



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ve KLİNİK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANDA DENEYSEL MİYOKARDİYAL
İSKEMİ – REPERFÜZYON MODELİNDE
CDP – KOLİN ve METABOLİTLERİNİN ETKİLERİ**

Dr. M. Sertaç YILMAZ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Vahide SAVCI

BURSA - 2005



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ve KLİNİK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANDA DENEYSEL MİYOKARDİYAL
İSKEMİ – REPERFÜZYON MODELİNDE
CDP – KOLİN ve METABOLİTLERİNİN ETKİLERİ**

Dr. M. Sertaç YILMAZ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Vahide SAVCI

BURSA - 2005

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İçindekiler	i
Türkçe Özet	ii
İngilizce Özet	iv
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	4
Gereç ve Yöntem	20
Bulgular	26
Tartışma ve Sonuç	40
Kaynaklar	45
Teşekkür	60
Özgeçmiş	61

ÖZET

Sitidin-5'-difosfatkolin (CDP-kolin) endojen olarak sentezlenen bir mononükleotiddir. Aynı zamanda, serebral iskemik durumlarda bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, CDP-kolin'in sıçanlarda miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı gelişimine karşı koruyucu etkileri olup olmadığı araştırıldı.

Anestezi altındaki sıçanların sol ana koroner arteri 7 dakika süre ile bağlanarak ve takiben 7 dakika süresince arterdeki bağ serbest hale getirilerek kısa dönem iskemi-reperfüzyon oluşturuldu. Reperfüzyon kaynaklı ventriküler taşikardi (VT), ventriküler fibrilasyon (VF), kan basıncı değişiklikleri ve ölüm oranları değerlendirildi. Kontrol grubundaki sıçanlarda VT, VF ve ölüm oranları sırasıyla %85, %62 ve %54 olarak gözlemlendi. İntravenöz (i.v.) yol ile verilen CDP-kolin (100, 250 ve 500 mg/kg), kan basıncında kısa süreli bir artışa neden oldu. 250 ve 500 mg/kg dozlarında verilen CDP-kolin, VT ve VF insidanslarını azaltırken iskemi-reperfüzyona bağlı ölümleri tamamen engelledi. 250 mg/kg CDP-kolin'e eşdeğer dozda kolin (64 mg/kg; i.v.) veya sitidin (111 mg/kg; i.v.), iskemi-reperfüzyona bağlı VT oluşumunu büyük oranda azaltırken, VF gelişimini ve ölümleri tamamen bloke etti. Kolin ve sitidin, kan basıncını düşürdü.

Anestezi altındaki sıçanların sol ana koroner arteri 30 dakika süre ile bağlanarak ve takiben 3 saat süresince arterdeki bağ serbest hale getirilerek uzun dönem iskemi-reperfüzyon oluşturuldu. İskemi-reperfüzyona bağlı nekroz miktarı ölçüldü. CDP-kolin, 250 mg/kg dozunda, nekroz miktarını ve nekroz miktarının risk bölgesine oranını, kontrol grubuna göre, anlamlı olarak azalttı.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, CDP-kolin'in miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında kardiyoprotektif etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Kısa dönem iskemi-reperfüzyon hasarında hem kolin hem de sitidin, CDP-kolin'in bu koruyucu etkisinde rol oynuyor gözükmektedir.

Anahtar kelimeler: CDP-kolin, kolin, sitidin, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon, aritmiler, nekroz miktarı

SUMMARY

Cytidine-5'-diphosphocholine (CDP-choline) is an endogenously synthesized mononucleotide. It is, also, a drug used for the treatment of cerebral ischemic situations. In the present study we aimed to determine whether CDP-choline can have any protective effect against the outcome of the myocardial ischemia-reperfusion injury in rats.

Short term ischemia-reperfusion was produced in anaesthetized rats by ligation of the left main coronary artery for 7 min followed by reperfusion period for the next 7 min. Reperfusion-induced ventricular tachycardia (VT), ventricular fibrillation (VF), changes in arterial pressure and lethality rate were evaluated. In control rats, VT, VF and lethality were observed in %85, %62 and %54 animals, respectively. Intravenous (i.v.) CDP-choline (100, 250 and 500 mg/kg) produced short term increase in blood pressure. At the dose of 250 and 500 mg/kg, CDP-choline reduced the incidence of VT, VF and lethality when injected in ischemic period. CDP-choline, at the dose of 250 mg/kg and 500 mg/kg, completely prevented the death. Choline (64 mg/kg; i.v.) or cytidine (111 mg/kg; i.v.) administration at the dose of equimolar to 250 mg/kg CDP-choline, greatly attenuated the incidence of VT and abolished the occurrence of VF and death. Blood pressure of rats was decreased in choline or cytidine injected rats.

Long term ischemia-reperfusion was produced in anaesthetized rats by ligation of the left main coronary artery for 30 min followed by reperfusion period for the next 3 h. Ischemia-reperfusion induced infarct size was measured. Compared to the control group, CDP-choline, at the dose of 250 mg/kg, reduced infarct size induced by ischemia-reperfusion and infarct size/risk zone.

Results show that CDP-choline exerts cardioprotective effect in myocardial ischemia-reperfusion injury. Both choline and cytidine seem to be involved in CDP-choline's effect in short term ischemia-reperfusion.

Key words: CDP-choline, choline, cytidine, myocardial ischemia-reperfusion, arrhythmias, infarct size

GİRİŞ ve AMAÇ

CDP-kolin (Sitidin 5'-difosfat kolin, sitikolin), vücudumuzda endojen olarak meydana gelen, mononükleotid yapıda bir bileşiktir. Hücre membran fosfolipidlerinden, fosfatidilkolin sentezinde bir ara ürün olarak ortaya çıkar. Oral, parenteral veya serebral yolla dışarıdan verilen CDP-kolin, hücre membranında yerleşik fosfodiesterazlar tarafından önce fosfokolin ve sitidinmonofosfata, takiben kolin ve sitidine hidroliz edilir (derleme için bkz 1). Sıçanlarda CDP-kolin verilmesi sonrası dolaşımında kolin ve sitidin düzeylerinde artış olduğu (2-4), insanlarda ise sitidin yerine üridin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (5). Bu final metabolitler; hücrelere alınır, kan beyin bariyerini geçer ve kendilerine ait metabolik yollara girerek CDP-kolin'in birçok fizyolojik ya da farmakolojik etkilerine aracılık ederler (1).

Laboratuvarımızda önceki dönemlerde yapılan çalışmalarda CDP-kolin'in kardiyovasküler ve endokrin etkileri olduğu gösterilmiştir. Merkezi veya periferik yolla verilen CDP-kolin kan basıncını artırır (3,4) ve başta ACTH olmak üzere birçok hipofizer hormonun plazma düzeylerinde artış yaratır (6-8). CDP-kolin bu etkilerini büyük ölçüde beyin kolin düzeylerini artırarak ve merkezi kolinerjik iletiyi uyararak gerçekleştirmektedir. Merkezi nikotinik reseptörlerin aktivasyonu da bu etkilerde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, çeşitli laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda CDP-kolin'in, fosfatidilkolin sentezinde artış yaratarak (9), kardiyolipin ve sfingomyelin seviyelerini koruyarak (10), glutatyon sentezini ve glutatyon redüktaz aktivitesini artırarak (11), fosfolipaz A₂ aktivitesini (12) ve iskemi kaynaklı hidroksil radikallerinin oluşumunu azaltarak (13), Na/K ATPaz aktivitesini düzelterek (14), prokaspazların ve kaspaz-3'ün ekspresyonunu azaltması aracılığı ile antiapoptotik etki göstererek serebral iskemi oluşturan çeşitli kafa travması modellerinde ve ilgili bazı klinik çalışmalarda nöron koruyucu etki yarattığı gösterilmiştir (15). Bu çalışmalarda, CDP-kolin tedavisinin ödemi ve infarkt volümünü azalttığı, nörolojik defisitlerde düzeltici etki gösterdiği de

rapor edilmiştir. Ancak günümüze kadar CDP-kolin'in miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon modelinde etkileri çalışılmamıştır.

Ana koroner arterlerin akut olarak tıkanması sonrası gelişen miyokardiyumun iskemik hasarı, batılı ülkelerde mortalite ve morbiditenin önde gelen sebepleri arasındadır ve Dünya Sağlık Örgütü'nün araştırmalarına göre 2020 yılında tüm dünyada en sık ölüm sebebi olacaktır (16). Hipoksi ve iskeminin süresi ve genişliği, kardiyak yanıtı ve miyokardiyal disfonksiyonun büyüklüğünü belirler. Ayrıca tıkalı koroner damarın kendiliğinden veya tedavi ile açılması sonucu oluşan reperfüzyona bağlı olarak, patofizyolojik düzeyde serbest oksijen radikalleri dolaşıma katılır ve reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan doku hasarının oluşmasını tetikler (17). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarının tedavisinde önemli gelişmeler olmakla birlikte henüz bu yaklaşımların çoğu kalıcı miyokard hasarı oluşumunu engellemekten uzaktır.

CDP-kolin ile ilgili olarak yukarıda belirtilen bulguları ve ayrıca yakın zamanda yayınlanmış ve asetilkolinin kardiyomyositleri iskemiye karşı koruduğu (18), nikotinik reseptör aktivasyonunun doku ve nöron koruyucu etkiler yarattığı (19) ve melanokortinlerin kan basıncını artırarak miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduklarını gösteren (20) çalışmaları da göz önünde bulundurarak, ilacın kardiyak iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etki sergileyebileceğini düşündük. Halen bazı Avrupa ülkeleri ve Japonya'da kafa travmalarının tedavisinde klinik kullanımı onaylanmış olan CDP-kolin'in yan etkisinin yok denecek kadar az ve güvenlik aralığının geniş olması da, bu incelemeyi cazip hale getirmektedir.

Çalışmamız, intravenöz yolla verilen CDP-kolin ve metabolitleri olan kolin ile sitidinin, kısa süreli iskemi-reperfüzyon çalışmasında kardiyak aritmiler ve yaşam süreleri, uzun dönem iskemi-reperfüzyon hasarında

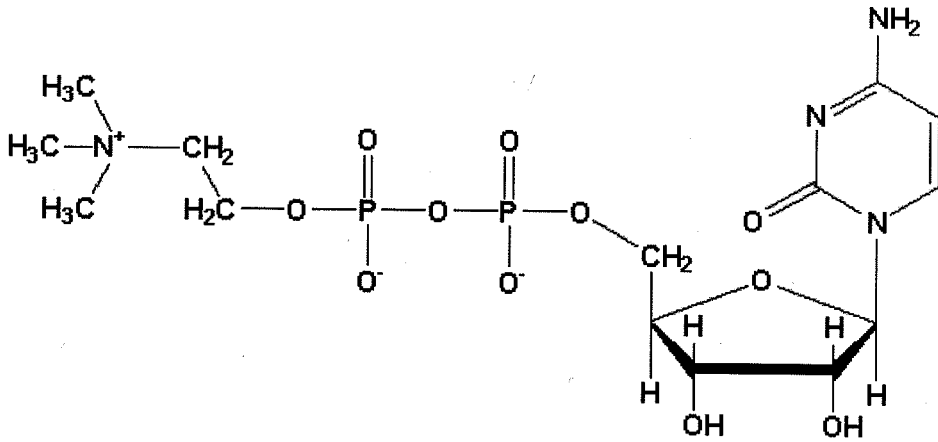
miyokardiyal nekroz miktarı üzerine koruyucu etkileri olup olmadığını araştırmak üzere planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

1. CDP-kolin

1.1. CDP-kolin'in Yapısı

CDP-kolin, insan vücudunda doğal olarak meydana gelen nükleotid yapısında endojen bir bileşiktir (Şekil 1). Molekül ağırlığı 488,33 g olan CDP-kolin'in monosodyum tuzu; beyaz, kristalize, oldukça higroskopik ve suda yüksek çözünürlüğe sahip bir moleküldür (1). Çeşitli ülkelerde 50'den fazla ticari isim altında yıllardır çalışılmaktadır. Sitikolin; bu bileşiğe, uluslararası genel isim (pINN) olarak önerilmiş ancak tescil edilmemiştir.

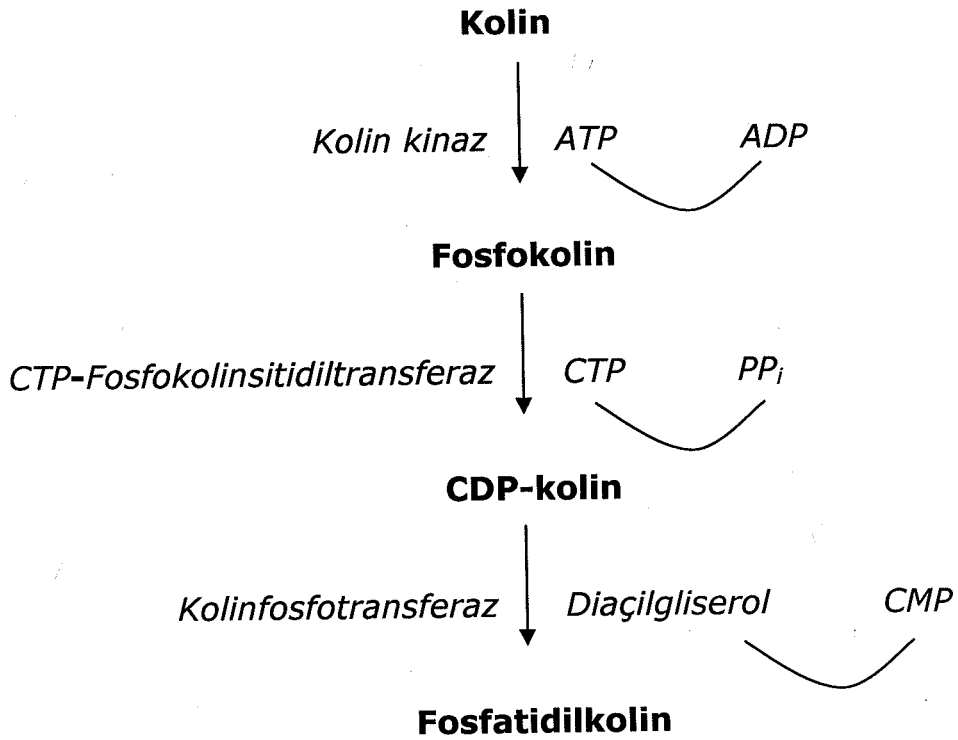


Şekil-1: CDP-kolin'in molekül yapısı

1.2. CDP-kolin'in Sentezi

CDP-kolin, fosfokolinin 1956 yılında Kennedy ve Weiss tarafından tanımlanan ve 'Kennedy yolağı' olarak adlandırılan sentez yolunda bir ara ürün olarak oluşur (21). Kolinden fosfatidilkolin yapımına uzanan bu sentez üç temel basamaktan meydana gelir (Şekil 2). İlk basamakta; kolin, kolin kinaz enziminin katalizlediği geri dönüşlü bir reaksiyonla fosforile edilerek fosfokoline dönüşür. İkinci basamakta; fosfokolin ile sitidin-5'-trifosfat (CTP),

CTP:fosfokolin sitidil transferaz (CCT) enzimi aracılığı ile geri dönüşlü bir reaksiyona girerek CDP-kolin'i oluşturur. İkinci basamak aynı zamanda fosfatidilkolin sentezinde hız belirleyici basamak olması nedeniyle önemlidir. Üçüncü ve son basamakta ise CDP-kolin'in fosfokolin grubunun, CDP-kolin: 1,2-diaçilgliserol kolin fosfotransferaz enzimi aracılığı ile diaçilgliserole aktarılması sonucu fosfatidilkolin sentezlenir (22-27). Kennedy yolağı, fosfatidilkolin sentezindeki tek yol olmamasına karşın, sentez edilen fosfatidilkolinin büyük kısmından sorumlu olan yoldur (1).

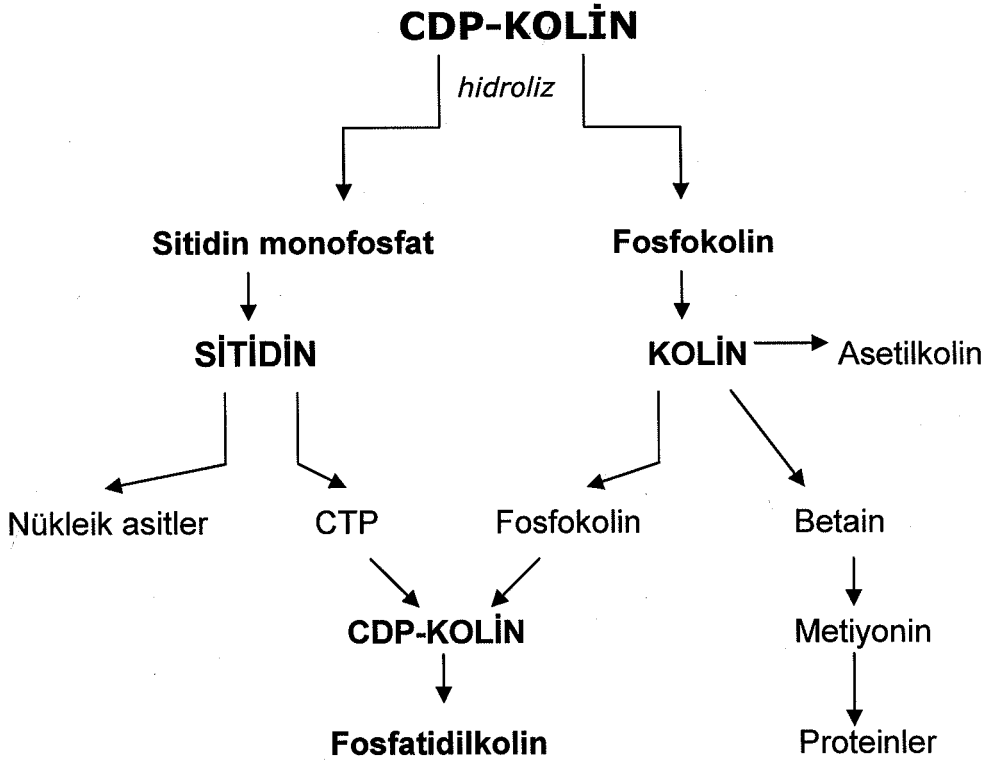


Şekil-2: CDP-kolin sentezi

1.3. CDP-kolin'in Metabolizması

1.3.1. Endojen CDP-kolin'in Metabolizması

CDP-kolin, in vivo koşullarda, hücre duvarındaki fosfodiesterazlar tarafından sitidin monofosfat ve fosfokoline hidroliz edilir. Hidroliz sonucu meydana gelen sitidin ve kolin hücre içine alınırlar. Hücre içinde sitidin, nükleik asit ve protein yapısına katılırken, kolin, betain ve metiyoninin yapısına katılır. Kolin, ayrıca, kolinasetiltransferaz enzimi aracılığı ile asetilasyon yolağına girerek asetilkolin sentezinde de kullanılır. Sitidin ve kolin, hücre içinde CDP-kolin'in yeniden sentezlenmesini de sağlarlar (Şekil 3).



Şekil-3: CDP-kolin'in metabolizması. Kısaltma: CTP: sitidin trifosfat.

1.3.2. Dışarıdan Verilen CDP-kolin'in Metabolizması

CDP-kolin, oral yolla verildiğinde, molekül yapısından dolayı emilim öncesi ya da emilim esnasında parçalanarak hızla kolin ve sitidine dönüşür (1,28). CDP-kolin'in periferik dokulardaki dağılımını incelemek için yapılan çalışmalarda; radyoaktif olarak işaretlenmiş CDP-kolin'in oral yolla verilmesinden otuz dakika sonra midedeki radyoaktivitenin büyük oranda CDP-kolin'e, bağırsaklardaki radyoaktivitenin ise kolin ve sitidin fraksiyonlarına ait olduğu ve bu fraksiyonların birkaç saat içinde bağırsaklardan emilebildiği tespit edilmiştir (29). Oral yolla verilen CDP-kolin'in biyoyararlanımının neredeyse tama yakın (%95) olduğu gösterilmiştir (25). Ayrıca oral ya da intravenöz yolla verilen CDP-kolin'in hızla metabolize edildiği de gösterilmiştir (28). İnsanlarda yapılan bir çalışmada da; ¹⁴C işaretli CDP-kolin'in 300 mg'lık tek dozunun oral verilmesini takiben toplanan gaitada, verilen CDP-kolin dozunun %1'inden daha azının tespit edilmesi CDP-kolin'in gastrointestinal sistemden emiliminin tama yakın olduğunu ortaya koymaktadır (30).

Yapılan çalışmalarda CDP-kolin'in oral yolla uygulanmasını takiben, sıçanlarda plazma kolin ve sitidin düzeylerinin arttığı gösterilirken (2,28,31), insanlarda ise plazma kolin ve üridin düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir (5). Ayrıca intravenöz yol ile verilen CDP-kolin'in plazma kolin seviyelerini artırdığı da gösterilmiştir (4).

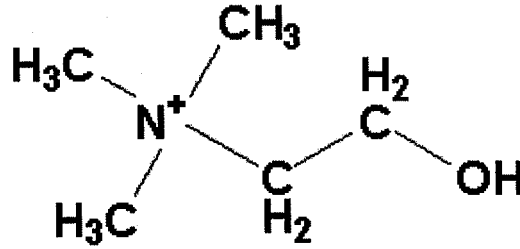
Büyük ve polar bir molekül olan CDP-kolin, periferik olarak uygulandığında ancak küçük bir miktarı kan-beyin bariyerini geçerek beyine ulaşır (32). Molekülün bir bütün olarak beyine geçişini artırmak amacıyla lipozomlara entegre edilmiş formları test edilmiş ve bu formların sıçan iskemi modellerinde lipozomlar kullanılmadan verilen CDP-kolin'e göre yaşam süresini anlamlı şekilde artırdığı (32,33) ve iskemi sonrası reperfüzyonla birlikte yavaş gelişen ilerleyici iskemik hasarla karakterize 'matürasyon fenomeni'ni azalttığı gösterilmiştir (34). Intraserebroventriküler yolla verilen

CDP-kolin'in beyinde, lateral serebral ventrikül ve hipotalamusda, kolin seviyelerini yükselttiği tespit edilmiştir (3).

2. CDP-kolin'in Metabolitleri

2.1 Kolin

Molekül ağırlığı 105 g olan hidrofilik bir moleküldür (Şekil 4). Kolin, kolinerjik nörotransmitter asetilkolinin ön maddesi olmasının yanı sıra tüm hücre membranlarında fosfatidilkolin ve sfingomyelinin polar subünitini oluşturur.



Şekil-4: Kolin'in molekül yapısı

Vücudun ihtiyacı olan kolin, gerek diyetle alınan kolinden gerek fosfatidilkolinden sentezlenen kolinden elde edilir. Fosfatidilkolinden olan sentez, başlıca karaciğer ve böbrekte olurken, çok sınırlı bir şekilde beyin nöronlarında da olabilir (35,36). Sentezlenen kolin önce dolaşıma sonra da dokulara dağılır. Kan-beyin bariyerini kolayca ve hızlı bir şekilde geçerek beyin hücrelerine ulaşır. Bu geçiş, kapiller endotel içerisinde yerleşik olan koline spesifik bir taşıyıcı sistem aracılığı ile olur. Bu taşıyıcı sistem, normal koşullarda, plazmadaki kolin ile doyurulmamıştır. Metabolik enerjiye ihtiyaç duymayan bu sistem bir konsantrasyon gradienti (yokuşu) de oluşturmaz. Bu nedenle, plazma kolin konsantrasyonu dışarıdan kolin verilerek artırılmadıkça kolin akışının yönü beyinden kana doğrudur (35). Dolaşımdaki kolin konsantrasyonu artırılırsa beyindeki kolin konsantrasyonu da artar (37,38).

Kolinin hücre içine alınması asetilkolin sentezinde hız kısıtlayıcı basamağı oluşturur (39,40). Beyin dokusunda hücre dışı aralıkta olan kolinin hücre membranını geçerek nöron içerisine alımı ise iki farklı transport sistemi ile gerçekleştirilir:

1) *Yüksek afiniteli transport sistemi*: Sodyum bağımlı olup presinaptik kolinerjik nöronun terminallerinde bulunur. Sinaptik aralıkta yıkılan asetilkolinden açığa çıkan kolin başlıca bu sistem ile nöron içerisine alınır. Bu yolla alınan kolin asetilkolin sentezi için gerekli olan kolinin önemli bir kısmını oluşturur (41). Bu sistem için K_m değeri $10 \mu M$ 'dan küçüktür (42) ve normal beyin konsantrasyonlarında ($50 \mu M$) doyurulmuş durumdadır. Kolinin kolinerjik nöronlara yüksek afiniteli transport sistemi ile alınması spesifik olarak hemikolinyum-3 ile bloke edilir (41).

2) *Düşük afiniteli transport sistemi*: Sodyum bağımlı olmayan, doyurulabilir ve kolin için K_m değeri $30 - 100 \mu M$ arasında olan bir sistemdir (42). Bu sistem normal beyin konsantrasyonlarında ($50 \mu M$) doyurulmamış durumdadır. Yüksek afiniteli transport sisteminin aksine insan dokularında yaygın olarak bulunur. Enterositler, hepatositler, plasental doku, mitokondri ve sinaptozomlarda karakterize edilmiştir (43). Bu sistem esas olarak fosfatidilkolin ve diğer fosfolipidler için gerekli olan kolin desteğini sağlar (43).

Organizmada herhangi bir sebebe bağlı olarak kolin eksikliği ortaya çıkarsa, fosfatidilkolin başta olmak üzere membran fosfolipidleri yıkıma uğratılarak kolin kaynağı oluşturulmaya çalışılır. Sıçan striatal dilimleri dışarıdan sürekli şekilde elektriksel olarak uyarıldığında, asetilkolin sentez ve saliverilmesi için fosfatidilkolin ve diğer membran fosfolipidlerinin azaldığı, ortama kolin eklendiğinde bu azalmanın önlendiği gösterilmiştir (44). Kolin eksikliğinin, membranda fosfatidilkolin ve sfingomyelin kaybına, seramid ve diaçilgliserol birikimine yol açtığı ayrıca kaspaz aktivasyonu ile apoptozisi indüklediği ortaya konmuştur (45,46).

Kolin, bir nörotransmitter olan asetilkolinin hem ön maddesi hem de yıkım ürünüdür. Kolin ve asetil CoA, kolinasetiltransferaz enziminin katalizlediği geri dönüşlü bir reaksiyonla birleşerek asetilkolini oluşturur. Kolinin normal koşullarda sıçan beyindeki konsantrasyonları (50 μ M), genel olarak enzimi doyurmak için gerekli konsantrasyonun (K_m :400 μ M) altında kalır. Bu nedenle beyin kolin seviyelerini artıran tedaviler asetilkolin sentezini de artırabilir. Nitekim yapılan çalışmalarda, dolaşımdaki kolin düzeylerini artıran tedavilerin beyinde kolin düzeylerini (4,37,38,47-49) ve asetilkolin sentezini (38,47,50) artırdığı ortaya konmuştur. Ayrıca bu tedavilerin asetilkolin salıverilmesini (48,50-54) de artırdığı gösterilmiştir. Sonuçta kolinerjik iletide artış (51,55) ve buna uyan fonksiyon değişiklikleri olur (3,4,6-8,56-59).

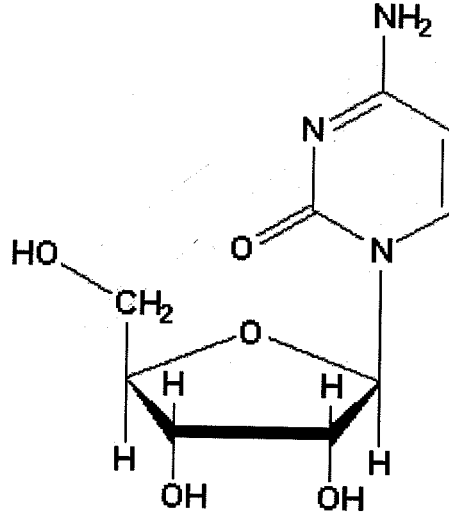
2.2. Sitidin ve Üridin

Nükleotidler; nükleik asitlerin yapı taşları, enerji metabolizmasında kritik elemanlar, biyosentez için aktive metabolitlerin (nükleozid difosfat şekerlerin) taşıyıcıları, koenzimlerin yapısal kısımları, metabolik düzenleyiciler ve sinyal molekülleri olarak görev yaparlar.

Nükleotidler, nükleozidlere fosfat grubu eklenmesi ile oluşurlar. Nükleozidler, beş karbonlu bir şeker ile pürin veya pirimidin bazlarından birinin birleşiminden oluşur. Pürin bazları, adenin ve guanin; pirimidin bazları, ise sitozin, timin ve urasildir. Eğer beş karbonlu şeker deoksiriboz ise nükleik asit DNA'dır, riboz ise RNA'dır.

Nükleotidlerin sentezi için iki yolak tarif edilmiştir:

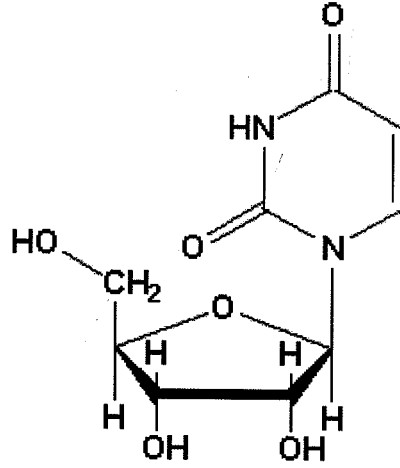
1) *De Novo yolak*: De Novo yolak üzerinden pürinlerin sentezi; glisin, glutamin, aspartat, tetrahidrofolat ve karbondioksit gibi prekürsörlerin pürin halkasına katılımını içerir. Organizmaların çoğu nükleotidleri, düşük molekül



Şekil-5: *Sitidin'in molekül yapısı*

ağırlıklı prekürsörlerinden, bu yolak üzerinden sentezler. Pürinler, fosforibozilpirofosfatın fosforibozilamine dönüşümü ve pürin halkasının amino grubunun üzerine eklenmesi ile nükleotid seviyesinde sentezlenir. Fosforibozilpirofosfattan başlayan reaksiyonlar sonucunda inozin monofosfat oluşur. İnozin monofosfat, tam olarak oluşan ilk pürin nükleotididir ve adenin ile guanin nükleotid biyosentezleri arasında bir dallanma noktasıdır. İnozin monofosfat, iki ayrı yola girerek adenozin monofosfat (AMP) ve guanozin monofosfatı (GMP) oluşturur. Pirimidin sentezi ise karbamoil fosfat oluşumu ile başlar. İlk reaksiyon karbamoil fosfat ve aspartattan karbamoil aspartat oluşumudur ve bu basamak pirimidin sentezine özgüdür. Pirimidin yolağında, pürin yolağından farklı olarak, dallanma görülmez.

2) *Kurtarma (Salvage) yolları*: Pürin ve pirimidin bazlarının kurtarılması ya da yeniden kullanımı, nükleik asit yıkımı ile ortaya çıkan molekülleri içerir. Yıkım, hücre içi olabilir, hücre ölümünün sonucu olabilir ya da hayvanlarda, diyetle alınan nükleik asitlerin sindirilmesi sonucu olabilir. Bazlar ya da nükleotidler kurtarma yolları üzerinden nükleik asit sentezi için tekrar kullanılmazsa; pürin bazları ürik aside, pirimidin bazları beta-üridopropionata yıkılır.



Şekil-6: Üridin'in molekül yapısı

Sitidin (Şekil 5) ve üridin (Şekil 6), CDP-kolin sentezi için önemli iki nükleoziddir. Sitidin, CDP-kolin'in hem yıkım ürünlerinden biri hem de sentezine katılan bir ön maddedir. Sitidin, ayrıca, membran fosfatidilkolinine kolin eklenmesini artırarak membran fosfolipid sentezini artırdığı hücre kültürlerinde ve sıçan beyin dilimlerinde gösterilmiştir (60,61). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda üridinin de, sitidin trifosfata dönüşerek, CDP-kolin sentezine katılabildiği ve dolaylı yoldan membran fosfolipid sentezine katkıda bulunabileceği iddia edilmiştir (5,62).

3. CDP-kolin'in Etkileri

3.1. CDP-kolin'in Asetilkolin Sentezi ve Kolinerjik İleti Üzerine Etkileri

CDP-kolin, dışarıdan verildiğinde (28,30,31) plazma kolin düzeylerinde artışa neden olur (31,63). Kolinin beyine taşınmasında rol oynayan transport sistemleri, normal koşullar altında doyurulmamış olduğundan, dolaşımdaki kolin konsantrasyonu artışı beyin kolin düzeylerinde de artışa yol açar (37,38). Nitekim intravenöz yolla uygulanan CDP-kolin'in plazma ve beyin kolin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (4). İntraserebroventriküler yolla uygulanan CDP-kolin'in beyin kolin düzeylerinde de artış yarattığı bilinmektedir (3). Beyin kolin düzeylerindeki artış, asetilkolin sentezinde (37) ve saliverilmesinde (44) artışa yol açar. İntraperitoneal olarak enjekte edilen CDP-kolin sonrası hipokampal asetilkolin düzeylerinde artış olduğu rapor edilmiştir (64). Belirtilen bu artışlar sonucu, kolinerjik iletide güçlenme ve buna uyan fonksiyon değişiklikleri ortaya çıkar (3,4,6-8,56-59).

3.2. CDP-kolin'in Membran Fosfolipidleri Üzerine Olan Etkileri

CDP-kolin, fosfatidilkolin sentezinde bir ara ürün olarak ortaya çıkar. Dışarıdan verildiğinde sitidin ve kolin düzeylerinde yarattığı artışlar aracılığıyla beyinde fosfatidilkolin, fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (2). CDP-kolin'in ayrıca fosfolipaz A₂ enziminin aktivitesini azaltarak (65) fosfatidilkolin yıkımını azaltması aracılığıyla da membran yapısını koruduğu düşünülmektedir.

Serebral iskemi oluşturulmuş sıçanlara uygulanan CDP-kolin tedavisinin iskemik hasara bağlı kardiyolipin ve sfingomyelin kayıplarını tamamen, fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin kaybını ise kısmen düzelttiği bilinmektedir (13).

3.3. CDP-kolin'in Kardiyovasküler Sistem Üzerine Olan Etkileri

Beyindeki kolinerjik aktivitenin artışı hem normal koşullarda (56,66) hem de hipotansif koşullarda (67-69) kan basıncı artışı üzerine etkilidir.

Merkezi veya periferik olarak uygulanan CDP-kolin'in, beyin kolin seviyelerini ve kolinerjik nörotransmisyonu artırarak ve merkezi nikotinik reseptörleri aktive ederek, normal koşullarda kan basıncını artırdığı ve hemorajik şok oluşturulmuş hayvanlardaki hipotansiyonu düzelttiği gösterilmiştir (3,4). Bu etkiye dolaşımdaki adrenalin ve vazopresin düzeylerindeki artış aracılık etmektedir.

Kardiyojenik şok ve hemorajik şokta en önemli ölüm sebeplerinden biri mezenterik vazospazma bağlı mezenter iskemisidir ve bu vazospazm renin-angiotensin sisteminin aktivasyonu sonucu olmaktadır (70). CDP-kolin'in plazma renin aktivitesini değiştirmeden hipotansiyonu düzeltmesi hipovolemik şokta bir avantaj oluşturmaktadır. Nitekim CDP-kolin'in, hemorajik şok oluşturulmuş anestezi altındaki hayvanlarda, süperior mezenterik arter ve renal arter kan akımını artırdığı ve bu hayvanlarda survival oranlarını yükselttiği gösterilmiştir (71).

3.4. CDP-kolin'in Endokrin Sistem Üzerine Olan Etkileri

Gerek insanlarda gerekse hayvanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda CDP-kolin'in endokrin sistem üzerine etkileri olduğu kanıtlanmıştır. İntravenöz infüzyon yolu ile uygulanan CDP-kolin, insanlarda serum büyüme hormonu (GH) seviyelerini artırırken serum prolaktin (PRL) seviyelerini ise azaltmıştır (72). Yine insanlarda yapılan bir diğer çalışmada, impotansı olan erkeklere oral yolla CDP-kolin verildiğinde plazma testesteron seviyeleri anlamlı olarak artarken folikül uyarıcı hormon (FSH) seviyelerinde azalma saptanmış, luteinizan hormon (LH) ve prolaktin seviyelerinde ise bir değişiklik gözlenmemiştir (73).

Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolin'in normal koşullarda plazma vazopresin ve ACTH düzeylerini artırdığı, uyarılmış koşullarda ise tiroid uyarıcı hormon (TSH), luteinizan hormon ve büyüme hormonu düzeylerinde ek artışlar yarattığı rapor edilmiştir (7,8).

3.5. CDP-kolin'in Serebral İskemideki Etkileri

CDP-kolin, çeşitli serebral iskemi modellerinde ve buna uyan klinik durumlarda kullanıldığında ödem ve infarkt miktarını azaltıcı, nörolojik defisitleri geri döndürücü etki gösterdiği kanıtlanmış bir ilaçtır (74-77). Günümüzde bazı Avrupa ülkeleri ve Japonya'da CDP-kolin'in kafa travmalarında klinik kullanımı onaylanmıştır. CDP-kolin'in iskemik koşullarda koruyucu ve yararlı etkilerini başlıca; i) membran lipidlerinden fosfatidilkolin sentezini artırarak, ii) fosfolipaz A₂ aktivitesini azaltması aracılığı ile membran lipidlerinin yıkımını engelleyerek ve dolayısıyla serbest yağ asidi ve serbest radikal oluşumunu azaltarak, iii) kardiyolipin ve sfingomyelin seviyelerini koruyarak (10), iv) glutasyon düzeylerini ve redüktaz aktivitesini artırarak (11), v) Na/K ATPaz pompasının aktivitesini düzelterek (14), vi) prokaspazların ve kaspaz-3'ün ekspresyonunu azaltarak ortaya koyduğu düşünülmektedir.

4. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Miyokarda kan sağlayan damarların, pıhtı gibi mekanik bir nedenle tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin bozulmasına iskemi, doku kanlanmasının ilaçlarla ya da mekanik müdahale ile yeniden sağlanmasına ise reperfüzyon denir.

İskemi, birçok hücresel fonksiyonu durdurarak hücre ölümüne yol açar. Normal koşullar altında miyokardiyal enerji ihtiyacının %95'i oksidatif fosforilasyon tarafından üretilen enerji ile karşılanır. İskemik koşullarda oksidatif fosforilasyon için gerekli oksijen sağlanamadığından mitokondriyal ATP üretimi bozulur ve hücrenin yaşamsal fonksiyonları için gerekli enerjiyi sağlayan kreatin fosfat ve ATP gibi yüksek enerjili fosfatların düzeyi azalır. Hücrenin yaşamını sürdürebilmesi için anaerobik solunum ve glikojenoliz ile enerji üretilmeye çalışılır. Ancak bu da laktat ve hidrojen iyonlarının birikimi nedeniyle hücre içi asidoza ve ona eşlik eden inorganik fosfat artışına yol açar. Son olarak biriken laktat ve protonlar glikoliz ve anaerobik solunumun da durmasına neden olur (78).

Enerji bağımlı transmembranal kontrol (ATP bağımlı iyon kanalları) bozulduğundan hücre içi potasyum ve magnezyum iyonları hücre dışına çıkar, hücre dışı sodyum ve kalsiyum iyonları hücre içine girer ve hücre içinde birikir (79). Aynı zamanda mitokondride de kalsiyum birikimi olur (80). Hücre içinde kalsiyum arttığı için fosfolipaz A₂, fosfolipaz C (81) ve endonükleazlar (82) gibi kalsiyuma bağımlı olarak çalışan enzimlerin aktivitesi artar. Fosfolipaz A₂, membran fosfolipidlerini hidrolize ederek serbest yağ asitlerine ve lizofosfolipidlere yıkar. Membran fosfolipidlerinin kaybı ile membran hasarı oluşur (83). Elektrolitlerin bu şekilde yer değiştirmesi osmotik değişikliklere ve sonuçta hücresel ödeme neden olur. Proteinlerin yıkımı ve sentezi durur.

Hücre sel iske mi, aynı zamanda, glutatyon ve süperoksit dismutaz gibi proteinlerin ve lipidlerin oksidatif strese karşı korunmasında önemli rol oynayan enzimlerin seviyelerinde de bir düşüklüğe neden olur. İske mi-reperfüzyon hasarı esnasında serbest oksijen radikallerinin aşırı miktarda oluştuğu ve bu radikallerin yapısal proteinler, nükleik asitler ve membran lipidlerine saldırarak membran hasarına yol açtığı bilinmektedir (84). Bir süre sonra mitokondri ve sarkoplazmik retikulumda da ödem gelişir. İske mi devam ederse kontraksiyon bantlarında nekroz, Z bantlarında bozulma ve miyofibrillerde yıkım gelişir. İske mi aynı zamanda spesifik mitokondrial DNA hasarına da yol açar. Tüm bu değişiklikler neticesinde hücre ölümü ve nekroz ortaya çıkar.

Hücrelerin yaşamlarını sürdürebilmeleri için iskemik bölgenin yeniden kanlanması (reperfüzyon) şarttır. Ancak reperfüzyonun kendisi de, iskemik dönem sonunda hala yaşama potansiyelleri olan hücrelerde hasara neden olabilir ki bu hasara 'reperfüzyon hasarı' denir (85,86). Bu yüzden Braunwald ve Kloner miyokardiyal reperfüzyon için 'iki tarafı keskin kılıç' tanımını yapmışlardır (87). Reperfüzyon hasarının mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (88). Günümüzde hasar mekanizmasında rol oynadığı düşünülen nedenler altta sıralanmıştır:

1) Serbest oksijen radikalleri (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali): Reperfüzyon döneminde hem serbest radikallerin aşırı saliverilmesi hem de antioksidan savunma mekanizmalarının zayıflaması miyokardı kolayca hasarlanabilir hale getirir. Reperfüzyon döneminin ilk dakikalarında serbest oksijen radikalleri düzeylerinin yüksek bulunması ve antioksidan tedavilerin hayvanlarda reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğunun gösterilmesi serbest oksijen radikallerinin reperfüzyon esnasında gelişen miyokard hasarında önemli bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır (17).

2) Aşırı kalsiyum yüklenmesi: Hücre içi kalsiyum homeostazisindeki değişiklikler reperfüzyon hasarı gelişiminde önemli bir rol oynar. Reperfüzyonun erken döneminde mitokondriye aşırı kalsiyum girişi olduğu bilinmektedir (89). Hücre içinde aşırı kalsiyum birikimi, iskemide olduğu gibi, fosfolipaz A₂, fosfolipaz C ve endonükleazlar gibi kalsiyuma bağımlı olarak çalışan enzimlerin aktivitesini artırır. Fosfolipaz A₂, membran fosfolipidlerini hidrolize ederek serbest yağ asitlerine ve lizofosfolipidlere yıkar ve bunun sonucunda membran fosfolipidlerinin kaybı ile membran hasarı oluşur. Ayrıca kalbin kasılma fonksiyonunu devam ettirebilmesi için gerekli ritmik vurular kalsiyuma ihtiyaç duyar. Kalsiyum depolarındaki değişiklikler aritmilerin gelişmesine ve kalp yetmezliğine neden olabilir (90).

3) Renin-anjiyotensin aracılı hasar: Son yıllarda renin-anjiyotensin sisteminin iskemi-reperfüzyona bağlı miyokard hasarında rol oynadığına dair kanıtlar bulunmuştur (88). Renin-anjiyotensin sisteminin en önemli ürünü olan anjiyotensin-II, miyositlerde ve düz kas hücrelerinde hücre içi kalsiyum düzeylerini artırarak diyastolik fonksiyonda zayıflamaya ve koroner vazokonstrüksiyona yol açar. Sonuç olarak patofizyolojik koşullarda anjiyotensin-II kardiyotoksik etkilidir ve miyosit nekrozuna neden olur (88).

4) Nötrofil aracılı hasar: Reperfüzyon sağlanmasından hemen sonra, hasarlanmış miyokard bölgesinde, nötrofil aktivasyonu ve birikimi görülür. Nötrofiller, reperfüzyon hasarı gelişiminde önemli yer tutarlar. Çünkü risk altında olan miyokard bölgesinde, oksijen radikallerini, proteazları ve pro-inflamatuar ajanları artırarak nötrofil infiltrasyonunun daha yüksek düzeylere çıkmasına ve miyosit hasarına neden olurlar (88).

5) Trombosit aracılı hasar: İskemi-reperfüzyon, trombosit aktivasyonunu artırır ve bu artış miyokard hasarını şiddetlendirir. Tromboksan A₂ ve serotonin gibi trombosit ürünleri mikrovasküler konjesyon artışına, trombozise ve koroner kan akımının yavaşlamasına neden olarak damarlardaki spazmın şiddetlenmesine neden olabilir (88).

6) Kompleman sistemi: İskemi-reperfüzyon esnasında kompleman sistemi de aktive olur. Kompleman faktörler, hücre geçirgenliğini ve histamin ile trombosit aktive edici faktör salıverilmesini artırarak direkt hücre hasarına neden olurlar. Ek olarak, kompleman faktörler, özellikle C5a, nötrofil adheransı ve süperoksit üretimi için potansiyel uyaranlardır (88).

Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon, birbirinden çok farklı iki temel mekanizma ile hücre hasarına neden olarak hücrelerin ölümüne sebep olur: nekroz ve apoptozis (91). Uzun zaman boyunca miyokardiyal infarktüsdeki hücre ölümünün yalnızca nekroza bağlı olduğu düşünülmüştür. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, bu hasarda apoptotik hücre ölümünün de önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (92,93).

Apoptozis yani programlanmış hücre ölümü, yaşam süresince aktif olan, hasarlanmış ya da normal ancak ihtiyaç duyulmayan hücrelerin ortadan kaldırılması için genetik olarak kodlanmış, bir mekanizmadır (94). Genel olarak kabul edilen görüşe göre apoptozis, ölüm reseptörleri bağımlı ya da bağımsız sinyal ileti mekanizmalarının harekete geçmeleri sonucu oluşur. Pro-apoptotik ligandların, reseptörlerine bağlanmaları sonucu düzenleyici

proteinlerde (Bcl-2) bir bozulma ve sitozolik proteazlarda (kaspazlar) aktivasyon meydana gelir. Reseptör bağımsız yolda ise mitokondri disfonksiyonu sonucu sitokrom C ve prokaspaz-9 salınması uyarılır. Her iki mekanizma da apoptozisi başlatarak hücre ölümüne neden olur (95). Birçok çalışmada iskemi-reperfüzyona bağlı miyokard hasarında mitokondri disfonksiyon ve kaspaz aktivasyonunun rolü olduğu gösterilmiştir (96,97).

GEREÇ VE YÖNTEM

Genel

Çalışmada, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden sağlanan 250-300 g 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 kadarı bir kafeste bakıldılar.

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

Cerrahi İşlemler

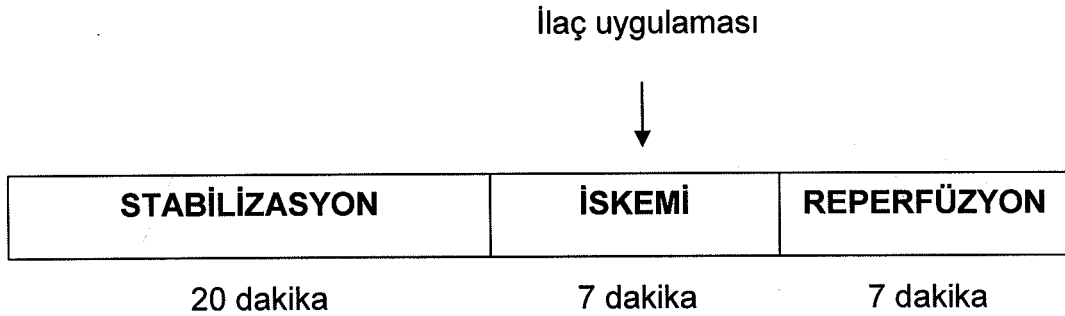
Sıçanlar periton içine verilen ürethan (1.25 g/kg) ile anestezi altına alındıktan sonra sol juguler ven (ilaç enjeksiyonu için) ve sol karotid arter (kan basıncı ölçümü için) içleri heparinli tuzlu su (250 IU/ml) dolu olan PE 50 kateter ile kanüle edildi. Takiben elektrokardiyografi (EKG) kaydı için 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 pCO₂, pO₂ ve pH'ı normal düzeylerde tutacak şekilde pozitif basınçlı suni solunum (1.5 ml/100g hacim ve 70 kez/dakika hız ile) 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 geri yerleştirildi.

Verilerin Kaydedilmesi ve İskemi-Reperfüzyon Prosedürü

Hazırlık süresince ve deney boyunca EKG, kan basıncı, kalp hızı ve vücut sıcaklığı verileri kaydedildi. EKG; EKG modülünün (ECG 100C), kan basıncı ve kalp hızı; volümetrik basınç transduserinin (BPT 300), vücut sıcaklığı; sıcaklık modülünün (SKT 100C) genel amaçlı transduser yükselticisine (DA100B, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) bağlanmasıyla ve MP100 sistem, AcqKnowledge yazılımı (BIOPAC Systems Inc., CA, A.B.D.) kullanılarak bir bilgisayara kaydedildi.

Kısa Dönem İskemi-Reperfüzyon Modeli: Kalp, göğüs kafesi içine geri yerleştirildikten sonra 20 dakika stabilizasyon için beklendi. Oklüzyon öncesinde kan basıncı 60 mm Hg'nin 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. Yedi dakikalık iskemi süresi tamamlandığında klemp açılarak tüp içinden geçen ip gevşetildi ve reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon süresi de yedi dakika olarak uygulandı (Şekil 1).



Şekil-1: Kısa dönem iskemi-reperfüzyon deney şeması.

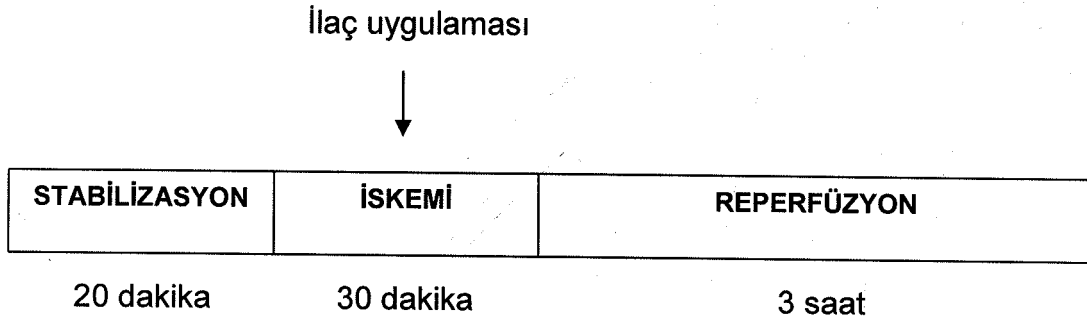
Birinci seri çalışmada, CDP-kolin'in miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine olan doz-yanıt etkisi araştırıldı. Cerrahi işlemlerin bitiminden sonra stabilizasyon için 20 dakika beklendi. Stabilizasyon süresinin bitiminden sonra hayvanların kontrol kan basıncı, kalp hızı ve EKG'si

kaydedildi. Kontrol değerlerin alınmasını takiben sol ana koroner arter kapatılarak iskemi-reperfüzyon prosedürüne başlandı. İskemi süresinin ortasında (oklüzyonun 3,5. dakikasında) intravenöz yol ile değişik dozlarda CDP-kolin (100, 250 ve 500 mg/kg) ya da tuzlu su hayvanlara verildi. Deney sonunda, yapılan kayıtlardan ventriküler taşikardi (VT) süresi ve insidansı, ventriküler fibrilasyon (VF) insidansı ve ölüm oranları değerlendirildi. VT ve VF değerlendirmeleri Lambeth Konvansiyonu'nda (98) önerilen diagnostik kriterlere uygun olarak yapıldı. Hayvanlar deney boyunca vücut sıcaklıkları 37 ± 0.2 C° olacak şekilde ısıtıcı bir platform üzerinde tutuldular.

İkinci seri çalışmada, CDP-kolin'in hidroliz ürünleri olan sitidin ve kolinin miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarındaki etkileri araştırıldı. Bu amaçla 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 3,5. dakikasında) intravenöz yol ile CDP-kolin'in 250 mg/kg dozu ile eşdeğer molar dozda kolin (64 mg/kg), sitidin (111 mg/kg) ya da tuzlu su hayvanlara verildi. Deney sonunda, yapılan kayıtlardan VT süresi ve insidansı, VF insidansı ve ölüm oranları değerlendirildi. VT ve VF değerlendirmeleri Lambeth Konvansiyonu'nda (98) önerilen diagnostik kriterlere uygun olarak yapıldı. Hayvanlar deney boyunca, vücut sıcaklıkları 37 ± 0.2 C° olacak şekilde, ısıtıcı bir platform üzerinde tutuldular.

Uzun Dönem İskemi-Reperfüzyon Modeli: Kalp, göğüs kafesi içine geri yerleştirildikten 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 oklüzyonu sağlandı. Otuz dakikalık iskemi

süresi tamamlandığında klemp açılarak tüp içinden geçen ip gevşetildi ve reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon süresi üç saat olarak uygulandı (Şekil 2).



Şekil-2: Uzun dönem iskemi-reperfüzyon deney şeması.

Uzun dönem iskemi-reperfüzyon çalışmasında, CDP-kolin'in iskemi-reperfüzyon 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. Hayvanlar deney süresince vücut sıcaklıkları 37 ± 0.2 C° olacak şekilde ısıtıcı bir platform üzerinde tutuldular. Bu seride, iskemi ya da reperfüzyon esnasında ventriküler fibrilasyon gelişen sıçanlar (kontrol grubunda iki, tedavi grubunda bir sıçan) değerlendirilme dışı bırakıldılar.

Kontrol değerlerin alınmasını takiben sol ana koroner arter kapatılarak iskemi-reperfüzyon prosedürüne başlandı. İskemi süresinin ortasında (oklüzyonun 15. dakikasında) intravenöz yol ile CDP-kolin (250 mg/kg) ya da tuzlu su (1 ml/kg) hayvanlara verildi. Deney sonunda, kalpler hızlıca yerlerinden çıkartılarak Langendorf düzeneğine asıldı ve arterlerin içinde kalan kanın uzaklaştırılması için, aortaya yerleştirilen bir kanül vasıtasıyla, %0.9 NaCl ile perfüze edildiler. Daha sonra, risk bölgesini belirlemek amacıyla, koroner arterin çevresinde bulunan ipek sütür yeniden bağlanarak 1-10 µm çapındaki floresan mikrosferlerin (Duke Scientific Corp., Palo Alto,

CA, A.B.D.) 25 mg'ının 20 ml %0.9 NaCl içerisinde katılmasıyla hazırlanan süspansiyondan 2 ml kadarı yaklaşık bir dakika süre içinde verildi (Deney sonunda, kalp dilimleri ultraviyole ışık altında incelendiğinde floresan mikrosferleri tutmayan bölge sol ana koroner arterin kanlandığı bölge yani risk bölgesi olarak tanımlandı). Takiben kalpler Langendorf düzeneğinden alınarak korunaklı bir şekilde -50 C°'de donduruldu.

Nekroz miktarını belirlemek için 'trifenil tetrazolyum klorid ile boyama tekniği' kullanıldı (99). Bu amaçla tetrazolyum boyası, 0.1 M NaH₂PO₄ 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 tetrazolyum içeren, pH'sı 7.4 olan ve sıcaklığı önceden 37 C°'ye getirilmiş tampon içerisinde 20 dakika inkübe edildiler. Dilimler tampon içerisinde konulduktan sonraki ilk bir dakika boyunca çalkalanarak tüm yüzeylerin boya ile teması sağlandı. İnkübasyon süresi sonunda tampon içerisinden çıkarılan kalp dilimleri %10'luk formalin içerisinde kondu ve 10 dakika beklendi. Bu sayede renklerin ayırımı daha iyi gözlenir hale geldi.

Dokuda, canlılığını koruyan bölgeler tetrazolyum ile boyanarak koyu kırmızı renk alırken nekrotik bölgeler soluk sarımsı bir renkte gözlemlendi. Bu işlemlerin sonrasında, kalp dilimleri aralarında 2 mm kalınlık olan iki lamel arasına konarak bir kısaç aracılığı ile sıkıştırıldı. Lamelin üzerine konan bir şeffaf asetat kağıdı üzerine nekrotik bölge (tetrazolyum ile boyanmayan bölge) ve risk bölgesi sınırları (ultraviyole ışık altında floresan mikrosferleri tutmayan bölge) çizildi. Daha sonra bu çizimler bir dijital fotoğraf makinesi aracılığı ile bilgisayar ortamına aktarıldı ve bilgisayar programı (Scion Image, Maryland, A.B.D.) destekli planimetrik yöntem ile nekroz miktarı ve risk bölgesi hesaplandı. Son olarak nekroz miktarının, risk bölgesine bölünüp yüz ile çarpılmasıyla nekroz miktarı/risk bölgesi oranı yüzde olarak hesaplandı.

İlaçlar

Çalışmada aşağıdaki ilaçlar kullanıldı; CDP-kolin (Fluka Chemie GmbH, İsviçre), kolin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya) ve sitidin (Acros Organics, New Jersey, A.B.D.). İlaçlar tuzlu su (%0.9 NaCl) içinde hazırlandılar. İntravenöz ilaç ve tuzlu su enjeksiyonları 1ml/kg volümde yapıldı.

İstatistik

Ventrikül taşikardisi ve ventriküler fibrilasyonun görülme sıklığı ile ölüm oranlarının karşılaştırılması *Fisher's Exact test* ile yapıldı. Kan basıncı ve kalp hızı değerleri ortalama \pm standart hata olarak verildi. Grupların karşılaştırılmasında *iki yönlü RM-ANOVA testi* ve anlamlı farklılık olan gruplarda posterior test olarak *Dunnett's test* kullanıldı. Nekroz miktarı ve nekroz miktarı/risk bölgesi karşılaştırmaları unpaired *Student's t test* ile yapıldı. $p < 0.05$ olan değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

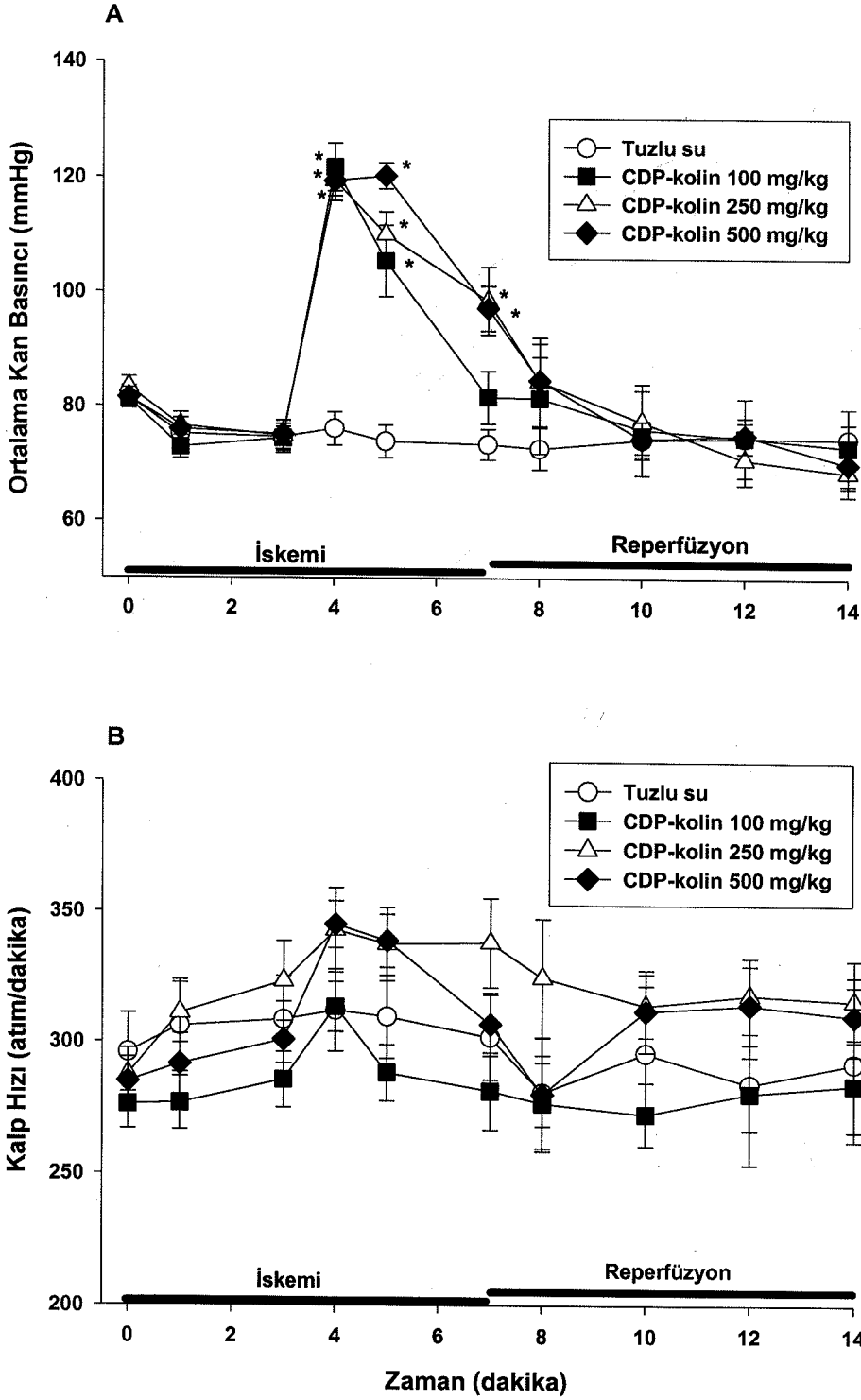
BULGULAR

1. Kısa Dönem İskemi-Reperfüzyon Hasarının Kan Basıncı, Kalp Atım Sayısı, Kardiyak Aritmiler ve Ölüm Oranları Üzerine Etkisi

Sıçanlarda, sol ana koroner arterden sütür geçirilmesinin ardından 20 dakikalık bir stabilizasyon süresi başlatıldı. Stabilizasyon öncesinde, esnasında ve sonunda sürekli olarak sıçanların kontrol kan basıncı, kalp atım sayısı ve EKG kayıtları alındı. Stabilizasyon periyodunun sonunda EKG'lerinde aritmi, ventriküler taşikardi (VT) ya da ventriküler fibrilasyon (VF) tespit edilen sıçanlar ve ortalama kan basıncı 60 mmHg'nin altında olan sıçanlar deney dışında bırakıldılar. Kan basıncı uygun ve EKG kayıtları düzenli olan sıçanlarda sol ana koroner artere yerleştirilen sütür sıkıştırılarak iskemi periyodu başlatıldı. İskemi periyodunun başlaması ile birlikte ortalama kan basıncı 82 ± 2 mmHg'dan 75 ± 3 mmHg'ya düştü (Şekil 1A) ancak kalp atım sayısında anlamlı bir değişiklik olmadı (Şekil 1B). İskemi döneminde 13 sıçanın 2 tanesinde VT, 1 tanesinde VF (Tablo 1) görüldü. 7 dakikalık iskemiye takiben arteri sıkıştıran ipin gevşetilmesi ile reperfüzyon oluşturuldu. Bu dönemde yoğun aritmilerin olduğu ve 13 sıçanın 11 tanesinde VT, 8 tanesinde VF (Tablo1) geliştiği görüldü. Kısa süreli iskemi-reperfüzyon prosedürü uygulanan 13 sıçandan 7 tanesi deney sonlanmadan öldü (Tablo 3).

2. Kısa Dönem İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda CDP-kolin'in Kan Basıncı, Kalp Atım Sayısı, Kardiyak Aritmiler ve Ölüm Oranları Üzerine Etkisi: Doz-Yanıt İlişkisinin İncelenmesi

CDP-kolin (100, 250 ve 500 mg/kg) veya tuzlu su (1 ml/kg), iskemi başlatıldıktan 3.5 dakika sonra i.v. yolla enjekte edildi. CDP-kolin, kan basıncında doza ve zamana bağlı olarak anşamlı bir artış yarattı [doz $F(3,45) = 3.9$ $p < 0.05$, zaman $F(9,353) = 89.5$ $p < 0.001$, doz x zaman $F(27,353) = 11.5$



Şekil-1: İntervenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin'in kısa dönem miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında ortalama kan basıncı ve kalp hızına etkisi: doz ve zaman ilişkisi

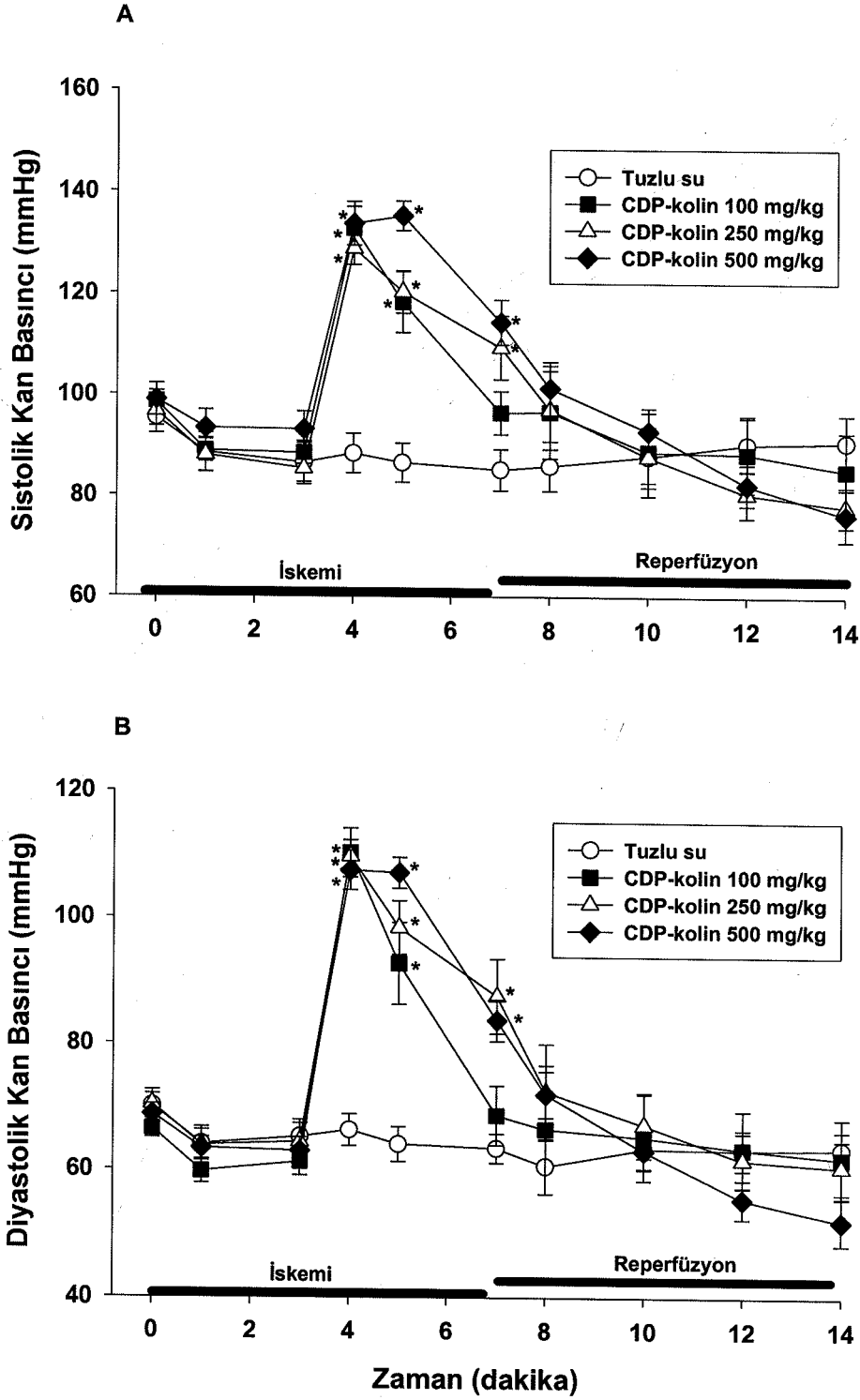
20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol kan basıncı değerleri alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg) ya da CDP-kolin (100, 250 ve 500 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 7 dakikalık iskemi periyodu sonunda 7 dakika süresince reperfüzyon yapıldı. 14 dakika boyunca kan basıncı (A) ve kalp hızı (B) değerleri kaydedildi. Değerler 12-13 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü RM-ANOVA'yı takiben Dunnett testi ile yapıldı. *, $p < 0.05$; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

$p < 0.001$] . Ortalama (Şekil 1A), sistolik (Şekil 2A) ve diyastolik (Şekil 2B) arter basınçlarında gözlenen artışlar benzerdi. Kan basıncında gözlenen artışlar enjeksiyon sonrası 1. dakikada maksimum değere ulaştı. Tuzlu su (1 ml/kg) ya da CDP-kolin (100, 250 ve 500 mg/kg) uygulanmasının 1. dakikasındaki ortalama kan basıncı değerleri sırasıyla, 76 ± 3 , 122 ± 4 , 119 ± 3 ve 119 ± 4 mmHg idi. CDP-kolin'in ortalama kan basıncını yükseltici etkisi 100 mg/kg dozunda yaklaşık 3-4 dakika içinde geri dönerken, 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozunda 5 dakikada geri döndüğü görüldü (Şekil 1 ve 2).

CDP-kolin, kullanılan dozlarda, iskemi ve reperfüzyon periyotları esnasında kalp atım sayısında tuzlu su verilen gruba göre anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 1B).

İskemi döneminde tuzlu su verilen grupta 13 sıçanın 1 tanesinde VF, 2 tanesinde VT geliştiği saptandı. CDP-kolin (100, 250 ve 500 mg/kg; i.v.) verilen grupta kontrol grubuna göre VT ve VF gelişme oranlarında ve sürelerinde herhangi bir anlamlı değişiklik saptanmadı (Tablo 1 ve 2).

Reperfüzyon döneminde tuzlu su verilen 13 sıçanın 8'inde VF geliştiği gözlemlendi (Tablo 1). 100 mg/kg dozda CDP-kolin anlamlı bir değişikliğe yol açmazken; 250 ve 500 mg/kg dozlarında, VF insidansını anlamlı olarak azalttı (Tablo 1). Kontrol grubundaki 13 sıçanın 11 tanesinde VT geliştiği gözlemlendi (Tablo 1). CDP-kolin her üç dozda da reperfüzyon dönemindeki VT insidansını anlamlı olarak azalttı (Tablo 1). Reperfüzyon döneminde gelişen VT süreleri kontrol grubunda 34 ± 7 saniye olarak bulundu. 100 mg/kg dozda CDP-kolin bu sürelerde anlamlı bir değişikliğe yol açmazken; 250 ve 500 mg/kg dozlarında reperfüzyon döneminde gelişen VT sürelerini anlamlı olarak azalttı (Tablo 2).



Şekil-2: İntravenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin'in kısa dönem miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında sistolik ve diyastolik kan basıncına etkisi: doz ve zaman ilişkisi

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol kan basıncı değerleri alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg) ya da CDP-kolin (100, 250 ve 500 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 7 dakikalık iskemi periyodu sonunda 7 dakika süresince reperfüzyon yapıldı. 14 dakika boyunca sistolik (A) ve diyastolik (B) kan basıncı değerleri kaydedildi. Değerler 12-13 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü RM-ANOVA'yı takiben Dunnett testi ile yapıldı. *, $p < 0.05$; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

Tablo-1: İntravenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin'in kısa dönem iskemi-reperfüzyon hasarında VT ve VF görülme oranları üzerine etkisi

<u>Tedavi</u>	<u>İskemi</u>	
	VT görülme oranı	VF görülme oranı
Tuzlu su	2/13	1/13
CDP-kolin (100 mg/kg)	2/12	1/12
CDP-kolin (250 mg/kg)	3/12	2/12
CDP-kolin (500 mg/kg)	1/12	0/12

<u>Tedavi</u>	<u>Reperfüzyon</u>	
	VT görülme oranı	VF görülme oranı
Tuzlu su	11/13	8/13
CDP-kolin (100 mg/kg)	4/12 *	5/12
CDP-kolin (250 mg/kg)	1/12 *	0/12 *
CDP-kolin (500 mg/kg)	3/12 *	1/12 *

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol EKG alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg) ya da CDP-kolin (100, 250 ve 500 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 7 dakikalık iskemi periyodu sonunda 7 dakika süresince reperfüzyon yapıldı. 14 dakika boyunca sıçanların EKG'si kaydedildi. Deney sonunda EKG dataları retrospektif olarak incelendi. İstatistiki değerlendirmeler Fisher's Exact test ile yapıldı. *, $p < 0.05$; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

Tablo-2: İntrevenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin'in kısa dönem iskemi-reperfüzyon hasarında VT süreleri üzerine etkisi

Tedavi	VT süresi-iskemi	VT süresi-reperfüzyon
Tuzlu su	38 ± 30	34 ± 7
CDP-kolin (100 mg/kg)	9 ± 3	21 ± 5
CDP-kolin (250 mg/kg)	5 ± 1	12 ± 2 *
CDP-kolin (500 mg/kg)	10 ± 0	8 ± 1 *

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol EKG alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg) ya da CDP-kolin (100, 250 ve 500 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 7 dakikalık iskemi periyodu sonunda 7 dakika süresince reperfüzyon yapıldı. 14 dakika boyunca sıçanların EKG'si kaydedildi. Deney sonunda EKG dataları retrospektif olarak incelendi. İstatistiki değerlendirmeler tek yönlü ANOVA'yı takiben Dunnett testi ile yapıldı. *, $p < 0.05$; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

Tablo-3: İntrevenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin'in kısa dönem iskemi-reperfüzyon hasarında ölüm oranları üzerine etkisi

Tedavi	Ölüm Oranları
Tuzlu su	7/13 (% 54)
CDP-kolin (100 mg/kg)	5/12 (% 42)
CDP-kolin (250 mg/kg)	0/12 (% 0) *
CDP-kolin (500 mg/kg)	0/12 (% 0) *

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol EKG alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg) ya da CDP-kolin (100, 250 ve 500 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 7 dakikalık iskemi periyodu sonunda 7 dakika süresince reperfüzyon yapıldı. 14 dakika içinde kardiyak arest gelişen sıçanların sayısı tespit edildi. İstatistiki değerlendirmeler Fisher's Exact test ile yapıldı. *, $p < 0.05$; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

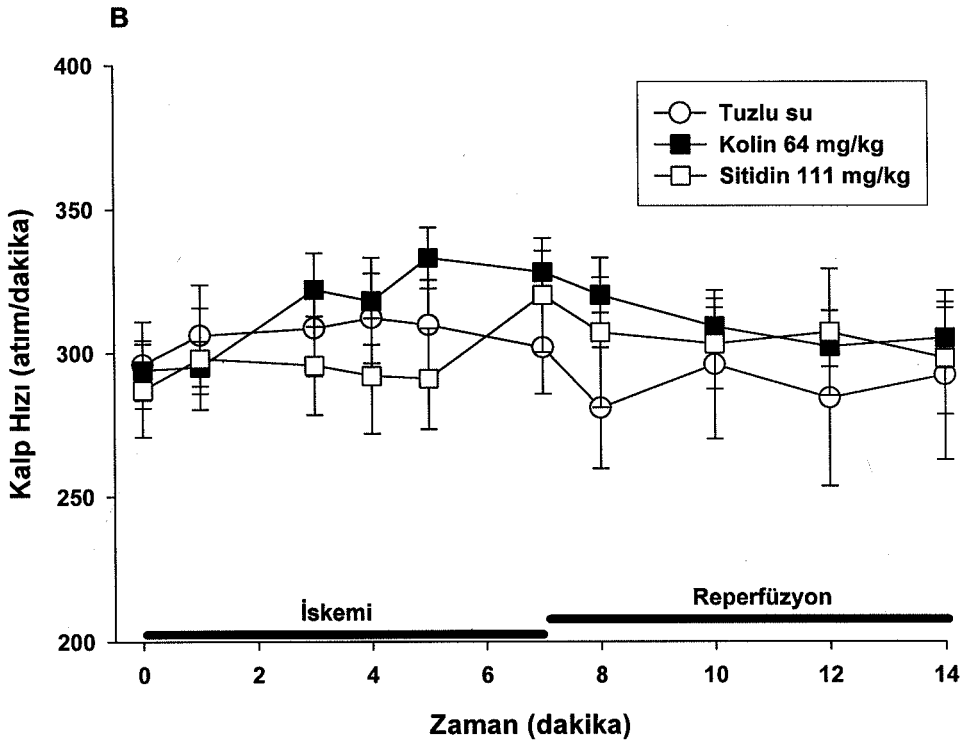
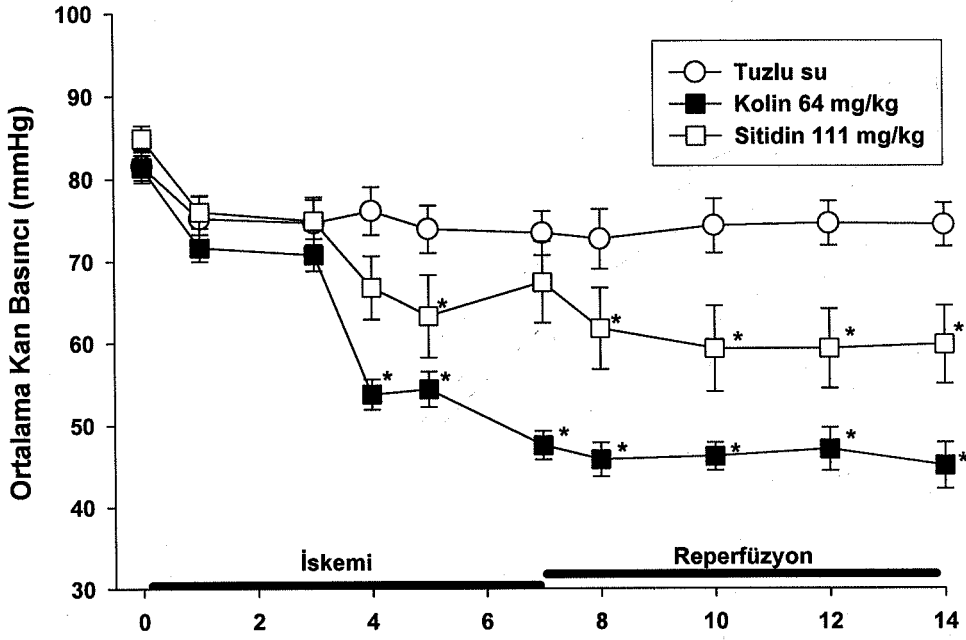
Kontrol grubundaki sıçanların %54'ü reperfüzyon döneminde öldüler (Tablo 3). 100 mg/kg dozunda CDP-kolin ölüm oranlarını anlamlı olarak değiştirmede. 250 ve 500 mg/kg dozlarında ise iskemi-reperfüzyona bağlı gelişen ölümü tamamen önledi (Tablo 3).

3. Kısa Dönem İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Kolin ve Sitidin'in Kan Basıncı, Kalp Atım Sayısı, Kardiyak Aritmiler ve Ölüm Oranları Üzerine Etkisi

CDP-kolin'in etkilerini eşit molar dozda enjekte edilmiş metabolitleri ile de incelemek ve karşılaştırmak amacıyla, 250 mg/kg CDP-kolin dozuna eşdeğer molar dozlarda kolin (64 mg/kg) ya da sitidin (111 mg/kg) verilerek kardiyak aritmi oluşumu ve ölüm oranları üzerine olan etkileri incelendi.

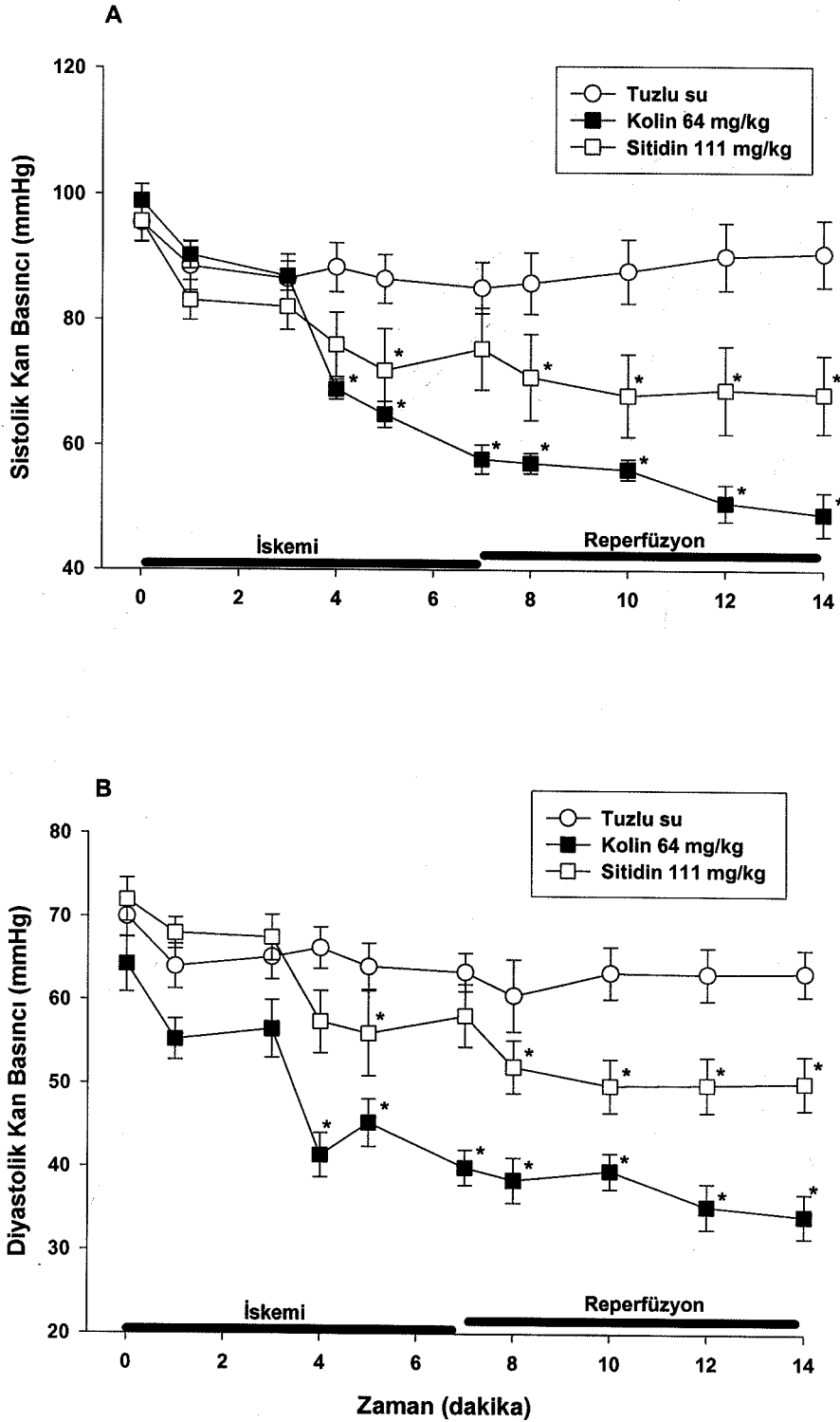
Benzer deney sisteminde, iskemi periyodunun ortasında (3,5. dakikasında) tuzlu su (1 ml/kg), kolin (64 mg/kg) veya sitidin (111 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. Kolin, ortalama kan basıncını ilk dakika içinde anlamlı olarak düşürdü ve ortalama kan basıncındaki bu düşüklük iskemi-reperfüzyon süresinin sonuna kadar devam etti [doz $F(1,19) = 51.6$ $p < 0.001$, zaman $F(9,146) = 36.9$ $p < 0.001$, doz x zaman $F(9,146) = 22.8$ $p < 0.001$] (Şekil 3A). Sitidin de ortalama kan basıncında düşmeye yol açtı [doz $F(1,19) = 4.5$ $p < 0.05$, zaman $F(9,145) = 12.1$ $p < 0.001$, doz x zaman $F(9,145) = 5.1$ $p < 0.001$] (Şekil 3A). Sitidin ve kolin uygulaması sonrası sistolik ve diyastolik kan basıncında meydana gelen değişiklikler ortalama kan basıncı değerlerinde meydana gelen değişikliklerle benzerdi (Şekil 4A ve B).

Kolin ve sitidin, kullanılan dozlarda, iskemi ve reperfüzyon periyotları esnasında kalp atım sayısında tuzlu su verilen gruba göre anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 3B).



Şekil-3: İntravenöz yol ile enjekte edilen kolin ve sitidinin kısa dönem miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuş sıçanlarda kan basıncı ve kalp hızına etkisi

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol kan basıncı değerleri alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg), kolin (64 mg/kg) ya da sitidin (111 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 7 dakikalık iskemi periyodu sonunda 7 dakika süresince reperfüzyon yapıldı. 14 dakika boyunca kan basıncı (A) ve kalp hızı (B) değerleri kaydedildi. Değerler 8-13 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler iki yönlü RM-ANOVA'yı takiben Dunnett testi ile yapıldı. *, $p < 0.05$; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil-4: İntravenöz yol ile enjekte edilen kolin ve sitidinin kısa dönem miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuş sıçanlarda sistolik ve diastolik kan basıncına etkisi

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol kan basıncı değerleri alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg), kolin (64 mg/kg) ya da sitidin (111 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 7 dakikalık iskemi periyodu sonunda 7 dakika süresince reperfüzyon yapıldı. 14 dakika boyunca sistolik (A) ve diastolik (B) kan basıncı değerleri kaydedildi. Değerler 8-13 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. İstatistiki değerlendirmeler iki yönlü RM-ANOVA'yı takiben Dunnett testi ile yapıldı. *, $p < 0.05$; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

İskemi döneminde kolin veya sitidin tedavileri VT insidansı, süresi ve VF insidansında anlamlı değişiklik yaratmadılar (Tablo 4). Reperfüzyon döneminde sitidin ve kolin VT ve VF insidanslarını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltırlarken (Tablo 4) VT süresi üzerinde herhangi bir anlamlı değişikliğe yol açmadılar (Tablo 5).

Tuzlu su grubundaki 13 sıçanın 7 tanesi (%54) reperfüzyon dönemi sonuçlanmadan öldüler (Tablo 6). Kolin (64 mg/kg; i.v.) ya da sitidin (111 mg/kg; i.v.) verilen 8 sıçandan hiçbiri (%0) deney esnasında ölmedi.

4. Uzun Dönem İskemi-Reperfüzyon Hasarının Miyokardiyal Nekroz Oluşumu Üzerine Etkisi

CDP-kolin'in kısa süreli kardiyak iskemi-reperfüzyon hasarında aritmileri önleyici ve ölüm oranını azaltıcı etki göstermesi ve diğer iskemi modellerinde doku koruyucu etkilerinin rapor edilmesi kardiyak iskemi modelinde doku nekrozunu azaltıp azaltmayacağı sorusunu akla getirdi. Bu nedenle, 30 dakikalık iskemi ve 3 saatlik reperfüzyon dönemini kapsayan uzun dönem iskemi-reperfüzyon modeli uygulandı. Deney boyunca hayvanların kardiyovasküler parametrelerinin takipleri sürekli olarak yapıldı (Tablo 8).

Reperfüzyon periyodunun sonunda kalpler yerlerinden çıkartılarak dilimlendikten sonra, gereç ve yöntem kısmında belirtildiği gibi boyandı. Takiben bilgisayarda planimetrik yöntem ile risk bölgesi ve nekroz miktarı hesaplandı. Hesaplanan miktarlar oranlanarak nekroz miktarının risk bölgesine oranı (yüzde olarak) elde edildi. Uzun dönem iskemi-reperfüzyon sonucunda $49 \pm 1 \text{ cm}^3$ lük risk bölgesinin $24 \pm 2 \text{ cm}^3$ ünde nekroz geliştiği gözlemlendi. Nekroz miktarının risk bölgesine oranı ise $\%48 \pm 2$ olarak bulundu (Tablo 7).

Tablo-4: İntravenöz yol ile enjekte edilen kolin ve sitidinin kısa dönem iskemi-reperfüzyon hasarında VT ve VF görülme oranları üzerine etkisi

<u>Tedavi</u>	<u>İskemi</u>	<u>VT görülme oranı</u>	<u>VF görülme oranı</u>
Tuzlu su		2/13	1/13
Kolin (64 mg/kg)		0/8	0/8
Sitidin (111 mg/kg)		0/8	0/8

<u>Tedavi</u>	<u>Reperfüzyon</u>	<u>VT görülme oranı</u>	<u>VF görülme oranı</u>
Tuzlu su		11/13	8/13
Kolin (64 mg/kg)		2/8 *	0/8 *
Sitidin (111 mg/kg)		2/8 *	0/8 *

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol EKG alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg), kolin (64 mg/kg) ya da sitidin (111 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 7 dakikalık iskemi periyodu sonunda 7 dakika süresince reperfüzyon yapıldı. 14 dakika boyunca sıçanların EKG'si kaydedildi. Deney sonunda EKG dataları retrospektif olarak incelendi. İstatistiksel değerlendirmeler Fisher's Exact test ile yapıldı. *, $p < 0.05$; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

Tablo-5: İntravenöz yol ile enjekte edilen kolin ve sitidinin kısa dönem iskemi-reperfüzyon hasarında VT süreleri üzerine etkisi

<u>Tedavi</u>	<u>VT süresi-iskemi</u>	<u>VT süresi-reperfüzyon</u>
Tuzlu su	38 ± 30	34 ± 7
Kolin (64 mg/kg)	0	62 ± 21
Sitidin (111 mg/kg)	0	34 ± 8

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol EKG alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg), kolin (64 mg/kg) ya da sitidin (111 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 7 dakikalık iskemi periyodu sonunda 7 dakika süresince reperfüzyon yapıldı. 14 dakika boyunca sıçanların EKG'si kaydedildi. Deney sonunda EKG dataları retrospektif olarak incelendi. İstatistiki değerlendirmeler tek yönlü ANOVA ile yapıldı.

Tablo-6: İntravenöz yol ile enjekte edilen kolin ve sitidinin kısa dönem iskemi-reperfüzyon hasarında ölüm oranları üzerine etkisi

<u>Tedavi</u>	<u>Ölüm Oranları</u>
Tuzlu su	7/13 (% 54)
Kolin (64 mg/kg)	0/8 (% 0) *
Sitidin (111 mg/kg)	0/8 (% 0) *

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol EKG alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg), kolin (64 mg/kg) ya da sitidin (111 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 7 dakikalık iskemi periyodu sonunda 7 dakika süresince reperfüzyon yapıldı. 14 dakika içinde kardiyak arest gelişen sıçanların sayısı tespit edildi. İstatistiki değerlendirmeler Fisher's Exact test ile yapıldı. *, $p < 0.05$; tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

5. Uzun Dönem İskemi-Reperfüzyon Hasarında Miyokardiyal Nekroz Oluşumu Üzerine CDP-kolin'in Etkisi

CDP-kolin (250 mg/kg; i.v.) veya tuzlu su (1 ml/kg; i.v.) iskemi döneminin 15. dakikasında enjekte edildi. CDP-kolin tedavisi, nekroz miktarını ve nekroz miktarının risk bölgesine oranını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalttı (Tablo 7). CDP-kolin uygulaması sonucu $51 \pm 3 \text{ cm}^3$ lük risk bölgesinin $5 \pm 1 \text{ cm}^3$ lük bölümünde nekroz geliştiği gözlenirken nekroz miktarının risk bölgesine oranı ise $\%10 \pm 3$ olarak bulundu (Tablo 7).

Tablo-7: Uzun dönem iskemi-reperfüzyon hasarı yapılan sıçanlarda CDP-kolin'in infarkt büyüklüğü üzerine etkisi.

Tedavi	Risk bölgesi (cm ³)	Nekroz miktarı (cm ³)	Nekroz miktarı /Risk bölgesi (%)
Tuzlu su (1 ml/kg)	49 ± 1	24 ± 2	48 ± 2
CDP-kolin (250 mg/kg)	51 ± 3	$5 \pm 1^*$	$10 \pm 3^*$

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg) ya da CDP-kolin (250 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 30 dakikalık iskemi periyodunun sonunda 3 saat süresince reperfüzyon yapıldı. Deney sonunda kalpler dilimlenerek risk bölgesi ve nekroz miktarı hesaplandı. Değerler 6 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. İstatistik değerlendirmeler unpaired Student's *t* test ile yapılmıştır. *, $p < 0.05$ tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

Tablo-8: Uzun dönem iskemi-reperfüzyon hasarı yapılan sıçanlarda hemodinamik parametreler.

Tedavi	Kontrol		İskemi (dak.)		Reperfüzyon (dak.)				
	10	20	30	30	30	60	90	120	150

KAN BASINCI (mm Hg)

Tuzlu su (1 ml/kg)	82±2	71±2	71±2	74±2	80±2	83±4	78±3	84±3	81±3	82±2
CDP-kolin (250 mg/kg)	81±2	73±3	99±3 *	78±2	78±2	81±5	83±4	83±3	82±3	81±2

KALP HIZI (atım/dakika)

Tuzlu su (1 ml/kg)	291±14	302±12	308±12	303±8	369±31	367±25	370±24	378±18	371±9	375±19
CDP-kolin (250 mg/kg)	286±15	286±13	289±12	293±20	350±12	348±14	352±18	348±9	347±6	345±15

20 dakikalık stabilizasyon döneminin sonunda kontrol kan basıncı ve kalp hızı değerleri alındıktan sonra sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak iskemi başlatıldı. İskemi periyodunun ortasında tuzlu su (1 ml/kg) ya da CDP-kolin (250 mg/kg) i.v. yolla enjekte edildi. 30 dakikalık iskemi periyodunun sonunda 3 saat süresince reperfüzyon yapıldı. Değerler 6 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verildi. İstatistik değerlendirmeler iki yönlü RM-ANOVA'ya tabi Dunnett testi ile yapılmıştır. *, $p < 0.05$ tuzlu su grubuna göre anlamlı farkı göstermektedir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, intravenöz yolla verilen CDP-kolin'in kısa süreli miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında, kardiyak aritmileri önlediğini, yaşam oranlarında artış yarattığını, uzun süreli miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında ise nekroz miktarını azalttığını göstermektedir. CDP-kolin metabolitleri, kolin ve sitidin de kısa süreli iskemi-reperfüzyon hasarında kardiyak aritmileri önleyici ve yaşam süresini artırıcı etki göstermiştir.

Çalışmalar esnasında uyguladığımız kısa dönem iskemi-reperfüzyon modelinde, sol ana koroner arterin 7 dakikalık oklüzyonunu takiben EKG'de QRS kompleksinde genişleme, aritmiler ve kan basıncında düşme gözlenmiştir. Bu dönemi izleyen 7 dakikalık reperfüzyon periyodunda da ventriküler taşikardi ve fibrilasyon geliştiği gözlenmiştir. Kontrol grubundaki hayvanların sadece %46'lık bölümü reperfüzyon döneminin sonuna kadar yaşayabilmişlerdir. Bulgularımız daha önce yapılmış olan kısa süreli kardiyak iskemi ve reperfüzyon çalışmalarının sonuçlarıyla büyük uyum göstermektedir (100,101). Bu koşullarda, iskemik dönemin ortasında verilen CDP-kolin doz ve zamana bağımlı olarak kan basıncını artırmıştır. Ortalama arter basıncındaki artışlar kısa süreli olarak gözlenmiş ve yaklaşık 5 dakika içinde geri dönmüştür. Laboratuvarımızda önceki yıllarda yapılan çalışmalarla, CDP-kolin'in merkezi (3) veya periferik yolla (4) uygulandığında kan basıncını artırdığı bilinmektedir. Bu çalışmadaki kan basıncı bulgularımız, önceki sonuçlarımızla benzerdir. CDP-kolin, bu modelde reperfüzyon döneminde gelişen ventriküler fibrilasyon ve ventriküler taşikardi görülme sıklığını anlamlı olarak azaltmıştır. Ayrıca CDP-kolin verilmiş hayvanlarda reperfüzyon döneminde gelişen ventriküler taşikardi sürelerinin, kontrol grubunda gözlenen sürelerle göre anlamlı olarak daha kısa olduğu görülmüştür. CDP-kolin'in ventriküler taşikardi gelişme insidansı üzerine olan etkileri tüm dozlarda anlamlı olarak ortaya çıkmış, ancak doza bağımlı olarak

gelişmemiştir. Ventriküler taşikardi süreleri dikkate alındığında ise doz-yanıt ilişkisi görülmüştür. Öyle ki 100 mg/kg dozdaki CDP-kolin verilmiş hayvanlarda görülen VT süreleri kontrol grubuna göre farklılık göstermezken, 250 ve 500 mg/kg dozda CDP-kolin verilen hayvanlarda anlamlı olarak kısalmıştır. CDP-kolin verilmiş hayvanlarda reperfüzyon döneminde gelişen ventriküler fibrilasyon sıklığı doza bağlı azalma göstermiştir. 250 ve 500 mg/kg dozda verilen CDP-kolin sonrası bulgular oldukça benzerdir.

CDP-kolin'e eşit molar dozda uygulanan kolin, CDP-kolin'in aksine kan basıncında uzun süreli bir düşmeye neden olmuştur. Kolin verilen hayvanların hiçbirinde reperfüzyon döneminde ventriküler fibrilasyon ve ventriküler taşikardi gelişmemiştir. Benzer şekilde CDP-kolin'e eşit molar dozda verilen sitidin sonrası kan basıncında küçük ama anlamlı düşme olmuştur. Sitidin verilen hayvanlarda da reperfüzyon döneminde ventriküler taşikardi ve fibrilasyon gelişmemiştir. Bu bulgular ve CDP-kolin verilen hayvanlarda kan basıncı artışının reperfüzyon dönemine kadar geri döndüğü halde kardiyak aritmilere karşı koruyucu etki sergilediği de göz önünde bulundurulduğunda, CDP-kolin ve metabolitlerinin aritmilere karşı koruyucu etkisinde oluşturdukları kan basıncı değişikliklerinin anlamlı bir rolü olmadığını düşündürmektedir.

Bulgularımız gerek CDP-kolin gerekse kolin ve sitidin tedavisinin kısa süreli iskemi-reperfüzyon hasarının neden olduğu ölümleri anlamlı ölçüde azalttığı ve/veya tamamen önlediğini göstermektedir. Çünkü kısa süreli iskemi-reperfüzyon hasarı çalışmalarında tuzlu su verilen kontrol hayvanlarının %54'ü reperfüzyon döneminin sonuna gelmeden ölürken, 100 mg/kg dozda CDP-kolin verilen hayvanların sadece %41'i ölmüş, 250 mg/kg ve 500 mg/kg dozda CDP-kolin ile 250 mg/kg CDP-kolin'e eşit molar dozda kolin ve sitidin verilen gruplarda hiç ölüm olmamıştır.

Kısa süreli iskemi-reperfüzyon çalışmalarındaki bulgular, CDP-kolin'in etki gösteren ortalama dozunun 250 mg/kg olduğunu ortaya koymuştur. Bu

nedenle uzun süreli iskemi-reperfüzyon hasarı çalışmalarında CDP-kolin bu dozda kullanılmıştır. Bu grupta 30 dakikalık iskemi ve sonrasındaki 3 saatlik reperfüzyon döneminin yarattığı hasara bağlı olarak gelişen infarkt büyüklüğü, daha önce yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir (101-104). CDP-kolin tedavisi bu modelde gözlenen infarkt miktarında anlamlı olarak azalma yaratmıştır. Tuzlu su grubunda, infarkt büyüklüğünün risk bölgesine oranı 48 ± 2 iken CDP-kolin (250 mg/kg) uygulaması sonrası bu oran 10 ± 3 'e düşmüştür.

CDP-kolin intravenöz yolla verildiğinde dolaşım ve beyinde kolin düzeylerini artırabilmekte ve etkilerini, tamamen olmasa da, büyük ölçüde merkezi kolinerjik mekanizmaların uyarılması aracılığı ile gerçekleştirmektedir (4). Özellikle merkezi nikotinic reseptörlerin aktivasyonunun bu etkilerde önemli rolü vardır. Yakın zamanda nikotinin merkezi nikotinic reseptörleri aktive ederek doku ve nöron koruyucu etkiler sergilediği gösterilmiştir (19). Ayrıca nikotinin bu etkilerinde özellikle merkezi alfa 7 nikotinic asetilkolin reseptör ($\alpha 7$ nAChRs) aktivasyonu aracılığı ile oluşan TrkA reseptör (yüksek afiniteli nerve growth faktör reseptörü) ekspresyonunu artırmasının aracılığı olduğunu düşündüren çalışmalar rapor edilmiştir (105-107). Merkezi nikotinic reseptörlerin bir alt grubu olan $\alpha 7$ nAChRs, hem yapısal olarak hem de kolinin selektif agonisti olduğu nikotinic reseptörler olarak önemlidir. Kolinin bu reseptörlerin aktivasyonu ve desensitizasyonu için asetilkoline benzer kinetik parametrelere sahip olduğu gösterilmiştir. İntravenöz yolla verilen CDP-kolin sonrası (250 mg/kg) beyinde lateral serebral ventrikül ve hipotalamusda kolin düzeylerinde 3-4 kat artış olduğunu daha önce göstermiştik (4). Normal koşullarda ekstrasellüler beyin kolin konsantrasyonlarının 4-6 μ M civarında olduğunu düşündüğümüzde, CDP-kolin sonrası bu düzeylerin 12-24 μ M'a çıkması olasıdır. Bu düzeyler, en azından reseptör çevresindeki dinamiği değiştirerek kolin aracılıklı $\alpha 7$ nAChRs aktivasyonu yaratılabileceğini akla getirmektedir. Diğer taraftan CDP-kolin ve kolin, fosfatidilkolin yapımını artırmakta ve iskemiye bağlı serbest yağ asidi oluşumunu önlemektedirler (10). Çalışmamızda hem CDP-

kolin hem de kolin ile benzer koruyucu etkilerin görülmesi CDP-kolin'in etkisinde kolin ve kolin ile bağlantılı bu mekanizmaların aracılığını düşündürmektedir.

Diğer taraftan CDP-kolin'in diğer metaboliti olan sitidin düzeylerinin de CDP-kolin verilmesi sonrasında dolaşımda arttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (2). Sitidin, nükleik asitlerin yapımına girerek ve yapısı itibariyle nükleozidlere ait reseptörleri aktive ederek doğrudan etkiler oluşturabilecek bir moleküldür. Sitidin verilmesi sonrasında antidepresan etkilerin ortaya çıktığı (108) ve bizim çalışmalarımızda da kan basıncında düşme olduğu (3,4) gösterilmiştir. Bu çalışmalarda ayrıca sitidin ile gözlenen bu etkilerin CDP-kolin'in nihai etki profilini değiştirebildiği de rapor edilmiştir. Dolayısıyla sitidin de CDP-kolin ile gerçekleşen etkilerde rol oynayabilmektedir. Çalışmamızda sitidin ile benzer koruyucu etkilerin gözlenmesi CDP-kolin'in etkisinde bu metabolitin de aracılığını düşündürmektedir.

Adenozinin; A₁, A_{2A} ve A₃ reseptörlerini aktive ederek kardiyak iskemi ve reperfüzyon çalışmalarında koruyucu etki yarattığı gösterilmiştir (109-110). Laboratuvarımızda son zamanlarda yapılan çalışmalarda sitidinin adenozin A₁ ve A₂ reseptörlerini etkileyerek kan basıncını düşürdüğü gözlenmiştir (yayınlanmamış gözlem). Bu bulgu ve gözlemlere dayanarak sitidinin, en azından kısmen, pürinerjik reseptörleri uyararak bu etkileri gerçekleştirdiğini ileri sürebiliriz.

Bu tez çalışması, CDP-kolin'in miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı gelişen aritmiler ve infarkt oluşumu üzerine etkilerini araştıran ilk çalışmadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar intravenöz yol ile uygulanan CDP-kolin'in anestezisi altındaki sıçanlarda miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada CDP-kolin'in kısa ve uzun süreli iskemi-reperfüzyon çalışmalarındaki yararlı etkilerinin mekanizması incelenmeden kalmıştır.

Ancak bu etkilerde kolinerjik ve pürinerjik reseptörlerin aracılığı ve membran fosfolipidlerinin profilindeki değişimin katkısı gelecek dönemde çalışılacaktır. Bir diğer olası mekanizma olarak CDP-kolin aracılıklı ACTH artışının melanokortin reseptörlerini aktive ederek CDP-kolin ile gerçekleşen koruyucu etkilerde rol oynayıp oynamadığı da incelenecek sistemler arasındadır.

KAYNAKLAR

- 1- Weiss GB (1995) Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci.*, 56:637-660.
- 2- Lopez G-Coviella I, Agut J, Savci V, Ortiz JA, Wurtman RJ (1995) Evidence that 5'-cytidinediphosphocholine can affect brain composition by increasing choline and cytidine plasma levels. *J. Neurochem.*, 65:889-894
- 3- Savci V, Cavun S, Goktalay G, Ulus IH (2002) Cardiovascular effects of intracerebroventricularly injected CDP-choline in normotensive and hypotensive rats: the involvement of cholinergic system. *Naunyn. Schm. Arch. Pharmacol.* 365 (5) : 388 - 398
- 4- Savci V, Goktalay G, Cansev M, Cavun S, Yilmaz MS, Ulus IH (2003) Intravenously injected CDP-choline increases blood pressure and reverses hypotension in haemorrhagic shock: effect is mediated by central cholinergic activation. *Eur. J. Pharmacol.* 468(2):129-139
- 5- Wurtman RJ, Regan M, Ulus IH, Yu L (2000) Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochem. Pharmacol.*, 60:989-992.
- 6- Savci V, Goktalay G, Ulus IH (2002) Intracerebroventricular choline increases plasma vasopressin and augments plasma vasopressin response to osmotic stimulation and hemorrhage. *Brain Research* 942 (1-2):58-70

- 7- Cavun S, Savci V, Ulus IH (2004) Centrally injected CDP-kolin increases plasma vasopressin levels by central cholinergic activation. *Fund. Clin. Pharmacol.* 18:71-77
- 8- Cavun S, Savci V, Ulus IH (2004) CDP-choline increases plasma ACTH and potentiates the stimulated release of GH, TSH and LH: the cholinergic involvement. *Fund. Clin. Pharmacol.* 18:513-523
- 9- Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ (1999) CDP-choline: Neuroprotection in transient forebrain ischemia of gerbils. *J. Neurosci. Res.* 58:697-705
- 10- Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ (2000) Lipid alterations in transient forebrain ischemia: Possible new mechanisms of CDP-choline neuroprotection. *J. Neurochem.* 75:2528-2535
- 11- Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ (2001) Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia. *Stroke.* 32:2376-2381
- 12- Secades JJ, Frontera G (1995) CDP-Choline: Pharmacological and clinical review. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology.* 17(B):1-54
- 13- Adibhatla RA, Hatcher JF, Dempsey RJ (2002) Citicoline: neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 80:12-23
- 14- Plataras C, Tsakiris S, Angelogianni P (2000) Effect of CDP-choline on brain acetylcholinesterase and NA⁺, K⁺-ATPase in adult rats. *Clinical Biochemistry* 33 (5):351-357

- 15- Maejima S, Katayama Y (2001) Neurosurgical trauma in Japan. *World J. Surg.* 25:1205-1209
- 16- Lopez AD, Murray CJL (1998) The global burden of disease, 1990-2020. *Nature Med.* 4:1241-1243
- 17- Zhao ZQ (2004) Oxidative stress-elicited myocardial apoptosis during reperfusion. *Current Opinion in Pharmacology*, 4:159-165
- 18- Kakinuma Y, Ando M, Kuwabara M, Katare RG, Okudela K, Kobayashi M, Sato T (2005) Acetylcholine from vagal stimulation protects cardiomyocytes against ischemia and hypoxia involving additive non-hypoxic induction of HIF-1 α . *FEBS Letters* 579 (10):2111-2118
- 19- Hejmadi MV, Dajas-Bailador F, Barns SM, Jones B, Wonnacott S (2003) Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24:779-78
- 20- Guarini S, Schioth HB, Mioni C, Cainazzo MM, Ferrazza G, Giuliani D, Wikberg JES, Bertolini A, Bazzani C (2002) MC₃ receptors are involved in the protective effect of melanocortins in myocardial ischemia/reperfusion-induced arrhythmias.
- 21- Kennedy EP, Weiss SB (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem.*, 222 (1):193-214
- 22- Sundler R, Akesson B (1975) Biosynthesis of phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines from ethanolamine and choline in rat liver. *Biochem. J.*, 146 (2):309-315

- 23- Toback FG (1984) Phosphatidylcholine metabolism during renal growth and regeneration. *Am. J. Physiol.*, 246 (15):F249-F259
- 24- Tokmakjian S, Haines DS, Possmayer F (1981) Pulmonary phosphatidylcholine biosynthesis. Alterations in the pool sizes of choline and choline derivatives in rabbit fetal lung during development. *Biochim. Biophys. Acta*, 663 (2):557-568
- 25- Van Heusden GP, Vanden Bosch H (1982) Utilization of disaturated and unsaturated phosphatidylcholine and diacylglycerols by cholinephosphotransferase in rat lung microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 711 (2):361-368
- 26- Wientzek M, Man RY, Choy PC (1987) Choline glycerophospholipid biosynthesis in the guinea pig heart. *Biochem. Cell Biol.*, 65 (10):860-868
- 27- Miller BE, Hook GE (1989) Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in activated alveolar type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1 (2):127-136
- 28- Paroni R, Cighetti G, Del Puppo M, Kienle MG (1985) Evidence for a different metabolic behaviour of cytidine diphosphate choline after oral and intravenous administration to rats. *Pharmac. Res. Commun.*, 17:805-819
- 29- Yashima K, Takamatsu M, Okuda K (1975) Intestinal absorption of cytidine diphosphate choline and its changes in the digestive tract. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*, 21(1):49-60

- 30- Dinsdale JR, Griffiths GK, Rowlands C, Castello J, Ortiz JA, Maddock J, Aylward M (1983) Pharmacokinetics of [¹⁴C]-CDP-choline. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 33(7A):1066-1070
- 31- Lopez G-Coviella I, Agut J, Von Borstel R, Wurtman RJ (1987) Metabolism of cytidine (5')-diphosphocholine (CDP-choline) following oral and intravenous administration to the human and the rat. *Neurochem. Int.* 11:293-297
- 32- Fresta M, Wehrl E, Puglisi G (1995) Enhanced therapeutic effect of cytidine-5'-diphosphate choline when associated with GM1 containing small liposomes as demonstrated in a rat ischemia model. *Pharm. Res.* 12(11):1769-1774
- 33 -Fresta M, Puglisi G (1997) Survival rate improvement in a rat ischemia model by long circulating liposomes containing cytidine-5'-diphosphate choline. *Life Sci.*, 61:1227-1235
- 34- Fresta M, Puglisi G (1999) Reduction of maturation phenomenon in cerebral ischemia with CDP-choline loaded liposomes. *Pharm. Res.*, 16(12):1843-1849
- 35- Blusztajn JK, Wurtman RJ (1983) Choline and cholinergic neurons. *Science*, 221(4611):614-620
- 36- Zeisel Sh (1985) Formation of unesterified choline by rat brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 835(2):331-343
- 37- Cohen EL, Wurtman RJ (1975) Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. *Life Sci.*, 16:1095-1102

- 38- Cohen EL, Wurtman RJ (1976) Brain acetylcholine: control by dietary choline. *Science*, 191:561-562
- 39- Tucek S (1985) Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. *J. Neurochem.* 44:11-24
- 40- Okuda T, Haga T (2003) High-affinity choline transporter. *Neurochemical Research.* 28:483-488
- 41- Okuda T, Haga T (2000) Functional characterization of human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett.*, 484(2):92-97
- 42- Lockman PR, Allen DD (2002) The transport of choline. *Drug development and industrial pharmacy.* 28(7):749-771
- 43- Allen DD, Lockman PR (2003) The blood brain barrier choline transporter as a brain drug delivery vector. *Life Sciences.* 73:1609-1615
- 44- Ulus IH, Wurtman RJ, Mauron C, Blusztajn JK (1989) Choline increases acetylcholine release and protects against the stimulation-induced decrease in phosphatide levels within membranes of rat corpus striatum. *Brain Res.*, 484:217-225
- 45- Yen CE, Mar M, Zeisel SH (1999) Choline deficiency induced apoptosis in PC12 cells is associated with diminished membrane phosphatidylcholine and sphingomyelin, accumulation of ceramide and diacylglycerol and activation of a caspase. *FASEB J.*, 13:135-142
- 46- McNary-Holmes MQ, Loy R, Mar MH, Albright CD, Zeisel SH (1997) Apoptosis is induced by choline deficiency in fetal brain and in PC12 cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 101(1-2):9-16

- 47- Hirsch MJ, Wurtman RJ (1978) Lecithin consumption increases acetylcholine concentrations in rat brain and adrenal gland. *Science*, 202:223-225
- 48- Buyukuysal RL, Ulus IH, Aydin S, Kiran BK (1995) 3,4-Diaminopyridine and choline increase in vivo acetylcholine release in rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.*, 281:179-185
- 49- Koppen A, Klein J, Holler T, Loffelholz K (1993) Synergistic effect of nicotinamide and choline administration on extracellular choline levels in the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266(2):720-725
- 50- Maire JCE, Wurtman RJ (1985) Effects of electrical stimulation and choline availability on the release and contents of acetylcholine and choline in superfused slices from rat striatum. *J. Physiol. (Paris)*, 80:189-195
- 51- Ulus IH, Hirsch MJ, Wurtman RJ (1976) Trans-synaptic induction of adrenomedullary tyrosine hydroxylase activity by choline: evidence that choline administration can increase cholinergic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 74(2):798-800
- 52- Koshimura K, Miwa S, Lee K, Hayashi Y, Hasegawa H, Hamahata K, Fujiwara M, Kimura M, Itokowa Y (1990) Effects of choline administration on in vivo release and biosynthesis of acetylcholine in the rat striatum as studied by in vivo brain microdialysis. *J. Neurochem.*, 54:533-539
- 53- Marshall DL, Wurtman RJ (1993) Effect of choline on basal and stimulated acetylcholine release: an in vivo microdialysis study using a low neostigmine concentration. *Brain. Res.*, 269:269-274

- 54- Koppen A, Klein J, Erb C, Loffelholz K (1997) Acetylcholine release and choline availability in rat hippocampus: effects of exogenous choline and nicotinamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 282(3):1139-1145
- 55- Scally MC, Ulus IH, Wurtman RJ (1978) Choline administration to the rat increases urinary catecholamines. *J. Neural Transmission*, 43:103-112
- 56- Arslan BY, Ulus IH, Savci V, Kiran BK (1991) Effects of intracerebroventricular injected choline on cardiovascular functions and sympathoadrenal activity. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 17 (5):814-821
- 57- Savci V, Ulus IH (1996) Central choline reverses hypotension caused by α -adrenoceptor or ganglion blockade in rats: the role of vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.* 311:153-161
- 58- Savci V, Gurun MS, Ulus IH, Kiran BK (1996) Effect of intracerebroventricularly injected choline on plasma ACTH and β -endorphin levels in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.* 309:275-280
- 59- Savci V, Gurun S, Ulus IH, Kiran BK (1996) Intracerebroventricular injection of choline increases plasma oxytocin levels in conscious rats. *Brain Res.* 709:97-102
- 60- Lopez G-Coviella I, Wurtman RJ (1992) Enhancement by cytidine of membrane phospholipid synthesis. *J. Neurochem.*, 59:338-343
- 61- Savci V, Wurtman RJ (1995) Effect of cytidine on membrane phospholipid synthesis in rat striatal slices. *J. Neurochem.*, 64:378-384

- 62- Richardson UI, Watkins CJ, Pierre C, Ulus IH, Wurtman RJ (2003) Stimulation of CDP-choline synthesis by uridine or cytidine in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Brain Res.*, 971:161-167
- 63- Babb SM, Appelmans KE, Renshaw PF, Wurtman RJ, Cohen BM (1996) Differential effect of CDP-choline on brain cytosolic choline levels in younger and older subjects as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Psychopharmacology*, 127(2):88-94
- 64- Dixon CE, Ma X, Marion DW (1997) Effects of CDP-choline treatment on neurobehavioral deficits after TBI and on hippocampal and neocortical acetylcholine release. *J. Neurotrauma*, 14(3):161-169
- 65- Arrigoni E, Averet N, Cohadon F (1987) Effects of CDP-choline on phospholipase A2 and cholinephosphotransferase activities following a cryogenic brain injury in the rabbit. *Biochemical Pharmacology* 36 (21):3697-3700
- 66- Buccafusco JJ (1996) The role of central cholinergic neurons in the regulation of blood pressure and in experimental hypertension. *Pharmacological Reviews* 48 (2):179-211
- 67- Guarini S, Tagliavini S, Ferrari W, Bertolini A (1989) Reversal of haemorrhagic shock in rats by cholinomimetic drugs. *British Journal of Pharmacology* 98 (1):218-224
- 68- Onat F, Aslan N, Goren Z, Ozkutlu U, Oktay S (1994) Reversal of hemorrhagic shock in rats by oxotremorine: The role of muscarinic and nicotinic receptors, and AV3V region. *Brain Research* 660 (2):261-266

- 69- Ulus IH, Arslan BY, Savci V, Kiran BK (1995) Restoration of blood pressure by choline treatment in rats made hypotensive by haemorrhage. *Br. J. Pharmacol.* 116:1911-1917
- 70- Toung T, Reilly PM, Fuh KC, Ferris R, Bulkley GB (2000) Mesenteric vasoconstriction in response to hemorrhagic shock. *Shock* 13 (4):267-273
- 71- Yılmaz MS, Savcı V, Ulus IH (2003) Effects of CDP-choline on arteria mesenterica superior and arteria renalis perfusions in haemorrhagic shock. 17. *Ulusal Farmakoloji Kongresi, Antalya, Türkiye*
- 72- Matsuoka T, Kawanaka M, Nagai K (1978) Effect of cytidine diphosphate choline on growth hormone and prolactin secretion in man. *Endocrinologia Japonica.* 25:55-57
- 73- De Rosa G, Corsello SM, Gulino A (1981) The effect of CDP-choline on the secretion of gonadotropins, prolactin and testosterone, in normal and impotent subjects. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 29(5):761-770
- 74- Cacabelos R, Caamano J, Gomez MJ, Fernandez-Novoa L, Franco-Maside A, Alvarez XA (1996) Therapeutic effects of CDP-choline in Alzheimer's disease. Cognition, brain mapping, cerebrovascular hemodynamics, and immune factors. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 777:399-403
- 75- D'orlando KJ, Sandage BW (1995) Citicoline (CDP-choline): Mechanisms of action and effects in ischemic brain injury. *Neurological Research* 17 (4):281-284

- 76- Suryani LK, Adnjana TAK, Jensen GD (1988) Citicoline treatment of memory deficits in elderly people. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 3 (3):235-236
- 77- Adibhatla RM, Hatcher JF (2005) Cytidine-5'-diphosphocholine in stroke and other CNS disorders. *Neurochem. Res.* 30:15-23
- 78- Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG (1997) Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions. *Cardiovascular Research* 33:243-257
- 79- Marban E, Koretsune Y, Corretti M, Chacko VP, Kusuoka H (1989) Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Circulation*, 80(6):IV 17-22
- 80- Lewartowski B, Pytkowski B, Janczewski AM (1987) The role of intracellular calcium in the ischemic myocardial damage. *Acta Physiol Pol.* 1987 Nov-Dec;38(6):493-505
- 81- Prasad MR, Popescu LM, Moraru II, Liu XK, Maity S, Engelman RM, Das DK (1991) Role of phospholipases A2 and C in myocardial ischemic reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 260:877-883
- 82- Trump BF, Berezesky IK (1995) Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* 9(2):219-228
- 83- Van Kuijk FJ, Dratz EA (1987) Detection of phospholipid peroxides in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.*, 3(5):349-354
- 84- Li C, Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:227-241

- 85- Maxwell SR, Lip GY (1997) Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int. J. Cardiol.* 58:95-117
- 86- Piper HM, Garcia-Dorado D (1999) Prime causes of rapid cardiomyocyte death during reperfusion. *Ann. Thorac. Surg.* 68:1913-1919
- 87- Braunwald E, Kloner RA (1985) Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.*, 76(5):1713-1719
- 88- Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ (2005) Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *International Journal of Cardiology*, 100:179-190
- 89- Bagchi D, Wetscher GJ, Bagchi M, Hinder PR, Perdakis G, Stohs SJ, Hinder RA, Dipak KD (1997) Interrelationship between cellular calcium homeostasis and free radical generation in myocardial reperfusion injury. *Chemico-Biological Interactions*, 104:65-85
- 90- Wehrens XHT, Matkovich SJ, Marks AR (2002) Calcium regulation in heart failure. *Pharmaceutical News*, 9:449-462
- 91- Yellon DM, Baxter GF (2000) Protecting the ischemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart* 83:381-387
- 92- Neuss M, Crow MT, Chesley A, Lakatta EG (2001) Apoptosis in cardiac disease-what is it-how does it occur. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 15:507-523

- 93- Kumar D, Jugdutt BI (2003) Apoptosis and oxidants in the heart *J. Lab. Clin. Med.* 5:288-297
- 94- Abbate A, Biondi-Zoccai GGL, Baldi A (2002) Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *J. Cell. Physiol.* 193:145-153
- 95- Zhao ZQ (2002) Oxidative stress-elicited myocardial apoptosis during reperfusion. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4:159-165
- 96- Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A, Izumo S (2000) Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circulation Research* 87 (2):118-125
- 97- Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FJ, Cryns VL (1999) Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31:1709-1715
- 98- Walker MJA et al. (1988) The Lambeth Conventions: Guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovascular Research* 22 (7):447-455
- 99- Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang X, Herbert D, Cohen MV, Downey JM (1994) Rat and rabbit heart infarction: Effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am. J. Physiol.* 267:2383-2390

- 100- Sahna E, Olmez E, Acet A (2002) Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: can the incidence of sudden cardiac death be reduced? *J. Pineal. Res.* 32:194-198
- 101- Birincioglu M, Olmez E, Aksoy T, Acet A (1997) The role of prostaglandin synthesis stimulation in the protective effect of captopril on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats in vivo. *Pharmacol. Res.* 36:299-304
- 102- Lee YM, Hsiao G, Chen HR, Chen YC, Sheu JR, Yen MH (2001) Magnolol reduces myocardial ischemia/reperfusion injury via neutrophil inhibition in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 422 :159-167
- 103- Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Sheu JR, Wang JJ, Yen MH (2002) Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J. Pineal Res.* 33:72-80
- 104- Ozer MK, Parlakpınar H, Acet A (2004) Reduction of ischemia-reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Clinical Biochemistry.* 37:702-705
- 105- Masini E, Pierpaoli S, Marzocca C, Mannaioni PF, Pietrangeli P, Mateescu MA, Zelli M, Federico R, Mondovi B (2003) Protective effects of a plant histaminase in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 309:432-439
- 106- Jonnala RR, Terry AV, Buccafusco JJ (2002) Nicotine increases the expression of high affinity nerve growth factor receptors in both in vitro and in vivo. *Life Sciences.* 70:1543-1554

- 107- Rattray M (2000) Is there nicotinic modulation of nerve growth factor? Implications for cholinergic therapies in Alzheimer' disease. *Biol. Psychiatry.* 49:185-193
- 108- Carlezon WA, Pliakas AM, Parow AM, Detke MJ, Cohen BM, Renshaw FP (2002) Antidepressant-like effects of cytidine in the forced swim test in rats. *Biological Psychiatry.* 51(11):882-889
- 109- Sommerschild HT, Kirkeboen KA (2000) Adenosine and cardioprotection during ischemia and reperfusion-an overview. *ACTA Anaesthesiol Scand.* 44:1038-1055
- 110- Mubagwa K, Flameng W (2001) Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection:An updated overview. *Cardiovascular Research.* 52:25-39

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bana emek harcayan ve uzmanlık tezimi hazırlamamda katkıları olan başta tez danışmanım Prof. Dr. Vahide SAVCI olmak üzere tüm Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. İ. Hakkı ULUS'a, Prof. Dr. Levent R. BÜYÜKUYSAL'a, Prof. Dr. M. Sibel GÜRÜN'e ve Doç. Dr. Sinan ÇAVUN'a, uzmanlık eğitimimin başlangıcından itibaren beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uzm. Dr. Gökhan GÖKTALAY ve Uzm. Dr. Mehmet CANSEV'e, çalışmalarım esnasında bana her zaman yardımcı olan Dr. Emre HAMURTEKİN'e ve diğer araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Zeki FIRAT'a, Dr. Murat GÜRSOY'a, Dr. Selim BATMAZ'a, tüm bilgisini cömertçe benimle paylaşan Kimyager Sami AYDIN'a ve Biyolog Şevket DOĞRUSÖZ'e, çalışmalarımın başlangıcındaki desteğinden dolayı Dr. Mustafa IRAZ'a ve beraber çalıştığımız zamanlardan hep keyif aldığım Vet. Dr. Murat YALÇIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her zaman, her konuda olduğu gibi tez çalışmalarım esnasında da yanımda olan sevgili eşim Füsün'a ve bugünlere gelebilmem için her türlü fedakarlığı yapan anneme, babama ve kardeşime de teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2003/30).

ÖZGEÇMİŞ

8 Nisan 1973 yılında Bursa'da doğdum. İlkokulu Bursa Setbaşı İlkokulu'nda okudum. Ortaokul ve lise öğrenimimi yaptığım Bursa Erkek Lisesi'nden 1990 yılında mezun oldum. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nde tıp öğretimime başladım. 1998 yılında tıp doktoru ünvanı alarak bu fakülteden mezun oldum. 2001 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım ve halen bu eğitime devam ediyorum. Bu eğitim boyunca çeşitli bilimsel projelerde görev aldım. İyi düzeyde İngilizce ve başlangıç düzeyinde Fransızca biliyorum. Evliyim.