi. Deney grupları:

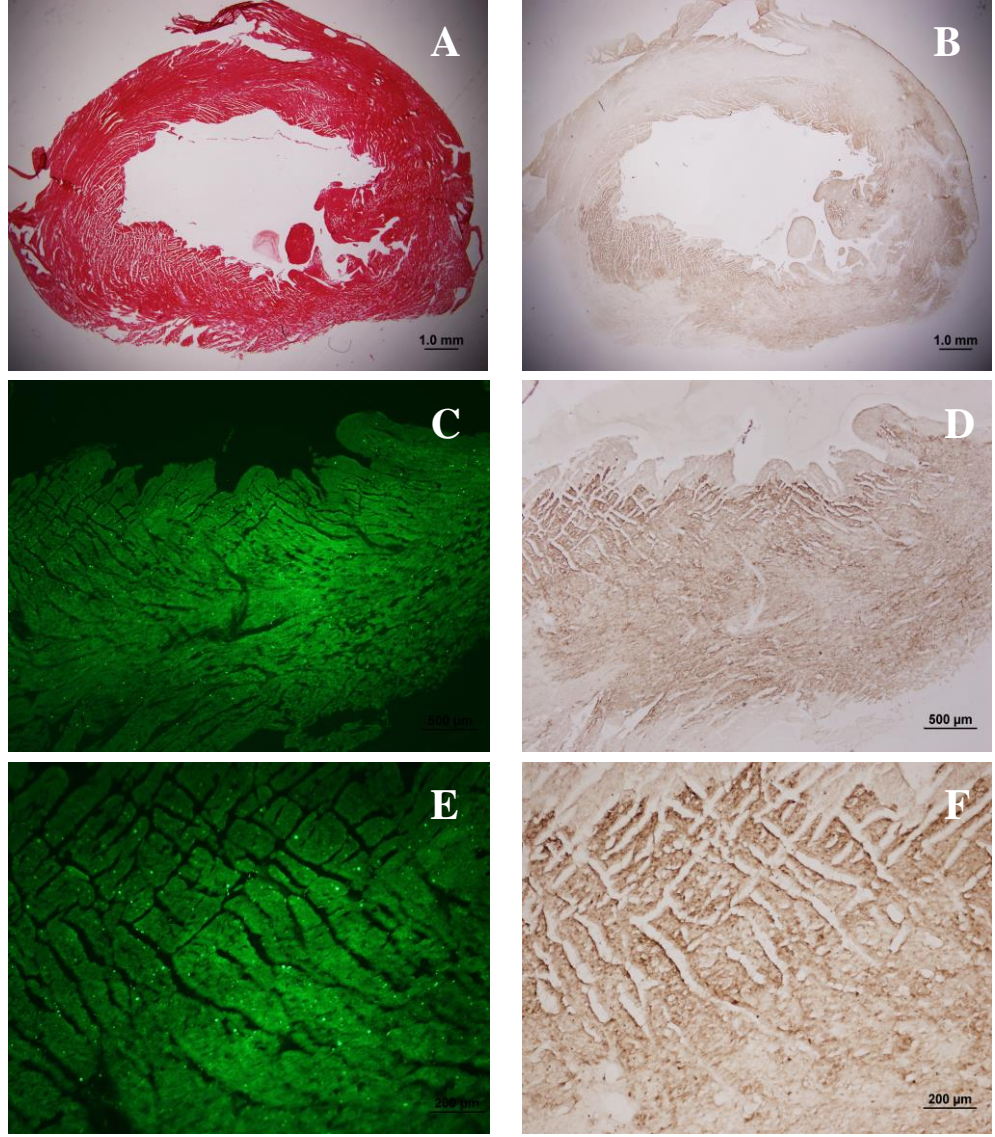
1. Sham (n=4)
2. Tuzlu su grubu (n=4)
3. TMZ 5 mg/kg (n=4)
4. NAS 50 mg/kg (n=4)
5. TMZ 5 mg/kg ve NAS 50 mg/kg (n=4)

Sham grubunda apoptotik aktivite izlenmedi. Şekil-15'de ilaç tuzlu grubu ve ilaç gruplarının apoptotik aktivite üzerindeki etkisi gösterilmiştir (Resim 1). Tuzlu su grubu ile karşılaştırıldığında, TMZ 5 mg/kg, NAS 50 mg/kg ve TMZ (5 mg/kg) - NAS (50 mg/kg) gruplarında apoptotik aktivitede anlamlı azalma izlendi ( $p < 0.05$ ) (Resim 2, 3, 4). TMZ 5 mg/kg ve NAS (50 mg/kg) grupları arasında anlamlı farklılık saptanmaz iken ( $p > 0.05$ ), her iki ilacı olan grupta [TMZ (5

mg/kg) - NAS (50 mg/kg)], TMZ 5 mg/kg olan gruba göre apoptotik aktivite anlamlı olarak azaldı ( $p < 0.05$ ). NAS 50 mg/kg ve TMZ (5 mg/kg) - NAS (50 mg/kg) grupları arasında apoptotik aktivitedeki azalma arasında anlamlı farklılık izlenmedi ( $p > 0.05$ ).

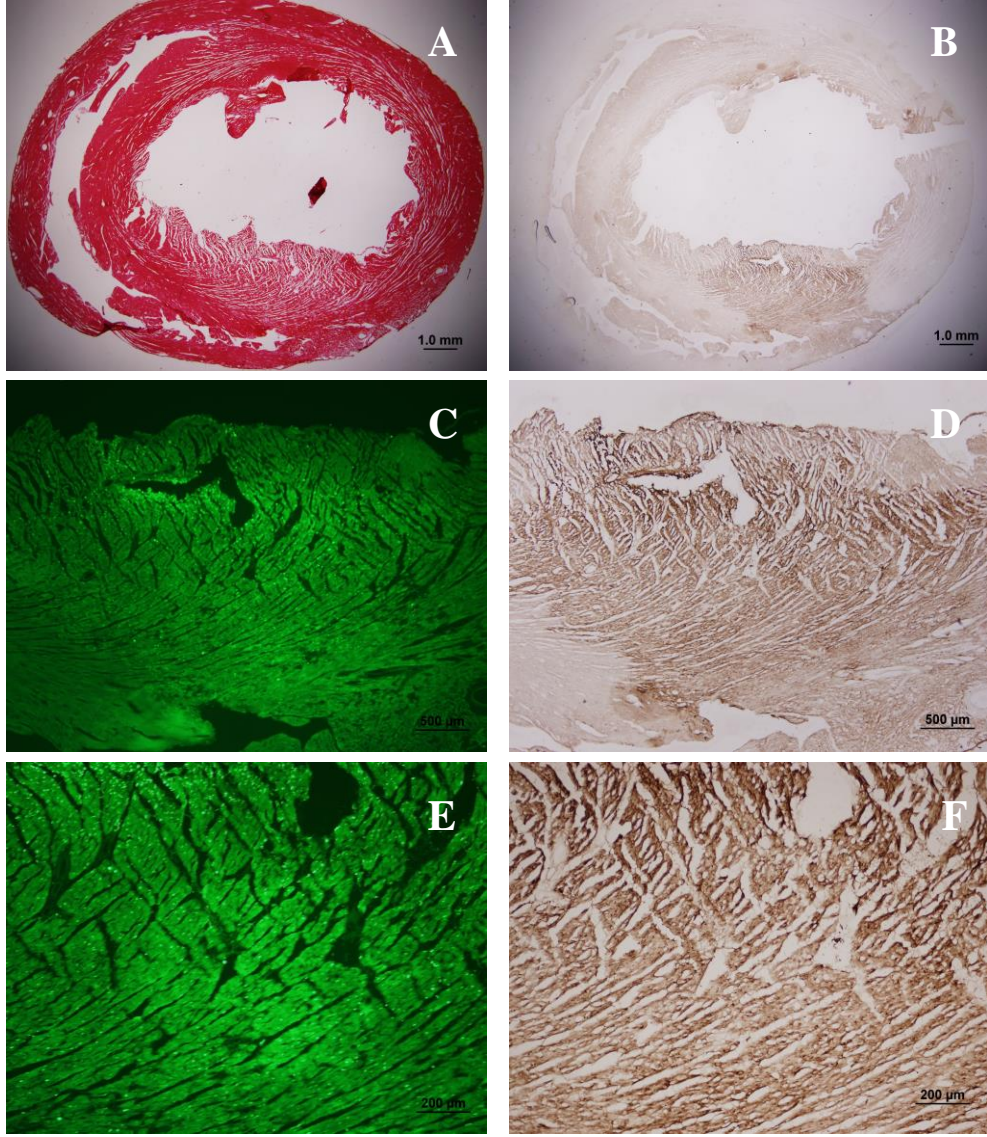


**Şekil-15:** Trimetazidin 5 mg/kg, N-asetil sistein 50 mg/kg ve TMZ (5 mg/kg) - NAS (50 mg/kg) kombinasyonunun apoptotik aktivite üzerindeki etkisi. \*:  $p < 0.05$  Tuzlu su grubuna göre anlamlı farklılık, a:  $p < 0.05$  TMZ grubuna göre anlamlı farklılık

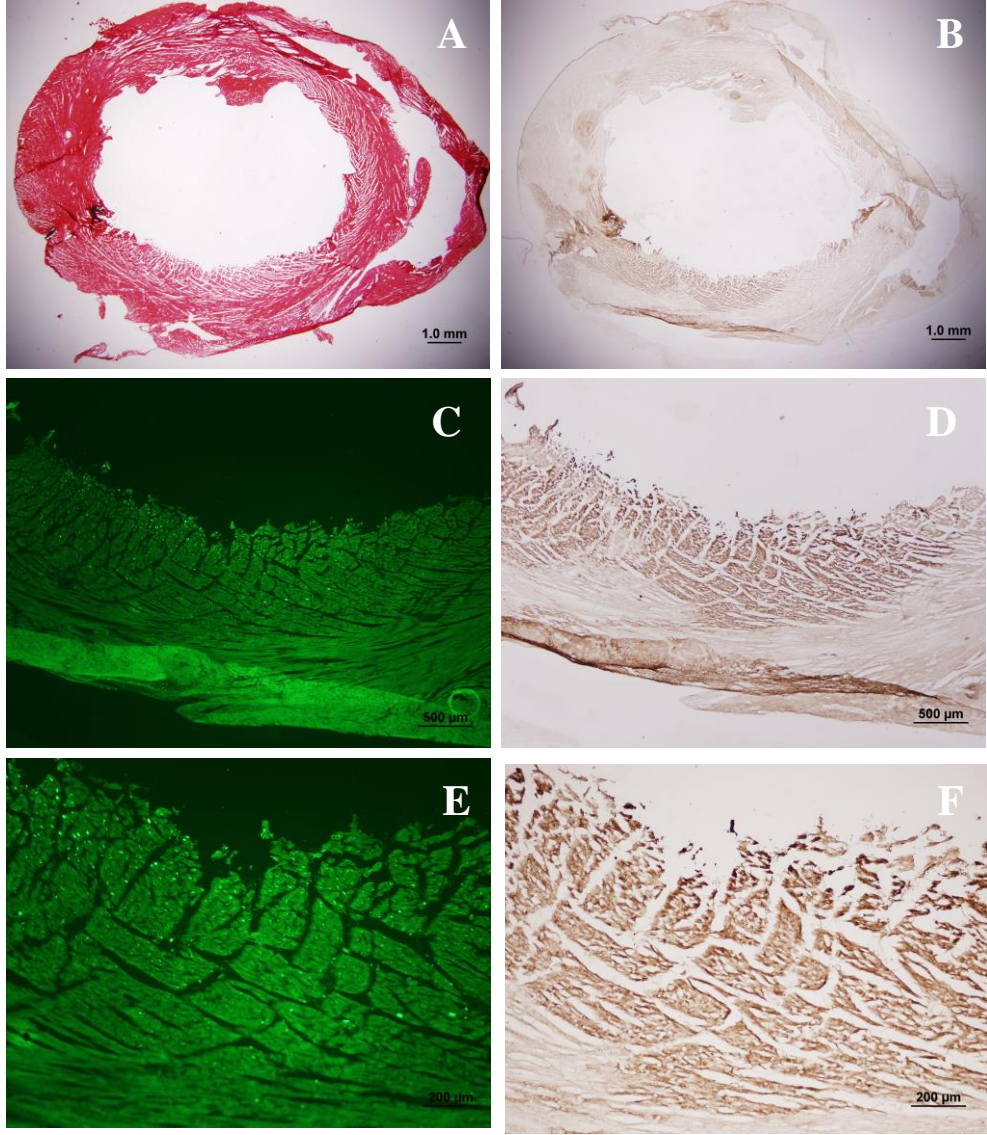


**Resim 1:** İskemi-reperfüzyon sonrası, tuzlu su grubuna ait kalp dokularından alınan kesitlerde, lezyon bölgesindeki histopatolojik değişiklikler ve apoptotik aktivasyon. Tüm kesitler kalbin apeksine en yakın doku bloğundan (4. blok) alındı. Hematoksilen-eozin boyaması (A- x1.25) miyokardiyumun normal ve iskemik alanlarını göstermektedir. Apoptotik aktivasyonu göstermek amacıyla TUNEL boyaması uygulanan kesitlerde (B-F); sol ventrikül duvarında DNA fragmentasyonu oluşan miyosit çekirdekleri parlak yeşil fluoresan işaretli olarak görülmektedir (C- x4 ve E- x10). Aynı kesitlerin TUNEL-POD sonrası DAB kromojeni ile boyanması sonrası çekilen mikrofotografalarında (B-x1.25, D-x4 ve F-x10); sol ventrikül duvarında DNA fragmentasyonu oluşan miyosit çekirdekleri kahverengi boyanmış olarak görülmektedir.

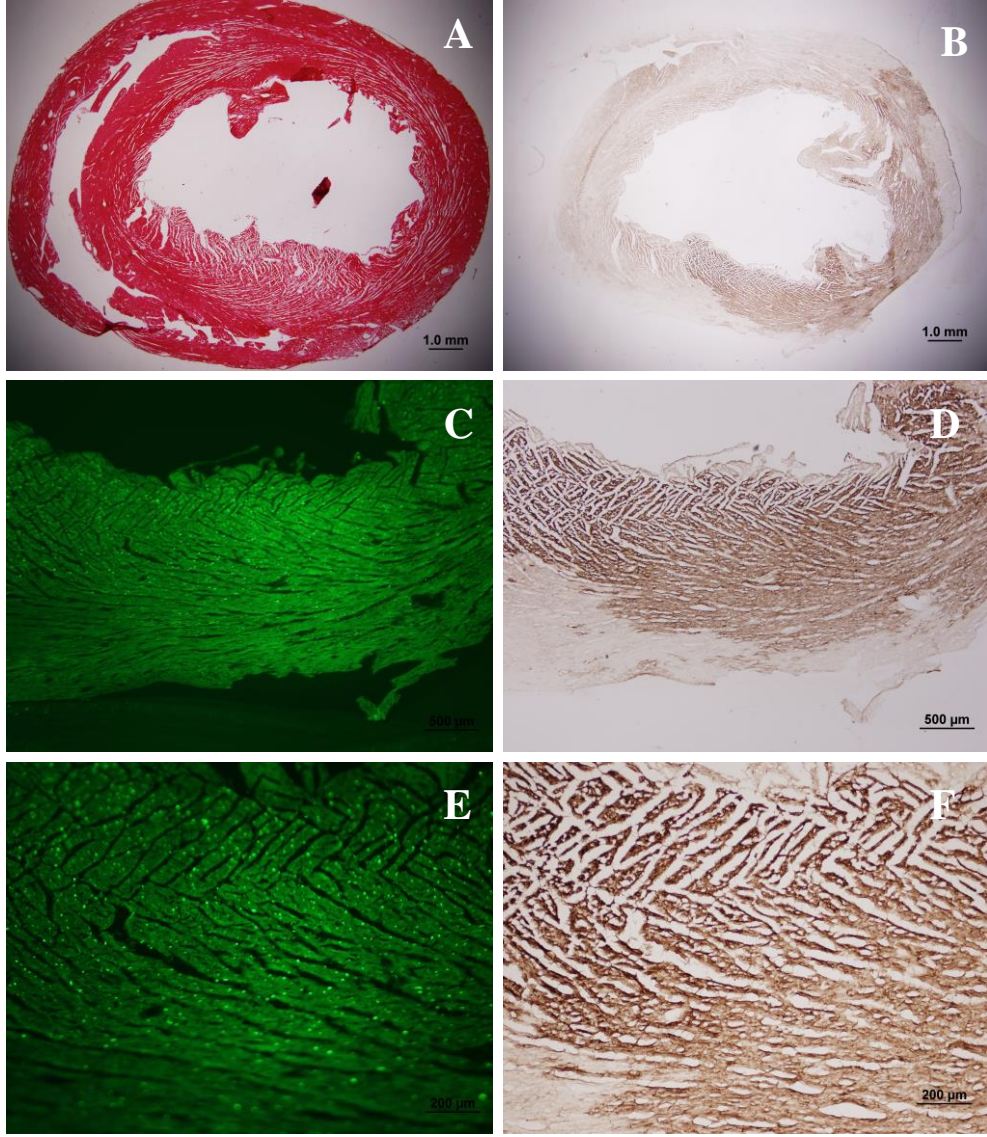




**Resim 2:** İskemi-reperfüzyon sonrası, NAS grubuna ait kalp dokularından alınan kesitlerde, lezyon bölgesindeki histopatolojik değişiklikler ve apoptotik aktivasyon. Tüm kesitler kalbin apeksine en yakın doku bloğundan (4. blok) alındı. Hematoksilen-eozin boyaması (A- x1.25) miyokardiyumun normal ve iskemik alanlarını göstermektedir. Apoptotik aktivasyonu göstermek amacıyla TUNEL boyaması uygulanan kesitlerde (B-F); sol ventrikül duvarında DNA fragmentasyonu oluşan miyosit çekirdekleri parlak yeşil fluoresan işaretli olarak görülmektedir (C- x4 ve E- x10). Aynı kesitlerin TUNEL-POD sonrası DAB kromojeni ile boyanması sonrası çekilen mikrofotograflarında (B-x1.25, D-x4 ve F-x10); sol ventrikül duvarında DNA fragmentasyonu oluşan miyosit çekirdekleri kahverengi boyanmış olarak görülmektedir.



**Resim 3:** İskemi-reperfüzyon sonrası, TMZ grubuna ait kalp dokularından alınan kesitlerde lezyon bölgesindeki histopatolojik değişiklikler ve apoptotik aktivasyon. Tüm kesitler kalbin apeksine en yakın doku bloğundan (4. blok) alındı. Hematoksilen-eozin boyaması (A- x1.25) miyokardiyumun normal ve iskemik alanlarını göstermektedir. Apoptotik aktivasyonu göstermek amacıyla TUNEL boyaması uygulanan kesitlerde (B-F); sol ventrikül duvarında DNA fragmentasyonu oluşan miyosit çekirdekleri parlak yeşil fluoresan işaretli olarak görülmektedir (C- x4 ve E- x10). Aynı kesitlerin TUNEL-POD sonrası DAB kromojeni ile boyanması sonrası çekilen mikrofotograflarında (B-x1.25D-x4 ve F-x10); sol ventrikül duvarında DNA fragmentasyonu oluşan miyosit çekirdekleri kahverengi boyanmış olarak görülmektedir.



**Resim 4:** İskemi-reperfüzyon sonrası, NAS+TMZ grubuna ait kalp dokularından alınan kesitlerde, lezyon bölgesindeki histopatolojik değişiklikler ve apoptotik aktivasyon. Tüm kesitler kalbin apeksine en yakın doku bloğundan (4. blok) alındı. Hematoksilen-eozin boyaması (A-x1.25) miyokardiyumun normal ve iskemik alanlarını göstermektedir. Apoptotik aktivasyonu göstermek amacıyla TUNEL boyaması uygulanan kesitlerde (B-F); sol ventrikül duvarında DNA fragmentasyonu oluşan miyosit çekirdekleri parlak yeşil floresan işaretli olarak görülmektedir (C-x4 ve E-x10). Aynı kesitlerin TUNEL-POD sonrası DAB kromojeni ile boyanması sonrası çekilen mikrofotograflarında (B-x1.25, D-x4 ve F-x10); sol ventrikül duvarında DNA fragmentasyonu oluşan miyosit çekirdekleri kahverengi boyanmış olarak görülmektedir.

## TARTIŞMA

Miyokardiyal İR hasarı uzun zamandan beri bilinen bir durumdur, miyokardiyal reperfüzyonun apoptotik yolların aktivasyonuna neden olduğu (121) ve hedef organ hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Günümüzde miyokard infarktüsündeki tedavi yaklaşımları infarkt alanının sınırlandırılmasına yöneliktir. Ancak reperfüzyondan sonrasında erken dönemde miyositlerde apoptozise bağlı hücre ölümü, nekrotik hücre ölümünden daha siktir (105). Çalışmamızın amacı, İR hasarına bağlı olarak gelişen miyosit apoptozisinin önlenmesinde antioksidan etkisi bilinen N-asetil sistein ve antioksidan ve iskemi sırasında miyosit metabolizmasını düzenleyen bir ajan olan trimetazidinin, S100B düzeyleri, oksidatif stres, infarkt alanı ve apoptozis üzerindeki etkilerinin belirlenmesiydi.

Çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda, sıçanlarda uzun süreli miyokardiyal iskemi modelinde; hem TMZ, hem de NAS'in, tuzlu su grubuna göre oksidatif stresi ve infarkt alanını anlamlı olarak azalttığı gösterildi. Bunun yanında TMZ'in, NAS'e göre oksidatif stres ve infarkt alanında daha belirgin azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca, NAS ve TMZ'in benzer şekilde apoptotik aktivitede azalmaya neden olduğu, NAS ve TMZ kombinasyonunun apoptotik aktiviteyi, sadece TMZ kullanan gruplara göre daha anlamlı şekilde azalttığı izlendi. Çalışma grupları arasında, serum S100B düzeyleri ile apoptozis belirteci olan serum M30, M65 düzeylerinde ise arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Miyokardiyal İR hasarının büyük bir kısmı reperfüzyon döneminde ortaya çıkmaktadır (63). İskemi reperfüzyona bağlı apoptozisi hücre içi kalsiyum artışı (60), serbest oksijen radikalleri (59), hücre içi asidoz, inflamatuvar yanıt (76) gibi faktörler indüklemektedir. İskemiye takiben reperfüzyon döneminde serbest oksijen radikalleri üretiminde patlama olur, serbest oksijen radikalleri membran lipidlerinin peroksidasyonuna, proteinlerin denatürasyonuna, DNA modifikasyonuna yol açar (63). Serbest oksijen radikalleri ile indüklenen hücre hasarı lokal inflamatuvar reaksiyona yol açar, oksidatif stres aracılı doku hasarınının artışına neden olur. Serbest oksijen radikalleri apoptozisi tetikleyen başlıca mediyatörlerdir. Ayrıca reperfüzyon hasarına bağlı mitokondriyal disfonksiyon, mitokondriyal geçirgenlik porlarının açılmasına neden olur. Mitokondriden sitozole sitokrom c'nin geçişi reaktif oksijen radikalleri ile

tetiklenen apoptoziste kritik aşamayı oluşturmaktadır (201). Kajstura ve arkadaşları (105) tarafından yapılan deneysel çalışma, koroner arter oklüzyonu sonrasında, miyokardiyal İR hasarının büyük kısmının apoptozisten kaynaklandığını, ilk saatlerde apoptozisin nekrozdan 30 kat daha fazla olduğu, nekrozun apoptozisi izlediğini, 7. günde nekroz izlenmez iken apoptozisin devam ettiğini göstermiştir. Daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından insanlarda akut Mİ sonrası erken ve geç dönemde apoptozisin varlığı gösterilmiştir (107, 202, 203). İskemi sonrası miyosit ölümünü apoptozis anlamlı bir şekilde arttırmaktadır, apoptotik hücre ölümünü önlemeye yönelik girişimlerin miyokardiyal İR hasarını azaltabileceği gösterilmiştir (204).

Çalışmamızda kullandığımız trimetazidinin çeşitli deneysel modellerde apoptozisi (183, 188) ve infarkt alanını (184, 185) azalttığı saptanmıştır. Trimetazidin, en iyi bilinen etkisi yağ asidi metabolizmasında beta oksidasyon yolunun inhibisyonudur (181). İskemi reperfüzyon sırasında beta oksidasyon yolunun inhibisyonu aynı zamanda glukoz oksidasyonunu artırır. Glukoz oksidasyonunun artışı, glikoliz hızını düşürerek, H<sup>+</sup> üretimini azaltır. İn vitro ve in vivo çalışmalarda, mitokondri fonksiyonlarını koruduğu (183), serbest oksijen radikallerine karşı membranı koruduğu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ettiği ederek İR hasarını engellediği gösterilmiştir (182).

Bu çalışmada kullanılan diğer ajan olan NAS'in akut miyokard infarktüsünde oksidatif stresi azalttığı, reperfüzyon hasarından koruduğu gösterilmiştir (157 - 159). N-asetil sistein, pek çok açıdan ilgi uyandıran bir ilaçtır ve glutatyon ve sistein öncüsü olarak koruyucu özelliklerini ortaya çıkarır (205). N-asetil sistein, süperoksit dismutaz gibi antioksidan sistemlerle direkt olarak etkileşirken glutatyon peroksidaz aktivitesinin arttırmaktadır (152). Vazodilatör ve antiagregan özellikleri vardır (162). Azalmış endotelial kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) aktivitesini düzenleyerek mikrosirkülasyonu ve doku oksijenasyonunu düzeltmektedir (206). Endotel kaynaklı gevşeme faktörü, endotel hücrelerinde sentez edilen damar düz kas hücrelerinin gevşemesini sağlayan, trombosit adhezyon ve agregasyonunu inhibe eden bir maddedir. N-asetil sistein, doku sülfidril gruplarını direkt olarak veya sistein seviyelerini arttırarak EDRF aktivitesini düzenlemektedir (207).

Serbest oksijen radikalleri, çeşitli hücrel yapıları etkileyerek hücre hasarına neden olur. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitler ve aldehidlerin oluşumuna yoluyla proteinlerin sülfidril gruplarıyla etkileşerek hücre hasarına katkıda bulunur (208). Çalışmamızda lipid peroksidasyonu belirteci olarak kullandığımız MDA düzeyleri, TMZ (3 mg/kg, 5 mg/kg), NAS (50 mg/kg, 150 mg/kg), TMZ (5mg/kg) - NAS (150 mg/kg) dozlarında anlamlı olarak azaldı. TMZ nin her iki dozu arasında farklılık izlenmez iken, en anlamlı azalma NAS 50 mg/kg ile TMZ - NAS kombinasyonu grubunda izlendi. Wang ve arkadaşları (209), trimetazidin verilen tavşanlarda 30 dk iskemiye takiben 30 dk reperfüzyon sonrasında MDA düzeylerini anlamlı olarak azalttığı, ayrıca iskemik dokuda ATP düzeylerini arttırdığını göstermiştir. Trimetazidin, mitokondriyal metabolizmayı olumlu etkilediğini ve oksijen radikallerine karşı koruyucu etki gösterdiğini öne sürülmüştür. Farklı bir çalışmada 15 gün boyunca trimetazidin (10 mg/kg/gün) verilen sıçanlarda kısa süreli İR modelinde (5 dk iskemi-5 dk reperfüzyon) aritmilerin, infarkt büyüklüğünün ve MDA düzeylerinin azaldığı izlenmiştir (210). Abe ve arkadaşları (211), sıçanlarda 30 dk iskemi ve 4 saatlik reperfüzyon modelinde NAS'in etkinliğini değerlendirmiştir. İskemi öncesinde başlanan NAS'in (150 mg/kg) glutasyon peroksidaz düzeylerini iyileştirdiği ve infarkt alanını anlamlı olarak sınırlandırdığı izlenmiştir. Bu çalışma, miyokardiyal İR hasarında NAS'in yararlı etkilerinin elde edilebilmesi için reperfüzyonun erken döneminde yeterli plazma NAS konsantrasyonunun sağlanması gerektiğini ortaya koymuştur. Çalışmamızdaki dikkat çekici noktalardan birisi de trimetazidinin her iki dozunda da, klasik bir antioksidan olarak bilinen NAS'e göre oksidatif stres düzeylerinde daha belirgin azalma sağlamasıdır. N-asetil sistein ve TMZ kombinasyonu grubunda oksidatif stres düzeylerinde NAS dozlarına göre daha belirgin olan azalmayı da TMZ'in etkisine bağlayabiliriz. Çalışmamızda NAS ve TMZ'in olumlu etkileri reperfüzyon tedavisinden önce uygulandığında görüldü.

Miyokardiyal İR hasarının değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerden birisi infarkt alanıdır. Çalışmamızda kullandığımız ilaç gruplarında, tuzlu grubuna göre infarkt alanı anlamlı şekilde azaldı. TMZ'nin her iki dozu arasında farklılık yoktu ve diğer gruplara göre [NAS (50 mg/kg, 150 mg/kg), TMZ (5mg/kg) - NAS (150 mg/kg)] infarkt alanındaki azalma daha anlamlıydı. Noble ve arkadaşları da (185), TMZ (3 mg/kg) verilen tavşanlarda 45 dk iskemi

sonrasında 24 saat reperfüzyon uygulandığında infarkt alanının azaldığını göstermiştir. Klinik çalışmalarda da trombolitik tedavi uygulanan miyokard infarktüsli hastalarda trimetazidinin infarkt alanını sınırladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (186). Ruixing ve arkadaşları (188) ise 2 hafta boyunca 2 mg/kg/gün TMZ verilen tavşanlarda 30 dk iskemi, 120 dk reperfüzyon uyguladıklarında, tedavi verilen grupta kontrol grubuna ve sham grubuna göre apoptotik indekste, MDA düzeylerinde anlamlı olarak azalma olduğunu, süperoksit dismutaz düzeylerinde artış olduğunu saptanmıştır. Ayrıca apoptotik indeks ile MDA düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu, superoksit dismutaz düzeyleri ile negatif korelasyon olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada tedavi grubunda, kontrol grubuna göre ortalama kalp hızı ve kan basıncı anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Farklı çalışmalarda trimetazidinin hemodinamik parametreleri değiştirmedigi saptanmıştır (208, 212). İkizler ve arkadaşları, 5 gün süreyle günde 2 kez TMZ (3 mg/kg) verilen sıçanlarda 60 dk iskemi - 60 dk reperfüzyon uyguladıkları izole kalp modelinde pik sistolik kan basıncının artış gösterdiğini saptamıştır (213). Rahman ve arkadaşları (214), izole kalp perfüzyonu modelinde 25 dk iskemi – 30 dk reperfüzyon uyguladıkları modelde TMZ'in kalp debisini arttırdığı, kalp hızı ve kan basıncında anlamlı değişiklik oluşturmadığını gösterdi. Bir çalışmada 90 dk koroner oklüzyon sonrasında 24 saat reperfüzyon uygulanan modelde iskeminin 30. dakikasında NAS (150 mg/kg) başlanarak 1 saat boyunca infüzyon şeklinde verilmiş ve 50 mg/kg/saat dozunda dozunda idame edildiğinde reperfüzyon sonrası miyosit ölümünde azalmaya neden olmasa bile miyokardiyal “stunning” azaltabildiği gösterilmiştir (215). Farklı deneysel modeller olmasına karşın bizim çalışmamızda da TMZ'in her iki dozunda ortalama kan basıncı ve kalp hızı tuzlu su grubuna göre daha yüksek seyretti. Çalışmamızda TMZ dozlarında kan basıncında kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik saptanmaz iken NAS 150 mg/kg ve TMZ (5 mg/kg) - NAS (150 mg/kg) gruplarında ortalama kan basıncı tuzlu su grubuna göre daha düşüktü. TMZ'in kan basıncı ve kalp hızı üzerindeki olumlu etkileri infarkt alanı azalmasına katkıda bulunmuş olabilir.

Miyokardiyal İR hasarını takiben ortaya çıkan olaylardan en önemlisi apoptozisdir. Kaspazlar apoptotik hücre ölümüne aracılık etmektedir. Çalışmamızda miyokardiyal İR modelinde NAS ve TMZ'in apoptotik hücre

ölümü üzerindeki etkilerini değerlendirdik. NAS 50 mg/kg dozunun, 150 mg/kg dozuna göre infarkt alanını sınırlama konusunda daha yararlı olması nedeniyle apoptotik aktiviteyi değerlendirirken 50 mg/kg dozunu kullandık. Değerlendirmede TUNEL yöntemi ve kaspaz 3 boyaması yöntemlerini kullandık. Çalışmamızda sham grubunda apoptotik aktivite izlenmedi. Çalışmamızda, TMZ 5 mg/kg ve NAS 50 mg/kg gruplarında tuzlu su grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik aktivitede benzer şekilde azalma izledik, ancak apoptotik aktivitede en belirgin azalmayı TMZ (5 mg/kg) - NAS (50 mg/kg) grubunda saptadık. Ruixing ve arkadaşları (188), ise sham grubunda da TUNEL pozitifliği gösteren hücreler olduğunu izlemiştir. Ruixing ve arkadaşları (188), 2 haftalık TMZ tedavisinin apoptotik aktiviteyi azalttığını gösterdi. Ancak AMİ gibi sık karşılaşılan durumlar düşünüldüğünde, reperfüzyon öncesinde apoptozisin önlenmesine yönelik tedavi yaklaşımlarının başlaması önem taşımaktadır. Çalışmamız bu anlamda iskemi döneminde başlanan tedavilerin reperfüzyon sağlandığı takdirde hem infarkt alanının sınırlanmasını sağladığı hemde apoptotik aktiviteyi azalttığını göstermesi açısından değerlidir. Trimetazidinin kardiyoprotektif etkisine katkıda bulunan bir mekanizmayı ortaya çıkaran çalışmada tavşanlara 30 dk koroner oklüzyon sonrası 4 saat reperfüzyon uygulanmıştır (183). Kontrol grubu, iskemik ön koşullanma grubu ve iskemiden 10 dk önce TMZ (5 mg/kg) uygulanan 3 grup değerlendirildiğinde, TMZ'in infarkt alanını % 34 oranında azalttığı, apoptozis belirteci kaspaz 3 aktivitesini azalttığı, apoptozis patolojisinde önemli rolü olan mitokondriyal PTP kanallarını açılmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada TMZ'in hemodinami üzerinde anlamlı etkisinin olmadığını göstermiştir. Trimetazidinin mitokondriyal geçirgenlik üzerine etkisine ışık tutan bir çalışmada Monteiro ve arkadaşları (214), izole sıçan kalbi modelinde iskemiye bağlı olarak solunum zinciri I aktivitesindeki azalmayı engellediğini göstermiştir. İskemi sırasında kompleks I aktivitesinin korunması SOR oluşumunu azaltarak mitokondriyal membran hasarını ve PTP açılmasına engel olabileceği saptanmıştır (216). Sentex ve arkadaşları (217), TMZ'in ventriküler miyositlerde mitokondri membranında sitokrom c'ye bağlı bulunan kardiyolipin sentezini arttırdığını göstermiştir, nitekim kardiyolipin serbest oksijen radikallerinin hedefi durumundadır. TMZ, bir yandan kardiyolipin sentezinin artışı diğer yandan serbest oksijen radikallerinin üretimini inhibisyonu ile koruyucu etkilerini



gösterebilir. Trimetazidin, çalışmamızda iki farklı dozunda MDA düzeyleri ile değerlendirdiğimiz oksidatif stresi anlamlı bir şekilde azaltmıştır. NAS 50 mg/kg dozunun ortalama kan basıncında anlamlı azalmaya neden olmaması ile birlikte TMZ'in oksidatif stresi de azaltıyor olması infarkt alanının sınırlanmasına ve apoptotik aktivitenin daha fazla azalmasına katkıda bulunmaktadır. Çalışmamızdaki çarpıcı bulgularda birisi de apoptotik aktivitedeki azalma üzerinde NAS içeren tedavilerin etkili olması iken, infarkt alanı üzerinde ise TMZ içeren tedavilerin daha etkili olmasıdır. N-asetil sisteine göre TMZ'in infarkt alanı üzerindeki sınırlayıcı etkisi muhtemelen hücre içi yağ asidi ve glukoz metabolizması üzerindeki olumlu etkileriyle ilişkili olabilir. Buna karşın antioksidan ajan olan NAS'in tek başına veya TMZ ile birlikte kullanıldığında apoptotik aktivitede daha belirgin azalmaya neden olması, oksidatif stresin apoptozisin indüklenmesindeki rolünü ve oksidatif stresi azaltan tedavilerin önemini gösterebilir.

İskemi ve sonrasında gelen reperfüzyon, miyositlerle birlikte endotel hücrelerini de etkileyerek miyokard hasarına neden olmaktadır. Bu hasarın kaynağı, reperfüzyonun erken döneminde ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin oluşmasıdır (218). Harlan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada glutasyon redoks yolunun korunmasının endotel hasarını azaltabileceğini göstermiştir (219). Endotelin korunması, reperfüzyon sonrası vasküler reperfüzyon hasarının önlenmesi açısından önemli mekanizmalarından birisidir (220). Bir çalışmada iskemiyi reperfüzyona maruz kalmış kalpte, vasküler hücrelerde % 44.5, kardiyak miyositlerde % 6.2 oranında TUNEL pozitif hücreler saptanmıştır. Bu çalışma reperfüzyonun erken döneminde etkilenen hücre tipinin endotel hücreleri olduğunu göstermiştir (221). Aynı grubun daha sonra yaptığı çalışma, İR sonrası, apoptozisin zamana bağlı bir şekilde geliştiğini göstermiştir. TUNEL yöntemi ve elektron mikroskopisi ile değerlendirildiğinde, iskeminin miyositlerde ve miyosit dışında hücrelerde apoptozis gelişimi için yeterli olmadığını göstermektedir (222). Reperfüzyonun erken evrelerinde, apoptozis öncelikle küçük damarlardaki endotel hücrelerinde görülür. Apoptozisin çevredeki miyositlere yayılması, reperfüzyon sırasında endotel hücrelerinden salınan çeşitli proapoptotik mediyatörlerin, miyositlerde apoptozise neden olduğunu göstermektedir (222).

Son yıllarda kardiyovasküler hastalıklarda sitokeratin 18'in potansiyel bir belirteç olarak yararını gösteren çalışmalar giderek artmaktadır. Sitokeratin 18, kardiyak mikrovasküler yapıdaki endotel hücrelerinde, aynı zamanda da ateromatöz plaktaki damar düz kas hücrelerinde eksprese edilmektedir (127). Sitokeratin 18 (M30 antijeni) olarak adlandırılan filaman, apoptozis sırasında erken dönemde yıkılır, canlı ve nekrotik hücrelerde saptanmamaktadır (125). Monoklonal bir antikor, M30, yıkıma uğratılan sitokeratin 18'i spesifik olarak tanır. Çeşitli çalışmalarda miyokard infarktüsü geçirmiş hastalarda, koroner oklüzyon düzeyinde M30 düzeylerini anlamlı olarak arttığını göstermiştir (129, 223). Bu çalışmada, miyositlerde apoptozisin saptanmadığı erken dönemde endotel hücresi apoptozisini değerlendirmek amacıyla serum M30 düzeylerini inceledik. Endotel hücresi apoptozisi, miyokarddaki vasküler dolaşımı olumsuz etkileyerek vasküler reperfüzyon hasarına katkıda bulunabilir. Ancak çalışma gruplarımızda arasında endotel hücrelerinde apoptozisi gösteren serum M30 ve apoptozis ve nekrozu içeren total hücre ölümünü gösteren serum M65 düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık izlenmedi. Ancak AMİ geçiren hastalarda serum M30 düzeyleri 24. saatte pik yapmıştır (223). Akut Mİ'li hastalarda semptomların başlangıcından 24 saat sonra artmış serum M30 düzeyleri, endotel ve/veya düz kas hücrelerinde apoptozise işaret etmektedir. Bu durum kardiyak mikrovasküler yapıdaki endotel hücrelerinde olabileceği gibi aterom plaklarındaki düz kaslardan da kaynaklanabilir (224). Aldbrecht ve arkadaşları (129), AMİ geçiren hastalarda benzer sonuçlar elde etmiştir. Klinik çalışmalarda AMİ'nde serum M30 düzeylerindeki artışın farklı çalışmalarda gösterilmiş olmasına karşın çalışmamızda gruplar arasında serum M30 düzeylerinde anlamlı bir farklılığın olması, patofizyolojinin ateroskleroz zemininde gelişmemiş olması ve deneysel modelimizin koroner ligasyon ile gerçekleştirilmesine bağlı olabilir.

S100B, Ca<sup>++</sup> bağlayıcı protein olup, normal olarak astrositlerden eksprese edilir, deneysel çalışmalarda miyokardiyal hipertrofik yanıtın negatif bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (225). Normal şartlarda miyokarda eksprese edilmez. Deneysel Mİ modelinde sıçanlarda koroner arter ligasyonu sonrası S100B mRNA sını saptanmıştır (131, 225). İskemi reperfüzyon hasarında mitokondriden sitokrom c salınımı ve apoptotik yollarının aktivasyonunda S100B'nin rolünü değerlendirmeyi amaçladık. Ancak çalışmamızda kontrol

grubu ile karşılaştırıldığında TMZ 3 mg/kg, 5 mg/kg, NAS 50 mg/kg, 150 mg/kg dozları arasında S100B düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Yapılan bir çalışmada, S100B indüksiyonunun LAD ligasyonundan 7 gün sonra ortaya çıktığı ve 28. günde pik yaptığı gösterilmiştir (225). Tsoporis ve ark. (226), LAD ligasyonu uyguladıkları farelerde 35. günde ventrikülün yeniden şekillenmesinde S100B nin rolünü incelemiştir ve S100B düzeyleri yüksek olan farelerde infarkttan uzak alanlarda hipertrofik yanıtın daha düşük olduğunu göstermiştir. Biz, 30 dakikalık iskemiye takiben 3 saatlik reperfüzyon sonrasında S100B düzeylerinde anlamlı farklılık izlemedik, S100B, muhtemelen ventrikülün yeniden şekillenmesinde düzenleyici role sahiptir ve etkisini daha uzun dönemde göstermektedir. Bir çalışmada, izole kalp perfüzyonu modelinde, 20 dk iskemiye takiben 30 dk'lık reperfüzyon protokolü uygulandığında, reperfüzyon anında S100B düzeylerinin arttığı, ancak daha sonra S100B düzeylerinin kontrol grubu ile farklılık göstermediği saptanmıştır (227).

Ancak bu çalışmayı kısıtlayan bir takım faktörler vardır;

İzole kalp perfüzyonu modeli kullanılmıştır, S100B düzeyleri in vivo koşulları yansıtmayabilir.

İskemi, perfüzyonun sonlandırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. İlk alınan ölçümde saptanan yüksek S100B düzeyleri, koroner vasküler yatakta biriken S100B düzeylerini yansıtabilir, nitekim 5. dk, 10 dk ve sonraki dönemlerde S100B düzeyleri kontrol grubundan farklı değildir.

S100B, Mİ sonrasında miyokarda apoptozisin düzenlenmesinde hasara uğrayan miyositlerden salınımından sonra RAGE ile etkileşimi sonrası sitokrom c salınımı ve proapoptotik kaspaz kaskadının aktivasyonu rol oynayabileceği düşünülmüştür (228).

Sonuç olarak, sıçanlarda uzun süreli miyokardiyal iskemi modelinde; hem TMZ, hem de NAS'in oksidatif stresi ve infarkt alanını anlamlı olarak azalttığı, bu etkilerin TMZ verilen grupta daha anlamlı olduğu görülmektedir. Ayrıca NAS ve TMZ'in benzer şekilde apoptotik aktivitede azalmaya neden olurken en anlamlı azalmanın NAS ve TMZ kombinasyonunda izlendiği saptanmıştır. Bu veriler ışığında miyokardiyal reperfüzyonu sağlamaya yönelik mekanik girişimler yanında farklı noktaları hedefleyen hücre koruyucu ajanların kullanımı

reperfüzyon hasarının ve reperfüzyona bağlı morbiditenin azaltılmasında ciddi yarar sağlayacağı öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR

5. JNEİD H, FONAROW GC, CANNON CP, PALACİOS IF, KILIÇ T, MOUKARBEL GV, MAREE AO, LABRESH KA, LIANG L, NEWBY LK, FLETCHER G, WEXLER L, PETERSON E. Get With the Guidelines Steering Committee and Investigators. Impact of time of presentation on the care and outcomes of acute myocardial infarction. *Circulation*, 117: 2502–2509, 2008.
6. AMERICAN HEART ASSOCIATION. Learn and Live. Know the Facts, Get the Stats. Dallas, TX: American Heart Association 1–4, 2006.
7. HOCHMAN JS, CHOO H. Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. *Circulation*, 75: 299–306, 1985.
8. SUTTON MG, SHARPE N. Left ventricular remodelling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, 101: 2981–2988, 2000.
9. JENNINGS RB, SOMMERS HM, SMYTH GA, FLACK HA, LINN H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*, 70:68–78, 1960.
10. BRAUNWALD E, KLONER RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*, 76: 1713–9, 1985.
11. YELLON DM, HAUNSENLOY DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 357: 1121–35, 2007.
12. OLİVETTİ G, QUAİNİ F, SALA R, LAGRASTA C, CORRADI D, BONACİNA E, GAMBERT SR, CİGOLA E, ANVERSA P. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 28:2005–2016, 1996.
13. SERRUYS PW, ARNOLD AE, BROWER RW, DE BONO DP, BOKSLAG M, LUBSEN J, REİBER JH, RUTSCH WR, UEBİS R, VAHANİAN A. Effect of continued rt-PA administration on the residual stenosis after initially successful recanalization in acute myocardial infarction--a quantitative coronary angiography study of a randomized trial. *Eur Heart J*, 8:1172-1181, 1987.
14. WILLİCH SN, LİNDERER T, WEGSCHEİDER K, LEİZOROVİCZ A, ALAMERCERY I, SCHRÖDER R. Increased morning incidence of myocardial infarction in the ISAM Study: absence with prior beta-adrenergic blockade. ISAM Study Group. *Circulation*, 80:853-858, 1989.
15. ENAR R. Akut Miyokard İnfarktüsü: Kanıtlar ve Tedavisi, Akut Miyokard İnfarktüsü Trombokardiyoloji, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 629-785, 2004.
16. BOERSMA E, MERCADO N, POLDERMANS D, GARDİEN M, VOS J, SİMOONS ML. Acute myocardial infarction. *Lancet*, 361: 847-858, 2003.
17. ANDREOTTİ F, PORTO I, CREA F, MASERİ A. Inflammatory gene polymorphisms and ischaemic heart disease: review of population association studies. *Heart*, 87: 107-112, 2002.
18. MORENO PR, FALK E, PALACİOS IF, NEWELL JB, FUSTER V, FALLON JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*, 90(2): 775-778, 1994.
19. PREDİMAN KS. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J am Coll Cardiol* 2003;41:15S-22S.
20. MORENO PR, BERNARDİ VH, LOPEZ-CUELLAR J, MURCİA AM, PALACİOS IF, GOLD HK, MEHRAN R, SHARMA SK, NEMERSON Y, FUSTER V, FALLON JT. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute

- coronary syndromes. *Circulation*, 94: 3090-3097, 1996.
21. REIMER KA, JENNINGS RB. The “wave front phenomenon” of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest*, 40:633, 1979.
  22. LIBBY P. The Vascular Biology of Atherosclerosis, in: Braunwald E (ed). *Heart Disease A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 6th ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp 995-1009, 2001.
  23. FALK E, FERNANDEZ-ORTÍZ A. Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J Cardiol*, 75: 3B-11B, 1995.
  24. FALK E. Morphologic features of unstable atherothrombotic plaques underlying acute coronary syndromes. *Am J Cardiol*, 63: 114E-120E, 1989.
  25. KONO T, MORITA H, NISHINA T, FUJITA M, HIROTA Y, KAWAMURA K, FUJIWARA A. Circadian variations of onset of acute myocardial infarction and efficacy of thrombolytic therapy. *J Am Coll Cardiol*, 27: 774-778, 1996.
  26. ANTMAN E, BRAUNWALD E. Acute Myocardial Infarction, in: Braunwald E (ed). *Heart Disease A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 6th ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp 1114-1231, 2001.
  27. DOBSON G, HIMMELREICH U. Heart design: free ADP scales with absolute mitochondrial and myofibrillar volumes from Mouse to human. *Biochim Biophys Acta*, 1553: 261–267, 2002.
  28. SOLAINI G, HARRIS DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J*, 390: 377–394, 2005.
  29. PALMER JW, TANDLER B, HOPPEL CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem*, 252: 8731–8739, 1977.
  30. SHARMA N, OKERE IC, BRUNENGRABER DZ, McELFRESH TA, KING KL, STERK JP, HUANG H, CHANDLER MP, STANLEY WC. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity and citric acid cycle intermediates during high cardiac power generation. *J Physiol*, 562: 593–603, 2005.
  31. O’ROURKE B. Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection. *Circ. Res*, 94: 420–432, 2004.
  32. STANLEY WC, RECCHIA FA, LOPASCHUK GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 85: 1093–1129, 2005.
  33. GERTZ EW, WISNESKI JA, STANLEY WC, NEESE RA. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest*, 82(6): 2017–25, 1988.
  34. LOPASCHUK GD, BELKE DD, GAMBLE J, ITOI T, SCHÖNEKESS BO. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1213: 263-276, 1994.
  35. VAN DER VUSSE GJ, VAN BILSEN M, GLATZ JF. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc Res*, 45: 279-293, 2000.
  36. STANLEY WC, MARZILLI M. Metabolic therapy in the treatment of ischemic heart disease: The pharmacology of trimetazidine. *Fundam Clin Pharmacol*, 17: 33-145, 2003.
  37. KURIEN VA, OLIVER MF. Serum-free-fatty-acids after acute myocardial infarction and cerebral vascular occlusion. *Lancet*, 2: 122–127, 1966.
  38. STANLEY WC, LOPASCHUK GD, HALL JL, MCCORMACK JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res*, 33: 243-257, 1997.

39. BELL GI, KAYANO T, BUSE JB, BURANT CF, TAKEDA J, LIN D, FUKOMOTO H, SEINO S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*, 13: 198–208, 1990.
40. DORÍA-MEDINA CL, LUND DD, PASLEY A, SANDRA A, SIVITZ WI. Immunolocalization of GLUT-1 glucose transporter in rat skeletal muscle and in normal and hypoxic cardiac tissue. *Am J Physiol*, 265: E454–E464, 1993.
41. CHANDLER MP, HUANG H, MCELFFRESH TA, STANLEY WC. Increased nonoxidative glycolysis despite continued fatty acid uptake during demand-induced myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282: H1871–H1878, 2002.
42. WISNESKI JA, GERTZ EW, NEESE RA, GRUENKE LD, MORRIS DL, CRAIG JC. Metabolic fate of extracted glucose in normal human myocardium. *J Clin Invest*, 76: 1819–1827, 1985.
43. MASSIE BM, SCHWARTZ GG, GARCIA J, WISNESKI JA, WEINER MW, OWENS T. Myocardial metabolism during increased work states in the porcine left ventricle in vivo. *Circ Res*, 74: 64–73, 1994.
44. LIEDTKE AJ. Alterations of carbohydrate and lipid metabolism in the acutely ischemic heart. *Prog Cardiovasc Dis*, 23: 321–336, 1981.
45. RANDLE PJ, NEWSHOLME EA, GARLAND PB. Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem J*, 93: 652–665, 1964.
46. HIGGINS AJ, MORVILLE M, BURGESS RA, GARDINER DG, PAGE MG, BLACKBURN KJ. Oxfenicine diverts rat muscle metabolism from fatty acid to carbohydrate oxidation and protects the ischaemic rat heart. *Life Sci*, 27: 963–970, 1980.
47. SACK MN, HARRINGTON LS, JONASSEN AK, MJØS OD, YELLON DM. Coordinate regulation of metabolic enzyme encoding genes during cardiac development and following carvedilol therapy in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Drugs Ther*, 14(1): 31–39, 2000.
48. MCNULTY PH, JAGASIA D, CLINE GW, NG CK, WHITING JM, GARG P, SHULMAN GI, SOUFER R. Persistent changes in myocardial glucose metabolism in vivo during reperfusion of a limited-duration coronary occlusion. *Circulation*, 101(8): 917–922, 2000.
49. TAEGETMEYER H, ROBERTS AF, RAINE AE. Energy metabolism in reperfused heart muscle: metabolic correlates to return of function. *J Am Coll Cardiol*, 6(4): 864–870, 1985.
50. PARKS DA, GRANNER DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*, 250: G749–753, 1986.
51. DOWNEY JM. Free radicals and their involvement during long term myocardial ischemia and reperfusion. *Annu Rev Physiol*, 52: 487–504, 1990.
52. FEDELE FA, GEWIRTZ H, CAPPONE RJ, SHARAF B, MOST AS. Metabolic response to prolonged reduction of myocardial blood flow distal to a severe coronary artery stenosis. *Circulation*, 78: 729–735, 1988.
53. PANTELY GA, MALONE SA, RHEN WS, ANSELONE CG, ARAI A, BRISTOW J, BRISTOW JD. Regeneration of myocardial phosphocreatine in pigs despite continued moderate ischemia. *Circ Res*, 67: 1481–1493, 1990.
54. RAMAToola SH. A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. *Circulation*, 72: V-123–125, 1985.

55. VATNER SF. Correlation between acute reductions in myocardial blood flow and function in conscious dogs. *Circ Res*, 81 :1948–1958, 1980.
56. DEPREE C, VANOVERSCHELDE JL, TAEGTMEYER H. Glucose for the heart. *Circulation*, 99(4): 578–588, 1999.
57. HEUSCH G. Hibernating myocardium. *Physiol Rev*, 78(4): 1055–1085, 1998.
58. VUORINEN K, YLITALO K, PEUHKURINEN K, RAATIKAINEN P, ALARAMI A, HASSINEN IE. Mechanisms of ischemic preconditioning in rat myocardium. Roles of adenosine, cellular energy state, and mitochondrial F1F0-ATPase. *Circulation*, 91: 2810–2818, 1995.
59. FABIATO A, FABIATO F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol*, 276: 233-255, 1978.
60. MURPHY E, PERLMAN M, LONDON RE, STEENBERGEN C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res*, 68: 1250-1258, 1991.
61. MURNAGHAM MF. Effect of fatty acids on the ventricular arrhythmia threshold in the isolated heart of the rabbit. *Br J Pharmacol*, 73(4): 909–915, 1981.
62. GOLL DE, THOMPSON VF, LI H, WEI W, CONG J. The calpain system. *Physiol Rev*, 83: 731–801, 2003.
63. FRENCH JP, QUINDRY JC, FALK DJ, STAIB JL, LEE Y, WANG KK, POWERS SK. Ischemia reperfusion- induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290:H128–H136, 2006.
64. ZWEIER JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem*, 263(3): 1353– 1357, 1988.
65. BROOKS WW, CONRAD CH, MORGAN JP. Reperfusion induced arrhythmias following ischaemia in intact rat heart: role of intracellular calcium. *Cardiovasc Res*, 29(4): 536– 542, 1995.
66. REILLY PM, SCHILLER HJ, BULKLEY GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The Am J Off Surgery*, 161: 488-503, 1991.
67. WHITE BC, GROSSMAN LI, KRAUSE GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology*, 43: 1656-1665, 1993.
68. BARBER DA, HARRIS SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm*, 9: 26-35, 1994.
69. NEGRE-SALVAYRE A, AUGÉ N, AYALA V, BASAGA H, BOADA J, BRENKE R, CHAPPELLE S, COHEN G, FEHER J, GRUNE T, LENGYEL G, MANN GE, PAMPLONA R, POLÍ G, PORTERO-OTÍN M, RIAHÍ Y, SALVAYRE R, SASSON S, SERRANO J, SHAMNÍ O, SIEMS W, SLOW RC, WISWEDEL I, ZARKOVIĆ K, ZARKOVIĆ N. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res*, 44(10): 1125-71, 2010.
70. DRAPER HH, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 186: 421-431, 1990.
71. VIJG J, BUSUTTIL RA, BAHAR R, DOLLE ME. Aging and genome maintenance. *Ann N Y Acad Sci*, 1055: 35-47, 2005.
72. GARCÍA-PÉREZ JC, ARIAS-DÍAZ J, VARA E, BALIBREA JL. Glucose intolerance modifies the inflammatory response after intestinal ischemia-



- reperfusion. *World J Surg*, 29(9): 1143-1150, 2005.
73. JORDAN JE, ZHAO ZQ, VINTEN-JOHANSEN J. The role of neutrophils in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 43(4): 860–878, 1999.
  74. SHEN AC, JENNINGS RB. Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. *Am J Pathol*, 67(3): 441–452, 1972.
  75. MOENS AL, CLAEYS MJ, TIMMERMANS JP, VRINTS CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol*, 20;100(2): 179-190, 2005.
  76. PIPER HM, MEUTER K, SCHAFFER C. Cellular mechanisms of ischemia–reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 75(2): S644 –48, 2003.
  77. BUJA LM, HAGLER HK, WILLERSON JT. Altered calcium homeostasis in the pathogenesis of myocardial ischemic and hypoxic injury. *Cell Calcium*, 9(5-6): 205-217, 1988.
  78. LINZ W, LAU HH, BECK G, SCHOKENS BA. Influence of the thromboxane synthetase inhibitor HOE 944, prostacyclin and indomethacin on reperfusion arrhythmias, cardiodynamics and metabolism in isolated ischemic rat hearts. *Biomed Biochim Acta*, 47(10–11): S23– 26, 1988.
  79. DREYER WJ, MICHAEL LH, WEST MS, SMITH CW, ROTHLEIN R, ROSSEN RD, ANDERSON DC, ENTMAN ML. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation*, 84(1): 400–411, 1991.
  80. HANSEN PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 91(6): 1872– 85, 1995.
  81. XIAO CY, HARA A, YUHKI K, FUJINO T, MA H, OKADA Y, TAKAHATA O, YAMADA T, MURATA T, NARUMIYA S, USHIKUBI F. Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia–reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation*, 104(18): 2210– 2215, 2001.
  82. ABBATE A, BUSSANI R, BIONDI-ZOCCAÌ GG, ROSSIELLO R, SILVESTRE F, BALDI F, BIASUCCI LM, BALDI A. Persistent infarct-related artery occlusion is associated with an increased myocardial apoptosis at postmortem examination in humans late after an acute myocardial infarction. *Circulation*, 106(9):1051-1054, 2002.
  83. FLISS H, GATTINGER D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 79(5): 949-956, 1996.
  84. BLACK SC, HUANG JQ, REZAIEFAR P, RADINOVIC S, EBERHART A, NICHOLSON DW, RODGER IW. Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, 30(4): 733-742, 1998.
  85. LONG X, BOLUTY MO, HIPOLITO ML, LUNDBERG MS, ZHANG JS, O'NEILL L, CIRIELLI C, LAKATTA EG, CROW MT. p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 99(11): 2635-2643, 1997.
  86. SEARLE J, KERR JFR, BISHOP CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance In *Pathology Annual Sommers SC, Rosen PP, eds Norwalk: CT Appleton-Century-Croftspp*, pp 229–260, 2000.
  87. LEIST M, JAATTELA M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:589–598, 2001.

88. PIPER HM, ABDALLAH Y, SCHAFFER C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 61: 365–371, 2004.
89. HONDA HM, KORGE P, WEISS JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci*, 1047: 248–258, 2005.
90. GOTTLIEB RA. Mitochondria and apoptosis. *Biol Signals Recept*, 10: 147–161 2001.
91. UMANSKY S, TOMEI L. Apoptosis in the heart In *Apoptosis: Pharmacological Implications and Therapeutic Opportunities* Kaufman SH, ed San Diego, CA: Academic Press pp. 383–408, 2000.
92. ADAMS III JE, SCHECTMAN KB, LANDT Y, LADENSON JH, JAFFE AS. Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I. *Clin Chem*, 40: 1291–1295, 1994.
93. BENNETT MR. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart*, 87: 480–487, 2002.
94. JENNINGS RB, MURRY CE, REIMER KA. Myocardial effects of brief periods of ischemia followed by reperfusion In *Advances in Cardiology* Vol. 37, Kellermann JJ, Braunwald E, eds Basel, Switzerland: Karger pp. 7–31, 1990.
95. GOTTLIEB RA, BURLESON KO, KLONER RA, BABIOR BM, ENGLER RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 94: 1621–1628, 1994.
96. SCARABELLI T, STEPHANOU A, RAYMENT N, PASINI E, COMINI L, CURELLO S, FERRARI R, KNIGHT R, LATCHMAN D. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischaemia/reperfusion injury. *Circulation*, 4: 253–256, 2001.
97. FREUDE B, MASTERS TN, KOSTIN S, ROBICSEK F, SCHAPER J. Cardiomyocyte apoptosis in acute and chronic conditions. *J Mol Cell Cardiol*, 94: 1621–1628, 1996.
98. BORTNER CD, OLDENBURG NB, CIDLOWSKI JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 5: 21–26, 1995.
99. THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312–1316, 1998.
100. FREUDE B, MASTERS N, ROBICSEK F, FOKIN A, KOSTIN S, ZIMMERMANN R, ULLMANN C, LORENZ-MEYER S, SCHAPER J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 32: 197–208, 2000.
101. SUZUKI K, KOSTIN S, PERSON E, ELSASSER A, SHAPER J. Time course of the apoptotic cascade and effects of caspase inhibitors in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 33: 983–994, 2001.
102. LEIST M, SINGLE B, CASTOLDI AF, KUHNLE S, NICOTERA P. Intracellular ATP concentration: a switch deciding between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*, 185: 1481–1486, 1997.
103. BRADBURY DA, SIMMONS TD, SLATER KJ, CROUCH SP. Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J Immunol Methods*, 240: 79–92, 2000.
104. TAKEMURA G, KATO S, AOYAMA T, HAYAKAWA Y, KANO H, MARUYAMA R, ARAI M, NISHIGAKI K, MINATOGUCHI S, FUKUDA K, FUJIWARA T, FUJIWARA H. Characterization of ultrastructure and its relation with DNA fragmentation in Fas-induced apoptosis of cultured cardiac myocytes. *J Pathol*, 193: 546–556, 2001.

105. KOCKX MM, MUHRING J, KNAAPEN MW, DE MEYER GR. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol*, 152: 885–888, 1998.
106. SCARABELLI TM, STEPHANOU A, PASINI E, COMINI L, RADDINO R, KNIGHT RA, LATCHMAN DS. Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*, 5;90:745–748, 2002.
107. GUSTAFSSON AB, GOTTLIEB RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol*, 23: 447–459, 2003.
108. VERHOVEN B, SCHLEGEL RA, WILLIAMSON P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*, 182: 1597–1601, 1995.
109. KAJSTURA J, CHENG W, REISS K, CLARK WA, SONNENBLICK EH, KRAJEWSKI S, REED JC, OLIVETTI G, ANVERSA P. Apoptotic and necrotic cell death are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*, 74: 86–107, 1996.
110. VEÏNOT JP, GATTINGER DA, FLISS H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol*, 28:485–492, 1997.
111. SARASTE A, PULKKI K, KALLAJOKI M, HENRIKSEN K, PARVINEN M, VOÏPIO-PULKKI LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation*, 21;95: 320–323, 1997.
112. SHAROV VG, SABBAAH HN, SHIMOYAMA H, GOUSSEV AV, LESCH M, GOLDSTEIN S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol*, 148: 141–149, 1996.
113. GABBIANI G, HIRSCHEL BJ, RYAN GB, STATKOV PR, MAJNO G. Granulation tissue as a contractile organ: a study of structure and function. *J Exp Med*, 135: 719–734, 1972.
114. FISHBEIN MC, MACLEAN D, MAROKO R. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol*, 90: 57–70, 1978.
115. TAKEMURA G, OHNO M, HAYAKAWA Y, MISAO J, KANO H, OHNO A, UNO Y, MINATOGUCHI S, FUJIWARA T, FUJIWARA H. Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res*, 82: 1130–1138, 1998.
116. PALOJOKI E, SARASTE A, ERIKSSON A, PULKKI K, KALLOJOKI M, VOÏPIO-PULKKI LM, TIKKANEN I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H2726–H2731, 2001.
117. ABBATE A, BIONDI-ZOCCA GG, BUSSANI R, DOBRINA A, CAMILOTTI D, FEROCCE F, ROSSIELLO R, BALDI F, SILVESTRI F, BIASUCCI LM, BALDI A. Increased myocardial apoptosis in patients with unfavorable left ventricular remodeling and early symptomatic post-infarction heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 41:753–760, 2003.
118. TAÏT JF, CERQUIRA MD, DEWHURST TA, FUJIKAWA K, RITCHIE JL, STRATTON JR. Evaluation of annexin V as a platelet-directed thrombus targeting agent. *Thromb Res*, 75: 491–501, 1994.
119. BLANKENBERG FG, KATSIKIS PD, TAÏT JF, DAVIS RE, NAUMOVSKI L, OHTSUKI K, KOPIWODA S, ABRAMS MJ, DARKES M, ROBBINS RC, MAECKER HT, STRAUSS HW. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad*

- Sci, 95: 6349–6354, 1998.
120. DUMONT EA, HOFSTRA L, VAN HEERDE WL, VAN DEN EIJNDE S, DOEVENDANS PA, DEMUÏNCK E, DAEMEN MA, SMÏTS JF, FREDERÏK P, WELLENS HJ, DAEMEN MJ, REUTELÏNGSPERGER CP. Cardiomyocyte death induced by myocardial ischemia and reperfusion: measurement with recombinant human annexin-V in a mouse model. *Circulation*, 102: 1564–1568, 2000.
  121. HOFSTRA L, LIEM IH, DUMONT EA, BOERSMA HH, VAN HEERDE WL, DOEVENDANS PA, DE MUÏNCK E, WELLENS HJ, KEMERÏNK GJ, REUTELÏNGSPERGER CP, HEÏNDENDAL GA. Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction. *Lancet*, 356: 209–212, 2000.
  122. HOLLY TA, DRÏNCÏC A, BYUN Y, NAKAMURA S, HARRÏS K, KLOCKE FJ, CRYNS VL. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol*, 31: 1709–1715, 1999.
  123. BROCHERÏOU V, HAGEGE AA, OUBENAÏSSA A, LAMBERT M, MALLET VO, DURÏEZ M, WASSEF M, KAHN A, MENASCHE P, GÏLGENKRANTZ H. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med*, 2: 326–333, 2000.
  124. CAÏN BS, MELDRUM DR, DÏNARELLO CA, MENG X, BANERJEE A, HARKEN AH. Adenosine reduces cardiac TNF-alpha production and human myocardial injury following ischemia–reperfusion. *J Surg Res*, 76: 117–123, 1998.
  125. PENG CF, LEE P, DEGUZNMAN A. Multiple independent mutations in apoptotic signaling pathways markedly decrease infarct size due to myocardial ischemia–reperfusion In *Scientific Sessions 2001* Willerson JT (ed) Anaheim, CA: Lippincott
  126. COMMUNAL C, SUMANDEA M, DE TOMBE P, NARULA J, SOLARO RJ, HAJJAR RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 6252–6256, 2002.
  127. RÏCCÏ JE, GOTTLÏEB RA, GREEN DR. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol*, 160: 65–75, 2003.
  128. WEÏSMAN HF, BUSH DE, MANNÏSÏ JA, WESÏFELDT ML, Healy B. Cellular mechanism of myocardial infarct expansion. *Circulation*, 78: 186–201, 1998.
  129. LÏNDER S, HAVELKA AM, UENO T, SHOSHAN MC. Determining tumor apoptosis and necrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker. *Cancer Lett* 214: 1–9, 2004.
  130. UENO T, TOÏ M, LÏNDER S. Detection of epithelial cell death in the body by cytokeratin 18 measurement. *Biomed Pharmacother* 59: 359–362, 2005.
  131. McDOUALL RM, YACOUB M, ROSE ML. Isolation, culture, and characterisation of MHC class II-positive microvascular endothelial cells from the human heart. *Microvasc Res* 51: 137- 152, 1996.
  132. MATTEY DL, DAWES PT, NÏXON NB, GOH L, BANKS MJ, KÏTAS GD. Increased levels of antibodies to cytokeratin 18 in patients with rheumatoid arthritis and ischaemic heart disease. *Ann Rheum Dis* 63: 420–425, 2004.
  133. ADLBRECHT C, HOETZENECKER K, POSCH M, STEÏNER S, KOPP C, HACKER S. Elevated levels of interleukin-1beta-converting enzyme and caspase-cleaved cytokeratin-18 in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 37: 372-380, 2007.

134. LI Q, LI B, WANG X, LERI A, JANA KP, LIU Y, KAJSTURA J, BASERGA R, ANVERSA P. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, 100: 1991–9, 1997.
135. TSOPORIS JN, MARKS A, KAHN HJ, BUTANY JW, LIU PP, O'HANLON D, PARKER TG. Inhibition of norepinephrine-induced cardiac hypertrophy in S100B transgenic mice. *J Clin Invest*, 102: 1609–1616, 1998.
136. DONATO R. Functional roles of S100 proteins, calcium binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta*, 1450:191–231, 1999.
137. DONATO R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, 60: 540–551, 2003.
138. TSOPORIS JN, MARKS A, VAN ELDİK LJ, O'HANLON D, PARKER TG. Regulation of the S100B gene by alpha 1-adrenergic stimulation in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 284 (1): H193–H203, 2003.
139. HOSHIIJIMA M, CHIEN KR. Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest*, 109: 849–855, 2002.
140. SCHAFER BW, HEIZMANN CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, 21: 134–140, 1996.
141. SORCÌ G, RIUZZI F, AGNELETTI AL, MARCHETTI C, DONATO R. S100B inhibits myogenic differentiation and myotube formation in a RAGE-independent manner. *Mol Cell Biol*, 23: 4870–4881, 2003.
142. HUTTUNEN HJ, KUJA-PANULA J, SORCÌ G, AGNELETTI AL, DONATO R, RAUVALA H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through RAGE activation. *J Biol Chem*, 275: 40096–40105, 2000.
143. SORCÌ G, RIUZZI F, AGNELETTI AL, MARCHETTI C, DONATO R. S100B causes apoptosis in a myoblast cell line in a RAGE-independent manner. *J Cell Physiol*, 99: 274–283, 2004.
144. SNYDER-RAMOS SA, GRUHLKE T, BAUER H, BAUER M, LUNTZ AP, MOTSCH J, MARTIN E, VAHL CF, MISSLER U, WIESMANN M, BOTTIGER BW. Cerebral and extracerebral release of protein S100B in cardiac surgical patients. *Anaesthesia*, 59(4): 344–349, 2004.
145. MISSLER U, ORLOWSKI N, NOTZOLD A, DİBBELT L, STEINMEIER E, WIESMANN. Early elevation of S-100B protein in blood after cardiac surgery is not a predictor of ischemic cerebral injury. *Clinical Chimica Acta*, 321: 29–33, 2002.
146. KENNEDY JA, KIOSGLOUS AJ, MURPHY GA, PELLE MA, HOROWITZ JD. Effect of perhexiline and oxfenicine on myocardial function and metabolism during low-flow ischemia/reperfusion in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 36: 794–801, 2000.
147. STANLEY WC. Partial fatty acid oxidation inhibitors for stable angina. *Expert Opin Investig Drugs*, 11: 615–629, 2002.
148. CANBAZ S, DURAN E, EGE T, SUNAR H, CİKİRİKÇIOĞLU M, ACİPAYAM M. The effects of intracoronary administration of vitamin E on myocardial ischemia–reperfusion injury during coronary artery surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 51(2): 57–61, 2003.
149. LASSNİGG A, PUNZ A, BARKER R, KEZNİCKL P, MANHART N, ROTH E, HİESMAYR M. Influence of intravenous vitamin E supplementation in cardiac

- surgery on oxidative stress: a double-blinded, randomized, controlled study. *Br J Anaesth*, 90(2): 148– 154, 2003.
150. GUAN W, OSANAİ T, KAMADA T, HANADA H, ISHİZAKA H, ONODERA H, IWASA A, FUJİTA N, KUDO S, OHKUBO T, OKUMURA K. Effect of allopurinol pretreatment on free radical generation after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 41(5):699–705, 2003.
  151. GREGORY S, KELLY ND. Clinical Applications of N-acetylcysteine by. *Alt Med Rev*, 3(2): 114-127, 1998.
  152. DE CARO L, GHİZZİ A, COSTA R, LONGO A, VENTRESCA GP, LODOLA E. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. *Arzneim Forsch*, 39: 38, 1989.
  153. SJODİN K, NİLSSON E, HALLBERG A, TUNEK A. Metabolism of N-acetyl-l-cysteine. *Biochem Pharm*, 38: 3981-3985,1989.
  154. DE VRİES N, DE FLORA S. N-Acetyl-l-Cysteine. *J Cell Biochem*, 17F: S270-S277, 1993.
  155. İSSELS RD, NAGELE A, ECKERT KG, WİLMANNNS W. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochem Pharmacol*, 37: 881-888,1988.
  156. HOFFER E, BAUM Y, TABAK A, TAİTELMAN U. N acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett*, 84: 7-12, 1996.
  157. ARUOMA OI, HALLİWELL B, HOEY BM, BUTLER J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, 6: 593-597, 1989.
  158. GAVİSH D, BRESLOW JL. Lipoprotein(a) reduction by N-acetylcysteine. *Lancet*, 337: 203-204, 1991.
  159. HULTBERG B, ANDERSSON A, ISAKSSON A. The effects of homocysteine and copper ions on the concentration and redox status of thiols in cell line cultures. *Clin Chim Acta*, 262: 39-51, 1997.
  160. WİKLUND O, FAGER G, ANDERSON A, LUNDSTAM U, MASSON P, HULTBERG B. Nacetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis*, 119: 99-106, 1996.
  161. CECONİ C, CURELLO S, CARGNONİ A, FERRARİ R, ALBERTİNİ A, VİSİOLİ O. The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: effects of Nacetyl cysteine. *J Mol Cell Cardiol*, 20: 5-13, 1988.
  162. ARSTALL MA, YANG J, STAFFORD I, BETTS WH, HOROWİTZ JD. Nacetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects. *Circulation*, 92: 2855-2862, 1995.
  163. SOCHMAN J, VRBSKA J, MUSİLOVA B, ROCEK M. Infarct size limitation: acute N-acetylcysteine defense (ISLAND trial): preliminary analysis and report after the first 30 patients. *Clin Cardiol*, 19: 94-100, 1996.
  164. YEŞİLBURSA D, SERDAR A, ŞENTÜRK T, SERDAR Z, SAĞ S, CORDAN J. Effect of N-acetylcysteine on oxidative stress and ventricular function in patients with myocardial infarction. *Heart Vessels*, 21(1): 33-37, 2006.
  165. WİNNİFORD MD, KENNEDY PL, WELLS PJ, HİLLİS LD. Potentiation of nitroglycerin-induced coronary dilatation by N-acetylcysteine. *Circulation*, 73:138-142, 1986.

166. CHIRKOV YY, HOROWITZ JD. N-Acetylcysteine potentiates nitroglycerin-induced reversal of platelet aggregation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 28: 375-380, 1996.
167. HOROWITZ JD, HENRY CA, SYRJANEN ML, LOUIS WJ, FISH RD, ANTMAN EM, SMITTH TW. Nitroglycerine/N-acetylcysteine in the management of unstable angina pectoris. *Eur Heart J*, 9: 95-100, 1988.
168. JUGDUTT BI. Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Heart Fail Rev*, 7(4): 391 – 405, 2002.
169. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet*, 345(8951):669– 685, 1995.
170. GISSI-3: effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6-week mortality and ventricular function after acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'infarto Miocardico. *Lancet*, 343(8906): 1115– 1122, 1994.
171. PERNOW J, URIUDA Y, WANG QD, LI XS, NORDLANDER R, RYDEEN L. The protective effect of l-arginine on myocardial injury and endothelial function following ischaemia and reperfusion in the pig. *Eur Heart J*, 15(12): 1712– 1719, 1994.
172. LI XS, URIUDA Y, WANG QD, NORLANDER R, SJOQUIST PO, PERNOW J. Role of l-arginine in preventing myocardial and endothelial injury following ischaemia/reperfusion in the rat isolated heart. *Acta Physiol Scand*, 156(1): 37 – 44, 1996.
173. PERNOW J, BOHM F, BELTRAN E, GONON AT. l-arginine protects from ischemia/reperfusion-induced endothelial dysfunction in humans in vivo. *J Appl Physiol*, 186:73, 2003.
174. YAMASHIRO S, KUNIYOSHI Y, ARAKAKI K, UEZU T, MIYAGI K, KOJA K. Cardioprotective effects of tetrahydrobiopterin in cold heart preservation after cardiac arrest. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 12(2): 95-104, 2006.
175. YASUTAKE M, IBUKI C, HEARSE DJ, AVKIRAN M. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and reperfusion arrhythmias: protection by intracoronary infusion of a novel inhibitor. *Am J Physiol*, 267: H2430– 2440, 1994.
176. BOYCE SW, BARTELS C, BOLLÍ R, CHAITMAN B, CHEN JC, CHI E, JESSEL A, KEREIAKES D, KNIGHT J, THULIN L, THEROUX P. Impact of sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide on death or myocardial infarction in high-risk CABG surgery patients: results of the CABG surgery cohort of the GUARDIAN study. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126(2): 420– 427, 2003.
177. GARCÍA-DORADO D, THEROUX P, DURAN JM, SOLARES J, ALONSO J, SANZ E, MUNOZ R, ELÍZAGA J, BOTAS J, FERNANDEZ-AVILÉS F. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*, 85(3): 1160–1174, 1992.
178. INSERTE J, GARCÍA-DORADO D, AGULLO L, PANIAGUA A, SOLER-SOLER J. Urodilatin limits acute reperfusion injury in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res*, 45(2): 351–359, 2000.
179. KUGA H, OGAWA K, OIDA A, TAGUCHI I, NAKATSUGAWA M, HOSHI T, SUGIMURA H, ABE S, KANEKO N. Administration of atrial natriuretic peptide attenuates reperfusion phenomena and preserves left ventricular regional

- wall motion after direct coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circ J*, 67(5): 443–448, 2003.
180. CRONSTEIN BN, KRAMER SB, WEISSMANN G, HIRSCHHORN R. Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med*, 158(4): 1160–1177, 1983.
  181. KOPECKY SL, AVILES RJ, BELL MR, LOBL JK, TIPPING D, TIPPING D, FROMMELL G, RAMSEY K, HOLLAND AE, MIDEI M, JAIN A, KELLETT M, GIBBONS RJ. A randomized, double-blinded, placebo-controlled, doseranging study measuring the effect of an adenosine agonist on infarct size reduction in patients undergoing primary percutaneous transluminal coronary angioplasty: the ADMIRE (AmP579 Delivery for Myocardial Infarction REduction) study. *Am Heart J*, 146(1): 146–152, 2003.
  182. MAHAFFEY KW, PUMA JA, BARBAGELATA NA, DI CARLI MF, LEESAR MA, BROWNE KF. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol*, 34(6): 1711–1720, 1999.
  183. FATH-ORDOUBADI F, BEATT KJ. Glucose–insulin–potassium therapy for treatment of acute myocardial infarction: an overview of randomized placebo-controlled trials. *Circulation*, 96(4): 1152–1166, 1997.
  184. WOODS KL, FLETCHER S, ROFFE C, HAIDER Y. Intravenous magnesium sulphate in suspected acute myocardial infarction: results of the second Leicester Intravenous Magnesium Intervention Trial (LIMIT-2). *Lancet*, 339(8809): 1553–1558, 1992.
  185. KANTOR PF, LUCIEN A, KOZAK R, LOPASCHUK GD. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial longchain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res*, 86: 580–588, 2000.
  186. PARANG P, SINGH B, ARORA R. Metabolic modulators for chronic cardiac ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 10: 217–23, 2005.
  187. ARGAUD L, GOMEZ L, GATEAU-ROESCH O, COUTURE-LEPETIT E, LOUFOUAT J, ROBERT D, OVIZE M. Trimetazidine inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and prevents lethal ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 39: 893–999, 2005.
  188. DRAKE-HOLLAND AJ, BELCHER PR, HYND J, NOBLE MI. Infarct size in rabbits: a modified method illustrated by the effects of propranolol and trimetazidine. *Basic Res Cardiol*, 88: 250–258, 1993.
  189. NOBLE MI, BELCHER PR, DRAKE-HOLLAND AJ. Limitation of infarct size by trimetazidine in the rabbit. *Am J Cardiol*, 76: 41B–44B, 1995.
  190. The EMIP-FR Group. Effect of 48-h intravenous trimetazidine on short- and long-term outcomes of patients with acute myocardial infarction, with and without thrombolytic therapy; A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. The EMIP-FR Group. European myocardial infarction project –free radicals. *Eur. Heart J*, 21: 1537–1546, 2000.
  191. STEG PG, GROLLIER G, GALLAY P, MORICE M, KARILLON GJ, BENEMER H, KEMPF C, LAPERCHE T, ARNAUD P, SELLIER P, BOURGUIGNON C, HARPEY C; LIST Study Group. A randomized double-blind trial of intravenous trimetazidine as adjunctive therapy to primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 77: 263–273, 2001.
  192. RUIXING Y, WENWU L, AL-GHAZELI R. Trimetazidine inhibits



- cardiomyocyte apoptosis in a rabbit model of ischemia-reperfusion. *Transl Res*, 149(3): 152-60, 2007.
193. WAYMAN NS, ELLIS BL, THIEMERMANN C. Simvastatin reduces infarct size in a model of acute myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *Med Sci Monit*, 9(5):BR155–159, 2003.
  194. BELL RM, YELLON DM. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll Cardiol*, 41(3): 508– 515, 2003.
  195. TIEFENBACHER CP, KAPITZA J, DIETZ V, LEE CH, NIROOMAND F. Reduction of myocardial infarct size by fluvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(1): H59– 64, 2003.
  196. JONES SP, GIBSON MF, RIMMER III DM, GIBSON TM, SHARP BR, LEFER DJ. Direct vascular and cardioprotective effects of rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *J Am Coll Cardiol*, 40(6): 1172– 8, 2002.
  197. ZHU B, SUN Y, SIEVERS RE, BROWNE AE, PULUKURTHY S, SUDHIR K, LEE RJ, CHOU TM, CHATTERJEE K, PARMLEY WW. Comparative effects of pretreatment with captopril and losartan on cardiovascular protection in a rat model of ischemia–reperfusion. *J Am Coll Cardiol*, 35(3): 787– 795, 2000.
  198. OZER MK, SAHNA E, BIRINCIÖGLU M, ACET A. Effects of captopril and losartan on myocardial ischemia–reperfusion induced arrhythmias and necrosis in rats. *Pharmacol Res*, 45(4): 257– 263, 2002.
  199. HORI M, GOTOH K, KITAKAZE M, IWAÏ K, IWAKURA K, SATO H, KORETSUNE Y, INOUE M, KITABATAKE A, KAMADA T. Role of oxygen-derived free radicals in myocardial edema and ischemia in coronary microvascular embolization. *Circulation*, 84(2): 828– 840, 1991.
  200. LEFER DJ. Myocardial protective actions of nitric oxide donors after myocardial ischemia and reperfusion. *New Horiz*, 3(1): 105 – 112, 1995.
  201. TOPOL EJ. Reperfusion therapy for acute myocardial infarction with fibrinolytic therapy or combination reduced fibrinolytic therapy and platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition: the GUSTO V randomised trial. *Lancet*, 357(9272): 1905–1914, 2001.
  202. KANDZARI DE, LABINAZ M, CANTOR WJ, MADAN M, MADAN M, GALLUP DS, HASSELBLAD V, JOSEPH D, ALLEN A, GREEN C, HINDINGER KG, KRUCOFF MW, CHRISTENSON RH, HARRINGTON RA, TCHENG JE. Reduction of myocardial ischemic injury following coronary intervention (the MC-1 to Eliminate Necrosis and Damage trial). *Am J Cardiol*, 92(6): 660– 664, 2003.
  203. YTREHUS K, LIU Y, TSUCHIDA A, MIURA T, LIU GS, YANG XM, HERBERT D, COHEN MV, DOWNEY JM. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol*, 267: H2383-2390, 1994.
  204. YOUNG IS, TRIMBLE ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem*, 28: 504-508, 1991.
  205. HALESTRAP AP, CLARKE SJ, JAVADOV SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 61(3): 372-385, 2004.
  206. BALDI A, ABBATE A, BUSSANI R, PATTI G, MELFI R, ANGELINI A, DOBRINA A, ROSSIELLO R, SILVESTRI F, BALDI F, DI SCIASCIO G. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol*,

- 34: 165–174, 2002.
207. OLIVETTI G, QUAINI F, SALA R, LAGRASTA C, CORRADI D, BONACINA E, GAMBERT SR, CIGOLA E, ANVERSA P. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 28: 2005–2016, 1996.
  208. GOTTLIEB RA, ENGLER RL. Apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion. *Ann N Y Acad Sci*, 874: 412-426, 1999.
  209. DE FLORA S, IZZOTTI A, D'AGOSTINI F, BALANSKY RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis*, 22(7): 999-1013, 2001.
  210. ZHANG H, SPAPEN H, NGUYEN DN, ROGIER P, BOKKER J, VINCENT J L. Effects of N-acetyl-L-cysteine on regional blood flow during endotoxic shock. *Eur. Surg. Res*, 27: 292-300, 1995.
  211. HARRISON PM, WENDON JA, GIMSON AE, ALEXANDER GJ, WILLIAMS R. Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med*, 324 : 1852-1857, 1991.
  212. DEL MAESTRO RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl*, 492:153-168, 1980.
  213. WANG J, HUANG YW, WEI JH, WEI TX, DONG JZ, ZHANG JY. Protective effect of trimetazidine on rabbit myocardium during ischemia- reperfusion. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 32(3) : 219-222, 2003.
  214. KARA AF, DEMIRYUREK S, CELIK A, TARAKCIOGLU M, DEMIRYUREK AT. Effects of trimetazidine on myocardial preconditioning in anesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol*, 503: 135- 145, 2004.
  215. ABE M, TAKIGUCHI Y, ICHIMARU S, TSUCHIYA K, WADA K. Comparison of the Protective Effect of N-Acetylcysteine by Different Treatments on Rat Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *J Pharmacol Sci*, 106: 571 – 577, 2008.
  216. AUBERT A, BERNARD C, CLAUSER P, HARPEY C, VAUDRY H. Effect of phenazine methosulfate on electrophysiological activity of the semicircular canal: antioxidant properties of trimetazidine. *Eur J Pharmacol*, 19: 174: 215-225, 1989.
  217. IKIZLER M, ERKASAP N, DERNEK S, BATMAZ B, KURAL T, KAYGISIZ Z. Trimetazidine-induced enhancement of myocardial recovery during reperfusion: a comparative study in diabetic and non-diabetic rat hearts. *Arch Med Res*, 37(6) : 700-708, 2006.
  218. RAHMAN F, TOSHIMA Y, KOHNO H, KINOSHITA K, TOKUNAGA K. The protective effects of trimetazidine on normothermic ischemic myocardium in rats. *Jpn J Surg*, 19: 346-350, 1989.
  219. FORMAN MB, PUETT DW, CATES CU, MCCROSKEY DE, BECKMAN JK, GREENE HL, VİRMANI R. Glutathione redox pathway and reperfusion injury. Effect of N-acetylcysteine on infarct size and ventricular function. *Circulation*, 78: 202-213, 1998.
  220. MONTEIRO P, DUARTE AI, GONÇALVES LM, MORENO A, PROVIDÊNCIA LA. Protective effect of trimetazidine on myocardial mitochondrial function in an ex-vivo model of global myocardial ischemia. *Eur J Pharmacol*, 503: 123–128, 2004.
  221. SENTEX E, HELIÉS-TOUSSAINT C, ROUSSEAU D, LUCIEN A, FERRARY E, GRYNBERG A. Influence of trimetazidine on the synthesis of complex lipids

- in the rat heart and other target organs. *Fundam Clin Pharmacol*, 15: 255–264, 2001.
222. BOLLÌ R. Causative role of oxyradicals in myocardial stunning: a proven hypothesis. A brief review of the evidence demonstrating a major role of reactive oxygen species in several forms of postischemic dysfunction. *Basic Res Cardiol*, 93:156–162, 1998.
  223. HARLAN JM, LEVINE JD, CALLAHAN KS, SCHWARTZ BR, HARKER LA: Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide. *J Clin Invest*, 73: 706-713, 1984.
  224. OLAFSSON B, FORMAN MB, PUETT DW, POU A, CATES CU, FRIESINGER GC, VÍRMANÍ R: Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: Importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation*, 76: 1135-1145, 1987.
  225. SCARABELLÌ TM, KNIGHT RA, RAYMENT NB, COOPER TJ, STEPHANOU A, BRAR BK, LAWRENCE KM, SANTILLÌ G, LATCHMAN DS, BAXTER GF, YELLON DM. Quantitative assessment of cardiac myocyte apoptosis in tissue sections using the fluorescence-based tunel technique enhanced with counterstains. *J Immunol Methods*, 228: 23-28, 1999.
  226. SCARABELLÌ T, STEPHANOU A, RAYMENT N, PASÌNÌ E, COMÌNÌ L, CURELLO S, FERRARÌ R, KNIGHT R, LATCHMAN D. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 104(3): 253-256, 2001.
  227. SENTURK T, AYDÌNLAR A, YÌLMAZ Y, ORAL AY, OZDABAKOGLU O, ULUKAYA E. Serial changes in circulating M30 antigen, a biomarker of apoptosis, in patients with acute coronary syndromes: relationship with the severity of coronary artery disease. *Coron Artery Dis*, 20(8): 494-498, 2009.
  228. DINGER S, JAHN L, WENDE P, WATSON L, GERBER SH, KUBLER W, KREUZER J. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 cDNA in vascular smooth muscle cells: induction of the synthetic phenotype: a possible clue to SMC differentiation in the process of atherogenesis. *Atherosclerosis*, 144 : 15–23, 1999.
  229. TSOPORÌS JN, MARKS A, KAHN HJ, BUTANY JW, LIU PP, O'HANLON D, AND PARKER TG. S100b inhibits beta 1-adrenergic induction of the hypertrophic phenotype in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 272: 31915–31221, 1997.
  230. TSOPORÌS JN, MARKS A, HADDAD A, DAWOOD F, LIU PP, PARKER TG. S100B Expression Modulates Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation*, 111: 598-606, 2005.
  231. MAZZÌNÌ GS, SCHAF DV, OLÌVEIRA AR, GONÇALVES CA, BELLÓ-KLEÌN A, BORDIGNON S, BRUCH RS, CAMPOS GF, VASSALLO DV, SOUZA DO, PORTELA LV. The ischemic rat heart releases S100B. *Life Sci*, 77(8) : 882-889, 2005.
  232. HUTTUNEN HJ, KUJA-PANULA J, SORCÌ G, AGNELETTÌ AL, DONATO R, RAUVALA H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through RAGE activation. *J Biol Chem*, 275: 40096-40105, 2000.



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen ve bizi destekleyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Ali Aydınlar'a, Farmakoloji ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Levent Büyükuysal'a, Anabilim Dalının değerli öğretim üyelerinden Prof.Dr. Vahide Savcı'ya, Prof.Dr. Mine Sibel Gürün'e, Doç.Dr. Gökhan Göktaaly'a, Dr. Mehmet Cansev'e ve Doç.Dr. Sertaç Yılmaz'a, her zaman bilgilerini bizimle paylaşan, eğitimim ve tezimin oluşumu ve yürütülmesinde emeği olan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Sinan Çavun'a, doktora eğitimim boyunca çok şey öğrendiğim tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım esnasındaki yardımları için Doç.Dr. Berrin Avcı'ya, Prof.Dr. Zehra Serdar'a, Doç. Dr. Celalettin Demircan'a, Uzm. Dr. Cenk Coşgun'a, Dr. Aysun Yermezler'e ve kimyager Sami Aydın'a teşekkür ederim.

Bölümümüzdeki araştırma görevlisi, yüksek lisans ve doktora öğrencisi tüm çalışma arkadaşlarıma da dostlukları için teşekkür ederim.

Hiçbir zaman sevgi ve desteklerini esirgemeyen, sevgili aileme, değerli eşim Ebru'ya ve oğullarım Ahmet Arda ve Burak Kaan'a teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

07 Mayıs 1976 tarihinde Bursa'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Bursa da tamamladım. Bursa Yıldırım Beyazıt Lisesi'nden 1993 yılında mezun oldum. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimime başladım. 1999'de tıp doktoru ünvanını aldım. 1999 yılında U.Ü.T.F. Kardiyoloji Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Uzmanlık eğitimim sırasında "Akut koroner sendromlarda prokalsitonin ve yüksek duyarlıklı serum reaktif protein arasındaki korelasyonun saptanması" isimli tez çalışmasını değerli hocam Prof. Jale Cordan'ın danışmanlığında tamamlayarak 2004'de Kardiyoloji Uzmanı ünvanına sahip oldum. 2005-2006 yılları arasında Hava Harp Okulunda askerlik görevimi yerine getirdim. 2006-2010 yılları arasında U.Ü.T.F. Kardiyoloji Anabilim Dalı'nda uzman olarak görev yaptım. Uzman olarak görev yaptığım Kardiyoloji Anabilim Dalı'mızın desteği ve teşvikiyle Farmakoloji ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Doktora programında eğitimime 15.09.2006 tarihinde başladım. 2010 yılı sonunda aynı anabilim dalında yardımcı doçent kadrosuna atandım. 23 Mart 2012 tarihinde girdiğim doçentlik sınavında başarılı olarak, doçent ünvanı aldım. Halen Kardiyoloji Anabilim Dalı'nda öğretim üyesi olarak görev yapmaktayım.

Evli ve iki erkek çocuk babasıyım.