

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENDOTELİN-1 ve NİTRİK OKSİT İNHİBİSYONUNUN
KALP İSKEMİ REPERFÜZYONUNA ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

DR. MEHMET ÜNAL

Tez Danışmanı

PROF.DR. DENİZ ERBAŞ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-01/2002-07 ve SBE-01/2003-02 proje numarası ile desteklenmiştir

Eylül 2007
ANKARA

TEŞEKKÜR

Tezimi hazırlamam sırasında her aşamada zamanını, bilgisini, deneyimini ve hoşgörüsünü benimle paylaşan, Fizyoloji Bilimi'nden keyif almamı sağlayan Sayın Danışman Hocam, Fizyoloji AD Başkanı Prof. Dr. Deniz ERBAŞ'a, eğitimimde emeği geçen Sayın Hocalarım; Prof. Dr. Bilge Gönül, Prof. Dr. Aydan BABÜL, Prof. Dr. Sibel DİNÇER, Prof. Dr. Lamia PINAR ve Prof. Dr. Eser ÖZ'e, desteklerinden dolayı Sayın Hocam Doç. Dr. K. Gonca AKBULUT'a, tez izleme jürisinde yer alan ve katkı sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na, laboratuvar çalışmalarımda bana yol gösteren ve yardımcı olan Sayın Hocam Doç. Dr. Çiğdem ÖZER'e, yardımlarından ötürü Lab. Tekn. Salime TARİHÇİ'ye, doktora eğitimim boyunca birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve bana her zaman destek olan çok değerli; ebeveynlerim, eşim ve çocuklarıma teşekkür ederim.

Dr. Mehmet ÜNAL

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Fizyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 04/09/2007



**Prof. Dr. Deniz Erbaş
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**



**Prof. Dr. Aydan Babül
Gazi Üniversitesi**



**Prof. Dr. Emine Koç
Ankara Üniversitesi**



**Prof. Dr. Suna Ömeroğlu
Gazi Üniversitesi**



**Prof. Dr. Eser Öz
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Tablo ve Şekiller	VII
Semboller ve Kısaltmalar	IX
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II-GENEL BİLGİLER	3
1. Endotel Doku	3
2. İskemi	5
2.1 İskeminin Fizyopatolojisi	5
2.1.1 Asidoz Oluşumu	6
2.1.2 Makromolekül Sentezinin Durması	7
2.1.3 İyon Dengesinin Bozulması	7
2.1.3.1 Lipoliz	9
2.1.3.2 Proteoliz	10
2.1.3.3 DNA Hasarı	11
2.1.3.4 Mitokondrial Elektron Transport Zinciri Hasarı	11
2.1.4 ATP Yıkım Ürünlerinin Birikimi	12
3. Reperfüzyon	12
3.1 Reperfüzyonda Serbest Radikal Üreten Kaynaklar	14
3.1.1 Mitokondrial Elektron Transport Zinciri Sızıntısı	17
3.1.2 Vasküler Endotel Kaynaklı Ksantin Oksidaz Aktivasyonu	17
3.1.2.1 Reaktif Oksijen Türleri	19
3.1.3 Lökosit Aktivasyonu	23
3.1.4 Plazma ve organel membranlarından kaynaklanan faktörler	26
3.1.4.1 Araşidonik Asit Metabolitleri	26
3.1.4.2 Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)	27
3.1.5 Komplemanlar ve Sitokinler	27
3.1.5.1 Komplemanlar	27
3.1.5.2 Sitokinler	28
3.1.6 Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Aracılı Serbest Radikal Oluşumu	28
3.2 Reperfüzyon Hasarı	29
3.2.1 Lipid Peroksidasyonu	29
3.2.2 Protein Oksidasyonu	31
3.2.3 DNA Hasarı	32
3.2.4 Kovalen bağlanma	32
3.2.5 Kalsiyum	33

4. Antioksidan Savunma Sistemleri	33
4.1 Endojen Antioksidanlar	33
4.1.1 Antioksidan enzimler:	33
4.1.2 Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar:	34
4.1.3 Serbest Radikal Toplayıcılar	34
4.1.4 Nötrofil İnhibitörleri	35
4.1.5 Serbest Radikal Üretimi İnhibitörleri	35
4.2 Ekzojen Antioksidanlar	35
5. Laboratuvar Teknikleri	35
5.1 Ölçüm Yöntemleri	35
5.1.1 Serbest Radikallerin Ölçümü	35
5.1.2 Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin Ölçülmesi	36
5.1.3 Perfüzyon MDA Tayini	36
5.2 Kardiyak İskemi Reperfüzyon Teknikleri	37
6. Endotelin-1	38
7.Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz	40
7.1 Nitrik Oksit	40
7.1.1 NO'nun Fizikokimyasal Özellikleri	42
7.1.2 Serbest Radikal olarak NO	44
7.1.3 NO Sentezi	46
7.1.4 Nitrik Oksit Sentaz Enzimi	48
7.1.4.1 NOS Enzimlerinin Hücredeki Lokalizasyonu	51
7.1.5 NO Yıkımı	51
7.1.6 NO'nun Metallerle Tepkimesi	52
7.1.7 Nitrolizasyon Tepkimeleri	53
7.1.7.1 Peroksinitrit	54
7.1.8 NO'nun Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri	55
7.1.8.1 NO'nun Damarlar Üzerine Etkisi	55
7.1.8.2 NO ve Miyokard Kontraktilitesinde Bozukluklar	57
7.1.8.3 Kalpte Reperfüzyon Hasarı ve NO	59
7.1.9 Reaktif NO Türlerine Karşı Vücudun Savunma Mekanizmaları	60
7.1.9.1 Peroksinitrite Karşı Korunma Mekanizmaları	61
III.GEREÇ VE YÖNTEM	62
1.Deney Hayvanları	62
2. Kullanılan Cihazlar	62
3.Uygulanan Ajanlar	62

4.Çalışma Grupları	63
5.Cerrahi İşlem	63
6.İzole Perfüze Kalp	64
7. Deney Protokolü	65
8. Hemodinamik Çalışma	65
9. Perfüze ve Doku Çalışması	65
9.1. Perfüze MDA Tayini	66
9.2. Perfüze RSH Tayini	66
9.3. Perfüze ve Doku NOx Tayini	67
9.4. Doku MDA ve GSH Tayini	67
9.5. Doku Karbonil Grupları Tayini	68
10.İstatistiksel Değerlendirme	69
IV.BULGULAR	70
1. Hemodinamik Bulgular	70
1.1 LVDP	70
1.2 dp/dtmak	71
1.3 dp/dtmin	73
1.4 Kalp Atım Hızı	74
2. Biyokimyasal Bulgular	75
2.1 Doku NOx Düzeyleri	75
2.2 Doku MDA Düzeyleri	76
2.3 Doku GSH Düzeyleri	77
2.4 Doku Protein Karbonil Grupları	78
2.5 Perfüze RSH Düzeyleri	78
2.6 Perfüze MDA Düzeyleri	79
2.7 Perfüze NOx Düzeyleri	80
V.TARTIŞMA	82
VII. ÖZET	89
VIII. SUMMARY	90
IX. KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	116

Tablo ve Şekiller

Tablolar		Sayfa
Tablo 1	Endotel Hücrelerinden Salgılanan Maddeler	4
Tablo 2	Endotel Disfonksiyonu ile Birlikte Olan Bozukluklar	4
Tablo 3	Plazma ET-1 Seviyesinin Yüksek Olduğu Durumlar	39
Tablo 4	NO Sentezleyen Enzimler	49
Tablo 5	NO Biyolojisindeki Değişikliklerin Rol Aldığı Kardiyovasküler Bozukluklar	58
Tablo 6	Grupların LVDP Değerleri	70
Tablo 7	Grupların dp/dt maksimum Değerleri	72
Tablo 8	Grupların dp/dt minimum Değerleri	73
Tablo 9	Grupların Kalp Atım Hızı Değerleri	74
Tablo 10	Doku Karbonil, MDA, GSH, NOx Değerleri	75
Tablo 11	Grupların Perfüzat RSH Değerleri	79
Tablo 12	Grupların Perfüzat MDA Değerleri	80
Tablo 13	Grupların Perfüzat NOx Değerleri	81
Şekiller		Sayfa
Şekil 1	I/R'da Serbest Radikallerin Oluşumu	15
Şekil 2	Oksidan ve Antioksidan Sistemler	16
Şekil 3	Reaktif Oksijen Türleri	19
Şekil 4	Metallerin Otooksidasyonu	20
Şekil 5	Süperoksit Radikali	20
Şekil 6	Hidrojen Peroksit Radikali	21
Şekil 7	Hidrojen Peroksit Tepkimeleri	22

Şekil 8	Hidrojen Peroksit Detoksifikasyonu	22
Şekil 9	Peroksinitrit Tepkimeleri	29
Şekil 10	Lipid Peroksidasyonu	30
Şekil 11	İskemide Endotelin-1 Etki Mekanizması	40
Şekil 12	Oksihemoglobin/miyogloblin ve Nitrat Oluşumu	44
Şekil 13	Reaktif Nitrik Oksit Türleri	45
Şekil 14	NO ve ROT	46
Şekil 15	NO'nun Biyolojik ve Patolojik Etki Mekanizması	47
Şekil 16	Deney Protokolü	65
Şekil 17	Grupların LVDP Grafikleri	71
Şekil 18	Grupların dp/dt maksimum Grafikleri	72
Şekil 19	Grupların dp/dt minimum Grafikleri	73
Şekil 20	Grupların kalp Atım Hızı Grafikleri	74
Şekil 21	Grupların Doku NOx Grafiği	76
Şekil 22	Grupların Doku MDA Grafiği	76
Şekil 23	Grupların Doku GSH Grafiği	77
Şekil 24	Grupların Doku Protein Karbonil Grafiği	78
Şekil 25	Grupların Perfüze RSH Grafiği	79
Şekil 26	Grupların Perfüze MDA Grafiği	80
Şekil 27	Grupların Perfüze NOx Grafiği	81

Resimler

Resim 1	İzole Perfüze Kalp	64
---------	--------------------	----

Semboller ve Kısaltmalar

Ach	asetil kolin
AMP	adenozin monofosfat
ATP	adenozin trifosfat
C3a	kompleman 3a
C5a	kompleman 5a
Ca ²⁺	kalsiyum
cGMP	guanozin monofosfat
Cl ⁻	klor
CO	karbon monoksit
CO ₂	karbondioksit
COX-2	siklooksijenaz-2
Dp/dtmak	first derivative of maximum pressure
Dp/dtmin	first derivative of minimum pressure
eNOS	endoteliyal nitrik oksit sentaz enzimi
EDRF	endotel kaynaklı gevşetici faktör
ET-1	endotelin-1
FAD	flavin adenin dinükleotid
FADH ₂	indirgenmiş flavin adenin dinükleotid
Fe ²⁺	ferröz demir
Fe ⁺³	ferrik demir
GR	glutasyon redüktaz
GSH	redükte glutasyon
GSH-Px	glutasyon peroksidaz
GSSG	okside glutasyon
H ⁺	hidrojen

OH•	hidroksil radikali
HO ₂ ⁻	hidroperoksil
H ₂ O	su
H ₂ O ₂	hidrojen peroksid
IL	interlökin
I/R	iskemi reperfüzyon
iNOS	indüklenabilir nitrik oksit sentaz enzimi
K ⁺	potasyum
KAT	katalaz
KDU	kontraktıl disfonksiyondaki uzama
LAM	lökosit adezyon molekülle
LB ₄	lökotrien B ₄
L-NAME	nitro-L-arginin metil ester
LOOH	lipid hidroperoksitleri
Lt	lökotrien
LVDP	left ventricular developed pressure
MDA	malondialdehit
METZ	mitokondrial elektron transport zinciri
Na ⁺	sodyum
nNOS	nöral NOS
NADH	indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO	nitrik oksit
NO ⁻	nitroksil iyonu
NO ₂ ⁺	nitronyum iyonu
NO ₂ ⁻	nitrit
NO ₂ •	nitrojen dioksit

NO ₃ ⁻	nitrat
NOS	nitrik oksit sentaz enzimi
NO _x	nitrojen oksit türleri
O ₂ ⁻	süperoksit anyon
OH•	hidroksil radikali
ONOO ⁻	peroksinitrit
PAF	trombosit aktive edici faktör
Pg	prostaglandin
PMNL	polimorfonükleer lökosit
ROT	reaktif oksijen türleri
RSH	total sülfidril grupları
SOD	süperoksit dismutaz
SOR	serbest oksijen radikalleri
SYA	serbest yağ asitleri
TBA	tiyobarbitürik asit
TCA	trikloroasetik asit
THB	tetrahidrobiopterinin
TNF-α	tümör nekroz faktörü α
TXA ₂	tromboksan A ₂
Tyr	tirozin
U-II	ürotensin-II
XDH	ksantin dehidrogenaz
XO	ksantin oksidaz

I. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemik kalp hastalığı, en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olarak güncelliğini korumaktadır. Gelişmiş ülkelerde her yıl meydana gelen ölümlerin yaklaşık yarısı kalp-damar sistemi ile ilgili sorunlardan kaynaklanmaktadır¹. En sık görülen şekli, aterosklerotik plaklara ve vazospazma bağlı olarak miyokardı besleyen koroner kan akımının klinik ve patolojik belirti verecek kadar azalmış olduğu, "koroner aterosklerotik kalp hastalığı" denilen durumdur². İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı; miyokard infarktüsü, serebral iske mi, inme, hemorajik şok ve organ transplantasyonu gibi cerrahi girişimler ve trombolitik tedaviye bağlı oluşan patofizyolojinin temelidir.

Kardiyovasküler hastalıklarda hipoksi ve iskeminin özel bir yeri vardır³. Miyokardiyal iskemide dokuya giden kan akımının ani azalması nedeniyle bölgeye substratların gelmesi ve oluşan metabolitlerin temizlenmesinin aksaması, oksidatif metabolit yolakların inhibe olması sonucu miyokardiyal fonksiyon kaybı ve hücre ölümüne (nekroz) neden olan bir dizi olaylar zinciri başlamış olur. İskemi terimi, besleyici ürünlerin azlığı ve metabolik artıkların temizlenmemesi kavramlarını gösterse de oksijen (O₂) yetmezliği temel kriter faktördür.

İskemi sonrası reperfüzyon sırasında oluşan süperoksit radikalleri (O₂^{•-}) kalpte doku hasarının önemli etmenlerindendir. Herhangi bir nedenle oluşan miyokardiyal hipoksi ve/veya iske mi sırasında ortaya çıkan serbest radikaller, sitokinler ve nitrik oksit (NO) iskeminin erken evresinde, nötrofil ve monositlerin intimayı infiltre ederek endotel hücrelerinde hasara neden olması sonucu ortaya çıkar ve lipid peroksidasyonunu indüklerler⁴. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünleri de miyokardiyal

hasarda rol oynar. MDA ve karbonil grupları olarak oksidan olayların artışı, antioksidanların azalması reperfüzyonda belirgin olarak meydana gelen biyokimyasal olaylardır⁵.

Endotel doku pek çok enzimatik aktivite, immün fonksiyonlar ve vazoaaktif maddelerin salınımı olaylarının yürütüldüğü bir yapıdır ve fizyopatolojik araştırmalarda önemi artmaktadır. NO endotelden salgılanan vazodilatatör etkili bir moleküldür ve üç farklı nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) tarafından sentezlenmektedir. NOS enziminin farmakolojik ajanlarla inhibisyonu, İ/R’u takiben miyokardiyal fonksiyonları düzeltmektedir⁶. Endotelial NOS (eNOS) fizyolojik koşullarda vasküler tonüsün regülasyonundan sorumlu izoformdur. eNOS İ/R hasarı sırasında yararlı görünmektedir⁷. İ/R sonrası eNOS aktivitesi ve NO salınımı azalmaktadır⁸. İndüklenebilir NOS (iNOS) indüksiyonu vasküler düz kas hücrelerinde saptanmıştır ve pek çok inflamatuvar faktör tarafından stimüle edilmektedir⁹. Kalbin düzelme döneminde iNOS artışı meydana gelir. iNOS inhibisyonu kalbin düzelme aşamasında fonksiyon azlığına neden olur¹⁰. NO’nun İ/R hasarındaki fonksiyonel ve metabolik etkileri halen tartışmalıdır. NO’nun miyokard iskemisi gibi patolojik durumlardaki rolü tam olarak açık olmayıp değişik koşullarda hem pozitif hem de negatif etkileri belirtilmiştir¹¹. Endotelin-1 (ET-1) ve Ürotensin-II (U-II) kuvvetli vazokonstriktör olup endojen kaynaklıdır. ET-1, NO ile etkileşim halindedir^{12,13}.

Çalışmamızda vazokonstriktörler ET-1 ve U-II, NO donörü Molsidomin, NOS inhibitörü nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) ve iNOS inhibitörü L-Canavaninin kalp İ/R hasarına olan etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu sebeple kardiyak fonksiyonları, doku ve perfüzatta biyokimyasal değişiklikleri ölçmek için izole sıçan kalpleri kullanarak İ/R modelinde çalışmamızı gerçekleştirdik.

II-GENEL BİLGİLER

1. Endotel Doku

Endotel, damar duvarını kaplayan ince bir epitel tabakasıdır. Vazodilatatör ve vasokonstriktör substratların yapımında etkili olarak, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan en küçük endokrin organdır¹⁴. Endotel hücreleri; 70 kg'lık bir insanda 6 tenis kortu büyüklüğünde bir alan kaplar. Beş normal kalp büyüklüğünde kitleye sahiptir. Toplam endotel hücre sayısı 1 trilyondur ve 1800 gr ağırlığındadır (karaciğerden büyük). Endotel kan akımına karşı tromborezistans bir yüzey görevi görürken, kan ve damar duvarı arasında da makromoleküler bir bariyer vazifesi yapar. Endotel hücreleri morfolojik yapıları ve stratejik anatomik pozisyonları sebebiyle vasküler düz kas hücreleri ile kan dolaşımının komponentleri arasında (platelet, monosit, enzimler, hormonlar v.d) seçici geçirgen bir bariyer oluşturur^{15,16}. Bunun için endotel hücreleri luminal yüzeyde dolaşım için nonadeziv bir yapıda bulunmalıdır. Endotel hücreleri damar tonusunun düzenlemesi, koagülasyon, hücre büyümesi ve ölümü, lökosit migrasyonu gibi çeşitli olaylarda rol oynar¹⁷.

Endotelin birçok hastalıkdaki önemi 1980'de Furchgott ve Zawadzki'nin endotel kaynaklı bir vazodilatatör faktör olduğunu keşfetmesiyle anlaşıldı¹⁸. Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ismindeki bu faktörün daha sonraları NO olduğu gösterildi¹⁹. Normalde vasküler tonusun sağlanması için belli bir seviyede gevşetici ve kasıcı faktörler endotelden devamlı olarak salgılanır. Bunun yanında nörotransmitterler, hormonlar ve nörolojik stimuluslarla aktive edilerek endotelial hücrelerin daha fazla salgı yapması sağlanır. Endotelden salgılanan başlıca maddeler Tablo I'de^{17,20}, endotel disfonksiyonu ile ilgili bozukluklar ise Tablo II'de görülmektedir^{15,16,21,22}.

Tablo 1. Endotel Hücrelerinden Salgılanan Maddeler

Vasokonstriktörler	Vasodilatatörler	Antitrombotikler	Büyüme mediatörleri
Angiotensin converting enzim (ACE) Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3) Angiotensin II Tromboksan A2 Asetilkolin Araşidonik asit PGH2 Trombin Nikotin	Nitrik Oksit (NO=EDRF) Adrenomedüllin Endotelium derived hiperpolarizing faktörler Prostasiklin (PGI2) Bradikinin Asetilkolin Serotonin Histamin Substance P	Trombomodülin Doku plazminojen aktivatör (t-PA) Plazminojen aktivatör inhibitör tip I (PAI-1)	PDGF Heparin sülfat Basic FGF TGF-β IGF-1 NO IL-1 Bradikinin Endotelin PGI2 A-II
İnflamatuar mediatörler			
Adezyon molekülleri		Antijenler	
Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü (ELAM) Platelet/endotelial Adezyon Molekülü (PECAM) İntraselüler Adezyon Molekülü (ICAM) Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri (VCAM)		Major histokompatibilite kompleks 2 (MHCII)	

Tablo 2. Endotel Disfonksiyonu ile Birlikte Olan Bozukluklar

Endotel disfonksiyonu ile birlikte olan bozukluklar			
Ateroskleroz	Kalp yetmezliği	Posttransplantasyon (koroner) reperfüzyon	Hipertansiyon
Hiperkolesterolemi	Tütün	İnsülin rezistans sendromları	Hormonal Bozukluk
Nörofizyolojik durumlar	Genetik yatkınlık; Hiperhomosisteinemi Familiyal hiperkolesterolemi ACE genotipi		

2. İskemi

Dokulara kan sağlayan damarların, bir pıhtı veya mekanik etkenle tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin bozulmasına iskemi denir. İskemi, dokunun O₂ ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır²³.

2.1 İskeminin Fizyopatolojisi

İskemi, organı veya dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen, geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre/doku zedelenmesine neden olmaktadır²⁴. İskeminin başlamasından hemen sonra kalpte kontraktıl güç hızla düşer. İskemi veya reperfüzyon sırasında irreversibl hasar olmamasına ve perfüzyonun normal veya normale yakın olmasına rağmen oluşan kontraktıl disfonksiyondaki uzama (KDU) (Miyokardiyal Stunning) ilk kez Heyndrickx ve ark. tarafından 1975 yılında, köpeklerde kısa koroner oklüzyonlarla ilgili olarak tanımlanmıştır²⁵. KDU, muhtemelen birçok patojenik mekanizmanın etkileşimi ve hücrel etkileşimler sonucu oluşan, kompleks olayları içeren, multifaktoriyel bir süreçtir. KDU ile ilgili olarak en fazla kabul gören hipotezler "oksidiradikal ve kalsiyum" hipotezleridir. Oksidiradikal hipotezinde, KDU'nın reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimine sekonder oluşan oksidan stres nedeniyle meydana geldiği ileri sürülmektedir. Diğer hipotezde hücrel kalsiyum (Ca²⁺) homeostazisinin bozulması sonucu oluştuğu ileri sürülmektedir²⁶.

Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Hücrel enerji eksikliği iskemik hasarın gelişmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat

bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt O_2 'dir. İskemi sırasında, O_2 yokluğuna bağlı olarak, mitokondrial elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon kapasitesi giderek azalmaktadır²⁷. İskemi hücrede oksidatif fosforilasyonu bozarak hücre içi adenosin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezinde azalmaya yol açar. Bu durum hücre membranının ATP'ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonunu bozarak hücreye daha fazla Ca^{2+} , sodyum (Na^+) ve su (H_2O) girmesi ile sonuçlanmaktadır. Miyokard pH'sı asit yöne yönelir. Oksidatif metabolizma, elektron transportu ve mitokondrilerdeki ATP üretimi hızla azalır. O_2 yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Anaerobik glikolizle ATP üretimi başlar. Ancak, bu hem göreceli olarak yetersiz enerji üretir hem de doku asidozunun daha da derinleşmesine neden olur. Sonuçta laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi artar. İskemide enerji eksikliği sonucu gelişen olaylar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- 1) Asidoz
- 2) Makromolekül sentezinin durması
- 3) İyon dengesinin bozulması
- 4) ATP yıkım ürünlerinin birikmesi

2.1.1 Asidoz Oluşumu

İskemi süresince laktik asit düzeyi artmaya devam eder. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır^{28,29,30,31}. Doku asidozu ve yağ asidi düzeyi arttıkça enerji üretebilmek için dokunun son şansı olan anaerobik glikoliz baskılanarak azalır. Anaerobik glikoliz ile elde edilen ATP de tükenince hücrede tam olarak bir enerji yokluğu ortaya çıkmaktadır. Anaerobik glikolizin bir istenmeyen sonucu da laktat

ve hidrojen (H^+) birikimi ile hücre içi ve dışı asidozunun gelişmesidir³². Deneysel çalışmalarda, uygulanan iskemi modeline ve iskeminin derinliğine göre hücre içi pH değerleri 6.08-6.64 arasında değişmektedir^{32,33}. Laktik asid ve düşük pH değerlerinin protein denatürasyonu, enzim fonksiyon kaybı ve serbest radikallerin oluşumu gibi iskemik hasarı oluşturan etkenlerin gelişmesinde katkısı olduğu gösterilmiştir^{34,35}.

2.1.2 Makromolekül Sentezinin Durması

ATP konsantrasyonunun azalması ile hücrenin temel enerji gerektiren makromolekül sentez işlemi giderek yavaşlamaktadır. Fosfolipid, polisakkarid, protein, nükleik asidlerin spontan veya enzim-katalizli yıkımlarının ardından bu yapı taşlarının yeniden sentezlenememesi nedeniyle hücre bütünlüğü bozulmaya başlamıştır. Bütün bu gelişmelerin sonucunda hücre içi dengeler bozulmaya başlar. İskeminin 15. dk.'dan itibaren hücre membranı görevini yapamaz hale gelir. Böylece hücre içine kontrolsüz sıvı ve elektrolit akımı ortaya çıkar. Hücre şişer, hücre membranındaki ATP bağımlı pompaların işlememesi nedeniyle hücre içinde Ca^{2+} birikimi kontrol edilemez hale gelir. 30-40 dk. içinde ultrastrüktürel değişiklikler iyice belginleşir. Hücre çekirdeğindeki kromatinler periferale yerleşim gösterir. Kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular ortaya çıkar^{28,29,30,35,36}.

2.1.3 İyon Dengesinin Bozulması

Hücre membranında bulunan Na^+/K^+ ATPaz pompası, ATP hidrolizi ile üç Na^+ atomunu iki potasyum (K^+) atomu karşılığında hücre dışına çıkarırken, Ca^{2+} pompası olan Ca^{2+} ATPaz ise iki H^+ iyonuna karşılık bir Ca^{2+} iyonunu hücre dışına çıkarmaktadır. Böylece ekstrasellüler Na^+ ve Ca^{2+} konsantrasyonları hücre içine göre sırasıyla 10 ve 10,000 kat daha fazla olmaktadır. Hücre içi K^+ konsantrasyonu ise hücre dışına oranla 40 kat fazla bulunmaktadır. Primer aktif

transport ile sağlanan Na^+ gradiyenti, $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ve Na^+/H^+ antiporterleri için enerji kaynağını oluşturmaktadır. Bu sekonder aktif transport antiporterleri ile Ca^{2+} ve H^+ iyonlarının hücre dışına çıkması sağlanmaktadır. Hücre membranının K^+ 'a olan geçirgenliği nedeniyle K^+ dağılımı temelde konsantrasyon gradiyenti ile oluşmaktadır³⁵.

İlk dönemde; ekstrasellüler K^+ konsantrasyonu yavaş yavaş yükselmektedir. Aynı dönemde H^+ iyonunun bir membran katyon kanalından kısmen hücre dışına çıkması, hücre içinde birikmeye başlayan laktik asidin noniyonik difüzyon ile kısmen hücreyi terk etmesi ve karbondioksit (CO_2) birikimine bağlı olarak hücre dışı pH'sı düşmektedir. Bu dönemde ekstrasellüler Ca^{2+} henüz azalmaya başlamamıştır³⁵.

İkinci dönemde iyon pompalarının bozulmasına bağlı olarak K^+ hızla hücreyi terk ederken Na^+ , klor (Cl^-) ve Ca^{2+} iyonları hücre içine alınmaktadır. Symon, K^+ atılımındaki artış ile, zaten azalmış hücre enerji düzeylerinin daha fazla iyon dengesini sağlayamayacak düzeylere indiğini ve bu noktanın aynı zamanda ekstrasellüler Ca^{2+} düzeylerinin aniden düştüğü zamana uyduğunu göstermiştir³⁷. Bu, ileri enerji eksikliğinin ve membran depolarizasyonunun görüldüğü dönemdir. Depolarizasyonda pompalar devre dışı kalmaya başladıkları için iyon akışı, iyonların konsantrasyon gradiyenti yönünde basit membran deliklerinden geçişleri ile sağlanmaktadır³⁵.

İyon dengesinin bozulmasının üçüncü aşamasında iyon pompalarının bozulmasının yanısıra hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun yükselmesine bağlı olarak, membran geçirgenliğinin artması ile ortaya çıkan iyon kaçakları oluşmaktadır. İskemi nedeniyle zaten azalmakta olan ATP bu iyon kaçaklarının önlenmesi için daha da fazla kullanılmakta ve bir kısır döngü içinde hızla

tüketilmektedir^{32,35}. İ/R hasarının gelişmesinde son derece önemli olan hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu artışı başlıca üç yoldan gerçekleşmektedir:

I.Hücre dışından Ca^{2+} girişi

II.Hücre içi Ca^{2+} depolarından Ca^{2+} salınımı

III.Hücre içi Ca^{2+} düzeyini kontrol eden mekanizmaların bozulması.

İskemide hücre içi serbest Ca^{2+} konsantrasyonun artışı erken dönemde fosfolipaz, lipaz, lizozomal enzimlerin de dahil olduğu proteazlar ve endonükleaz gibi enzim gruplarının aktivasyonuna neden olmaktadır^{32,34,35,38}. İskemide hücre içinde serbest Ca^{2+} artışı ile birlikte başlıca;

1-Lipoliz 2- Proteoliz 3- DNA hasarı 4- Mitokondrial Elektron Transport Zinciri Hasarı (METZ) görülmektedir.

2.1.3.1 Lipoliz

Fosfolipazlar sitozol, plazma ve mitokondri membranlarında bulunan enzim ailesidir. Fosfolipidlerden fonksiyonel grupları hidrolize ederler. Böylece, membran fosfolipidlerinin lipolizi ile ortamda serbest yağ asitleri (SYA) artmaktadır. Ca^{2+} ile aktive olan fosfolipaz A_2 enziminin, fosfolipidlerin beta pozisyonundan kopardığı araşidonik asid birikimi, SYA'nın reperfüzyon döneminde prostoglandin (Pg) ve lökotrienlere (Lt) metabolizmaları sırasında oluşturdukları serbest radikaller nedeni ile, iskemik hasarın ilerlemesindeki temel etiyolojik faktörlerdendir.

Normal koşullarda mebran fosfolipidleri bir dizi enerji bağımlı reaksiyon ile yenilenmektedir. Bu nedenle intrasellüler SYA konsantrasyonu düşük düzeylerde

tutulmaktadır. İskemide yukarıda sözü edildiği gibi enerji depolarının tükenmesi nedeni ile bu yenilenme gerçekleşmemektedir. Ca^{2+} tetikli membran fosfolipid kaybı büyük olasılıkla membran protein/lipid oranlarının bozulmasına bağlı geçirgenlik artışına neden olarak, iskemik hücreye Ca^{2+} girişini daha da hızlandırmaktadır. Bu oranın intrasellüler organellerde de bozulması birçok hücre fonksiyonuna zarar vermekle birlikte, lipoliz ile artan SYA'nın asıl zararlı etkisi, reperfüzyon kısmında söz edileceği gibi zararlı metabolitlerin özellikle, İ/R hasarının en önemli nedeni olan serbest radikallerin oluşmasına yol açmasıdır^{33,35,39,40,41}. Değişik yazarlara göre biriken SYA reperfüzyonda serbest radikal kaynağı olmalarının yanı sıra iskemi döneminde de serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır^{35,42}. Katsura ve ark.'a göre, derin iskemide SYA konsantrasyonunu artıracak kadar ileri düzeydeki fosfolipid hidrolizi, yaklaşık olarak enerji eksikliğinin membran depolarizasyonunu tetiklediği zamana rastlamaktadır⁴³.

2.1.3.2 Proteoliz

Hücre içi Ca^{2+} düzeyi artışının hücre hasarına yönelik bir diğer önemli sonucu da proteaz aktivasyonudur. Proteaz aktivasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan değişiklikler şunlardır:

a. Ksantin oksidaz (XO) oluşumu: Reperfüzyon döneminde en önemli radikal kaynağı olan XO oluşumu, ksantin dehidrogenazın (XDH) Ca^{2+} ile aktive olan proteazlarca XO'a dönüştürülmesi ile gerçekleşmektedir. XDH-XO dönüşümünün iskemik dokuda gerçekleştiği değişik çalışmalarda gösterilmiştir^{27,33,44,45}. Özellikle mikrovasküler endotelde ve az miktarda da nöron mitokondrisinde bulunmaktadır^{42,45,46}.

b. Nötral proteazların aktivasyonu: Ca^{2+} 'a bağımlı nötral proteazlar

nöroflamanların ve hücre iskeletinin protein içeren bileşenlerinin yıkılmasından, dolayısıyla tübülün bütünlüğünden sorumludur³⁸. Marimato ve ark. 3 saatlik uzun ve 30 dk.lık kısa iskemi sonunda nötral proteaz aşırı aktivasyonu nedeni ile poliribozomların disagregasyonunu, dolayısıyla polipeptid sentezinin durduğunu gözlemlemişlerdir⁴⁷. Poliribozomlar kısa süreli iskemiyeye maruz kalan hayvanlarda normale dönerken, 3 saatlik iskemi dönüşümsüz poliribozom disagregasyonuna neden olmuştur.

c. Lizozomal proteaz aktivasyonu: Lizozomal proteazlar olarak adlandırılan katepsinlerin aktivasyonu ile artan proteolizin özellikle derin ve uzun süreli iskemi ve ardından gelen reperfüzyon sırasında süregelen hücre hasarını hızlandırarak, dönüşümsüz hasar oluşumunda rol oynadığı savunulmaktadır⁴⁸.

2.1.3.3 DNA Hasarı

Endonükleazların aktivasyonu ile gelişen DNA fragmentasyonunun, apoptotik hücre ölümüne benzer bir durum olabileceği öne sürülmektedir^{38,49}.

2.1.3.4 Mitokondrial Elektron Transport Zinciri Hasarı

İntrasellüler Ca^{2+} artışını tamponlayan mekanizmalar arasında bulunan mitokondride Ca^{2+} tutulması, iskemi sırasında mitokondrinin Ca^{2+} ile aşırı yüklenmesine neden olmaktadır. İskeminin ilk dakikalarında O_2 konsantrasyonu düşüklüğüne bağlı olarak durma noktasına gelen hücre solunum fonksiyonları ve ATP sentezi mitokondrideki Ca^{2+} birikimi ile daha da bozulmaktadır. Böylece hücrede ATP eksikliği ile başlayan iskemik kaskatın gelişiminde, intrasellüler Ca^{2+} artışının bir sonucu olarak ATP sentezi giderek azalmakta ve olaylar kısır bir döngü içine girmektedir^{32,35}.

2.1.4 ATP Yıkım Ürünlerinin Birikimi

İskemide enerji eksikliği sonucu gelişen olayların bir diğer sonucu da ATP yıkım ürünlerinin birikmesidir. İskemi süresi uzadıkça intrasellüler metabolik bozulma devam eder. Miyositler içinde gittikçe daha çok SYA birikir ve sonunda diyastolik arrest oluşur. Adenozin, inozin, laktat gibi küçük moleküller hücre dışına kaçarlar. Böylece tekrar ATP üretmek için kullanılabilecek ürün kalmaz. Bir saat sonra nerdeyse tüm glikojen depoları tüketilir. ATP üretimi nerdeyse durma noktasına gelmiştir. Sonuçta otoliz başlar⁵⁰. İskemi sırasında ATP rejenerasyonunun bozulmasına karşın, mevcut ATP'nin hidrolizi sürmektedir. ATP hidrolizi ile ROT prekürsörü hipoksantin, ksantin gibi pürin metabolitleri hücre içinde birikmektedir. Bu metabolitlerin reperfüzyon sırasında ksantin ile reaksiyonları, İ/R hasarından dokuya göre değişen derecelerde sorumlu tutulan serbest radikallerin en önemli kaynağını oluşturmaktadır^{35,45}.

3. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskekiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden düzenlenmesidir. İskemik bir dokunun reperfüzyonu dokunun O₂ ve diğer metabolik ihtiyaçlarını karşılarken paradoksal olarak dokularda hasar oluşturur⁵¹. Reperfüzyon hasarına doku pH'sının azalmasına neden olan laktat benzeri asit metabolitlerin neden olduğu öne sürülmüştür⁵². Ancak yine de İ/R hasarının fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. İ/R hasarında serbest radikallerin oluşumu, polimorf nüveli lökositlerin (PMNL) aktivasyonu, endotel ve kompleman sistemi gibi major komponentlerin rol oynadığı bilinmektedir^{53,54,55}. Bu tablo lokal ve sistemik inflamatuvar cevabın başlamasına yol açarak lokal ve uzak organlarda da hasar oluşturmaktadır.

Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik

metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Böylelikle reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü, dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır^{28,31,51,56}. İskemik bir dokunun yeniden kanlandırılması doku nekrozunu önleme açısından önemli olmasına rağmen, kan akışının yeniden sağlanması ile iskemik dokuda reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır. Kısa iskemik ataklar miyositler tarafından tolere edilirler, belirgin bir hasar oluşmaz. Kısa iskemik periyodlarda kalp kasında, KDU gözlenebildiği gibi uzamış iskemik periyodlarda ise nekroza kadar giden hasar oluşur^{26,57,58}.

İskeminin neden olduğu hasarın önemli bir kısmının reperfüzyon sırasında, post-iskemik dönemde olduğu düşünülmektedir. Geri dönüşsüz hücre hasarını önleyebilmek için organa/dokuya yeniden kan akımının sağlanması gerekmektedir. Ancak reperfüzyonun gerçekleştirilmesi, iskemik dokularda iskeminin dokuda/organda oluşturduğu hasardan daha fazla bir hasara yol açabilmektedir^{59,60}. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir^{30,61}. Esas hasarın, hipoksi döneminde değil dokunun tekrar O₂'le karşılaştığı dönemde olduğu kabul edilmektedir^{52,62}. Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri (SOR), endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. İskemik dokuların reperfüzyonu ile iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak, bir kısım hücre nekroz veya apoptozis ile ölmeye devam eder. Etkilenen dokularda sıklıkla nötrofil infiltrasyonu gözlenir. Postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına çıkması ve lökositlerin hareketliliği başlar. İ/R sonrası dokularda mikrovasküler fonksiyon bozukluğu gelişir. Arteriyollerde endotele bağımlı dilatasyon bozulur. Kapillerlerde lökosit tıkağları oluşur, sıvı filtrasyonu artar⁵⁵.

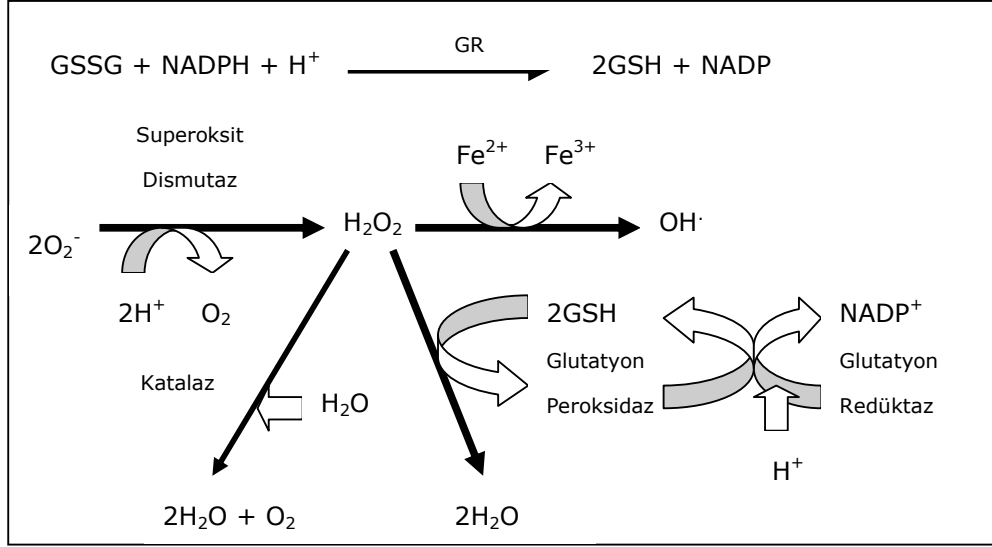
Mikrosirkülasyonun bütün segmentlerinde aktive olan endotel hücreleri daha fazla SOR ve daha az NO üretir. İ/R hasarından SOR sorumlu tutulmaktadır. SOR, bir çok kalp hastalığında oluşur^{63,64}. Günümüzde, SOR yerine daha kapsamlı olarak, ROT tanımı kullanılmaktadır⁵⁵. Reperfüzyonda yüksek miktarda ROT üretilir. Düşük O₂ basıncında meydana gelen ROT'ne bağlı reaksiyonlar, hipokside daha da tehlikeli olur. Hücrede oluşan ROT, "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar. Ancak bazen hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla ROT oluşabilir. Organizmada hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla ROT meydana gelmesi oksidatif stres olarak tanımlanır⁶⁵.

İskemi sonrası reperfüzyon ve hücre içine O₂'in yeniden sunulması ile birlikte ROT hızla oluşmaktadır. İskemi aynı zamanda endotel hücrelerinde bazı proinflamatuvar gen ürünlerinin (LAM, sitokinler vb) ve biyoaktif bileşiklerin (endotelin, tromboksan A₂ vb) sentezini artırırken, bazı koruyucu gen ürünlerinin, eNOS, siklooksijenaz-2 (COX-2) ve bu enzimlerin ürünlerinin (NO, prostasiklin) ekspresyon ve sentezini baskılamaktadır⁵³. Kalp hasarında dolaşımdaki anjiotensin-II, O₂⁻ ve NO'nin arttığı tespit edilmiştir^{60,63,64,66}. Endotelial disfonksiyonundaki ilerlemenin NOS ve O₂⁻ aşırı üretimi ve bunun sonucu olarak da peroksinitrit (ONOO⁻) oluşumunda bir artışla bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür^{63,64,66}. Endotel hücrelerinde O₂⁻ ve NO arasındaki dengesizlik, inflamatuvar mediyatörlerin üretim ve salınımına öncülük ederken adezyon moleküllerinin biyosentezini de artırır^{54,55}.

3.1 Reperfüzyonda Serbest Radikal Üreten Kaynaklar

İskemide gelişen olaylar, temelde reperfüzyonda O₂ ve kan ürünlerinin

Px'dır⁶⁹.



Şekil 2. Oksidan ve Antioksidan Sistemler

Parankimal hücreler, endotel hücreleri ve lökositlerce ROT yapımı artar. Bu arada hasarlı mitokondrilerde O_2 yetersizliği veya alternatif yollardan O_2 'in indirgenmesi ile de ROT oluşabilir. Ortaklanmamış bir elektrona sahip olan ROT yüksek reaktivitesi nedeniyle hücre içindeki tüm biyomoleküllere atak yapar^{55,70,71}. ROT'in etkisiyle oluşan organik peroksitler, kendileri de radikallik özelliği kazandıkları için başka moleküllere atak yaparlar. Organizmada ROT ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. Zincirleme bir şekilde devam eden bu olay, radikallerin tutulması, peroksitlerin ortamdan temizlenmesine dek sürebilir. Oksidan moleküllerin oluşum hızı ile antioksidan savunma arasındaki dengenin bozulması oksidan strese yol açmaktadır^{72,73}.

İ/R'da çok çeşitli hücre, organel ve enzimler serbest radikal kaynağını oluşturmaktadır³⁵. Bu kaynakları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

1. Mitokondrial Elektron Transport Zinciri (METZ) Sızıntısı
2. Vasküler Endotel Kaynaklı XO Aktivasyonu
3. Nötrofillerin Aktivasyonu
4. Plazma ve organel membranları
5. Komplemanlar ve Sitokinler
6. Nitrik oksit sentaz (NOS) aktivasyonu

3.1.1 Mitokondrial Elektron Transport Zinciri Sızıntısı

Normalde hücrelerde en büyük ROT kaynağı METZ'den sızıntıdır. Normal koşullarda METZ'de O_2 'in kısmi indirgenmesi ile oluşan serbest radikallerin %1-5 olduğu belirtilmiştir. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal $O_2^{\cdot-}$ üretimi artar. Reperfüzyonda gelen ani ve yüksek konsantrasyondaki O_2 'in iskemi sırasında birikmiş indirgen maddeler (NADH, $FADH_2$) ile kısmi indirgenmesi sonucunda, serbest radikal iletimi ve O_2 kaçağındaki fizyolojik oran artmaktadır^{35,74}. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır.

3.1.2 Vasküler Endotel Kaynaklı Ksantin Oksidaz Aktivasyonu

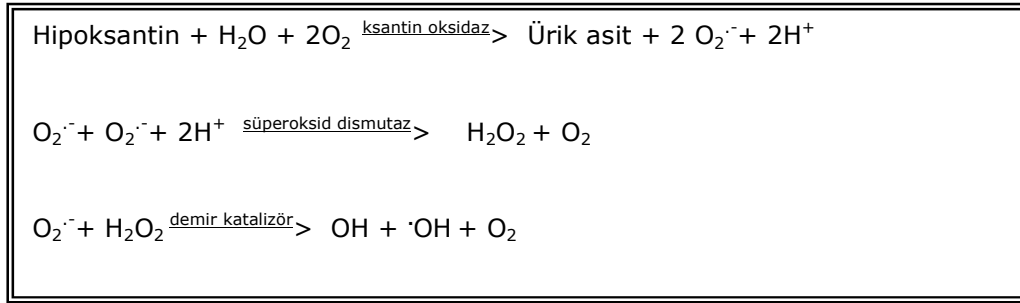
Post iskemik dönemde, iskemik dokudaki serbest radikallerin en belirgin kaynağı XO enzimidir. Bu enzim "dehidrojenaz" ve "oksidaz" aktivitesine sahip iki şekilde bulunur. Çalışmalarda iskemi sırasında XDH enziminin Ca^{2+} aracılı bir proteaz katalizörlüğünde XO'a dönüşmesi, intestinal dokuda 10 sn., kalp kasında 8 dk., karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde 30 dk. sürmektedir. Bu da değişik

dokuların İ/R hasarına neden farklı oranlarda cevap verdiği konusunda açıklayıcı olmaktadır. Birçok organın İ/R hasarının oluşum mekanizmasında XO enziminin aktivitesinin artması önemli yer tutmaktadır. Bunun doğal bir sonucu olarak pürin bazlarının yıkımı artmaktadır^{75,76}. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar^{28,35,61,77}(Şekil 1).

İskemi döneminde Ca^{2+} bağımlı proteazlarca veya sülfidril gruplarının oksidasyonu ile XDH'nin, XO'a dönüşmesi sonucunda dokuda XO oranı %10 luk fizyolojik oranın üzerine çıkmaktadır^{75,78,79}. XDH ve XO aynı tepkimeyi katalizlemekle beraber XDH kataliz sonucu $O_2^{\cdot-}$ üretmez, ama XO üretir. O_2 kaynağı yeterli olmadığı için iskemik ortamda $O_2^{\cdot-}$ azdır. Ayrıca iskemi sırasında ATP düzeyleri azalır, adenosin monofosfat (AMP) düzeyleri artar. AMP katabolize olarak adenosin, inozin ve hipoksantin oluşumunu sağlar. Hipoksantin ve ksantin de, XO enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla $O_2^{\cdot-}$ oluşturur (şekil 1). XO, iskemik dokuda serbest radikal oluşumu sürecinde temel role sahiptir. Ayrıca, postiskemik reperfüzyon hasarında önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir⁸⁰. Reperfüzyon ile O_2 'in ani ve fazla miktarda dokuya girmesi sonucu XO reaksiyonu ile ürik asit, yan ürün olarak da $O_2^{\cdot-}$ oluşmaktadır⁸¹(Şekil 3). Ayrıca reperfüzyon ile birlikte aşırı ATP harcanması sonucu biriken pürin nükleotidlerinin XO enzimiyle ürik aside çevrilmesi aşamasında patlama tarzında $O_2^{\cdot-}$ üretimi olur. Bu olay reperfüzyonun neden ilgili organda iskemik şartlardan daha ağır hasar oluşturabildiğinin bir kanıtıdır⁷⁹.Oluşan $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve $\cdot OH$ 'ni oluşturmaktadır (Şekil 3).

Dhalla ve ark. kalp İ/R hasarında ROT'nin rolünü ve lipid peroksidasyonunun oluşumu ile doku hasarına yol açma mekanizmasını açıklamışlardır⁶⁹. Uzun süreli iskemi ile kısa süreli iskeminin kalp dokusu üzerine olan hasarlarının patofizyolojileri farklılık gösterebilmektedir^{82,83}. Kısa süreli kalp

İ/R'u sonrası ölümler sıklıkla aritmiler ile olmaktadır^{78,83}. Bu aritmilerin oluşum mekanizmalarında pürin yıkımının etkinliğinin farklı cinslerde farklılık gösterdiği rapor edilmiştir⁸⁴. İskemi sonrası XO enziminin katalizi ile ROT'nin hızlı bir şekilde üretilmesi ve bunun sonucu ortaya çıkan reaksiyonlar zincirinin ilk basamağının göstergesi sayılabilen ATP yıkımı bir çok organ ve dokuda saptanmıştır⁸⁵.



Şekil 3. Reaktif Oksijen Türleri

3.1.2.1 Reaktif Oksijen Türleri

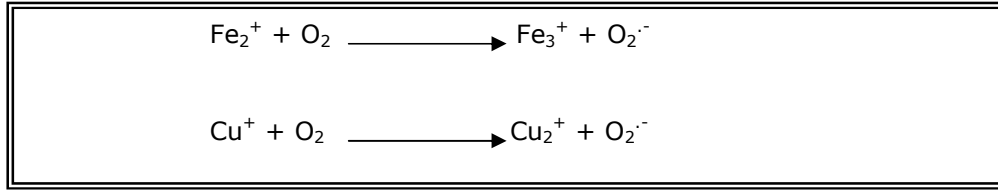
Moleküler O_2 iki tane eşleşmemiş elektronu olan radikal bir moleküldür. Moleküler O_2 'in indirgenmesi ve uyarılması ile çok değişik ROT üretilebilirler^{28,29,77} (Tablo 3). İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında gerçekleşen reoksijenasyon bir yandan canlılığın devamını sağlarken diğer yandan da reaktif oksidanların oluşumuna yol açan sayısız enzimatik oksidasyon reaksiyonu için substrat olarak gerekli olan O_2 'i ortama getirmektedir. Biyolojik sistemlerle ilişkili O_2 türevli serbest radikallerin başlıcaları şunlardır;

1. Süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$)
2. Peroksil radikali ($\text{HO}_2^{\cdot}$)
3. Hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$)

Süperoksit radikali

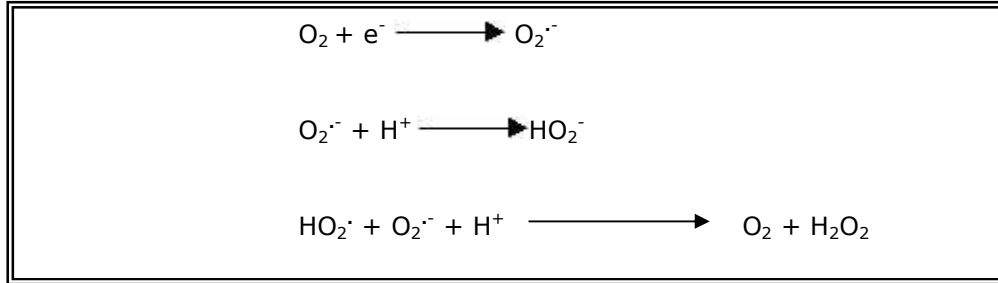
Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) hemen tüm aerobik hücrelerde O_2 'nin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu

sırasında oluşur. $O_2^{\cdot-}$, O_2 'ne bir elektron ilavesi ile oluşur ve spontan olarak dismutasyona uğrayarak ya da SOD enzimi tarafından H_2O_2 'e dönüştürülür. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu $O_2^{\cdot-}$ meydana getirebilir⁶⁵ (Şekil 4).



Şekil 4. Metallerin Otooksidasyonu

$O_2^{\cdot-}$ kendisi direkt olarak zarar vermez. Dokularda yaptığı etkinin çoğunu, oluşturduğu sekonder ROT aracılığı ile gerçekleştirir. Bu radikal anyonun asıl önemi, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. $O_2^{\cdot-}$ düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, $HO_2^{\cdot}$ oluşturmak üzere protonlanır⁶⁵ (Şekil 5).



Şekil 5. Süperoksit Radikali

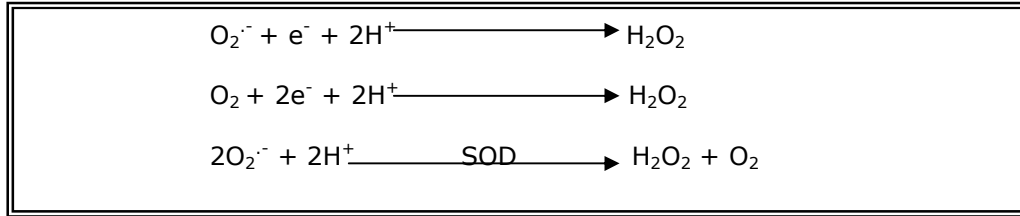
$O_2^{\cdot-}$ ile $HO_2^{\cdot}$ birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda O_2 ve H_2O_2 meydana gelir⁶⁵ (Şekil 5).

$O_2^{\cdot-}$ nin fizyolojik bir serbest radikal olan NO ile birleşmesi sonucu bir ROT olan peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelir. $ONOO^-$, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. $ONOO^-$, azot dioksit ($NO_2\bullet$), hidroksil radikali

(OH•), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki NO'nun zararlı etkilerinden ONOO^- sorumludur⁶⁵.

Hidrojen peroksit

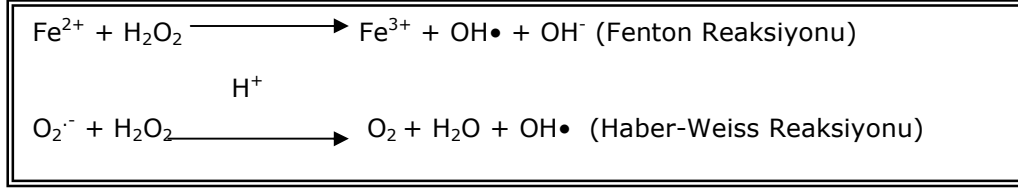
H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'in çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya O_2 'in çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir⁶⁵ (Şekil 6).



Şekil 6. Hidrojen Peroksit Oluşumu

Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl üretimi, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu ile olur. İki $\text{O}_2^{\cdot-}$ molekülü, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak H_2O_2 ve O_2 'i oluştururlar. Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir (Şekil 3 ve 6). Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir⁶⁵.

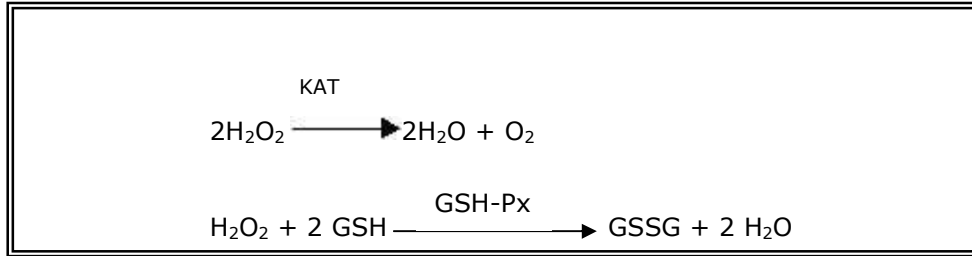
H_2O_2 serbest radikal olmadığı halde ROT kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü ferröz demir (Fe^{2+}) veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, $\text{O}_2^{\cdot-}$ varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici ROT olan OH• oluşturur⁶⁵ (Şekil 7).



Şekil 7. Hidrojen Peroksit Tepkimeleri

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 'in lipid çözünürlüğü sınırlı olduğu halde H_2O_2 lipid çözünürdür. Bu nedenle H_2O_2 kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturabilir. H_2O_2 'in hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir;

1. H_2O_2 , KAT veya GSH-Px tarafından toksik olmayan ürünlere dönüştürülür (Şekil 8).
2. H_2O_2 , metallerin varlığında toksik $\text{OH}\bullet$ radikaline dönüşür (Fenton reaksiyonu) (Şekil 7).



Şekil 8. Hidrojen Peroksit Detoksifikasyonu

Okside glutatyon (GSSG) da nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında glutatyon redüktaz (GR) ile redükte glutatyona (GSH) dönüştürülür.

Hidroksil radikali

Hidroksil radikali ($\text{OH}\bullet$), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu H_2O_2 'ten oluşmaktadır (Şekil 7). Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici

radasyona maruz kalması sonucu da oluşur⁶⁵.

OH• son derece reaktif bir oksidan radikaldır, yarılanma ömrü çok kısadır. Diğerleriyle karşılaştırılığında O₂⁻ radikali yüksek elektron aktivitesine sahiptir ve çok reaktiftir. Ancak ROT'den en aktif olanı OH• radikalidir^{28,77}. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS•), karbon merkezli organik radikaller (R•), organik peroksitler (RCOO•) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur. Bu radikaller hücrede lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarını başlatırlar³⁵.

İskemik dokularda, ROT üreten intraselüler mekanizmalar tam aktive edilmiş durumdadır. Ancak O₂ sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyon görmezler. Kan akımı ve O₂ sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlardaki ROT üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir²⁹.

3.1.3 Lökosit Aktivasyonu

Nötrofil infiltrasyonunun, barsak, kalp, beyin, karaciğer ve böbrek gibi birçok organda İ/R hasarının oluşumunda anahtar role sahip olduğu düşünülmektedir^{86,87}. İ/R, lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adezyonuna yol açar. PMNL de, endotel hücreleri gibi ROT üretme kapasitesine sahiptir⁵⁵. İ/R hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar;

1. Mikrovasküler oklüzyon
2. ROT salınması
3. Sitotoksik enzim salınması
4. Vasküler permeabilite artışı

5. Sitokin salınımında artıştır.

Reperfüzyon hasarının önemli bir nedeni de, iskemik bölgeye lökositlerin, öncelikle de PMNL olan nötrofillerin infiltrasyonudur. Bilindiği gibi nötrofiller fagositoz olayı ile canlıyı enfeksiyöz ajanlardan koruyan kan hücreleridir³⁹. İskemik dokuda, serbest radikaller de dahil olmak üzere diğer bazı kemotaktanların etkisi ile göç eden nötrofiller, aşağıdaki mekanizmalar ile reperfüzyonda doku hasarının ilerlemesine yol açmaktadırlar:

1)Salgıladıkları proteazlar (elastaz, jeletinaz vb.) ile endotel hücre hasarına neden olurlar.

2)Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akışının geri dönmemesi fenomenine (no reflow phenomen), aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı ve nötrofillerin kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmesine engel olan kapiller tıkaçları oluşturduğu bildirilmiştir⁸⁸.

3)Salgıladıkları vazokonstriktör ajanlar ve trombosit aktive edici faktör (PAF) ile daha büyük damarlarda da (arteriyol, prekapiller damarlar) daralmaya neden olmaktadır.

İ/R'nun yol açtığı mikrovasküler hasar için nötrofil ve endotelial hücre ilişkisi gerekmektedir. İskemi sırasında ve daha ağırlıklı olarak bunu takip eden reperfüzyon döneminde postkapiller venüllerde endotele artmış nötrofil adezyonu görülür ki bunun İ/R'a bağlı disfonksiyonda önemli rolü vardır. PAF, lökotrien B₄ (LB₄) ve ROT bu durumun en muhtemel kimyasal mediatörleridir^{28,89}.

Nötrofil kemotaksisine neden olan en önemli etken, XO reaksiyonu sırasında ortaya çıkan O₂^{-•}'dir³⁸. Reoksijenasyon ile aktive olan ve lökosit

akümülyasyonunda görev üstlenen diğler ajanlar ise, kompleman 5a (C5a) kompleman 3a (C3a), araşidonik asid metabolitleri, özellikle LB₄, NO, PAF, interlökin-1,6,8 (IL-1,6,8), gama interferon ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) gibi sitokinlerdir^{35,38,44}. Nötrofiller araşidonik asid metaboliti olan LB₄ salgılayarak, O₂⁻ üretimine ve nötrofillerin kemotaksisine neden olmaktadır. Böylece bir geri beslenme mekanizması ile toplanmış olan nötrofillerden salgılanan kemotaktik faktörler yeniden serbest radikal üretimine ve nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır⁹⁰. Hartmann ve ark. nötrofillerce üretilen O₂⁻, eritrositlerin agregasyonunu da hızlandırdığını ve bu etkinin nötrofil agregasyonu ile birlikte kapiller tıkanmayı daha arttırıcı olabileceğini savunmuşlardır⁴⁶. İ/R, NOS enzimlerinin inhibisyonu, ROT üreten sistemler, NO azlığına neden olarak lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasına ve dokuya geçişine neden olurlar.

PMNL'in aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerde ve lökositlerde bulunan adezyon molekülleri aracılığı ile olur. Lökosit adezyon molekülleri (LAM) lökositlerde ve diğler başka hücrelerde de bulunan ve gelişme, haberleşme, inflamasyon ve apoptozis gibi pek çok biyolojik olaylarda rol alan yapılardır. Selektin grubu adezyon molekülleri, doku hasarı olan bölgede aktive olmuş endotele, PMNL'lerin başlangıçtaki adezyonunda rol alırlar. Aktive lökositler ekstravasküler kompartmana ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar⁵⁵. Burada aktive lökosit cevabı şu mekanizmalarca gerçekleştirilir;

1. Fosfolipaz A₂ aktivasyonu sonucu araşidonik asid metabolitleri (Pg ve Lt'ler) üretilir,
2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır,
3. ROT üretimi gerçekleşir.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü mediyatörleridir

ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirir. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilue etmeye yönelik bu inflamatuvar cevap sonucu mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve lenfatik dolaşım ile ortamdan uzaklaştırılırlar⁵⁵.

3.1.4 Plazma ve organel membranlarından kaynaklanan faktörler

Vasküler endotelial çeper pek çok lokal hormon ve otakoid salgılayarak vasküler düz kas tonusunu düzenler²⁸. İyon ve organik moleküllere geçirgenlikte bariyer oluşturması, Pg'lerin dolaşımdan kısmen uzaklaştırılması, akciğerlerde Anjiotensin I'ın Anjiotensin II'ye dönüştürülmesi ve koagülasyondaki rolü, endotel hücresinin bilinen klasik görevlerindendir. Endotel hücrelerin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir, LAM'nin üretimi artar. ROT etkisi ile endotelden salınan PAF lökositleri aktive eder. Lökosit endotel hücre etkileşimi sonucu lökositler endotele yapışır ve transmigrasyon gerçekleşir⁵⁵.

3.1.4.1 Araşidonik Asit Metabolitleri

a)-Prostasiklin (PGI₂): Endotel hücrelerinden serbestlenen ilk vazoaktif ajan olan PGI₂ endotelial yüzeylerde trombosit agregasyonunu önleyen güçlü bir vazodilatatördür.

b)-Tromboksan A₂ (TxA₂): Araşidonik asitten siklooksijenaz yardımı ile oluşan TxA₂ trombositleri agrege eder ve vazokonstriktör etkisi vardır. Reperfüzyon, Pg üretiminin en potent uyarandır. TxA₂, İ/R'da endotelyuma nötrofil adezyonunu indükleyen güçlü bir kemotaktik maddedir.

c)-Lökotrien B₄ : Lökotrienler, İ/R boyunca endotelial disfonksiyonda önemli rol

oynayan ve lipooksijenaz yoluyla oluşan araşidonik asit metabolitleridir. LB₄ nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır. LAM'nin aktivasyonunu, endotelial hücrelere yapışmayı, ROT'nin ve proteazların üretimini sağlar. Üç saatlik iskemi periyodu mukozal LB₄ seviyelerini değiştirmezen, reperfüzyonun izlediği aynı süreli iskemi mukozal LB₄ seviyelerinde %200 ila 600 oranında artışa yol açmaktadır^{51,55}.

İskemi sırasında membran fosfolipidlerinin artmış lipolizi ile biriken araşidonik asidin reperfüzyonda hızlanmış metabolizması sonucu HO₂[•] ve O₂^{•-} oluşmaktadır^{35,91,92}.

3.1.4.2 Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)

Fosfolipaz A₂'nin etkisiyle endotel hücreleri tarafından membran fosfolipidlerinden üretilir. Çok çeşitli inflamatuvar reaksiyonda etkin olduğu gözlenen bir substrattır^{28,51,94}. Trombositlerin şekil değişikliğine, agregasyonuna, ve granül içeriğinin salınmasına yol açan oldukça kuvvetli bir ajandır. Ek olarak PAF kuvvetli bir nötrofil kemoatraktan ve aktivatör bir maddedir ve TNF- α üretiminde önemli bir rol oynar. Dokuların reperfüzyonu sonucu lökositlerin aktivasyonuna, adezyon ve diapedezine ve aynı zamanda vasküler permeabilitede artışa yol açar. Pek çok çalışma PAF'ın in vitro ve in vivo ortamda lökositlerin mikrovasküler endotele adezyonunu arttırdığını göstermiştir. PAF'ın, reperfüzyon sonucu gerçekleşen kemotaksisin bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir^{28,29,95}.

3.1.5 Komplemanlar ve Sitokinler

3.1.5.1 Komplemanlar

İ/R kompleman sistemini aktive eder. Kompleman aktivasyonunun başlangıç dönemi ve mekanizması halen tartışmalıdır ve tam olarak açıklığa

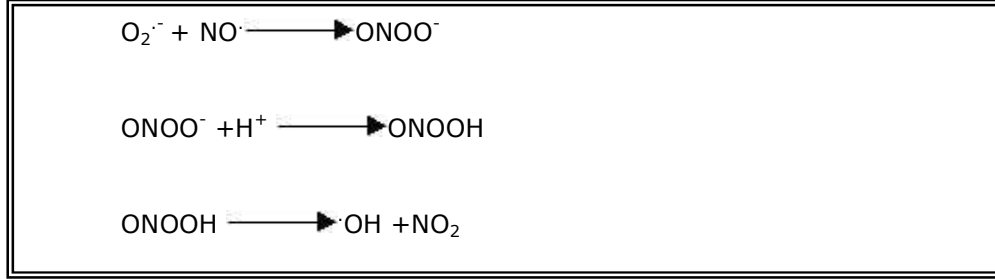
kavuşmamıştır. Kompleman aktivasyonu sonucu oluşan, proinflamatuvar komponentler bir yandan lökositleri aktive ederken, diğer yandan TNF- α , IL-1 ve IL-6 oluşumunu uyararak inflamatuvar cevabı güçlendirir. Komplemanların arka arkaya aktivasyonu, anafatoksin, C3a ve C5a'nın üretimine yol açar. Nötrofiller üzerindeki etkileri ise kemotaksis, endotele adezyonun artışı, ROT'nin üretim ve salınmasını sağlamaktır^{28,29}.

3.1.5.2 Sitokinler

Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler gözlenir. Bu ajanlara karşı antagonistler kullanılarak, hem IL-1'in hem de TNF- α 'nın vasküler yaralanmaya katkıda bulundukları ve endotel adezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir^{28,29}. İ/R'da sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin direkt mi yoksa hücre adezyon molekülleri ve nötrofil adezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir⁸⁹.

3.1.6 Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Aracılı Serbest Radikal Oluşumu

OH• oluşumu için bir diğer yol ise O₂⁻ in NOS aracılığı ile sürekli oluşan ve bir gaz radikal olan NO• ile girdiği reaksiyondur. Bu reaksiyon ürünü ONOO⁻ 'dir^{35,96} (Şekil 9). Son derece hızlı gerçekleşen bu reaksiyonda ONOO⁻ oluşum hızı 6.7X10⁻⁹ L. mol⁻¹.s⁻¹ olup difüzyon sınırlıdır⁹⁷. Fizyolojik pH'da ONOO⁻ derhal OH• ve NO₂•'e parçalanır (Şekil 9). Çok güçlü bir prooksidan olan ONOO⁻, SOD ile reaksiyona girerek güçlü bir nitratlayıcı ajan oluşturur. Sonuçta hücrel proteinlerin tirozin (Tyr) kalıntılarının nitratlanması hücrel disfonksiyon ve ölüme yol açabilir^{35,98,99}.



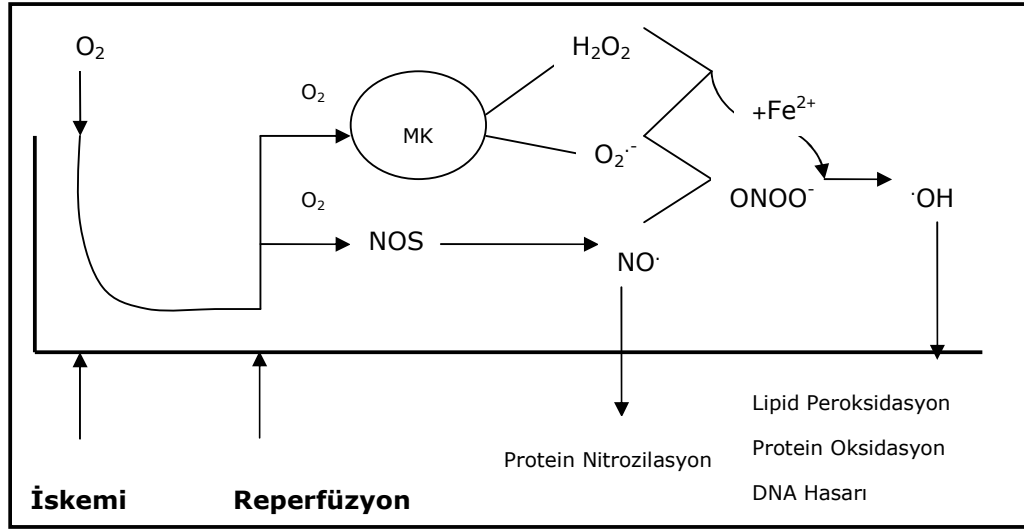
Şekil 9. Peroksinitrit Tepkimeleri

3.2 Reperfüzyon Hasarı

Reperfüzyon sırasında hücresel hasar oluşumunda özellikle iki reaksiyon önemlidir; lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu.

3.2.1 Lipid Peroksidasyonu

Hücre zarı hasarı ve sonucunda lipid peroksidasyon ürünlerinin açığa çıkması için uzun süreli bir iskemi gerekmektedir (Şekil 10). Oksidatif stresin membran üzerine olan etkisinin iskeminin süresi ile ilgili olduğu bilinmektedir^{84,100}. İ/R sonrası doku hasarında lipid peroksidasyonunun rolü bir çok organa ait çalışmada bildirilmiştir¹⁰⁰. Kalp İ/R hasarında bu mekanizma ile ilgili değişik spekülasyonlar mevcuttur. Bu spekülasyonların temelinde ROT'nin yer aldığı görülmektedir⁶⁹ (Şekil 10). Serbest radikal süpürücüleri reperfüzyon süresince OH• ile indüklenen elektrofizyolojik değişiklikleri geciktirirler. Reperfüzyon uygulanan sıçan kalbinde reperfüzyonu takiben 20 sn. içinde ROT oluşurken, lipid peroksidasyonunun 10 dk. içinde olduğu rapor edilmiştir. Serbest radikallerin açığa çıkmasından çok uzun süre sonra membran hasarı ortaya çıkar^{69,101}. ROT aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonu, hücre membran hasarının önemli bir nedenidir, membran geçirgenliğini etkileyerek hücre içinde aşırı Ca⁺² birikmesine yol açar^{102,103}. Hücre membran disfonksiyonu da, hücre şişmesi ve hücre ölümü ile sonuçlanır.



Şekil 10. I/R'da Lipid Peroksidasyonu

Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni, artan serbest radikallerin nöronal hücre, plazma ve organel membranları, vasküler endotel hücre membranı ve myelinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur. Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizması şeklinde gelişen lipid peroksidasyonu sırasında, çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA) yan zincirlerinde yeniden düzenlenme söz konusudur⁴¹. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri ÇDYA'dır. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Lipid peroksidasyonu, ortamda ÇDYA, O_2 ve metal katalizörler bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipid peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlaması bakımından çok uygundur^{35,41}.

Oluşan fonksiyonel hasarlar şunlardır:

A) Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranında akışkanlığın azalması, membran geçirgenliğinin değişmesi, membran potansiyeli azalması, membrana bağlı enzimlerde (Örn: Na^+-K^+ATPaz) aktivite azalması^{35,104}.

B) Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin (mitokondrial matriks enzimleri, lizozomal enzimler gibi) hücre içine salınması. Normal koşullarda lizozomlar içinde güvenli bir şekilde tutulan lizozomal proteolitik enzimlerin sitoplazmaya salınmaları ile hücre içi proteolizin hızlanması ve doku hasarının şiddetlenmesi^{35,97}.

3.2.2 Protein Oksidasyonu

Proteinler serbest radikallere karşı ÇDYA'den daha az hassastırlar. Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin, özellikle duyarlı amino asitler ile direkt etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur³⁵.

Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir⁹³. Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin ROT üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin O_2^- veya H_2O_2 'le reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur⁶⁵.

ROT, aminoasit yan zincirleri oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein yapısında, ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel

önemi olan enzimlerde bozulmalar ortaya çıkar. ROT ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metionin sülfokside, histidin oksihistidine veya asparagine, tirozin ditirozine ve sistein disüflitlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir^{36,77}. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle ROT'nin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücre ve membran fonksiyonları bozulmaktadır³⁹. Protein yapılarındaki hasarın gösterilmesi için, protein karbonillerinin belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir göstergedir. Son yıllarda protein bağlı okside amino asitlerin; özellikle aromatik ve sülfidril içeren kalıntıların analizi yapılmaktadır¹⁰⁵. Bunun yanı sıra İ/R sürecinde hücre içi antioksidan enzimlerin oksidasyonları da bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmanın nedenlerinden birini oluşturabilmektedir^{35,106}.

3.2.3 DNA Hasarı

ROT'nin, hücrede saldırdığı bir diğer önemli makromolekül nükleik asitlerdir. DNA'nın temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazları ROT'nin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. OH•, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır^{35,39,107}. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂ membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir¹⁰⁸.

3.2.4 Kovalen bağlanma:

Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, ve nitrozaminler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalen bağlanmasına

neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir¹⁰⁸.

3.2.5 Kalsiyum:

Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Ca^{2+} 'un transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Ca^{2+} ATPaz enzimleri önemli sülfidril gruplarına sahiptir ve ROT tarafından inaktive edilebilir³¹.

4. Antioksidan Savunma Sistemleri

ROT'nin ciddi hasar yapma potansiyellerine karşı hücreler, bu toksik ürünleri hızla metabolize edecek savunmaları geliştirmişlerdir. Organizmada devamlı olarak ROT oluşmasına rağmen antioksidan savunma sistemleri ile oksidasyon arasındaki dinamik dengeden dolayı zararlı etkiler ortaya çıkmaz. Fizyolojik veya patolojik olaylar sonucu bu dengenin oksidasyon lehine değişmesi durumunda oksidatif hasar gelişebilmektedir³¹.

4.1 Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidan enzimler ve enzim olmayan endojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar.

4.1.1 Antioksidan enzimler:

Antioksidan enzimler, serbest radikalleri, biyolojik önemi olan moleküllerle etkileşmeden önce daha zararsız bileşiklere dönüştürerek veya başka moleküllerden radikal üretimini engelleyerek etkilerini gösterirler^{36,77}. Başlıca antioksidan enzimler şunlardır; 1) SOD 2) GSH-Px 3) Glutasyon S-Transferazlar (GST) 4) KAT 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi 6) Hidroperoksidaz

4.1.2 Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar:

Savunmanın bu ikinci hattındaki bir diğer yöntem Fenton reaksiyonu sonucu OH• oluşumunu engellemek amacıyla redoks aktif metallerin (bakır, demir gibi) transport ve depo proteinlerine bağlanarak ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Demirin transferrine bağlanarak taşınması veya ferritine bağlanarak depo edilmesi buna örnek verilebilir. Başlıca endojen antioksidanlar; 1) Melatonin. 2) Seruloplazmin. 3) Transferrin. 4) Miyogloblin. 5) Hemogloblin. 6) Ferritin. 7) Bilirubin. 8) Glutasyon. 9) Sistein. 10) Metionin. 11) Ürat. 12) Laktoferrin. 13) Albümin.

4.1.2.1 Glutasyon

Glutasyon (GSH) karaciğerde sentezlenebilen bir tripeptittir. GSH çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur^{109,110}. Hemogloblinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. Hipoksik koşullarda kan ve doku GSH düzeylerinin azaldığı, lipid peroksidasyon ürünlerinin ise arttığı bildirilmektedir^{111,112,113}.

4.1.3 Serbest Radikal Toplayıcılar

Vitamin E, vitamin C, β-karoten, ürik asit, bilirubin, albümin bu gruptandır ve sekonder antioksidanlar olarak bilinir. Bunlar serbest radikalleri yakalayarak oluşabilecek zincir reaksiyonlarını engeller^{36,77}.

4.1.4 Nötrofil İnhibitörleri

PAF antagonistleri ve 5-lipooksijenaz inhibitörleri kemotaksisi inhibe ederken, Transforming Growth Faktör nötrofillerin endotele yapışmasını ve adenosin reseptör mekanizması yoluyla aktive nötrofillerden serbest radikal üretimini inhibe eder³¹.

4.1.5 Serbest Radikal Üretimi İnhibitörleri

Allopurinol ve desferroksamin bu gruptandır.

4.2 Ekzojen Antioksidanlar

a-tokoferol, propranolol, Ca kanal blokerleri bu grup ajanlardır.

5. Laboratuvar Teknikleri

5.1 Ölçüm Yöntemleri

Kalpde I/R'da oluşan etkileri incelemek için çeşitli hemodinamik ve biyokimyasal yöntemler mevcuttur.

5.1.1 Serbest Radikallerin Ölçümü

Serbest radikaller son derece reaktif ve kısa ömürlüdürler. Bu yüzden direkt olarak ölçülmeleri zordur. Serbest radikalleri direkt olarak ölçen tek analitik teknik spin rezonans spektrofotometredir. Spin rezonans spektrometre ileri teknik donanım gerektirir, ayrıca çok duyarlı olmaması ve mikromolar düzeyde sabit konsantrasyonlarda serbest radikaller gerektirmesi nedeniyle kullanımı yaygın değildir⁶⁵. Serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için bunların lipidlerle, proteinlerle ve DNA ile reaksiyonları sonucu oluşan çeşitli ürünlerin ölçümü gibi indirekt yöntemler kullanılır. Bu yöntemler arasında lipid

peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçümü en çok kullanılan yöntemdir⁶⁵.

5.1.2 Lipid Peroksidasyon Ürünlerinin Ölçülmesi

ROT'ın başlattığı lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu sonucunda lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler oluşur. LOOH ve konjuge dienler de daha sonra alkan aldehitler, alken aldehitler, hidroksialken aldehitler, MDA ve uçucu hidrokarbonlar oluşturmak üzere parçalanırlar⁶⁵.

Serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için LOOH ölçümü, konjuge dienlerin ölçümü, MDA dışındaki aldehitlerin ölçümü, uçucu hidrokarbonların ölçümü, lipid peroksidasyonu fluoresan ürünlerinin ölçümü ve MDA ölçümü yapılabilir. Her bir tekniğin kendine göre zorlukları vardır ve hiçbir metodun lipid peroksidasyonunu tam bir doğrulukta ölçtüğü söylenemez. Ayrıca, oluşan ürünlerin miktarı çeşitli faktörlerden etkilenebildiğinden bir tek ürün yerine birden fazla ürünü ölçmek idealdir⁶⁵.

5.1.3 Perfüzat MDA Tayini

MDA ölçümü lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvuru olan testtir. MDA ölçümü en yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle yapılır. Bazı deneysel sistemlerde TBA yönteminin esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir. Ancak çoğu sistemde bu test MDA için spesifik olmadığından tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddelerin (thiobarbituric acid reactive substances) TBARS ölçümü şeklinde ifade edilir. Saf lipidlerle yapılan çalışmalar ve hayvanlar üzerinde yapılan denemeler, TBARS ölçümü ile lipid peroksidasyonunu ölçen diğer metotlar arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir⁶⁵.

TBARS ölçümü çok basit ve hızlı olmakla birlikte biyolojik materyallere uygulanmasında çeşitli problemler vardır. Numunede mevcut ya da reaksiyon sırasında açığa çıkan pigmentler kolorimetrik ölçümü bozabilirler. Ayrıca MDA dışındaki aldehitler de TBA ile renkli kompleks oluşturmak üzere reaksiyona girebilirler. Serbest MDA'nın direkt tayini en güvenilir şekilde yüksek performans likit kromatografisi (HPLC) yöntemiyle yapılır. HPLC çok hassas ve hızlı bir metottur ve az numune gerektirir. Fakat teknik çok dikkatli numune hazırlığı gerektirir.

5.2 Kardiyak İskemi Reperfüzyon Teknikleri

İ/R sonucu oluşan KDU'dan nekroza kadar giden hasarı incelemek için değişik deneysel düzenekler kullanılmaktadır. Deneysel olarak çalışılan konular; KDU, kronik kontraktıl disfonksiyon, önkoşullama ve reperfüzyon aritmleridir^{26,57,58}. KDU ile ilgili çok farklı deney düzenekleri araştırmalarda kullanılmaktadır. Deneysel seviyede gözlemler kabaca 6 kategoride gruplanabilir;

- 1) Orijinal olarak Heyndrickx ve ark. tarafından tanımlanan tek ve tamamıyla tersinir in-vivo iskemiye takiben oluşan KDU (Ör; köpeklerde < 20 dk koroner oklüzyon)
- 2) İn-vivo, tamamıyla tersinir lokal çoklu iskemi periyodlarını takiben oluşan KDU (Ör; köpekte tekrarlayıcı 5-10 dk koroner oklüzyonu takiben)
- 3) Kısmen reversibl (nekrozsuz), kısmen irreversibl (bazı sahalarda nekrozlu) in-vivo lokal iskemi epizodlarını takiben oluşan KDU (Ör; köpeklerde >20 dk- < 3 saat koroner oklüzyon). Bu kategori, trombolizis tedavisi alan veya anjioplasti geçiren akut miyokard enfarktüslü hastaların durumunu temsil eder ve kurtarılmış dokuların fonksiyonunu, gecikmiş iyileşmesini gösterir.
- 4) İn-vitro global iskemi sonrası KDU (Ör; izole kalp preparatları)

5) İn-vivo global iskemiye takiben KDU (Ör; kardiyoplejik arrest)

6) Egzersize bağlı iskemi sonrası KDU (Ör; yüksek akımlı iskemi)

6. Endotelin-1

Endotelin-1 potent vazokonstriktör etkili polipeptiddir. Sürekli bir vazokonstriksiyona yol açar. Kalpte pozitif inotrop, pozitif kronotrop etkilidir, aksiyon potansiyeli süresini uzatır. Damar düz kaslarındaki endotelde yapılan parakrin ve otokrin etki gösteren, 21 aminoasitli, bilinen en potent vazokonstriktör polipeptiddir. Endotelin dolaşımda çok küçük konsantrasyonda (nanomolar/ pikomolar) bulunur^{114,115}. Endotelin sadece endotelde değil; beyin, böbrek ve bazı hücrelerde de sentez edilmektedir. Endotelin ilk olarak 1988 yılında Yanagisawa ve ark. tarafından idendifiye edilmiştir¹¹⁶. Üç farklı endotelin geni tarafından (farklı kromozomlarla) kodlanmaktadır; Endotelin-1 (ET-1), Endotelin-2 (ET-2), Endotelin-3 (ET-3)²⁰. Preproendotelin önce big endoteline (inaktif prekürsör) dönüşür. Endotelin konverting enzim (ECE-1) big endotelini endoteline çevirir (Şekil 11).

Endotelden salınan ET-1 kuvvetli vazokonstriktördür ve NO ile etkileşim halindedir^{12,116}. Dolaşımdaki ET-1 çok kısa yarı ömürlüdür (4-7 dakika). Plazma, akciğer ve böbrekte endopeptidazlar tarafından parçalanır. Preproendotelin mRNA'nın yarı ömrü ise 15 dk.dır, bunun için vazomotor tonusun ayarlanmasında hızlı ET yapımı sağlanır. ET-2 ise esas olarak böbrek ve barsakta, ET-3 ise nöronal hücrelerde ve beyinde yapılır²⁰. Endotelin hidrofilik olduğundan plazma membranını geçemez. Etkisini spesifik reseptörleri vasıtası ile gösterir. Başlıca iki reseptörü vardır. Endotelin A (ET-A) ve endotelin B (ET-B).

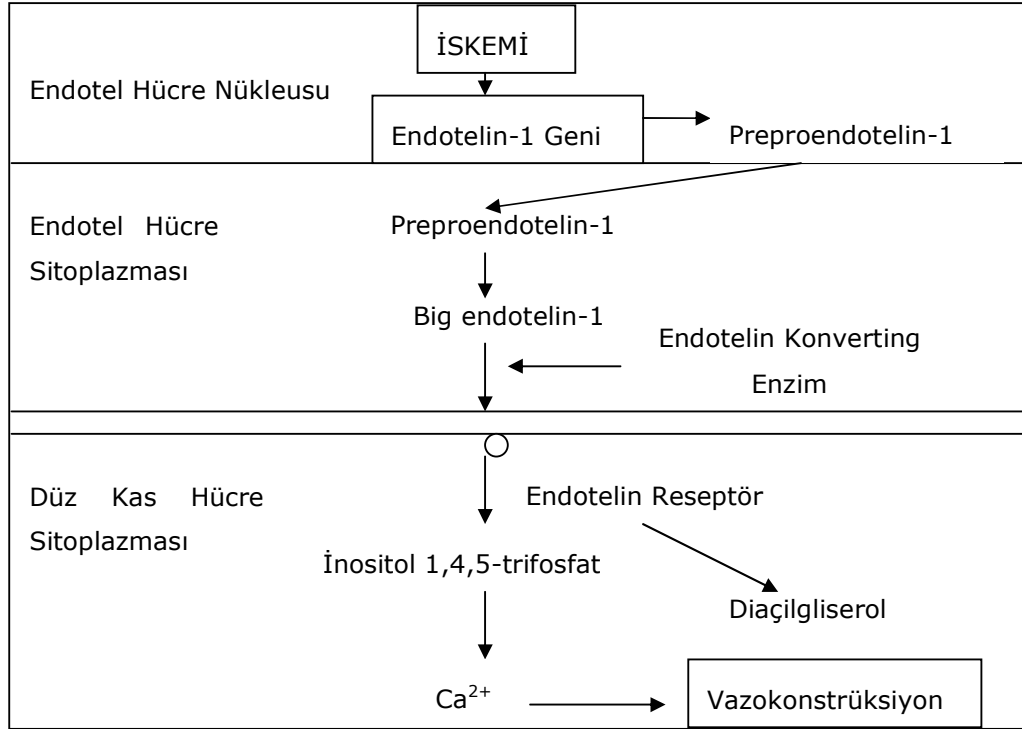
Her iki reseptör de vasküler düz kas hücreleri ile vazokonstriksiyonda rol

oynar. ET-1 düz kas hücrelerindeki ET-A ve ET-B reseptörlerine bağlanarak vazokonstriksiyon meydana getirir. ET-A reseptörü vasküler düz kas hücrelerinde, ET-B reseptörü de endotel ve vasküler düz kas hücrelerinde lokalizedir¹¹⁷. Vasküler endotel hücrelerinde ET-B ile NO ve PGI₂ salgılanmasında rol oynayarak vazodilatasyona yol açar¹¹⁸. ET-A; ET-1 ve ET-2'ye yüksek affinite gösterirken ET-3'e affinitesi çok düşüktür. ET-B ise her üçünde de eşit affinite gösterir. Plazma endotelin seviyeleri kalp yetmezliğinin şiddeti ile pozitif, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile negatif koreledir¹¹⁹. Plazma endotelin seviyelerinin yüksek olduğu bazı hastalıklar tablo 3 de gösterilmiştir.

Tablo 3. Plazma ET-1 Seviyesinin Yüksek Olduğu Durumlar

Plazma endotelin-1 seviyesinin yüksek olduğu durumlar				
Hipertansiyon	Ateroskleroz	Astma	Akut böbrek yetmezliği	Pulmoner hipertansiyon
Beyin travması	Serebral vazospazm	Konjestif kalp yetmezliği	Hiperkolesterolemi	

NO sadece ET-1'in vazokonstriktör etkisini gidermez aynı zamanda endotel hücrelerinden ET-1 yapımı ve salınımını inhibe eder^{12,119}. Endotel hücrelerinde ET-1, ET-B reseptörlerini uyararak NO salınımına neden olur¹²¹. Miyokard İ/R'da ET-1 üretimi ve salınımı artar ve bu da ET-A reseptörü üzerinden İ/R hasarına katkıda bulunur¹²². ET reseptörlerinin farmakolojik blokajı aterosklerotik farelerde¹²³ ve insanlarda¹²⁴ endotele bağlı vazodilatasyonda artışa neden olmuştur. İ/R süresince selektif ET-A ve miks ET-A/ET-B reseptör antagonistleri infarkt alanında azalmaya, miyokard kontraktil fonksiyonunda artışa ve nötrofillerin toplanmasında azalmaya neden olur^{125,126,127}. ET reseptör antagonistleri İ/R sırasındaki NO etkisini arttırabilirler^{12,123,128}.



Şekil 11. İskemide Endotelin-1 Etki Mekanizması

7. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz

7.1 Nitrik Oksit

Bilimdeki keşifler bazen beklenmedik olaylarla ortaya çıkabilir. Bunlardan biri de 70'li yılların sonlarında Dr. Robert F. Furchgott'ın laboratuvarında gerçekleşmiştir. Dr. Furchgott'ın iki teknisyeni aynı deney protokolünde birbirine zıt iki veri elde etti; bir teknisyen asetilkolin (Ach) ile ön kastırılmış tavşan aortasında bir miktar kasılma oluştururken, diğer teknisyen tam tersine gevşeme elde etti. Dikkatli bir gözlemlerle, Furchgott teknisyenlerden birinin damarı izole ederken onu bir çubuğa yerleştirdiğini ve hoyratça davrandığını dolayısıyla damar endotelini tahrip ettiğini, buna karşılık diğerinin (Zawadski) daha dikkatli bir preparasyon yaptığını ve damar endoteline zarar vermediğini fark etti. Endotelin sağlam olduğu şeritlerde Ach gevşeme oluştururken diğer teknisyenin hazırladığı preparatta Ach gevşeme oluşturmada, tam tersine yüksek konsantrasyonlarda

kasılma meydana getirdi. Bunu takiben, Prof. Furchgott basit bir deney protokolü ile damar endotelinin, Ach gevşemesi için zorunlu olduğunu yayımladı¹⁸. Furchgott, endotelli ve endotelsiz dokuları organ banyosuna asarak endotelli damarlardan endotelsiz damara transfer edilebilen ve kısa yarılanma ömürlü bir maddenin bu gevşemeden sorumlu olduğunu ileri sürdü ve ona "endotel kaynaklı gevşetici faktör" (EDRF) adını verdi¹⁸. Bu keşfin ardından Ach'in oluşturduğu gevşemenin doğası çok geçmeden büyük ilgi topladı. 1983 yılında F. Murad'ın grubu EDRF'nin siklik guanozin monofosfat (cGMP) bağımlı bir şekilde gevşeme oluşturduğunu gösterdi. Ancak daha önceleri (1977 yılında) yine Murad'ın grubu tarafından NO adlı basit bileşiğin, cGMP düzeylerini arttırarak vasküler gevşeme oluşturduğu gösterilmişti. 1986-87 yıllarında Furchgott ve diğer bir araştırmacı L. Ignarro, birbirinden bağımsız olarak EDRF'nin NO olabileceğini iddia ettiler. 1987 yılında da Salvador Moncada'nın grubu, NO'nun L-arginin aminoasidinden sentezlendiğini ve bu sentezin basamaklarını ortaya koydu. Ancak, 1982 yılında beyin dilimlerinde L-argininin cGMP düzeylerini artırdığı gösterilmişti. Damarlara endotel hücreleri intakt olan aortik parçalar uygulandığında Ach'in etkisi tekrar geri kazanılmaktaydı. Bu çalışmalar (endotel hücre içeren aort parçalarının uygulanması) EDRF'ün ömrünü ve etkisini uzatırken; O_2^- , hemoglobin, metilen mavisi, demir (Fe^{2+}) ve hiperoksi EDRF'ün ömrünü kısaltıyor ve etkisini inhibe ediyordu¹²⁹.

İlginç olarak, göğüs ağrısı çeken Alfred Nobel, kendisinin bir kazanç haline getirdiği dinamitin ham maddesi olan nitrogliserini kullanmak zorunda kalmıştır. İronik olarak, NO'nun biyolojik bir molekül olduğu ve vücutta önemli fizyolojik olaylara katkı sağladığını bulan araştırmacılara 1988 yılında NOBEL Tıp/Fizyoloji Ödülü verilmiştir.

7.1.1 NO'nun Fizikokimyasal Özellikleri

Yüksek miktarda enerji gerektiren bir tepkime olması nedeniyle, NO'nin kendini oluşturan elementler olan O₂ ve nitrojenden (N₂) sentezi güçtür. Bu nedenle atmosferin en bol bulunan iki gazı olan O₂ ve N₂ birbiri ile tepkimeye girerek NO oluşturmazlar. Normal koşullarda NO gazı bozunarak N₂ ve O₂ gazlarını da oluşturmaz¹²⁹.

NO, organizmada yaygın olarak bulunan ve birçok hücre ve dokuda doğal olarak sentezlenen bir moleküldür. NO renksiz bir gaz olup, serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. Yağda çözünür ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçer. NO'nin hidrofobik ortamdaki çözünürlüğü sudakinin 70 katı kadar olması nedeniyle biyolojik zarları geçmek için herhangi bir engelle karşılaşmaz. NO'nin difüzyonunu kısıtlayan tek faktör, kendi reaktivitesidir. Çok kısa yarılanma ömrüne (3-5 sn) sahiptir. Basit kimyasal yapıya sahip olmasına rağmen oldukça farklı ve zıt etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler, çoğunlukla basit gibi görünen NO kimyasının komplike doğasından kaynaklanır¹³⁰. Kalp ve damar fonksiyonları üzerine önemli bir etkisi olduğu saptanan NO, NOS aracılığı ile L-argininden endotelde ve endokardda sentezlenip salgılanan bir vazodilatatördür¹³¹. Yanısıra trombosit agregasyonunu ve adezyonunu inhibe eder.

Reaktif özelliği nedeniyle, üretildiği andan itibaren NO'nin tepkimeleri ve difüzyonu eş zamanlı olarak gerçekleşir. Üretilen NO hedef moleküllere (örneğin metalloproteinlere) bağlanabilir veya O₂ ve O₂⁻ ile tepkimeye girerek reaktif nitrojen oksit türlerini (NO_x) oluşturabilir. Difüzyonla etkisini gösterebileceği komşu hücrelere (örneğin damar düz kas hücrelerine) veya dolaşıma geçebilir. Alyuvarlara ulaşabilen NO, oksihemoglobin ile tepkimeye girerek NO₃⁻'a oksitlenir. Bu son tepkimenin hızı difüzyon limitine yakın olup, NO'ı ortamdan

uzaklaştıran en etkili mekanizmadır. NO aerobik ortamda oksitlenerek kendi derişimini azaltır. NO'ın üretildiğı kaynaktaki derişimi ile difüzyonu ya da yarı ömrü arasında ters bir ilişki vardır. NO derişimi arttıkça oksidasyon tepkimeleri de hızlandığından yarı ömrü ve difüzyonu azalır. Ancak oksidasyon tepkimeleri ile oluşan reaktif türleri biyomoleküllerle tepkimeye girdiklerinden, NO üretimindeki artış onun sitotoksik etkilerini de arttırır. Oluşan yeni NOx'ın biyomoleküllerle tepkimesi çok hızlıdır ve bu türler sonunda NO_2^- ve NO_3^- gibi daha stabil türler oluştururlar¹²⁹.

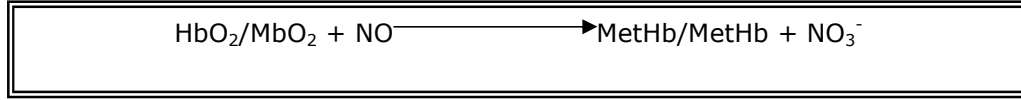
Enzimatik bir mekanizma ile sentezlenen NO'ı ortamdan temizleyen herhangi özel bir enzim yoktur. Buna karşılık, NO çok kısa ömürlü bir moleküldür. NO'ın kısa ömürlü olmasından sorumlu iki mekanizma vardır:

a) Kendiliğinden oksidasyon tepkimeleri; NO molekülleri kendi aralarında ve O_2 ile tepkimeye girerler. Önce bir grup NO türleri oluşur ve bu türler ortamdaki biyomoleküllerle tepkimeye girebilirler veya NO_2^- oluşturmak üzere bozunurlar. NO'ın aerobik sulu ortamda kendiliğinden oksidasyonu sırasında nitrojen dioksit (NO_2), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve dinitrojen tetraoksit (N_2O_4) gibi NOx meydana gelir. Bu ürünler güçlü oksitleyici ve nitrozlayıcı ajanlardır. Oluştukları ortamda tepkimeye girebilecekleri bileşikler yoksa, su ile tepkimeye girerek NO_2^- oluştururlar. Ortamda NO_2^- 'i NO_3^- 'a çeviren herhangi bir oksitleyici etken olmadıkça aerobik sulu ortamda NO'ten NO_3^- oluşumu gözlenmez¹²⁹.

b) Normal koşullarda NO'ın fizyolojik derişimini kontrol eden en önemli faktör, NO ile oksihemoglobin arasındaki tepkimedir. İnsan vücudunda NO, hemoglobine bağlandığında inaktive olur. Bu bağlanma, O_2 'e göre 3000 kat daha hızlı olmaktadır¹³². Bu kadar hızlı inaktive olması belki de NO'ın etkilerini lokalize

kılan en önemli faktördür.

Oksihemoglobin ve oksimiyoglobin büyük bir hızla NO ile tepkimeye girerek, NO'ı inert bir form olan NO_3^- 'a oksitlerler (Şekil 12).



Şekil 12. Oksihemoglobin/myoglobin ve Nitrat Oluşumu

Bu tepkimenin hız sabiti çok sayıdaki enzimatik tepkimenin hız sabitinden daha büyüktür. Aslında NO'nin oksihemoglobin tarafından NO_3^- 'a oksidasyonu, NO'nin katalizlenen bir inaktivasyonu olarak değerlendirilebilir. Oluşan NO_3^- , NO oksidasyonunun en stabil son ürünüdür. Herhangi bir hedef hücreye ulaşan NO, üretim kaynağından difüzyonla yayılarak derişimini azaltan ve oksihemoglobin ile tepkimeye girmekten kaçabilen NO'tir. Oksihemoglobin ve oksimiyoglobulinin NO ile tepkimeleri sırasında bu proteinler methemoglobin ve metmyoglobuline oksitlenirler. Bu tepkime sonunda oluşan methemoglobin ise, methemoglobin redüktaz enzimi tarafından NADPH kullanılarak tekrar hemoglobin indirgenir¹²⁹.

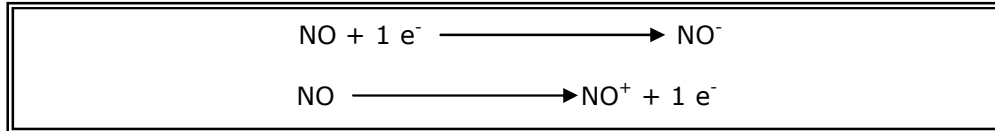
O_2 derişiminin artması nitrozilhemoglobinden NO ayrışmasını artırır. O_2 derişiminin düştüğü dokularda da NO, hemoglobinden O_2 bırakılmasını sağlamada rol alır. Tepkime sırasında bu proteinlerin taşıdığı O_2 de tüketildiğinden, özellikle NO sentezinin indüklediği dokularda, NO hipoksi veya iskemi durumuna ilave katkıda bulunur¹²⁹.

7.1.2 Serbest Radikal olarak NO

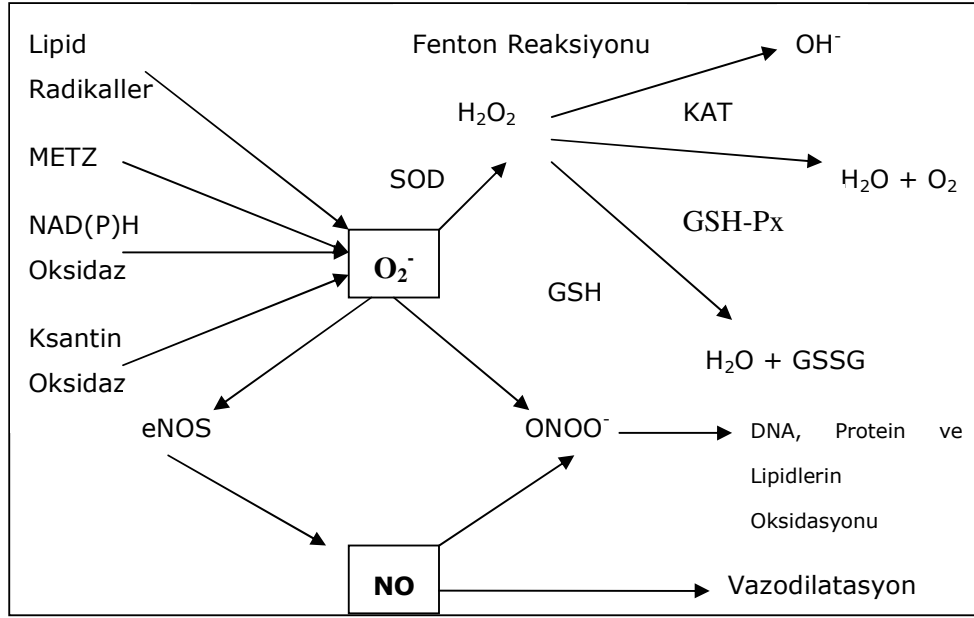
Radikallerin en önemli özelliği paylaşılmamış elektron içeriği nedeniyle çok

reaktif olmalarıdır. Oysa paylaşılmamış elektron içermesine rağmen, diğer radikal türlerle kıyaslandığında NO'nın reaktivitesi son derece düşüktür. Diğer radikal türlerinin aksine (örneğin O₂ ve karbon merkezli radikaller), NO radikalinde paylaşılmamış elektron, nitrojen atomu üzerinde yerleşik değil; fakat nitrojen ve oksijen atomları üzerinde delokalize bir şekilde bulunur. NO radikalının bu özelliği kendi reaktivitesini baskılar, stabilitesini artırır ve biyolojik koşullarda sentezlendiği yerden daha uzak mesafelere difüzyonunu kolaylaştırır. Radikalik tepkimeler yönünden reaktivitesi az da olsa, NO büyük bir afinite ile organik yapılardaki metal merkezlere bağlanır. NO, organik radikallerle difüzyon limitine yakın bir hızla tepkimeye girerek nitrojen içeren organik bileşiklerin oluşumuna neden olur¹²⁹.

NO gibi radikal bir molekül olan O₂⁻ tek elektron ile indirgendiğinde ya da oksitlendiğinde oluşan türlerin reaktivitesi daha azdır. Oysa NO'nun oksidasyon düzeyindeki tek elektronluk değişiklik, onun daha reaktif türlerinin oluşmasına neden olur. Biyolojik sistemlerde NO'nun nitronyum (nitrozonyum) iyonuna (NO⁺) oksidasyonu ya da nitroksile (NO⁻) indirgenmesi veya diğer oksitlenmiş formlarının oluşumu doğrudan tek elektron tepkimeleri ile değil; NO'nun O₂'li ortamlarda kendiliğinden oksidasyonu sırasında oluşan reaktif türler aracılığı ile gerçekleşir¹²⁹ (Şekil 13).



Şekil 13. Reaktif Nitrik Oksit Türleri



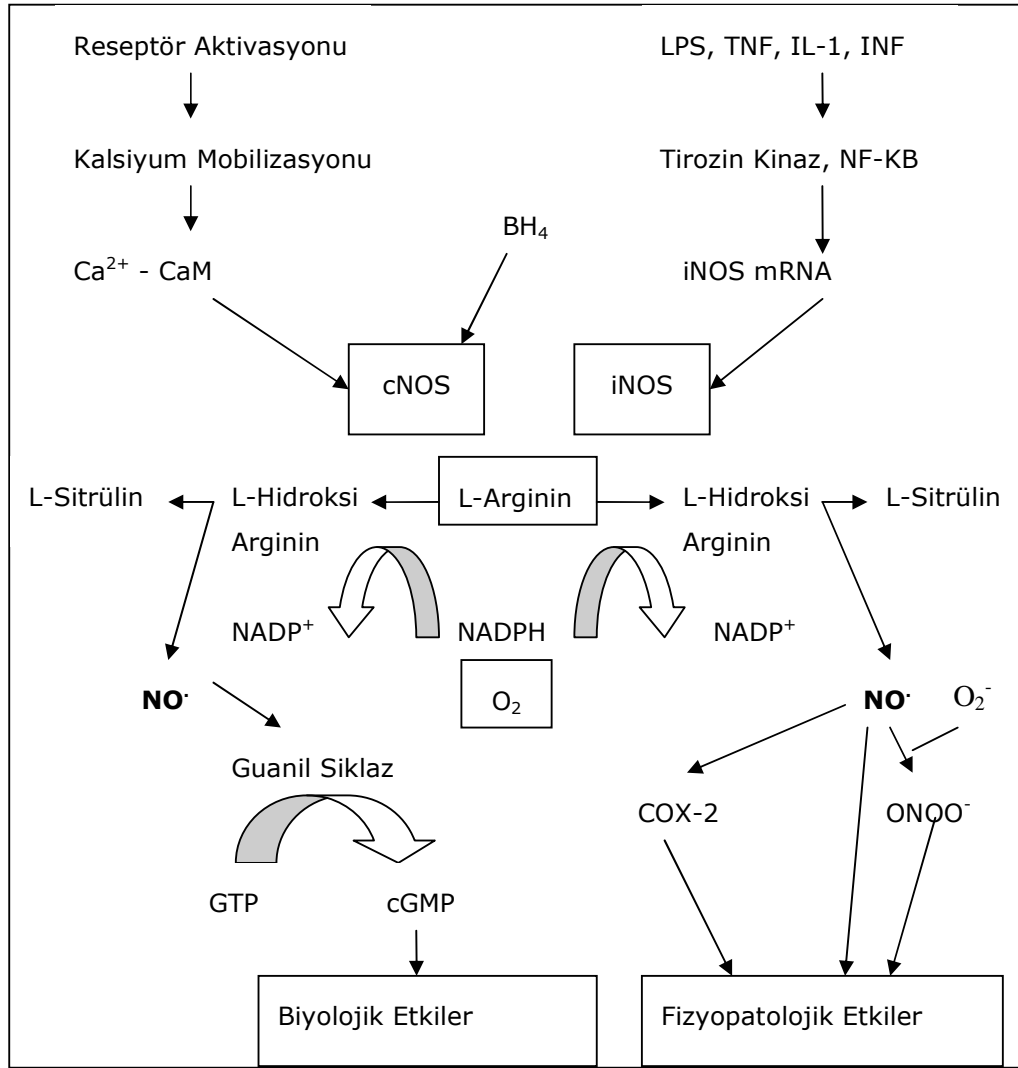
Şekil 14. NO ve ROT

NO üretimi, ortamda bulunan O_2 miktarı ile doğru orantılı artarken, ROT'nin etkileri ile oluşan endotel harabiyeti sonucunda üretimi azalmakta ve direkt olarak ROT ile reaksiyona girerek bloke olmaktadır^{133,134}(Şekil 14).

7.1.3 NO Sentezi

NO, L-arjinin ve O_2 'den, NOS etkisiyle sentezlenir. NOS enzimi tarafından bir mol arjininden bir mol NO sentezi için 2 mol O_2 ile 1.5 mol NADPH kullanılır (Şekil 15). NO sentezi damarlarda başlıca "shear stres" ile tetiklenir. Bu fenomen, kalbin her sistolde kanı damarlara göndermesi sonucu damar endoteli yüzeyinde oluşturduğu mekanik etki (sürtünme, yalama) olarak ifade edilebilir. Endotel hücreleri bu mekanik etki ile şekil değişikliğine zorlanırken hücre iskeleti aracılığı ile hücre içine sinyaller gönderir. Bunun sonucunda Protein Kinaz G aktive edilerek eNOS'u fosforile eder. Fosforilasyon, bu enzimin aktivasyonuna neden olur. Sonuçta, endotel hücresinden sürekli NO üretilir. Damar endotelinden NO üretimine neden olan en önemli fizyolojik stimulus bu

fenomendir ("shear stres"). İlginç olarak bu şekilde NO üretimi için Ca^{2+} 'a gerek yoktur, eNOS'un fosforile edilerek aktive edilmesi yeterlidir. Diğer taraftan hücre içi Ca^{2+} düzeylerini arttıran bileşikler de (Ach, histamin, bradikinin, trombin, glutamat, P maddesi, serotonin, noradrenalin, tromboksan A_2 , ET-1, ATP, anjiotensin II, vd.) vasküler endotelyumda fosfolipaz C enzimi üzerinden Ca^{2+} 'a bağımlı bir enzim olan eNOS enzimini aktive ederler¹²⁹.



Şekil 15. NO'nun Biyolojik ve Patolojik Etki Mekanizması

NO bir kez sentezlendikten sonra hızla hedef dokulara yayılır ve hücre içinde guanilat siklaz enzimini aktive ederek düz kas kasılmasını sağlayan cGMP miktarını artırır^{132,135} (Şekil 15).

NO aynı zamanda trombositler içindeki çözülebilir guanilat siklaz aktivitesini de arttırarak trombosit adezyon ve agregasyonunu azaltır. NO plateletlerin homotipik (platelet-platelet) ve heterotipik (platelet-lökosit) agregasyonunu ve lökosit-endotel hücre adezyonunu inhibe eder. NO veya nitrovazodilatörler tarafından sentezi arttırılan cGMP, cAMP fosfodiesterazı inhibe ederek siklik adenosin monofosfat (cAMP) düzeyini yükseltir ve platelet agregasyonunu inhibe eder. Prostosiklinlerle NO arasındaki sinerjik etkinin nedeni budur¹³⁶.

NO, ayrıca immünolojik sataşma sonucu Ca^{2+} 'dan bağımsız olarak immün sistem hücreleri tarafından da üretilir ve bu hücrelerin selektif olmayan sitotoksik etkilerine aracılık eder. Ayrıca mikroorganizmaların mitokondrial proteine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip DNA sentezini bozarak yıkılmalarına yol açar ve savunma sisteminde rol oynar.

7.1.4 Nitrik Oksit Sentaz Enzimi

NOS enzimi NADPH, O_2 , flavoproteinler (FAD, FMN), kalmodulin (CaM) ve tetrahydrobiopterinin (THB) varlığında L-arginini, sitrulin ve NO'ya dönüştürür. NO sentezleyen enzimin 3 farklı izoformu vardır (Tablo 4). Bu izoenzimlere özgü genler kromozom 7 (endotelial NOS-eNOS), 12 (nöral NOS-nNOS) ve 17 (indüklenebilen NOS-iNOS) üzerinde bulunmuştur¹³⁷. NOS-I (nNOS) ve NOS-III (eNOS) sürekli, ancak az miktarda ve Ca^{2+} 'a bağımlı olarak (enzim aktivasyonu için hücre içi Ca^{2+} 'un artması gerekir) salınır. Nöral dokularda NOS-I, vasküler

endotelde NOS-III bulunur. NOS-II Ca^{2+} 'a bağımlı değildir. Bütün NOS enzimleri arginin analoglarınca inhibe edilir.

Tablo 4. NO Sentezleyen Enzimler

NOS izoformu	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO Miktarı	Kromozom
Tip I (nNOS)	Sürekli	Nöron	Kalsiyum	Düşük (picomol)	12
Tip II (iNOS)	İndüklendiğinde	Makrofaj, Damar düz kası, damar endoteli, hava yolu epiteli, immün hücreler, miyokard	Sitokin, endotoksin, oksidanlar	Yüksek (nanomol)	17
Tip III (eNOS)	Sürekli	mast hücreleri, plateletler, pankreasın β -adacıkları, endotel, vasküler düz kas hücreleri	Kalsiyum	Düşük (picomol)	7

cNOS Özellikleri

1. Sitoplazmik (nNOS) veya zarsal (eNOS) enzimlerdir.
2. NADPH-bağımlı ve P-450 tip hemoproteinlerdir.
3. L-Arjinin analogları tarafından inhibe edilirler.
4. Ca^{2+} /Kalmodulin-bağımlı enzimlerdir.

5. Kısa süreli NO sentezini katalizlerler.
6. Aktiviteleri düşüktür. Dakikada, miligram enzim başına, pikomol seviyesinde NO sentezlerler.
7. Enzimlerin sentezi ve aktivitesi glukokortikoidlerden etkilenmez.
8. eNOS mast hücreleri, plateletler, pankreasın β -adacıklarında, vasküler düz kas hücrelerinde bulunur.
9. nNOS sinir sistemi, adrenal bez (medulla ve korteks) ve astrositlerde bulunur.

iNOS Özellikleri

1. Sitoplazmik bir enzimdir.
2. NADPH bağımlı ve P-450 tip bir hemoproteindir.
3. L-Arjinin analogları tarafından inhibe edilir.
4. Aktivitesi Ca^{2+} bağımsızdır. Kalmodulin iNOS'ın bir alt birimidir. Enzimin aktivitesi, transkripsiyon düzeyindeki kontrol ile düzenlenir.
5. Uzun süreli NO sentezini katalizler.
6. Enzimin aktivitesi yüksektir. Enzimin miligramı başına, dakikada nanomol seviyesinde NO sentezlenir.
7. Enzimin indüksiyonu glukokortikoidler tarafından inhibe edilir.
8. Konstitütif enzimin aksine, uygun indükleyicilerle uyarıldığında, çok sayıdaki hücre türleri iNOS enzimini sentezlerler; Makrofajlar, PNML, T-lenfositler, kondrositler, hepatositler, Kupffer hücreleri, böbrek, retina ve barsak epitel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, vasküler düz kas ve çizgili kas hücreleri, mezengial hücreler, mezotelial hücreler, beyin endotel hücreleri, mikrogliya hücreleri, astrositler, pankreasın Langerhans adacıkları, HL-60

lösemi, nöroblastoma, EMT-6, TA 23 adenokarsinoma hücreleri.

iNOS aktivitesi koenzim olarak THB bağımlıdır; FAD ise enzimin aktivitesini artırır¹²⁹.

7.1.4.1 NOS Enzimlerinin Hücredeki Lokalizasyonu

nNOS ve iNOS enzimleri esas olarak sitoplazmik proteinler olarak bilinirler. Yapısal olarak nNOS ve iNOS izoformları zara tutunmalarını sağlayacak kimyasal grup içermezler. eNOS ise zarsal ya da zarla etkileşimde bulunan bir enzimdir.

Kalp kolinerjik sinir uçları ile non-adrenerjik/non-kolinerjik sinirlerde nNOS'un, immünoreaktivitesi gösterilmiş olmasına rağmen myositlerden, esasen yüksek miktarda eNOS eksprese edilmektedir¹³⁸. Diğer taraftan inflamatuvar sitokinlerle uyarıldığında myositler iNOS enzimini eksprese etmektedir^{139,140}. Kalp yetmezliği olan hastalarda da iNOS ekspresyonları artmaktadır¹⁴¹. Ancak kalp yetmezliklerinde ve sitokin sataşmalarında iNOS ekspresyonları artarken eNOS azalmaktadır. Depre ve ark. tavşan kalbinde miyokardiyal iskemiden sonra NOS aktivitesinde artışa bağlı NO birikimi ve miyokardiyal hasarda artış saptamışlardır^{142,143}.

7.1.5 NO Yıkımı

NO'ı ortamdan uzaklaştırmak için herhangi bir özel enzimatik koruma mekanizması yoktur. Bu durum, NO'nın kalıcı ya da uzun ömürlü bir bileşik olduğu anlamına gelmez. Tam aksine, NO reaktif özelliği nedeniyle protein yapıdaki ya da diğer çok çeşitli bileşiklerle tepkimeye girdiğinden, saniyelerle ifade edilebilecek bir ömüre sahiptir¹²⁹.

NO oluştuktan sonra: 1) Methemoglobin, nitrite (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) dönüşerek inaktive olur; 2) $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile birleşerek ONOO^- 'e dönüşür. ONOO^- , $\text{OH}^\bullet$ ve Tyr ile birleşerek nitrotirozini oluştururlar. 3) guanilat siklaz aktivasyonu ile cGMP'yi artırarak düz kas gevşemesine neden olmaktadır¹²⁹.

7.1.6 NO'nın Metallerle Tepkimesi

NO'nın Hem içeren merkezlere reaktivitesi, bu molekülün biyolojik hedef moleküllerdeki etkisinin temelini oluşturur. Fonksiyonel biyolojik moleküllerde, örneğin hemoglobin, miyoglobin ve enzimlerde, demir esas olarak hem yapısında bulunur. NO'nın bağlanması ile hem-nitrozil kompleksi oluşur. Proteinlerde hem-nitrozil oluşumu, guanilat siklaz enziminde olduğu gibi, konformasyon değişimini indükleyerek hedef enzimleri aktive eder. Hem-nitrozil oluşumu, enzim inaktivasyonuna da neden olur. Hem-nitrozil oluşumu ile guanilat siklaz ve siklooksijenaz enzimleri aktive olurken; sitokrom P450, lipoksijenaz, tromboksan sentaz, katalaz ve peroksidaz enzimleri inhibe olur¹²⁹.

NO, hafif asidik koşullarda Fe^{2+} ile tepkimeye girerek demir-nitrozil oluşturur. Demir kompleksleri NO'ı büyük bir afinite ile bağlarlar. NO'nın özellikle porfirin yapılarıdaki demire afinitesi çok yüksektir. NO'nın Fe^{2+} 'e afinitesi ferrik demire (Fe^{+3}) afinitesinden daha fazladır. Fe^{2+} , Haber-Weiss tepkimesi ile $\text{OH}^\bullet$ 'in yapımını katalizlediğinden demirin reaktif formlarından biri olarak kabul edilir. Normal olarak vücut sıvılarında Fe^{2+} bulunmaz; Fe^{+3} formunda transferine bağlı olarak taşınır. Oksidan stres koşullarında $\text{O}_2^{\cdot-}$, Fe^{+3} formunu Fe^{2+} formuna indirgeyerek proteinlerden salınımına neden olabilir. NO'nın Fe^{2+} 'le nitrozil kompleksi oluşturması, demirin bu reaktif formunu inaktive etmesi bakımından önemlidir. Sulu ortamdaki Fe^{+3} ise NO ile tepkimeye girmez¹²⁹.

Şelat yapmış demir komplekslerine afinitesi yüksek olan diğer iki önemli molekül O_2 ve karbon monoksittir (CO). Ancak her ikisi de Fe^{+3} ile tepkimeye girmezler. Fe^{2+} 'in NO'e afinitesi ise O_2 ve CO'e afinitesinden çok daha fazladır. Fe^{2+} 'in NO ile oluşturduğu demir-nitrozil kompleksi kısmen de olsa stabildir. Oysa NO, Fe^{+3} ile tepkimeye girdiğinde oluşan kompleksde yük transferi olur ve $Fe(III)-NO\cdot$ ya da $Fe(III)-^+NO$ ile temsil edilen türler oluşur. Bu demir-nitrozil türleri reaktif olup, herhangi bir nükleofil ile tepkimeye girerek nitrozolayıcı bir ajan olarak davranırlar¹²⁹.

NO'nin başta demir içerenler olmak üzere metal merkezlerle oluşturduğu nitrozil kompleksleri stabil olmayıp, NO'ı tekrar dissosiyede edebilirler. Ortamdaki serbest NO derişiminin azalması ile nitrozil yapısındaki NO ayrılır ve NO'den kaynaklanan aktivasyon veya inhibisyon ortadan kalkar. Bu nedenle nitrolizasyon şeklinde gerçekleşen protein modifikasyonu tersinirdir ve protein aktivitesinin NO ile kontrol edilmesine olanak sağlar¹²⁹.

7.1.7 Nitrolizasyon Tepkimeleri

O_2 derişiminin yüksek olduğu dokularda, O_2 , NO ile tepkimeye girerek NO_2 oluşturur, bu tür de nitrasyon tepkimelerine neden olur. Oysa O_2 derişiminin düşük olduğu yerlerdeki nitrasyon NO_2^- derişimi ve peroksidazların aktivitesine bağlıdır.

NO oksidasyonu ile oluşan reaktif türlerden N_2O_3 , N_2O_4 , ve $ONOO^-$ biyomolekülleri başlıca fonksiyonel gruplarından olan hidroksiller, aminler ve tiyollerle tepkimeye girerek nitrozasyona neden olurlar. Oluşan nitrozaminler, O_2 varlığında DNA bazlarının deaminasyonuna neden olduklarından mutajenik ve karsinojenik etkiye sahiptirler. Nitrozotiyoller NO'nin biyolojik ömrünün artmasına

neden olurlar ve NO deposu olarak değerlendirilirler. Proteinlere bağlı tiyollerin nitrozasyonu genellikle fonksiyonu için tiyol bağımlı enzimlerin inaktivasyonuna neden olur¹²⁹.

Başta GSH olmak üzere tiyoller, reaktif NO türlerine karşı önemli koruma mekanizması oluştururlar. Ancak tiyollerin nitrozotiyollere çevrilmesi hücrelerde indirgenmiş GSH seviyesinde azalmaya neden olduğundan oksidan strese ve oksidan strese duyarlılığın artmasına neden olur¹²⁹.

7.1.7.1 Peroksinitrit

Bir anyon olarak ONOO⁻'in zarsal ortama geçmesi zordur. Ancak proton bağlamış formu, peroksinitröz asit, hidrofobik ortama rahatça geçebilir ve reaktif özelliği nedeniyle doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girerek nitratlayabilir. ONOO⁻, peroksinitröz asit ve OH•'ne dönüşebilmektedir. Peroksinitröz asit (ONO-OH) son derece dayanıksız ve reaktiftir. Peroksinitröz asit ayrıca ortamdaki lipidlerin peroksidasyonunu da başlatabilir. Peroksitlenmekte olan lipidlerin ONOO⁻'le tepkimesi ile nitratlanmış lipidler meydana gelir¹²⁹. NO inhibisyonunun ONOO⁻ oluşumunu engelleyeceği ve kardiyak performansı arttırabileceği gösterilmiştir¹⁴⁴. Bu nedenle, NO sentezini gerçekleştiren NOS'un (özellikle iNOS) pro-oksidatif bir enzim olabileceği düşünülmektedir .

NO'nin O₂⁻ ile tepkimesi sonucu oluşan ONOO⁻ her ne kadar daha reaktif ise de; ONOO⁻ hızla NO₃⁻'a izomerize olacağından, bu tepkime SOD bulunmayan bir ortamda O₂⁻'in ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlaması bakımından önemlidir. Hücresel koşullarda NO'nin tepkimeye girdiği başlıca radikaller, lipid peroksidasyonu sırasında biyolojik zarlarda oluşan alkoksi (RO•) ve peroksi (ROO•) radikallerdir. NO'nin bu radikallerle tepkimeleri lipid peroksidasyonunu

sonlandırıcı bir etki oluşturur. NO ayrıca lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerini inhibe ederek inflamasyonda etkili olan eikozanoidlerin sentezini de baskılar¹²⁹. ONOO⁻ damar düz kaslarında gevşemeye, platelet agregasyonunun inhibisyonuna neden olur ve endotel hücrelerine PMNL'in yapışmasını önler. ONOO⁻ sitoplazmik guanilat siklazı NO'e benzer şekilde aktive eder¹²⁹.

ONOO⁻ güçlü bir oksitleyici olup, doğrudan sülfidril gruplarını oksitleyebilir. Bu tepkime hücrede GSH gibi antioksidanları tüketmesi ve aktiviteleri için sülfidril gruplarına bağımlı enzimleri inaktive etmesi bakımından önemlidir. ONOO⁻'in metal iyonları ya da iyon kompleksleri ile tepkimesi sırasında güçlü bir nitratlayıcı ajan olan NO₂⁺ oluşur.

ONOO⁻ dokularda çok hızlı yıkıldığı için tayin edilemez, bu nedenle Tyr ile oksidasyonu sonucu oluşan 3-nitrotirozin ONOO⁻ seviyelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

7.1.8 NO'nun Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

NO'nun endotelde düz kas gevşemesi ve kalp kasılması üzerine etkileri bulunmaktadır.

7.1.8.1 NO'nin Damarlar Üzerine Etkisi

NO güçlü bir damar düz kas gevşeticisidir. Hedef hücrelerde çözünür (sitoplazmik) guanilat siklaza bağlanır ve onun aktivitesini yaklaşık 400 kat artırır. Hedef hücrelerin bazı moleküllerine bağlanır (guanilat siklazdan bağımsız etkiler). Bu enzimin aktivasyonu ile cGMP açığa çıkar ve bu da Protein Kinaz G'yi aktive eder. Protein Kinaz G ile oluşan düz kas gevşemesi başlıca şu mekanizmaları içerir:

- Ca^{2+} 'un hücre içi depolardan saliverilmesinin inhibisyonu
- Voltaja bağımlı Ca kanallarının inhibisyonu
- $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ değiş-tokuşunun aktivasyonu
- Fosfolipaz C ve İnositol trifosfat (IP_3) oluşumunun inhibisyonu
- Ca^{2+} 'a bağımlı K^+ kanallarının aktivasyonu

Aktive olan protein kinazlar düz kasın relaksasyonu ve ardından damarların dilatasyonundan sorumludurlar. NO tarafından sentezi arttırılan cGMP'nin aktive ettiği protein kinazlar, hücrede Ca^{2+} derişimini kontrol eden proteinleri fosforile ederek bu proteinlerin aktivitelerini kontrol ederler. Bu nedenle NO-cGMP bağımlı sinyal iletiminin başlıca amaçlarından biri, hücre içi Ca^{2+} derişimi kontrol etmektir. Damar düz kaslarında NO'nin ne kadar gevşemeye neden olacağı, düz kasın kontraksiyonu derecesine bağlıdır. Düz kasların kasılması esas olarak hücre içi Ca^{2+} derecesine bağımlıdır. Hücre içi Ca^{2+} artması ile, Ca^{2+} /kalmodulin kompleksi, miyozin hafif zincir kinazını aktive ederek miyozinin fosforilasyonuna neden olur ve kasılmayı başlatır. NO başlıca iki mekanizma ile düz kaslarda gevşemeye neden olur. Bu mekanizmalardan birisi, kasılmayı başlatan hücre içi Ca^{2+} derişimini düşürmesi; ikincisi ise myozin hafif zincir kinaz enzimini inaktive etmesidir. Myozin hafif zincir kinazının aktivitesi Ca^{2+} /CaM kompleksi ve cGMP bağımlı protein kinazlar aracılığı ile kontrol edilir. Myozin hafif zincir kinazı, cGMP bağımlı protein kinaz enzimi ile fosforile edilince inaktive olur ve kasılmadaki katalitik etkisini yitirir. Böylece NO, cGMP bağımlı protein kinaz aracılığı ile düz kaslarda kasılmayı inhibe ederek gevşeme şeklinde bir etkiye sahip olur¹²⁹.

cGMP bağımlı protein kinazların en önemli substratları, hücre zarlarında bulunan iyon pompalarıdır. İyon pompalarının protein kinaz enzimi ile

fosforilasyonu sonucu hücre dışına ve hücre içi depolara Ca^{2+} 'un pompalanması hızlanır ve sitoplazmik Ca^{2+} derişimi düşürölür. cGMP, K^+ pompasını ve Na^+/K^+ -ATPaz enzimini aktive ederek düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyona neden olur. NO doğrudan veya daha yagın olarak da cGMP aracılığı ile iyon pompalarının aktivitelerini etkileyerek düz kas hücrelerinde Ca^{2+} derişimini düşürerek ve hiperpolarizasyona neden olarak gevşemeye neden olmaktadır. NO, damar düz kaslarında cGMP'ye bağılı olmayan etkilere de sahiptir. cGMP bağımlı etkileri nanomolar derişimlerde görölürken; mikromolar derişiminde cGMP'den bağımsız etkileri görölür¹²⁹.

Kan damarlarında kanın akış hızının artması endotel hücreler üzerinde mekanik bir kuvvet (Shear stress) oluşturarak NO sentez ve salınımını artırır. Shear stress K^+ kanallarının aktivasyonuna neden olarak hiperpolarizasyona; hiperpolarizasyon ise daha fazla Ca^{2+} girişine neden olarak NO sentezini artırır. Endoteldeki Ca^{2+} bağımlı NO salınım fazı geçici bir süre için olup, bunu Ca^{2+} bağımsız faz izler. Ca^{2+} bağımlı olmayan NO salınımı mekanik uyarı olduğı sürece devam eder ve bu tür salınımdan eNOS enziminin Tyr fosforilasyonu ile aktivasyonu sorumludur¹²⁹.

7.1.8.2 NO ve Miyokard Kontraktilitesinde Bozukluklar

NO'nun normal fizyolojik olayların düzenlenmesinde ve çeşitli patolojik süreçlerin gelişiminde önemli rol oynadığı sistemlerden birisi de kardiyovasküler sistemdir. Normal homeostazı sağlamada NO'nun aracılık ettiğı temel olaylar miyokard kontraktilitesi, vasküler tonüs, trombosit endotel etkileşimleri ve lökosit adezyonununun düzenlenmesidir. Dolayısıyla farklı hücrelerde NO'nun üretiminde veya etkinliğinde bir bozuklukla seyreden NO dengesindeki değişiklikler birçok fizyopatolojik sürece katkıda bulunmaktadır. Vasküler yapıda

NO üretiminin azalması, sonuçta trombosit endotel etkileşimi ve vasküler düz kasın proliferasyonu üstünde NO aracılı inhibitör etkinin azalmasına yol açarak aterojenik potansiyeli arttırır¹²⁹.

NO'nun kalpte oluşturduğu etkiler, cGMP'ye bağımlı ve bağımsız etkiler olarak ortaya çıkar. NO'nun hem pozitif hem de negatif inotropik etkisi bulunmaktadır. Ancak sonuç olarak NO, kalp kasılmasını inhibe etme yönünde hareket eder. Bununla uyumlu olarak çeşitli agonistlerle (örneğin β -agonistler) oluşturulan pozitif inotropik etki eNOS aktivasyonu (P maddesi ile) veya NO vericileri ile azalmaktadır. NO, ayrıca myositlerin mitokondriyal solunumunu inhibe ederek kalbin O₂ tüketimini azaltır¹⁴⁵.

Postiskemik miyokard depresyonunda patogeneizde sitokinler rol oynar. Reperfüzyon sırasında aktive olmuş lökositler ve makrofajlar iskemik miyokarda göç eder ve bu immün sistem hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin saliverilmesi miyokardda iNOS aktivasyonuna ve aşırı NO saliverilmesine neden olur. Klinikte bu olayın en tipik örneği koroner by-pass cerrahisinden sonra sıklıkla postoperatuvar komplikasyon olarak ortaya çıkan 'miyokardiyal dona kalma'' tablosudur¹⁴⁶. NO biyolojisinde bozulma ile karakterize olan bazı kardiyovasküler hastalıklar Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. NO Biyolojisindeki Değişikliklerin Rol Aldığı Kardiyovasküler Bozukluklar

Septik Şok	Miyokard kontraktilitesinde bozukluklar	İ/R hasarı	Ateroskleroz	Diyabetik anjiopati
Esansiyel Hipertansiyon	Pulmoner Hipertansiyon	Konjestif kalp yetmezliği	Gebelikte preeklampsi	

7.1.8.3 Kalpte Reperfüzyon Hasarı ve NO

Normal endotel hücreleri tarafından salgılanan NO ve doku tipi plazminojen aktivatörü, kalbi koruyucu etkiye sahip aracı moleküllerdir. Bu faktörlerin fibrinolitik sistemin aktivasyonunda görevleri vardır. Nitrozillenmiş doku plazminojen aktivatörü, miyokarddaki İ/R sonrası nekrozları azaltır ve nötrofil-endotel etkileşimini inhibe eder¹²⁹.

Miyokard iskemisinde erken dönemde endotel disfonksiyonu oluşur. İskemik ataklar herhangi bir histolojik hasar oluşturmada NO aracılı vazodilatasyonda kayba ve koroner arterlerde vazokonstriksiyona eğilime yol açar ve geçici koroner oklüzyonunu takiben oluşan reperfüzyona bağlı miyokard hasarının oluşumunda dokuya nötrofil göçü rol oynamaktadır¹⁴⁷. Sonuçta aktive lökositlerden ROT'nin saliverilmesi tabloyu başlatır. ROT arasında ilk akla gelen $O_2^{\cdot-}$ bütün hücrelerde bazı enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla oluşur. Kan damarlarında ise $O_2^{\cdot-}$ 'in konstitütif olarak devamlı sentezlendiği gösterilmiştir. Böylece $O_2^{\cdot-}$ kan damarlarında NO derişimini kontrol ederek onun vazodilatör etkisini düzenler.

Bir dokuda İ/R sonucu oluşan hasar, dokunun aynı toplam sürede sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır¹⁴⁸. Reperfüzyon sırasında hem $O_2^{\cdot-}$, hem de NO üretimi söz konusudur ve bu iki molekül ONOO⁻ oluşturur. Böylece NO'nin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar. Wang ve ark. NO'nin kalpteki toksik etkisini; NO'nin $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyonu sonucu ONOO⁻ oluşması ile sağladığını göstermişlerdir¹⁴⁹. Biyolojik koşullarda üretilen $O_2^{\cdot-}$, SOD enzimi tarafından H_2O_2 'e çevrilir. NO'nin $O_2^{\cdot-}$ ile tepkimeye girerek ONOO⁻'i oluşturması çok düşük NO derişimlerinde ve difüzyon limitine yakın bir hızla gerçekleşir. $O_2^{\cdot-}$ ile NO arasındaki tepkimenin hızı, SOD tarafından

katalizlenen enzimatik dismutasyon tepkimesinin 3 katı kadardır. Aslında bu tepkime ile güçlü bir oksitleyici olan ONOO⁻'in ne kadar üretileceği, sentezlenen O₂⁻ derişimine bağlıdır. ONOO⁻'in NO benzeri aktivitesi çok düşüktür, ancak güçlü bir oksidandır ve biyolojik sistemlerde membranlarda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu reaksiyonlarına karışır¹⁵⁰.

NOS inhibisyonu ile ONOO⁻'i oluşturan bir komponentin baskılanmasının reperfüzyon hasarını azaltacağı düşünülebilir. Ancak İ/R'nda NO'nun protektif rolü olduğu da bilinmektedir. Öncelikle doku hasarında gelişen inflamatuvar yanıtta nötrofillerin rolü tartışılmazdır. NO, lökosit migrasyonu ve yapışkanlığı önleyerek ve mikrovasküler permeabilitede lökosit aracılı artışı baskılayarak inflamatuvar hasarı belirli bir ölçüde sınırlar¹⁵¹. NO ayrıca lökosit adezyonunun güçlü bir uyarıcısı olan O₂⁻ anyonunu inaktive eder ve nötrofillerde O₂⁻ oluşumunu NADPH oksidaza direkt etki ile inhibe eder¹⁵². Nitekim dışarıdan uygulanan NO'nun İ/R hasarında kardiyoprotektif olduğu, antiaritmik koruma sağladığı bildirilmiştir¹⁵³. Ayrıca İ/R'nda NO üretiminin azalması koroner endotele nötrofillerin yapışmasını ve ek radikal oluşumunu tetikler; eksojen NO uygulaması bu mekanizmayı da tersine çevirebilir¹²⁹.

7.1.9 Reaktif NO Türlerine Karşı Vücudun Savunma Mekanizmaları

O₂'den kaynaklanan ROT'nin canlılardaki toksik etkilerini önleyen enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar aynı zamanda organizmayı NOx'ne karşı da koruyucu fonksiyonlar görürler. GSH, askorbik asit, ürik asit, tokoferoller, protein tiyoller NOx ile tepkimeye girip oksitlenirken, aslında NOx'ne karşı diğer hücrel molekülleri de korurlar. Bu antioksidan bileşiklerin en etkin olanı GSH olup, tepkimeleri sonunda nitrozo glutatyon ve GSSG oluşur. ROT'lerine karşı enzimatik antioksidan sistemi oluşturan bir grup enzim de

NOx'ne karşı koruyucu fonksiyon görür. Protein yapısındaki bu koruyucu mekanizmaların başlıcaları şunlardır:

- a) H_2O_2 'in yıkımını katalizleyen KAT enzimi NOx'nin oluşumunu önler
- b) SOD enzimi ana substratı olan $O_2^{\cdot-}$ 'in yanı sıra, reaktif bir tür olan NO'i çok daha az reaktif olan NO'e oksitler. Oksihemoglobin NO'i NO_3^- 'a oksitleyerek NOx'nin oluşumunu önler.
- c) NOS enzimleri, özellikle eNOS ve nNOS enzimlerinin aktivitesi kontrol altındadır. Bu sayede aşırı NO ve NOx'nin sentezi önlenir.
- d) H_2O_2 ve organik peroksitlerin yıkımını katalizleyen GSH-Px enzimi, $ONOO^-$ 'in yıkımını da katalizler.
- e) Metal iyonları özellikle $O_2^{\cdot-}$ 'in reaktif türlerinin yapımında son derece etkindirler. O_2 radikallerinin yapımındaki etkileri kadar olmasa bile, demir ve bakır iyonlarının NOx'nin yapımında da etkileri vardır. Fe (III) kompleksleri $NO_2^{\cdot-}$ 'i, NO_2^{+} 'a oksitleyerek nitrasyon tepkimelerine neden olabilirler. Bakır iyonları da nitrozotiyollerin hızlı bozunumunu katalizleyerek hızlı ve yüksek derişimde NO salınımına ve neticede nitrozatif strese neden olurlar. Bu nedenle metal iyonunu bağlayıcı proteinler (transferrin, ferritin, seruloplazmin gibi) reaktif NOx'ne karşı da bir koruma mekanizması oluştururlar¹²⁹.

7.1.9.1 Peroksinitrite Karşı Korunma Mekanizmaları

Normal koşullarda, düşük derişimde de olsa hücrelerde devamlı bir $ONOO^-$ yapımı vardır. Bu durumlarda hız kısıtlayıcı basamak ne kadar $O_2^{\cdot-}$ oluştuğudur. SOD enzimi, ortamdaki $O_2^{\cdot-}$ 'leri uzaklaştırdığından, $ONOO^-$ oluşumunu önleyen önemli bir koruma mekanizması oluşturur. Selenyum bağımlı GSH-Px enzimleri GSH'u kullanarak $ONOO^-$ 'i NO_2^- ve suya indirgerler. Bu özelliği nedeniyle GSH-Px enzimi NOx'ni detoksifiye eden tek enzimatik mekanizmayı oluşturur¹²⁹.

III.GEREÇ VE YÖNTEM

1.Deney Hayvanları

Çalışma için Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı alınmıştır. Grupları oluşturmak amacıyla Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edilen 250-300 gram arası Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanların her biri ayrı kafeslerde standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi.

2. Kullanılan Cihazlar

Basit Tartı

Elektronik Tartı (Sartorius basic)

Vorteks (Nüve NM 110-02488)

Homojenizatör (Heidolph DIAX 900 297000010)

Soğutmalı Santrifüj (Hermle Z 323 K)

Su Banyosu (Guft DBS 12734)

Spektrofotometre (UV-1208 Shimadzu)

Elisa Okuyucusu (Biokit EL_x 800 Bioekisa Reader)

Mikropipet

10-100 (Transferpette 01 Z 2517)

100-1000 (Genex Beta CR 59389)

40-300-8 kanallı-(Microlit MC 8/300)

Biopac Data Acquisition & Analysis System Cihazı

3.Uygulanan Ajanlar

Gruplara taşıyıcı (krebs), genel NOS inhibitörü L-NAME (100µM/L)^{12,154,155}, potent vazokonstriktör Endotelin-1 (100nM/L)¹⁵⁶, iNOS inhibitörü L-Canavanin

(1mM/L)¹⁵⁷, NO donörü Molsidomin (100µM/L)¹⁵⁸, bir diğer güçlü vazokonstriktör Ürotensin-II (10nM/L)^{159,160} ve Endotelin reseptör blokörü olarak Anti-Endotelin Reseptör A Antikoru iskemi başlangıcında verildi.

4.Çalışma Grupları

Denekler 8 gruba ayrıldı.

1-İ/R Kontrol Grubu (n=7) (İ/R-K)

2-Reperfüzyon Kontrol Grubu (n=6) (P-K)

3-L-NAME Grubu (n=9)

4-Endotelin-1 Grubu (n=8) (ET-1)

5-L-Canavanin Grubu (n=8)

6-Molsidomin Grubu (n=6)

7-Ürotensin-II Grubu (n=6) (U-II)

8-Endotelin-1 Reseptör Blokörü Grubu (n=6) (ET-1 Res. Bl.)

Çalışmamızda madde verilen gruplar çift kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Bunlardan biri olan P-K grubunda deney süresince perfüzyon kesimeden devam ettirilmiştir. İ/R-K grubunda ise madde verilen gruplar gibi stabilizasyon, iskemi ve perfüzyon süreçleri aynen uygulanmış ancak iskemi başında medikasyon yapılmamıştır.

5.Cerrahi İşlem

Ketamine HCl (60 mg/kg ip) ile anestezi altına alınan 250-300 gr. arası yetişkin erkek Wistar-Albino sıçanların göğüs kafesleri cerrahi olarak açıldı. Kalbin etrafındaki perikard tabaka sıyrılarak, aort ve pulmoner damarlar kesilerek hızla kalp disseke edildi. Buz içerisindeki krebs içeren petri kabına alınan kalpler, aortadan langendorf sistemindeki kanüle bağlanarak sabitlendi.

Langendorf sisteminde sol atrium vasıtasıyla sol ventrikül içine bir basınç ölçgere bağlı plastik balon yerleştirildi (Resim 1). Kalp atım hızını elde etmek için ikisi sağ ve sol atriümlara biri kalbin apeksine olmak üzere toplam üç adet EKG derivasyon uçları sabitlendi (Resim 1).



Resim 1. İzole Perfüze Kalp

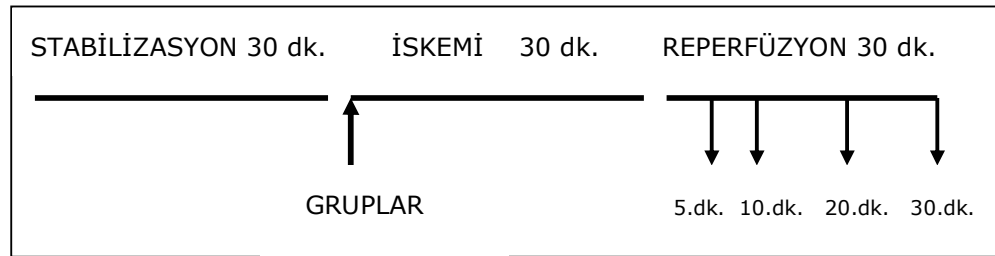
Langendorf sistemine bağlı kanüle aortadan asılmış izole perfüze kalpte sağda basınç ölçgere bağlı plastik balon atriumdan geçerek ventrikül içine yerleştirilmiş. Solda ise kırmızı, sarı, siyah renkte EGG derivasyon uçları görülmekte.

6.İzole Perfüze Kalp

Langendorff sisteminde kalpler, aortadan kanüle edildikten sonra Krebs-Henseleit (KH) solüsyonu (mM) 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 25,2 mM NaHCO_3 , 11,1 mM Glükoz ile, sabit hızda perfüze edildi. Perfüzattan % 95 O_2 ve %5 CO_2 geçirildi ve 37 °C'da tutuldu (Resim 1).

7. Deney Protokolü

Langendorf perfüze sıçan kalpleri 30 dk. stabilizasyon ve 30 dk. global iskemiye takiben 30 dk. reperfüzyona tabii tutuldu. İskemi, akımın kesilmesiyle sağlandı (Şekil 16). Miyokard performansı, NO_2^- ve NO_3^- olarak NO_x çıkışı , lipid peroksidasyonu göstergesi olarak MDA peroksidasyonu, protein oksidasyon ürünleri göstergesi olarak protein karboniller, antioksidan kapasitesi göstergesi olarak RSH ve GSH monütere edildi.



Şekil 16. Deney Protokolü

8. Hemodinamik Çalışma

Kasılma fonksiyonu sol atrium vasıtasıyla sol ventrikül (LV) kavitesine bir basınç ölçgere bağlı plastik balon aracılığı ile ölçüldü. Sol ventrikül diastol sonu basıncı (LVEDP) balonun içine fizyolojik salin solüsyonu doldurularak 5-10 mmHg arasında tutuldu. Sol ventrikül basıncı ve türevleri (dp/dt maksimum ve minimum) devamlı olarak Biopac Data Acquisition & Analysis System cihazı ile kaydedildi. Hemodinamik (HD) parametreler iskemi öncesi ve reperfüzyonun 5, 10, 20 , 30. dakikalarında ölçüldü. Grupların LVDP (left ventricular developed pressure) ve (first derivative of maximum pressure) dp/dt maksimum ile (first derivative of minimum pressure) dp/dt minimum değerleri hesaplandı.

9. Perfüzat ve Doku Çalışması

Perfüzatlar 1, 5, 10 , 20 , 30. dk.'larda ependorf tüplerine toplandı ve

biyokimyasal analiz için -20 °C'da sıvı nitrojen ortamda saklandı. Reperfüzyon sonunda kalpler derhal yine sıvı nitrojen ortamda donduruldu ve derin dondurucuda -80 °C'da biyokimyasal analizler için saklandı. NOx, TBARS RSH seviyeleri perfüzlarda ölçüldü. GSH, TBARS, karbonil grupları ve NOx seviyeleri kalp dokusunda ölçüldü.

9.1. Perfüzat MDA Tayini

Perfüzat lipid peroksid seviyeleri Kurtel ve ark.'nın metoduyla belirlendi¹⁶¹. Kısaca lipid peroksidasyonu (LP), TBARS formasyonunun ölçümü ile belirlendi. Deney günü perfüzat oda ısısında 15 dk. inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 0,5 ml supernatan, 1 ml %15 (w/v) trikloroasetik asit (TCA), %0.375 (w/v) tiobarbitürik asit ve 0.25 N HCl içeren solüsyona eklendi. Santrifüje edilen örnekler, %0.02 (w/v) butil hidroksi toluen ilave edilmiş cam tüplere alındı. Daha sonra örnekler su banyosunda 100 °C kaynar suda ısıtıldıktan sonra soğutuldu ve santrifüjle çökelti ayrıldı. Her örneğin absorbansı 532 nm'de ölçüldü. LP seviyeleri MDA eküivalanı olarak ve ekstingtion katsayısı $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak hesaplandı¹⁶¹.

9.2. Perfüzat RSH Tayini

Total sülfidril gruplarının (RSH) seviyeleri Kurtel ve ark.'nın metoduyla tayin edildi¹⁶¹. Her örneğin 0,5 ml'si 100 mM Tris-HCl (pH 8.2), %1 sodyum dodesil sülfat ve 2 mM EDTA içeren solüsyonun 1 ml'si ile karıştırıldı. Karışım 25 °C'da 5 dk. inkübe edilip santrifüjle süpernatant ayrıldı. Her reaksiyon hacmine 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoik asit)/ DTNB 0.3 mM eklenip, 15 dk. 37 °C'de inkübe edildi. Örnekler spektrofotometrede 412 nm absorbansta ölçüldü. RSH seviyeleri 412 nm'de $13.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı ile hesaplandı.

9.3. Perfüzet ve Doku NOx Tayini

NOx seviyeleri Elisa ile vanadyum klorid (VCl_3)/Griess metoduyla okundu . Serum örneklerindeki NOx seviyeleri VCl_3 ile NO_3^- 'ın NO_2^- 'e indirgenmesine dayalı belirlendi. NO_2^- seviyeleri Griess reaksiyonu ile ölçüldü. NOx belirlemesinden önce dokular 5 hacim fosfat buffer salinde (PH:7) homojenize edildi ve 5 dk. 2000 g'de santrifüj edildi. Daha sonra 0,25 ml 0,3 M NaOH , 0,5 ml süpernatana eklendi. Oda ısısında 5 dk. inkübasyonu takiben 0,25 ml % 5lik (W/v) $ZnSO_4$ deproteinizasyon için eklendi. Karışım 14000 rpm de 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatant ölçümde kullanıldı^{162,163}. NO_3^- standart solüsyonu seri olarak dilüe edildi. Platein 100micro litre örnekle doldurulmasını takiben ve VCl_3 (100 µl) her deliğe eklenmesini takiben hızlıca Griess reagentleri olan sülfanilamid (SULF) (50 µl) ve N-(1-naphtyl) etilendiamid dihiyroklorid (NEDD) (50 µl) eklendi. İnkübasyondan sonra (30-45 dk.) örnekler 540 nm'de Elisa okuyucuda okundu. Perfüzet örneklerine de aynı prosedür uygulandı.

9.4. Doku MDA ve GSH Tayini

Kalp dokusu elde edildikten sonra -70 °C'de sıvı nitrojende analiz gününe kadar saklandı. MDA seviyeleri ve GSH seviyeleri spektrofotometrik olarak tayin edildi^{164,165}. LP TBARS formasyonu ölçülerek yapıldı. Kısaca doku örnekleri buz soğukluğunda TCA (doku ağırlığının 9 katı) içinde homojenize edildi. 3000 rpm de 10 dk. santrifüjü takiben 750 µl süpernatant üstüne aynı hacimdeki %0,67 (m/v) olacak şekilde tiyobarbitürük asit eklendi ve 15 dk. 100 °C'de ısıtıldı. Absorbans 535 nmde spektrofotometrede ölçüldü. LP seviyeleri MDA eküivalanı olarak ve ekstingtion katsayısı $1.56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ olarak hesaplandı. GSH seviyeleri modifiye edilmiş Elman metodu ile belirlendi. Homojenat 10 dk 3000 rpm de santrifüj edildi ve 0,5 ml süpernatant 2 ml 0,3 M Na_2HPO_4 2 H_2O solüsyonuna eklendi. 0,2 ml lik ditiobisnitrobenzoat (0.4 mg/ml 1% sodyum

sitrat) eklendi ve karıştırdıktan hemen sonra absorbans 412 nm de ölçüldü. GSH seviyeleri $13,600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. ekstinktion katsayısı ile hesaplandı. MDA, GSH ve RSH ölçümleri oda ısısında spektrofotometre ile yapıldı.

9.5. Doku Karbonil Grupları Tayini

Kalp dokularının bir kısmı protein karbonil ölçümü için homojenize edildi. Homojenizasyon 1:10 luk (w/v) olacak şekilde 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH:7,4) homojenize edildi. 10000 rpm de + 4 °C da 10 dk. santrifüjden sonra süpernatant faz alındı ve karbonil grubu analizine tabi tutuldu.

Dokudaki protein oksidasyonu Levine ve ark.'nın daha önce tarif ettiği şekilde süpernatantın dinitrofenil hidrazin ile olan reaksiyonunu ölçerek yapılan protein karbonil içeriğini ölçen bir kalorimetrik ölçüm ile yapıldı¹⁶⁶. Kısaca iki tüpe 1.0 ml'lik örnekler alındı, biri "test" diğer "kontrol" olarak işaretlendi. 2.5 M HCl içinde 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazine (DNPH)'den 4.0 ml test örneğine ve 4.0 ml 2.5 M HCl kontrol örneğine eklendi. İçerikler tamamiyle karıştırıldı ve karanlık odada oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Tüpler her 15 dk. da bir çalkalandı. Ardından % 20 lik TCA (w/v)'dan 5 ml her iki tüpe de eklendi ve karışım 10 dk. buz içinde bekletildi. Protein çökeltisi elde etmek için tüpler 3500 rpm de 20 dk. santrifüje edildiler. Süpernatant dikkatlice aspire edilerek alındı. Bunu yukarıda tarif edildiği şekilde % 10 luk TCA ile ikinci bir işlem izledi. Son olarak çökelti, reaksiyona girmemiş DNPH ve lipid artıklarını ortamdaki uzaklaştırmak için 4 ml etanol: etil asetat (1:1, v/v) ile 3 defa yıkandı. En son kalan protein çökelti 2 ml 6M guanidine hidroklorid içinde çözüldü ve 37 °C de 10 dk. inkübe edildi. Santrifüj ile çözünmeyen materyaller ayrıldı.

Doku protein karbonil içeriği doku protein konsantrasyonu olan ve daha

önce Lowry ve ark. tarafından ölçülen oranlama ile ifade edildi¹⁶⁷. Her örnek kontrol 2.5 M HCl uygulanan örneğe göre okundu. Örneklerin absorbanası 355-390 nm de ölçülerek karbonil içerik tesbit edildi ve $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ absorbanas katsayısı ile hesaplandı. Protein karbonil içerik nmol/mg olarak ifade edildi.

10.İstatistiksel Değerlendirme

Bilgisayarda 'SPSS; 12.0 for Windows' programı kullanılarak istatistiksel değerlendirme yapıldı. Gruplar arası farkları belirlemede ANOVA varyans analizi ve iki grup arası farkı belirlemede Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D (standart sapma) olarak ifade edildi. $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

IV.BULGULAR

1. Hemodinamik Bulgular

1.1 LVDP

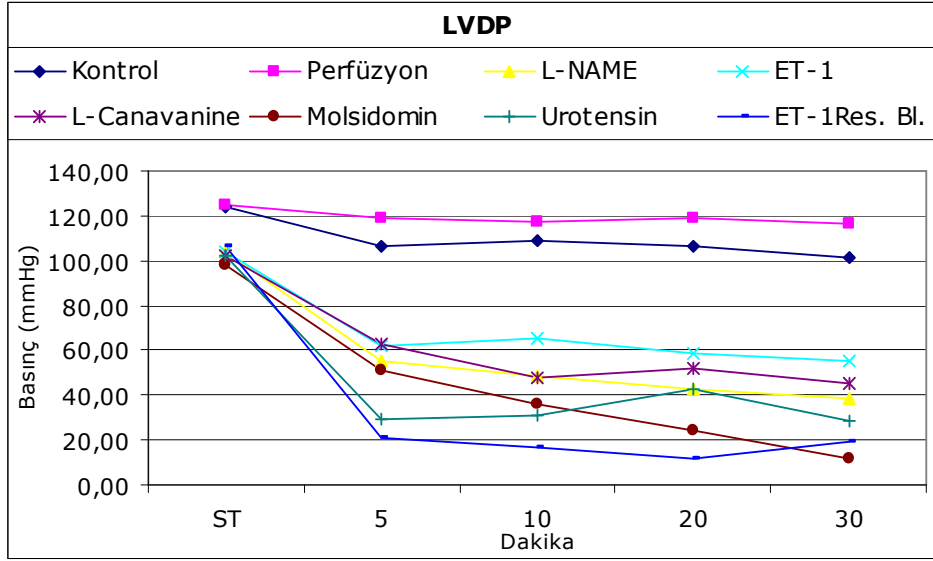
Tüm gruplarda LVDP değerleri özellikle ilk 5 dk. da ani düşme gösterdi. İlk 5 dk. da en fazla ET-1 Res. Bl. olmak üzere sırasıyla bunu U-II, Molsidomin, L-NAME, ET-1, L-Canavanin, İ/R-K ve P-K grupları izledi. Ancak P-K grubu ile İ/R-K grubu arasında fark yoktu ($p>0.05$). P-K grubu hariç olmak üzere LVDP, İ/R-K grubuna göre tüm diğer gruplarda anlamlı şekilde düştü (Tablo 6 ve Şekil 17). L-NAME verilen grupta LVDP, özellikle 5 dk. dan itibaren belirgin olmak üzere ölçüm yapılan 30 dk. boyunca azaldı ($p<0.001$). L-Canavanin verilen grupta ise LVDP yine 5. dk. da belirgin olmak üzere, ölçüm yapılan tüm zamanlarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düştü ($p<0.002$).

Tablo 6. Grupların LVDP Değerleri (mmHg)

	ST	5.dk	10.dk	20.dk	30.dk
İ/R-K	124,17±23,27	106,59±34,03	109,37±18,25	106,78±24,52	101,49±22,38
P-K	124,90±19,82	118,77±25,36	117,40±30,22	118,92±22,19	116,82±14,06
L-NAME	103,61±20,07	55,47±51,13	48,87±47,86	43,05±34,96	38,67±26,17
ET-1	103,82±14,60	62,35±51,00	65,69±47,86	58,96±34,96	55,50±26,17
L-Canavanin	102,41±9,01	62,79±42,87	47,75±40,53	52,00±30,52	45,31±27,70
Molsidomin	98,05±7,81	51,49±40,00	36,05±40,32	24,32±20,59	12,05±10,44
Urotensin	101,95±10,30	29,11±26,00	31,28±24,30	43±37,90	28,33±28,30
ET-1Res. Bl.	106,41±16,10	21,01±11,40	16,57±11,00	11,67±11,80	19,68±23,50

Molsidomin verilen gruba bakıldığında, LVDP tüm zamanlarda giderek ciddi şekilde anlamlı düşüş gösterdi ($p<0.004$). Bu azalma L-NAME ve L-Canavanin verilen grupların 30. dk. ölçümlerine göre de anlamlılık içeriyordu ($p<0.025$, $p<0.02$). Kısaca tüm gruplarda 30. dk. itibarıyla en fazla düşüş Molsidomin grubunda gerçekleşti. En az düşüş ise ET-1 verilen grupta oldu ve

LVDP tüm zamanlarda düşmekle beraber 20. dk. dan itibaren anlamlı sonuçlar verdi ($p<0.028$).



Şekil 17. Grupların LVDP Grafikleri

Tüm gruplar içinde en fazla düşüş ET-1 Res. Bl. verilen grupta gerçekleşti ve İ/R-K grubuna göre LVDP anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0.004$). ET-1 ve ET-1 Res. Bl. verilen gruplar karşılaştırıldığında LVDP, ET-1 Res. Bl. verilen grup en düşük, ET-1 grubu ise en yüksek sonuçları verdi. Özellikle 20. dk. dan itibaren bu iki grup arasındaki farklılık anlamlıydı ($p<0.02$). U-II grubunda LVDP ilk 5 dk. da bariz düştü ve 30 dk. ya kadar daha sabit bir seyir izledi ($p<0.004$). Sonuç olarak İ/R-K grubuna göre LVDP'de en az düşme ET-1 grubunda olurken Molsidomin ve özellikle ET-1 Res. Bl. gruplarında daha fazla düşüş meydana geldi.

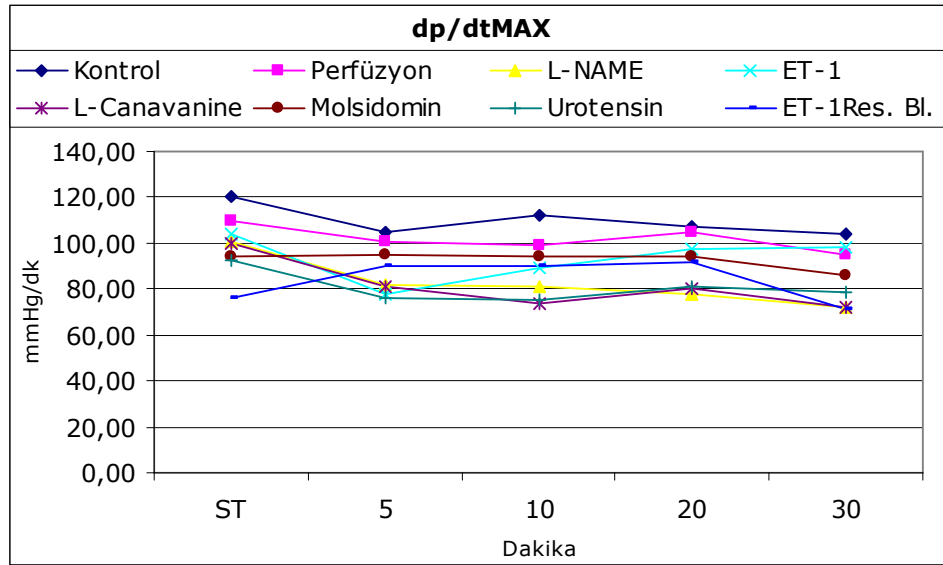
1.2 dp/dtmak

Kalbin kontraksiyon gücünü gösteren dp/dt maksimum (dp/dtmak) değerlerinde İ/R-K grubuna göre ET-1 ve Molsidomin verilen gruplarda anlamlı bir değişiklik olmazken diğer gruplarda düşüş meydana geldi (Tablo 7 ve Şekil

18). L-NAME ve L-Canavanin verilen gruplarda dp/dtmak ilk 5. dk.'da daha belirgin düşüş gösterdi ve 30 dk. boyunca birbirine yakın eğri oluşturarak İ/R-K grubuna göre anlamlı farklılık oluşturdular ($p<0.018$ ve $p<0.020$). U-II grubunda da dp/dtmak düşük seyretti ve bu İ/R-K grubuna göre anlamlıydı ($p<0.010$).

Tablo 7. Grupların dp/dt maksimum Değerleri (mmHg/dk)

	ST	5.dk	10.dk	20.dk	30.dk
İ/R-K	120,17±21,00	105,16±30,99	111,79±20,16	107,64±30,10	104,04±25,95
P-K	109,61±22,67	100,35±39,35	98,96±32,92	104,48±23,66	95,14±22,89
L-NAME	100,42±20,17	82,02±31,38	81,42±28,30	78,14±21,98	71,99±19,99
ET-1	104,23±18,27	77,48±48,27	89,50±41,59	97,32±29,70	98,54±21,04
L-Canavanin	99,90±16,24	81,24±31,99	73,89±25,68	80,12±16,36	72,4±12,32
Molsidomin	94,06±11,73	95,27±16,49	94,32±21,20	94,16±33,79	85,87±36,03
Urotensin	92,62±19,13	76,16±21,56	75,24±20,69	81,12±27,60	78,73±26,02
ET-1Res. Bl.	76,41±24,33	90,36±17,09	90,32±18,34	91,48±16,93	71,27±37,27



Şekil 18. Grupların dp/dt maksimum Grafikleri

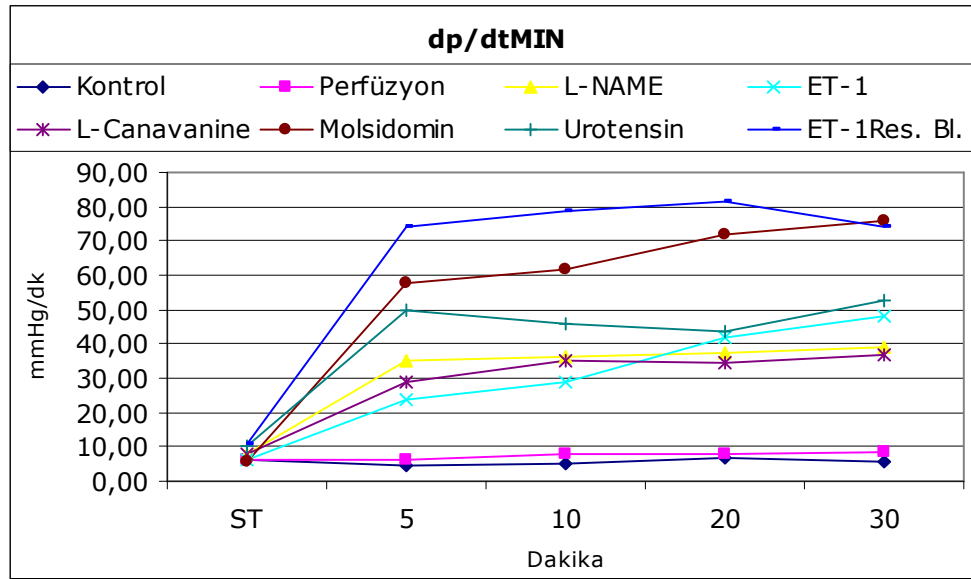
Kalpde ET-1 ve Molsidomin dp/dtmak üzerine daha olumlu etki gösterirken NOS inhibisyonu tam tersine olumsuz etki gösterdi. ET-1 Res. Bl.

grubunda ise İ/R-K grubuna göre bir fark yoktu (Tablo 7 ve Şekil 18).

1.3 dp/dtmin

Tablo 8. Grupların dp/dt minimum Değerleri (mmHg/dk)

	ST	5.dk	10.dk	20.dk	30.dk
İ/R-K	6,08±2,83	4,77±5,96	5,28±5,44	6,64±6,44	5,69±5,30
P-K	6,01±5,14	6,18±3,96	7,73±4,28	8,10±4,58	8,60±5,21
L-NAME	7,93±3,42	35,25±20,72	36,25±23,66	37,37±19,48	39,17±19,72
ET-1	6,09±6,14	23,94±44,15	29,07±26,43	41,72±23,71	48,07±24,52
L-Canavanin	7,80±2,63	28,93±20,65	34,92±17,15	34,60±22,58	36,90±21,75
Molsidomin	5,68±1,36	57,55±41,19	61,43±36,09	72,04±42,99	75,73±41,13
Urotensin	10,09±3,80	49,74±38,24	45,61±34,89	43,53±32,68	52,83±35,76
ET-1Res. Bl.	10,91±1,73	73,89±19,54	78,65±22,05	81,73±25,15	74,25±25,21



Şekil 19. Grupların dp/dt minimum Grafikleri

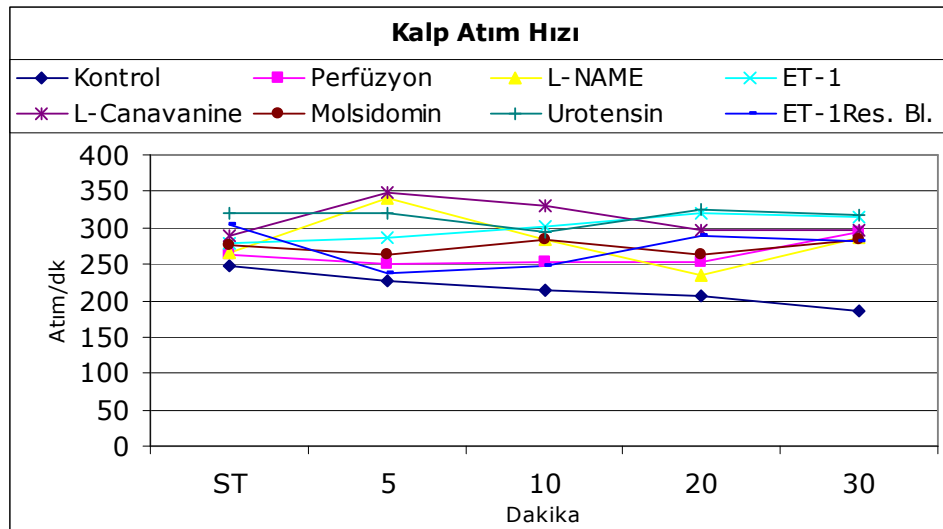
İ/R-K grubuna göre P-K grubu hariç diğer gruplarda dp/dtmin anlamlı olarak daha yüksek çıktı. ET-1 Res. Bl. grubunda dp/dtmin tüm gruplar içinde en yüksek eğri elde edildi ($p<0.004$). Molsidomin grubunda dp/dtmin giderek ciddi

bir yükselme gösterdi ve bu sonuçlar anlamlıydı ($p<0.003$). 30. dk.'da tüm gruplar arasında en yüksek değer Molsidomin grubundaydı. L-NAME ($p<0.002$) ve L-Canavanin ($p<0.003$) verilen gruplarda dp/dtmin, İ/R-K grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. ET-1 ($p<0.002$) ve U-II ($p<0.006$) gruplarında da dp/dtmin İ/R-K grubuna göre anlamlı artış gösterdi. Sonuç olarak en bariz ET-1 Res. Bl. ve Molsidomin en az olarakta NOS inhibitörleri olmak üzere tüm gruplarda dp/dtmin anlamlı olarak yükseldi (Tablo 8 ve Şekil 19).

1.4 Kalp Atım Hızı

Tablo 9. Grupların Kalp Atım Hızı Değerleri (atım/dk)

	ST	5.dk	10.dk	20.dk	30.dk
İ/R-K	230,4±24,7	228,2±54,8	215,3±51,5	206,2±59,0	185,9±71,7
P-K	253,1±48,9	253,1±48,9	253,1±48,9	253,1±48,9	253,1±48,9
L-NAME	267,0±57,1	340,2±142,8	284,1±162,2	235,1±107,5	287,3±122,5
ET-1	279,9±58,1	286,4±116,1	301,5±145,9	319,1±107,6	314,6±86,8
L-Canavanin	289,8±55,9	347,9±147,5	330,1±121,1	295,5±97,8	295,7±77,9
Molsidomin	277,3±73,9	263,8±121,1	182,8±124,1	261,9±61,4	283,7±98,5
Urotensin	320,5±92,9	319,2±143,7	294,9±139,3	324,9±152,1	316,4±160,1
ET-1 Res. Bl.	303,9±60,2	238,4±153,2	248,5±146,8	289,2±148,0	282,5±186,4



Şekil 20. Grupların Kalp Atım Hızı Grafikleri

Kalp atım hızı İ/R-K grubu ile diğer gruplar arasında reperfüzyonda anlamlı bir farklılık göstermedi. Kalp atım hızında en fazla artış ET-1 ve U-II gruplarında ortaya çıktı ancak diğer gruplarla aralarında anlamlılık yoktu (Tablo 9 ve Şekil 20).

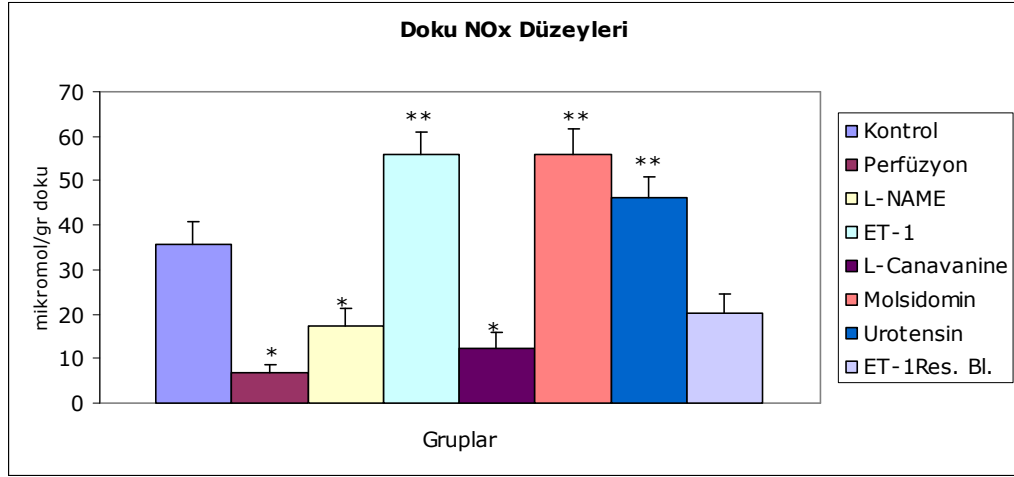
2. Biyokimyasal Bulgular

Tablo 10. Doku Protein Karbonil, MDA, GSH, NOx Değerleri

	Karbonil (nmol/mg protein)	MDA (nmol/gr doku)	GSH (nmol/gr doku)	NOx (nmol/gr doku)
İ/R-K	0,12±0,06	16,70±1,30	1,12±0,12	35,55±5,37
P-K	0,13±0,02	3,30±1,10	2,40±0,50	6,68±1,89
L-NAME	0,16±0,03	9,30±1,00	1,56±0,18	17,50±3,67
ET-1	0,18±0,04	20,00±1,30	1,08±0,06	56,06±4,99
L-Canavanin	0,14±0,16	7,90±0,90	1,70±0,22	12,33±3,43
Molsidomin	0,20±0,03	18,60±1,50	1,00±0,20	55,80±5,86
U-II	0,30±0,02	19,90±1,20	1,10±0,10	46,23±4,73
ET-1 Res. Bl.	0,30±0,02	12,70±1,10	1,40±0,16	20,07±4,58

2.1 Doku NOx Düzeyleri

Doku NOx düzeyleri, P-K grubuna göre sırasıyla iskemi ($p<0.003$), U-II ($p<0.004$), Molsidomin ($p<0.004$), ET-1 ($p<0.002$) gruplarında en yüksek, L-Canavanin ($p<0.002$) ve L-NAME'de ($p<0.001$) düşük, ET-1 Res. Bl. verilen grupta İ/R-K grubuna göre düşük ($p<0.003$) perfüzyon grubundan yüksek bulundu ($p<0.004$) (Tablo 10 ve Şekil 21). İ/R-K grubuna göre de sırasıyla U-II ($p<0.015$), Molsidomin ($p<0.003$) ve ET-1 ($p<0.001$) grupları anlamlı yüksek değerlere ulaştı.

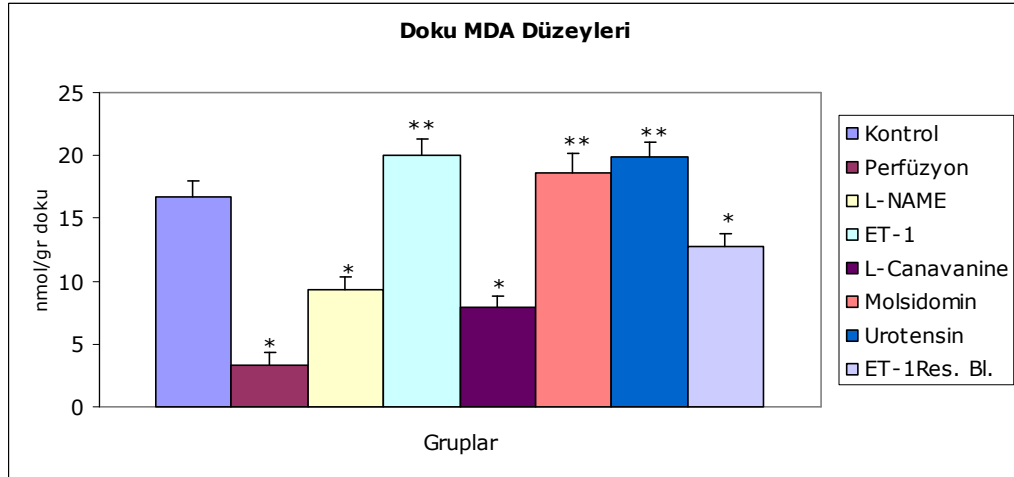


Şekil 21. Grupların Doku NOx Grafiği

*Kontrol grubuna göre anlamlı düşük çıkan gruplar

** Kontrol grubuna göre anlamlı yüksek çıkan gruplar

2.2 Doku MDA Düzeyleri



Şekil 22. Grupların Doku MDA Grafiği

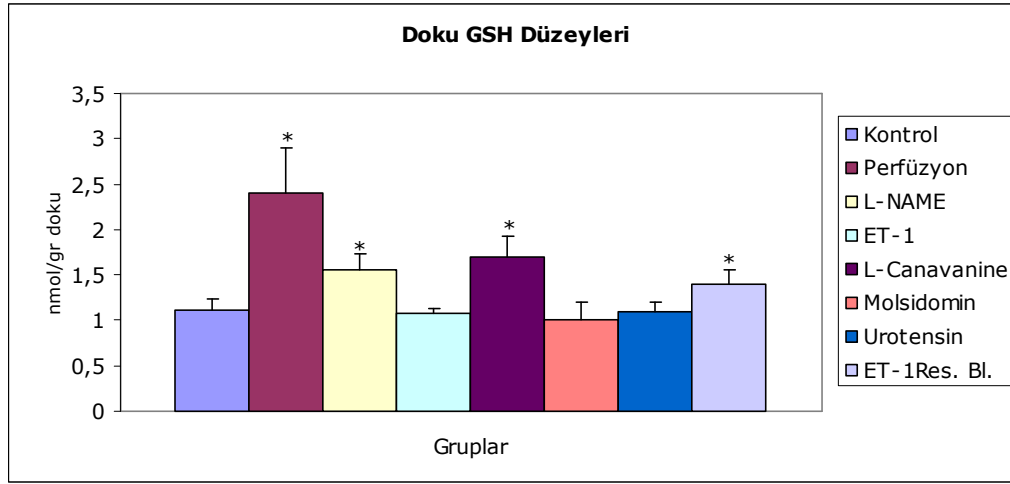
*Kontrol grubuna göre anlamlı düşük çıkan gruplar

** Kontrol grubuna göre anlamlı yüksek çıkan gruplar

Doku MDA düzeyleri, P-K grubuna göre sırasıyla ET-1 ($p<0.002$), U-II ($p<0.004$), Molsidomin ($p<0.004$) ve İ/R-K ($p<0.003$) gruplarında yüksek

düzeylerde bulundu. P-K grubuna göre L-NAME ($p<0.001$) ve L-Canavanin ($p<0.002$) gibi NO inhibitörleri MDA artışına neden olmakla birlikte diğer gruplara göre bu yükseliş daha az idi. ET-1 Res. Bl. verilen grupta P-K grubuna göre orta düzeyde bir artış gözlemlendi ($p<0.008$) (Tablo 10 ve Şekil 22).

2.3 Doku GSH Düzeyleri



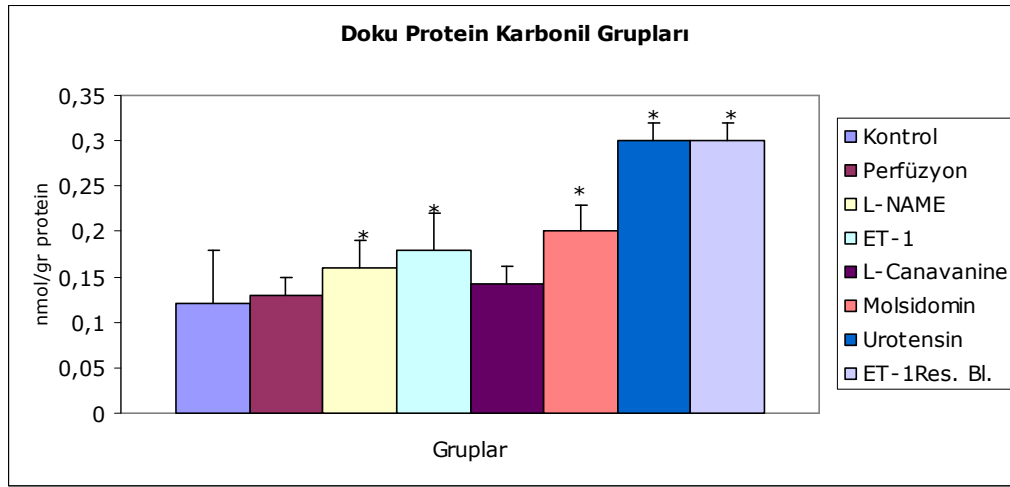
Şekil 23. Grupların Doku GSH Grafiği

*Kontrol grubuna göre anlamlı yüksek çıkan gruplar

Doku GSH düzeyleri MDA düzeylerinin tam tersi yönde sonuç verdi (Tablo 10 ve Şekil 23). P-K grubuna göre sırasıyla L-Canavanin ($p<0.002$), L-NAME ($p<0.002$), ET-1 Res.Bl. ($p<0.004$), İ/R-K ($p<0.003$), U-II ($p<0.004$), ET-1 ($p<0.002$), Molsidomin ($p<0.004$) gruplarında GSH seviyeleri düşme gösterdi. İ/R-K grubuna göre en fazla anlamlı artış P-K grubunu hariç tutarsak, L-NAME ve L-Canavanin verilen gruplarda oldu ($p<0.001$). ET-1 Res. Bl. verilen grup kontrol grubuna göre anlamlı yüksek ($p<0.003$) perfüzyon grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0.004$).

2.4 Doku Protein Karbonil Grupları

Doku protein karbonil gruplarına bakıldığında, İ/R-K grubuna göre perfüzyon ve L-Canavanin verilenler hariç, tüm gruplarda anlamlı artış oldu (Şekil 24 ve Tablo 10). Sonuçlar P-K ve İ/R-K gruplarında birbirine yakın bulunurken, en çok U-II ($p<0.003$) ve ET-1 Res. Bl. ($p<0.003$) gruplarında olmak üzere, L-NAME ($p<0.013$), Molsidomin ($p<0.004$) ve ET-1 ($p<0.028$) verilen grupta yükselmiş bulundu. En belirgin artış ET-1 Res. Bl, U-II ve Molsidomin verilen gruplarda meydana geldi.



Şekil 24. Grupların Doku Protein Karbonil Grafiği

*Kontrol grubuna göre anlamlı yüksek çıkan gruplar

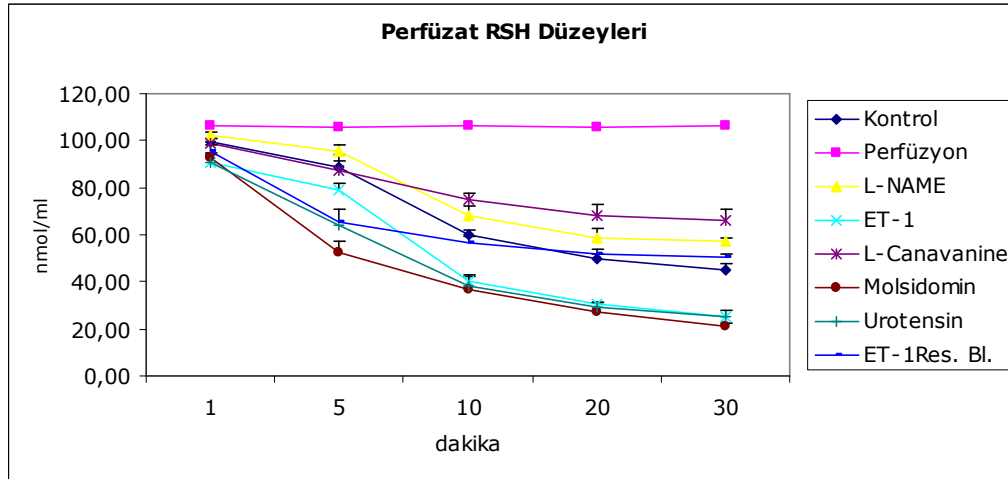
2.5 Perfüzat RSH Düzeyleri

Antioksidan etkili RSH düzeyleri MDA düzeylerinin tersi bir görüntü gösterdi (Tablo 11 ve Şekil 25). Perfüzat RSH düzeyleri P-K grubunda değişmezken diğer tüm gruplarda giderek düşüş gösterdi. P-K grubuna göre en yüksekten düşüğe sıralamada, L-Canavanin ($p<0.002$), L-NAME ($p<0.001$), ET-1 Res. Bl. ($p<0.004$), İ/R-K ($p<0.001$), U-II ($p<0.004$), ET-1 ($p<0.002$) ve Molsidomin ($p<0.004$) anlamlı olarak düşüş gösterdi. İ/R-K grubuna göre ise L-Canavanin ($p<0.001$) ve L-NAME ($p<0.001$) anlamlı yüksek, sırasıyla U-II

($p<0.003$), ET-1 ($p<0.001$) ve Molsidomin ($p<0.003$) anlamlı düşük bulundu.

Tablo 11. Grupların Perfüzat RSH Değerleri (nmol/ml)

	1. dk.	5. dk.	10. dk.	20. dk.	30. dk.
İ/R-K	99,47±1,73	88,57±5,77	59,80±1,98	49,64±2,15	45,00±2,73
P-K	106,05±1,30	105,50±1,08	106,17±1,08	105,70±1,60	106,08±1,50
L-NAME	102,10±1,50	95,54±2,40	68,34±3,80	58,75±3,90	57,40±1,20
ET-1	90,87±3,30	79,03±2,60	40,49±2,20	30,4±1,30	25,42±2,2
L-Canavanin	99,1±1,7	87,10±4,50	74,70±2,70	68,20±4,70	66,18±4,60
Molsidomin	92,60±2,10	52,50±4,70	36,90±5,60	27,00±4,30	21,40±1,13
U-II	90,50±3,40	64,40±14,40	38,40±9,50	29,30±3,90	25,50±1,90
ET-1 Res. Bl.	95,30±3,00	65,30±5,50	56,80±2,40	52,00±1,70	50,20±1,30



Şekil 25. Grupların Perfüzat RSH Grafiği

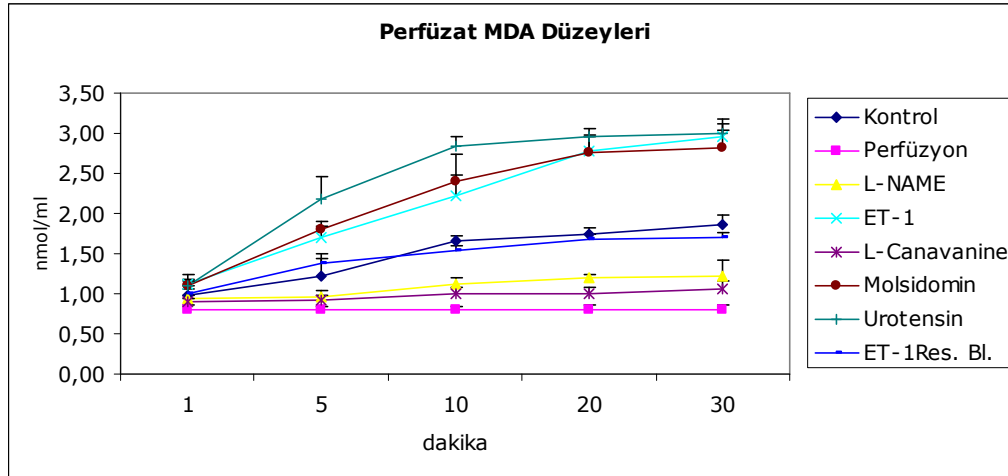
2.6 Perfüzat MDA Düzeyleri

Perfüzatlarda MDA özellikle 30. dk. da, doku düzeylerini yansıtır şekildeydi (Tablo 12 ve Şekil 26). MDA düzeyleri P-K grubuna göre sırasıyla L-Canavanin ($p<0.002$), L-NAME ($p<0.001$), ET-1 Res. Bl. ($p<0.004$), İ/R-K ($p<0.003$), Molsidomin ($p<0.004$), ET-1 ($p<0.002$) ve U-II ($p<0.004$) gruplarında anlamlı olarak yükseldi. İ/R-K grubuna göre L-NAME ($p<0.001$) ve L-Canavanin anlamlı

düşerken sırasıyla, Molsidomin ($p<0.003$), ET-1 ($p<0.001$) ve U-II ($p<0.003$) anlamlı olarak yükseldiler. ET-1 Res. Bl. verilen grupta yükselmiş olmasına karşın İ/R-K grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık yoktu ($p<0.100$).

Tablo 12. Grupların Perfüzat MDA Değerleri (nmol/ml)

	1. dk.	5. dk.	10. dk.	20. dk.	30. dk.
İ/R-K	0,99±0,11	1,22±0,23	1,66±0,06	1,75±0,08	1,86±0,11
P-K	0,80±0,06	0,80±0,04	0,80±0,04	0,80±0,06	0,80±0,06
L-NAME	0,94±0,05	0,97±0,07	1,13±0,07	1,20±0,05	1,23±0,20
ET-1	1,13±0,12	1,70±0,21	2,22±0,25	2,78±0,21	2,97±0,20
L-Canavanin	0,90±0,04	0,93±0,04	1,00±0,08	1,01±0,07	1,07±0,08
Molsidomin	1,10±0,08	1,80±0,04	2,40±0,35	2,76±0,20	2,82±0,23
U-II	1,09±0,07	2,19±0,26	2,84±0,13	2,97±0,09	3,00±0,12
ET-1 Res. Bl.	1,00±0,07	1,39±0,12	1,55±0,06	1,69±0,06	1,70±0,07



Şekil 26. Grupların Perfüzat MDA Grafiği

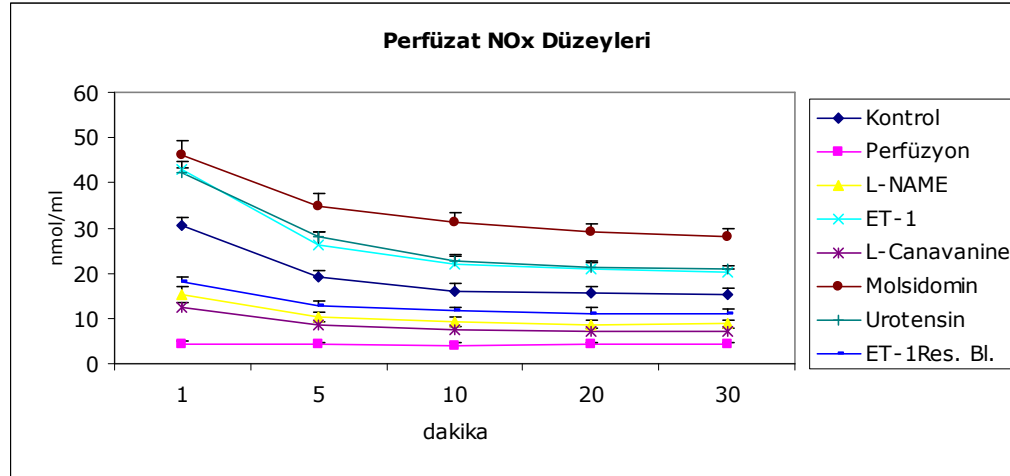
2.7 Perfüzat NOx Düzeyleri

Perfüzat NOx düzeyleri P-K grubunda değişmezken, diğer gruplarda zamana bağlı azalmakla beraber P-K grubundan yüksekti (Tablo 13 ve Şekil 27). P-K grubu dışındaki gruplarda ilk 5 dk. da belirgin düşme meydana geldi. P-K grubuna göre yüksekten düşüğe sırasıyla Molsidomin ($p<0.004$), U-II ($p<0.004$),

ET-1 ($p<0.002$), İ/R-K ($p<0.003$), ET-1 Res. Bl. ($p<0.004$), L-NAME ($p<0.001$) ve L-Canavanin ($p<0.003$) grupları anlamlı yüksekti. NOx değerleri, İ/R-K grubuna göre ET-1 ($p<0.001$), U-II ($p<0.003$) ve Molsidomin ($p<0.003$) anlamlı yüksek sonuç verirken, ET-1 Res. Bl. ($p<0.003$), L-NAME ($p<0.001$) ve L-Canavanin ($p<0.002$) anlamlı düşük çıktı.

Tablo 13. Grupların Perfüzat NOx Değerleri (nmol/ml)

	1. dk.	5. dk.	10. dk.	20. dk.	30. dk.
İ/R-K	30,66±1,75	19,02±1,60	16,01±1,80	15,73±1,28	15,41±1,20
P-K	4,39±0,52	4,19±0,45	4,07±0,53	4,11±0,43	4,19±0,48
L-NAME	15,09±2,02	10,23±1,16	9,21±1,04	8,66±0,77	8,78±0,74
ET-1	42,82±1,94	26,20±3,08	21,95±1,66	20,96±1,25	20,30±0,69
L-Canavanin	12,44±1,10	8,40±0,90	7,50±0,50	7,05±0,70	7,24±0,70
Molsidomin	46,05±3,27	34,97±2,60	31,07±2,20	29,17±1,58	28,07±1,84
U-II	42,21±1,12	28,01±1,16	22,84±1,36	21,28±1,50	20,77±0,82
ET-1 Res. Bl.	18,12±1,00	12,67±1,19	11,61±0,94	11,16±1,23	10,87±1,15



Şekil 27. Grupların Perfüzat NOx Grafiği

Kalp İ/R'da elde ettiğimiz hemodinamik artı biyokimyasal bulgularımızla vardığımız sonuçları ve mevcut literatür bilgilerini aşağıda tartışmaya çalıştık.

V.TARTIŞMA

İskemik kalpte reperfüzyonda oluşan $O_2^{\cdot -}$ 'i de içeren ROT reperfüzyonun ilk dakikasında yüksek konsantrasyonlara ulaşırlar¹⁶⁸. Son zamanlarda yaşlanmanın da etkenleri arasında sayılan bu radikaller çok hızlı reaksiyona girerek özellikle lipid yapıların (lipid peroksidasyonu) ve proteinlerin (karbonil grupları) bozulmalarına neden olmaktadır^{169,170}. Bu yapıların oluşumunun önlenmesi ya da oluşuktan hemen sonra ortamdan uzaklaştırılması doku hayatiyeti ve fonksiyonları açısından önemlidir.

Koroner perfüzyon miyokard fonksiyonlarının devam ettirilebilmesi için hayati bir faktördür. İ/R hasarı olasılıkla miyositler, koroner endotel ve düz kaslarını etkilemektedir. Koroner sirkülasyonda hasarlanma NO mekanizmalarına dayalı olabilir¹⁷¹. Çalışmaların büyük çoğunluğu NO'nin miyokard İ/R hasarında faydalı etkileri olduğunu söylerken az miktardaki çalışma da NO'nun zararlı etkilerinden bahsetmektedir. Miyokardiyal iskemi gibi patolojik durumlarda NO'nun rolü tam net değildir çünkü pozitif ve negatif etkilerin her ikisi de değişik deneysel çalışmalarda gösterilmiştir^{11,154,155}. NO, miyokardiyum üzerinde negatif inotropik ve kronotropik etki meydana getirmektedir¹⁶⁸. Çalışmamızda izole kalp fonksiyonlarında NO ve NOS inhibisyonu U-II, ET-1 ve ET-1 reseptör blokajının etkilerini araştırdık. Bu çalışma izole kalpte artmış oksidatif stresin ve azalmış kalp fonksiyonlarının sebebinin NO olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda madde verilen gruplar çift kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Bunlardan biri olan P-K grubunda deney süresince perfüzyon kesmeden devam ettirilmiştir. İ/R-K grubunda ise madde verilen gruplar gibi stabilizasyon, iskemi ve perfüzyon süreçleri aynen uygulanmış ancak iskemi

başında medikasyon yapılmamıştır. Bir anlamda P-K grubu ile fizyolojik sürece yakın referans değerler izlenirken İ/R-K grubu ile patolojik sürece yakın referans değerler elde edilmiştir.

İzole sıçan kalbi sadece Ca^{2+} bağımlı NOS aktivitesine sahiptir ve miyokardiyumda iNOS aktivitesinin ölçülebilmesi için en az 2 saat in vitro ekzotoksin ve/veya pro-inflamatuar sitokinlerin salınımı gereklidir¹⁶⁸. Ca^{2+} bağımsız NOS tarafından oluşturulan NO miyokardiyal kontraktıl fonksiyonda depresyona katkı sağlamaktadır¹⁴⁴. NO inhibitörlerinin konsantrasyona bağlı olarak mekanik fonksiyonlar ve enerji metabolizması üzerine çift yönlü etkilerinin olduğu söylenmektedir¹⁵⁵. Oksidatif hasarın baskılanması sebebiyle NOS inhibisyonu yararlı olmakla beraber NOS'un kuvvetli vazoaktif inhibisyonu İ/R hasarını arttırmaktadır¹⁵⁵. İzole tavşan kalplerinde İ/R'da L-NAME mekanik fonksiyon bozukluklarında düzelmede artış sağlamıştır. İ/R'da serbest radikallerin akut salınımı KDU oluşumuna katkıda bulunmaktadır¹⁶⁸. Wahida ve ark. L-NMMA'nın konsantrasyona bağlı koruyucu aktivitesini inceledikleri çalışmada 10mM'de optimal koruyuculuk olduğunu ve daha yüksek konsantrasyonlarda bu koruyucu aktivitenin kaybolduğunu buldular. Bu da NO sentezinin parsiyel inhibisyonunun kalbi KDU'dan koruduğunu düşündürmüştür¹⁶⁸. Bu durumda aşırı NO üretimini ve reperfüzyonda ONOO⁻ yapımını azaltan ancak fizyolojik NO üretimine minimal etkili bir NOS inhibitörünün seçimi ve konsantrasyonu çok önemli olabilir. İskemide serbest radikaller gibi dakikalar içinde NO üretiminde de hızlı değişiklikler meydana gelmektedir. Bizim sonuçlarımız da bunu doğrulamaktadır. İ/R-K grubunda NO salınımı P/K grubundan daha fazlaydı. NO açısından, bizim sonuçlarımız reperfüzyonda tüm gruplarda NO salınımının kademe kademe düştüğünü gösterdi. L-NAME, L-Canavanin ve ET-1 Res. Bl. verilen gruplarda iskemi grubuna göre en düşük NO seviyeleri saptandı.

Molsidomin belirgin olarak perfüzatta NO salınımını arttırdı. ET-1 ve U-II'de NO salınımını arttırdı. Benzer bulgular doku NOx seviyelerinde de bulundu. Bu sonuçlar endotel hücrelerinde ET-1'in ET-B reseptörleri üzerinden, U-II'nin eNOS'u uyararak NO salınımını uyardığı bilgisine uyuyordu^{122,160}. NOx değerleri NO donörü verilen gruplarda beklenildiği gibi yüksek, inhibitör verilen gruplarda düşük bulunmuştur^{172,173,174}. Molsidomin, ET-1 ve U-II kalp dokusunda NOx seviyelerini anlamlı olarak arttırırken L-NAME ve L-Canavanin, her ikisi de anlamlı olarak inhibe ettiler.

Doku ve perfüzat MDA düzeyleri ele alındığında beklendiği gibi iskemiye takip eden reperfüzyonun oksidan stresi arttırdığı gözlenmektedir. Gupta ve ark. İ/R'dan sonra miyokardial dokuda GSH düzeylerinde ciddi düşüş MDA seviyelerinde anlamlı artış gözlediler¹⁷⁵ ve bu sonuçlar çalışmamızı onaylamaktadır. Çalışmamızda İ/R, MDA seviyelerini kardiyak doku ve perfüzatta arttırdı ve antioksidan etkiyi azalttı. NO donörü olarak Molsidomin bu etkiyi daha da kötüleştirmiştir. MDA ve NO'nun arttığı olgularda NO'nun oksidan hasarı arttırıcı bir etkide bulunduğu gözlenmiştir^{176,177,178}. Bizim sonuçlarımız ET-1 Res. Bl.'nün doku GSH seviyelerini arttırdığını ve doku ile perfüzat MDA seviyelerini azalttığını gösterdi. Çalışmamızda U-II ve ET-1 oksidatif hasarı arttırıcı rol oynarken, NO buna paralel bir etkide bulundu. ET-1 ve U-II'de kuvvetli vazokonstriktör maddeler olarak MDA düzeylerini arttırmıştır^{159,175}. Bizim bulgularımızda reperfüzyon periyodunda perfüzat RSH seviyeleri azaldı ve MDA seviyeleri arttı. Bu değişimler zamana bağlı olarak en yüksek reperfüzyonun 30. dk.'da saptandı. Molsidomin bu etkileri kötüleştirdi. Bu bulgulara paralel olarak Molsidomin verilen grupta NO'ya bağlı bozukluğun göstergesi olarak MDA ve karbonil grup seviyeleri yükseldi ve GSH seviyeleri düştü. Bu çalışmada kardiyak İ/R sonrası protein karbonil grup seviyeleri literatüre ilk defa sunuldu. Doku

protein karbonil grupları bir başka oksidan stres belirticidir¹⁷⁹. Elde edilen bulgular protein karbonillerinin yağlarının oksidan strese maruz kalışından daha geç meydana gelen bir olgu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Zira artış olan gruplarda bu artışlar anlamlı değildi. Ancak ET-1 Res. Bl. ve U-II'nin özellikle protein oksidasyonuna neden olduğu gözlenmiştir. NO donörü olarak Molsidomin bu süreci kötüleştirdi çünkü Molsidomin dışında L-NAME ve L-Canavanin verilen gruplar iskemi grubuna göre anlamlı yüksek karbonil seviyeleri göstermediler.

Verilerimiz göstermiştir ki NO direkt olarak kalp kası fonksiyonunu etkilememektedir. Çalışmamızda P-K ve İ/R-K gruplarına göre tüm madde verilen gruplarda, kalp fonksiyonları üzerine negatif etkilerinden dolayı, LVDP seviyeleri azaldı. İlk 5 dk. da LVDP'de en hızlı düşüş ET-1 Res. Bl. verilen grupta meydana geldi ancak 30. dk da en fazla düşüş Molsidomin verilen grupta oldu. Bu da dışarıdan verilen NO'nun kalp kasılma gücünü azalttığını göstermektedir¹⁷³. Oysa NO inhibisyonu yapılan gruplarda bu kadar fazla düşüş olmadı. L-NAME ve L-Canavanin verilen gruplardaki LVDP değerleri göreceli yüksekliği NO'nun negatif inotropik etkisini göstermektedir. Han H ve ark.'nın çalışmasında da L-NAME (100 microM) verilen grupta LVDP düşük bulunmuştu¹⁵⁴. Yasmin ve ark. NOS inhibitörü L-NMMA'nın reperfüzyon sırasında mekanik fonksiyonlarda anlamlı bir düzelmeye sebep olduğunu gösterdiler¹⁶⁸. Yasmin ve ark. NO sentezinin parsiyel inhibisyonunun kalbi KDU'dan korumada gerekli olduğunu ileri sürdüler¹⁶⁸. NO'nun ortamda bulunması LVDP üzerinde olumlu etki yapmamaktadır. ET-1 verilen grupta ise LVDP'deki azalma en az olmuştur. U-II endoteline göre LVDP yi daha etkili azalttı. U-II ve ET-1 her ikisi ve şüphesiz Molsidomin doku ve perfüzatta NOx seviyelerini arttırdı fakat ET-1 Res.Bl. NOx'i inhibe etti. Bizim sonuçlarımız da Molsidomin grubunda, iskemik grupla karşılaştırıldığında LVDP'ni anlamlı olarak düşürdüğünü gösterdi. U-II ve ET-1 her ikisi de LVDP ile gösterilen

kalp fonksiyonunu azalttı ve bu etki üzerine ET-1 Res. Bl. iyileştirici etki göstermedi. Hemodinamik çalışmalarda ET-1 Res. Bl., Molsidomin verilen gruba yakın bir etkide bulundu. Bu durum ET reseptör antagonistleri İ/R sırasındaki NO etkisini arttırabilirler tezine uyuyordu^{12,123,128}. Önceki çalışmalar ET reseptör antagonistlerinin kalp fonksiyonlarını iyileştirdiğini gösterse de^{127,180} son çalışmalar İ/R'da ET reseptör antagonistlerinin kalbi koruyucu etkisinin NOS inhibisyonu ile ortadan kalktığını göstermiştir^{126,181}. Son yapılan bir çalışmada ET reseptör blokajının artmış eNOS ekspresyonu ile birlikte olduğunu gösteriyordu¹².

Hemodinamik verilerimiz göstermiştir ki NO'nun kalp kontraksiyonuna herhangi bir direkt etkisi yoktur. Dp/dtmak açısından tüm gruplar arasında anlamlı farklılıklar görülmedi. U-II, L-NAME ve L-Canavanin'de düşüş daha belirgindi. Han H ve ark.nın çalışmasında da L-NAME (100 microM) verilen grupta dp/dtmak düşük bulunmuştu¹⁵⁴. Kalpte ET-1 ve Molsidomin dp/dtmak üzerine daha olumlu etki gösterirken NOS inhibisyonu (L-NAME ve L-Canavanin) tam tersine olumsuz etki gösterdi. Endojen NO üretiminin kardiyak kontraktilite için daha etkili dozajda olduğu ve eksojen NO verilmesinin kardiyak kontraktilite fonksiyonunu kötüleştirdiği ileri sürülebilir. Ancak bazı diğer faktörler reperfüzyon sırasındaki kontraktilite değişikliklerinden sorumlu olabilir.

Dp/dtmin'a bakıldığında NOS inhibisyonu yapan L-NAME ve L-Canavanin'de en az yükselme olduğu görüldü. En fazla artış ise Molsidomin ve ET-1 Res. Bl. verilen gruplarda ortaya çıktı. Bu sonuçlara göre Molsidomin ve ET-1 Res. Bl. verilen gruplarda dp/dtmin'daki belirgin artış, dp/dtmak'daki az da olsa düşüşle beraber değerlendirildiğinde LVDP'de en fazla düşüşün yine bu iki grupta olmasını açıklayabilir. İ/R'da fazladan NO verilmesi kalp fonksiyonları üzerinde olumlu etki yapmamaktadır.

U-II kardiovasküler sistem, santral sinir sistemi ve böbrek dahil olmak üzere birçok dokuda üretilen siklik yapıda bir peptittir ve şimdiye kadar gösterilmiş en potent vazokonstriktördür^{13,160}. U-II plazma konsantrasyonu sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu olarak bilinen sol ventrikül sistolik fonksiyonu ile ters ilişkilidir¹³. U-II, hem NO ve Pg.'ler üzerinden endotel-bağımlı vasodilatasyona hem de vasküler düz kas hücreleri üzerinden endotelden-bağımsız vasokonstriksiyona neden olmaktadır; net etki incelenen türlere, vasküler yatağa ve reseptör yoğunluğuna göre farklılık göstermektedir¹⁷⁰. İnsanlarda U-II'nin etkisinin faydalı mı zararlı mı olduğu henüz netleşmemiş olmakla birlikte U-II ve reseptörünün koroner ve karotid arterlerdeki aterosklerotik plaklarda da gösterilmiş olması, U-II'nin çeşitli intrasellüler sinyal mekanizmalarıyla vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olduğunun saptanması dolayısıyla aterosklerozun ilerlemesine katkıda bulunuyor olabileceği düşünülmektedir^{13,160,182}. Dolayısıyla U-II antagonistleri vazospazmın ve vasküler yeniden yapılanmasında faydalı olabilirler¹³. L-NAME, sıçanlarda U-II'nin in vivo sistemik depresör etkilerini azaltmakta ve vasküler kontraktıl etkisini arttırmaktadır¹⁶⁰. NOS inhibitörleri perfüze kalplerde koroner arterlerin maksimum kontraksiyonlarını arttırmakta ve U-II'ye karşı gecikmiş vazodilatasyonu inhibe etmektedir¹⁶⁰. Bu bulgular, U-II'nin vasküler tonusu NO salınımı üzerinde modüle ettiğini düşündürmektedir. U-II sıçanlarda eNOS artışını uyarmış ve NO üretimine sebep olmuştur¹⁶⁰. Bizim sonuçlarımızda da ET-1 ve U-II oksidan aktiviteyi ve NO oluşumunu arttırdı ve antioksidanları inhibe etti. ET-1 Res. Bl. oksidant stresi ve NO oluşumunu azalttı fakat karboniller olarak gösterilen protein oksidasyonuna sebep oldu.

VI. SONUÇ

İskemi öncesi verilen maddelerin kalpte reperfüzyon süresince ne gibi etkiler ortaya çıkardığını incelediğimiz bu çalışmada son zamanların önemli endojen maddelerinden U-II, NO ve ET-1'in reperfüze kalp fonksiyonları ve oksidan-antioksidan madde düzeylerine olan etkileri araştırıldı. İ/R, MDA seviyelerini perfüze ve kalp dokusunda progresif olarak arttırmış, antioksidan etkiyi azaltmıştır. NO donörü olarak Molsidomin bu etkiyi kötüleştirmiştir. Çalışmamızda dışarıdan verilen NO aynı zamanda kalbin kasılma gücünde de azalmaya neden olmuştur. Kalp dokusu ve perfüzeatlarında Molsidomin, ET-1 ve U-II verilen gruplarda, MDA ve NOx düzeyleri artmıştır. Perfüze ve doku antioksidan özelliği olan GSH ve RSH değerleri iskemi sonrası azalmış, NO, U-II ve ET-1 bu azalışı etkilememiş iken NO inhibisyonu ve ET-1 reseptör blokajı bu düzeyleri arttırıcı yönde etkide bulunmuştur. ET-1 Res. Bl.'ü kullanılan gruplardaki MDA, NOx ve RSH değişimleri de beklendiği gibi ET-1 verilen gruptaki değerleri tersine çevirecek şekilde etkilemiştir. Biyokimyasal değerler ise beklendiği gibi ve yapılan çalışmayı destekler nitelikte olmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulgulardan kalp iskemi reperfüzyonunda ET-1, U-II ve dışarıdan verilen NO oksidan hasarı arttırıcı, antioksidan mekanizmaları azaltıcı yönde etkide bulunmuştur. Bu nedenle iskemik kalp hastalıklarında endotel yapının korunmasına yönelik maddelerin verilmesi, ET-1 ve U-II gibi ortama çıkan vazokonstriktör maddelerin inhibisyonu yararlı sonuçlar sağlayacaktır.

VII. ÖZET

Nitrik Oksit'in (NO) miyokard iskemisi gibi patolojik durumlardaki rolü tam olarak açık olmayıp, değişik koşullarda hem pozitif hem de negatif etkileri belirtilmiştir. Çalışmamızda vazokonstriktörler Endotelin-I (ET-1) ve Urotensin-II (U-II), NO donörü Molsidomin, nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) inhibitörü nitro-L-argininmetilester (L-NAME), iNOS inhibitörü L-Canavanin ve Anti-Endotelin Reseptör-A Antikoru'nun (ET-1 Res.Bl.) kalp iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarına olan etkilerini araştırmayı amaçladık. Langendorf perfüze sıçan kalpleri 30'ar dk. stabilizasyon, global iskemi ve takiben reperfüzyona tabii tutuldu. Gruplara iskemi başlangıcında, L-NAME , ET-1, U-II, L-Canavanin, Molsidomin ve ET-1 Res.Bl. verildi. Gruplar kontrol grubu (İ/R-K) ile aralıksız perfüzyon uygulanan grupla (P-K) karşılaştırıldı. Reperfüzyonun 1, 5, 10, 20, 30. dk.'larında toplanan perfüzetlerde malondialdehit (MDA), total nitrik oksit (NOx), sülfidril grupları (RSH), kalp dokusunda da MDA, protein karbonil grupları, redükte glutatyon (GSH) ve NOx düzeyleri ölçüldü. Kalp fonksiyonları için belirleyici olan sol ventrikül sistol-diyastol farkı basıncı (LVDP), dp/dt maksimum (dp/dtmak), dp/dt minimum (dp/dtmin) ve kalp atım hızı Biopac Data Acquisition & Analysis System ile kaydedildi. Tüm gruplarda LVDP seviyeleri P-K grubuna göre azaldı. Kalpte ET-1 ve Molsidomin dp/dtmak üzerine daha olumlu etki gösterirken NOS inhibisyonu olumsuz etki gösterdi. En fazla ET-1 Res.Bl. ve Molsidomin en az NOS inhibitörleri olmak üzere tüm gruplarda dp/dtmin anlamlı olarak yükseldi. ET-1, Molsidomin ve U-II gruplarında doku protein karbonil, perfüzet ve doku MDA ile NOx'da belirgin artış oldu. Tersine RSH ve GSH seviyelerinde en fazla düşme yine bu gruplarda oldu. Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulgulardan kalp İ/R'nunda ET-1, U-II ve dışarıdan verilen NO oksidan hasarı arttırıcı, antioksidan mekanizmaları azaltıcı yönde etkide bulunmuştur.

VIII. SUMMARY

Nitric oxide (NO) role on myocardial ischemia is not clear although both positive and negative contributions have been reported under different experimental conditions. Our purpose was to investigate the effects of both vasoconstrictors Endothelin-I (ET-1) and Urotensin-II (U-II), NO donor Molsidomin, NO synthase (NOS) inhibitor nitro-L-argininemethylester (L-NAME) iNOS inhibitor L-Canavanine and Anti-Endothelin Receptor Antibody (ET-1.Res.Bl.) on cardiac ischemia-reperfusion (I/R) injury. With rat hearts I/R protocol (30 min stabilization, 30 min ischemia, 30 min reperfusion) was introduced. L-NAME, ET-1, U-II, L-Canavanine, Molsidomin and ET-1.Res.Bl. were applied to the groups at the beginning of the ischemia and these groups were compared with the control and continuous perfusion groups. Malondialdehyde (MDA) and total NO (NOx) levels were measured in reperfusion solutions collected at 1, 5, 10, 20 and 30th minutes. MDA, protein carbonyl groups, reduced glutathione (GSH) and NOx levels were measured at the heart tissue. Left ventricle developed pressure (LVDP), dp/dt maximum(dp/dtmax) and dp/dt minimum (dp/dtmin) were monitored. LVDP levels were decreased in experimental groups. While ET-1 and Molsidomin had a more positive effect on dp/dtmax, NOS inhibition had a negative effect. In all groups dp/dtmin increased while this effect was highest in ET-1.Res.Bl. and Molsidomin and lowest with NOS inhibitors. In ET-1, Molsidomin and U-II groups tissue protein carbonyl, perfusate and tissue NOx and MDA were increased significantly. On the contrary the highest decrease in RSG and GSH was also in these groups. This study demonstrated that ET-1, U-II and external NO increased the oxidative damage and decreased the antioxidant mechanisms.

IX. KAYNAKLAR

1. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. *Cardiovascular Research* 2003; 58:10-9.
2. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 2000; 109: 315-23.
3. Haider KH, Stimson WH. Cardiac myofibrillar proteins: biochemical markers to estimate myocardial injury. *Mol Cell Biochem* 1999,194:31-39.
4. Das UN. Free radicals , cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2000,215:145-152.
5. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* 1994;52:253-265.
6. Naseem SA, Kontos MC, Rao PS, Jesse RL, Hess ML, Kukreja RC. Sustained inhibition of nitric oxide by NG-nitro-L-arginine improves myocardial function following ischemia/reperfusion in isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1995 Jan;27(1):419-26.
7. Sumeray MS, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium. *Basic Res Cardiol.* 1998 Oct;93(5):384-90.
8. Giraldez RR, Panda A, Xia Y, Sanders SP, Zweier JL. Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22;272(34):21420-6.

9. Mellilo G, Taylor LS, Brooks A, Cox GW, Varesio L. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in IFN-gamma-treated murine macrophages cultured under hypoxic conditions. *J Immunol.* 1996 Sep 15;157(6):2638-44.
10. Wildhirt SM, Weismuller S, Schulze C, Conrad N, Komberg A, Reichart B. Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1999 Aug 15;43(3):698-711.
11. Andelova E, Bartekova M, Pancza D, Styk J, Ravingerova T., The role of NO in ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. *Gen Physiol Biophys.* 2005 ;24(4):411-26.
12. Gonon AT, Erbas D, Broijersen A, Valen G, Pernow J. Nitric oxide mediates protective effect of endothelin receptor antagonism during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 May;286(5):H1767-74. Epub 2003 Dec 23.
13. Russell FD., Emerging roles of urotensin-II in cardiovascular disease *Pharmacology & Therapeutics* 103 (2004) 223– 243.
14. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990 Jul 5;323(1):27-36. Review.
15. Loscalzo J. Nitric oxide and vascular disease. *N Eng J Med* 1995;333:251-253.
16. Lüscher TF. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Myocard*

Ishcemia 7,1995 (suppl:1): 515-520.

17. Dzau VJ. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease. A Unifying Hypothesis. Hypertension. 2001;37:1047-1052.

18. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288:273-276.

19. Furchgott RF, The Discovery of Endotheliumderived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. J Am Med Assn. 1996;276:1186-1188.

20. Inoue A, Yanagisawa M., Kimura S, et al. The human endothelin family: three structually and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci USA 989;86:2863-2867.

21. American Heart Association. AHA special report. Cardiovascular diseases and stroke in African-American and other racial minorities in United States. Circulation 1991;83:1462-1480.

22. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins:molecular biology , biochemistry, pharmacology, and pathophysiology. Pharmacol Rev. 1994;46:325-415. Loscalzo J. Nitric oxide and vascular disease. N Eng J Med 1995;333:251-253.

23. Majino G., Jorris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of the cell death. Am. J. Pathol., 146: 3-9, 1995.

24. Siemionow M, Arslan E.: Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*, 24, 468-475 (2004).
25. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest*. 1975;56(4):978-85.
26. Birincioglu M. İskemi-reperfüzyon tekniklerine genel giriş [online] 2005 [cited 2005]
Available from : URL : <http://www.ctf.edu.tr/farma/tfd/gaziantepbirincioglu.pdf>
27. Winyard PG, Morris CJ, Winrow VR, Zaidi M, Blake DR. In: Rice-Evans CA, Burdon RH. Free radical damage and its control. England, Elsevier Science Press, 1994; 361-81.
28. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery* 1994; 81: 637-647.
29. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery*. Mc Graw-Hill 7th Edition 1999; Vol I: 13-32.
30. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res*. 2000;86: 117-118.
31. Basım S. Alt ekstremitede iskemi-reperfüzyon oluşturulan ratlarda ginkgo biloba egb 761'in barsak anastomoz iyileşmesi üzerine etkisi [online] 2005 [cited

2005] Available from : URL :

http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/genel_cerrahi/dr_serdar_basim.pdf.

32. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia part I: Pathophysiology. J Neurosurg 1992; 77:169-84.

33. Garcia JH. and Anderson ML. Physiopathology of cerebral ischemia. CRC Critical Reviews in Neurobiology, 1989; 4 (4): 303-24

34. Siesjö BK. Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. Ann NY Acad Sci 1988; 522: 638-61

35. İskekel H. Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion [online] 2000 [cited 2005]

Available from : URL : <http://med.ege.edu.tr/~norolbil/2000/NBD09100.html>.

<http://med.ege.edu.tr/~norolbil/2000/NBD09200.html>.

36. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res. 2000; 39:1529-1542.

37. Symon L. The scientific basis of cerebral infarction. In: Suzuki J. Advances in surgery of cerebral stroke proceedings of the international symposium on surgery for cerebral stroke, Sendai, Springer-Verlag Press, 1987; pp.237-9.

38. Siesjö BK, Katsura KI, Zhao Q, Folbergrova J, Pahlmark K. Mechanisms of

secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. J Neurotrauma 1995; 12 (5): 943-56.

39. Kilgore KS, Lucchesi BR. Reperfusion injury after myocardial infarction: The role of free radicals and the inflammatory response. Clin Biochem; 26:359-70,1993.

40. O'Donnell VB, Eiserich JP, Chumley PH, Jablonsky MJ, Krishna NR, Kirk M, Barnes S, Darley-Usmar VM, Freeman BA. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous oxide, nitrogen dioxide and nitronium ion. Chem Res Toxicol 1999;12:83-92

41. White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. Neurology; 43:1656-65, 1993.

42. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia Stroke 1990; 21 (7): 1086-90.

43. Katsura K, Rodriguez de Turco EB, Folbergrova J, Bazan NG, Siesjö BK. Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis and phospholipase A2 and C activation during ischemia. Neurochem 1993; 61: 1677-84.

44. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. N Engl J Med 1985; 312: 159-61.

45. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkey GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am J Surg. 1991; 161: 488-502.
46. Hartmann A, Yatsu F, Kuschinsky W. Cerebral ischemia and basic mechanisms, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag Press, 1994 pp.331-51
47. Morimoto K, Yanagihara T. Cerebral ischemia in gerbils: polyribosomal function during progression and recovery Stroke 1981; 12: 105-10
48. İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Lizozomal proteolitik aktivitenin beyin dokusunda penumbral ve derin iskemi-reperfüzyonunda karşılaştırılması Ege Tıp Dergisi 1998; 37(3-4): 163-6.
49. Frei B. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action FASEB J 1999 ; 13:963-4
50. Uçanok K, Miyokardiyal korunma yöntemleri [online]. 7 Nov 2006[cited 2006]. Available from : URL : http://www.medicine.ankara.edu.tr/cerrahi_tip/kvc//modules/show.php?page=Myocardialprotection
51. Zimmerman B. J., Granger N.: Reperfusion injury. Surg Clin North Am 72: 65-83, 1992.

52. Hall ED, Wolf DL. A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of post-traumatic spinal cord ischemia. *J Neurosurg* 64; 951-961, 1986.
53. Carden D. L., Granger D. N.: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 190: 255-66, 2000.
54. Chamoun F., Burne M., O' Donnell M., Rabb H.: Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci* 5: E103-E109, 2000.
55. Ozel Y. Ratlarda karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarında grape seed proanthocyanidin koruyucu etkilerinin incelenmesi [online] 2006 [cited 2006] Available from : URL : http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/genel_cerrahi/dr_yahya_ozel.pdf.
56. Kuzu MA, Köksoy C, Kale İT, Tanık A, Terzi C, Elhan AH, Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J of Surgery* 1998; 176: 348-351.
57. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation*. 1998;97(18):1848-67.
58. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation*. 2001;104(24):2981-9. part 2. *Circulation*. 2001;104(25):3158-67.

59. Collard C.D., Gelman S.: Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anest.* 94: 1133-1138, 2001.
60. Kandilci HB. Akciğerlerde iskemi-reperfüzyon hasarı ve iskemik önkoşullanma [online] 2005 [cited 2005 June 15] Available from : URL : http://www.eczfakder.hacettepe.edu.tr/Arsiv/EskiDergiler/01_2005/35-01-2005.pdf.
61. Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K, Elhan A. Sıçanlarda intestinal İskemi modelinde profilaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* 2000, 8;1: 10-16.
62. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory aminoacids as a final common pathway for neurological disorders. *N Eng J Med* 330: 613-622, 1994.
63. Bkaily, G., D'orleans-Juste, P. (1999) Cytokine – induced free radicals and their roles in myocardial disfunctions. *Cardiovascular Research*. 42: 576-577.
64. Nurzen Sezgin, Alpay Turan Sezgin, Hakan Güllü, Aysun Karabulut, Fatma Özyalın, Ergün Topal, Engin M. Gözükar The Effects of Cytokines, Nitric Oxide and Superoxide Dismutase on Myocardial Function. *Turk J Biochem* 2004; 29 (2); 178-182.
65. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar [online] Available from : URL: <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.doc>.
66. Gaballa, MA. (1999) Effects of endothelial and inducible nitric oxide synthases inhibition on circulatory function in rats after myocardial infarction.

Cardiovascular Research. 42: 627-635.

67. Terada LS. Hypoxia-reoxygenation increases O₂⁻ efflux which injures endothelial cells by an extracellular mechanism. *Am J Physiol* 1996;270(3 Pt 2):H945-50.

68. Vento AE, Ramö OJ, Nemlander AT et al. Nitecapone is of benefit to functional performance in experimental heart transplantation. *Res Exp Med* 1997;197:137-146.

69. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47:446-456.

70. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49:481-93.

71. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-oksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998;11:336-41.

72. Atlan N. Diabetes mellitus ve oksidatif stres [online] 2006 [cited 2006 June 21] Available from : URL : http://www.turkjbiochem.com/2006/051_056.pdf.

73. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-47.

74. Babbs CF, Lafayette W. Role of iron ions in the genesis of reperfusion injury following successful cardiopulmonary resuscitation: preliminary data and a biochemical hypothesis *Annals of Emergency Medicine* 1985; 14 (8):777-83.
75. Packer L, Glazer AN. *Methods in Enzymology, Volume 186 Oxygen Radicals in Biological Systems Part B, Oxygen Radicals and Antioxidants*, Academic Press, 1990; 651-656.
76. Laycock SK, McMurray J, Kane KA and Parratt JR Effect of xanthine oxidase system on cardiac function in anaesthetised rats. *Free Radic Bio Med* 1993; 15: 249-255.
77. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni* 2001,2;4: 154-167.
78. Manning A, Bernier M, Crome R, Little S. and Hearse D. Reperfusion-induced arrhythmias: a study of the role of xanthine oxidase-derived free radicals in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20: 35-45.
79. Xia Y and Zweier JL. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. *JBC* 1995. 270:18797-18803.
80. Yamazaki I, Soma T, Ichikawa Y et al. Usefulness of allopurinol for prevention of myocardial reperfusion injury in open heart surgery. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1995; 43: 26-31.
81. Nettiçadan T, Temsah R, Osada M and Dhalla NS. Status of

Ca²⁺/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. Am J Physiol 1999; 277: C384-C391.

82. Kramer JH, Misik V, Weglicki WB. Lipid peroxidation-derived free radical production and postischemic myocardial reperfusion injury. Ann NY Acad Sci 1994; 723: 180-196.

83. Ostadal B, Ostadalova i. And Dhalla NS. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. Physiol Rev 1999; 79: 635-659.

84. Downey JM, Miura T, Eddy LJ, et al. Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. J Mol Cell Cardiol 1987; 19: 1053-1060.

85. Parks DA and Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. Acta Physiol Scand 1986, 548: 87-99.

86. Sakamoto N, Sun Z, Brengman M et al. Hepatic reticuloendothelial system dysfunction after ischemia-reperfusion: Role of P-selectin-mediated neutrophil accumulation. Liver Transplantation 2003;9:940-948.

87. Suleiman M, Cury PM, Pestana JOM et al. FTY 720 prevents renal T-cell infiltration after ischemia/reperfusion injury. Transplantation Proc 2005; 37: 373-374.

88. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, Zoppo DGJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early

focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*; 25,1847–54, 1994.

89. Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand J Gastroenterol* 2001, 36;1: 55-65.

90. Dohrmann GJ: Experimental spinal cord trauma. *Arc Neurol*, 27: 468–473, 1972.

91. Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33: 71-90.

92. Rice-Evans CA Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes. In: Rice-Evans CA, Burdon RH. Free radical damage and its control. England, Elsevier Science Press, 1994, pp.1- 31.

93. Rice-Evans CA Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. In: Rice-Evans CA, Burdon RH. Free radical damage and its control. England, Elsevier Science Press, pp. 131–53, 1994.

94. Stammberger U, Carboni GL, Hillinger S, Schneiter D, Weder W, Schmid RA. Combined treatment with endothelin and PAF antagonists reduces posttransplant lung ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Heart and Lung Transp* 1999, 18;9: 862-868.

95. Souza DG, Cara DC, Casalli GD, Coutinho SF, Silveira MR, Andrade SP, Poole SP, Teixeira MM. Effects of the PAF receptor antagonists UK74505 on local

and remotereperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. British Journal of Pharmacology 2000; 131: 1800-1808.

96. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. Stroke ; 27:1124-29., 1996.

97. Hue RT, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. Free Radic Res Commun; 18,1620-24, 1993.

98. Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. ALS, SOD and peroxynitrite. Nature 1993;18:195-9.

99. Patel RK, McAndrew J, Sellak H, White CR; Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar. Biological aspects of reactive nitrogen series. Biochym Biophys Acta 1999;1411:385-400.

100. Carmeliet E Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias Physiol Rev 1999; 79: 917-1017.

101. Coetzee WA, Owen P, Dennis SC, Saman S and Opie LH. Reperfusion damage: free radicals mediate delayed membrane changes rather than early ventricular arrhythmias. Cardiovasc Res 1990; 24: 156-164.

102. Folden DV, Gupta A, Sharma AC et al. Malondialdehyde inhibits cardiac contractile function in ventricular myocytes via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. Br J Pharmacol 2003; 139:1310-1316.

103. Kacmaz A, Polat A, User Y et al. Octreotide improves reperfusion-induced oxidative injury in acute abdominal hypertension in rats. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2004; 8: 113-119.
104. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal in in situ perfused rat kidney. *J Lipid Res*; 38,1660-5, 1997.
105. Witko SV, Friedlander M, Capeillere BC, Nguyen KT, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps LB, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*; 49,1304-13, 1996.
106. İşlekel S, İşlekel H, Güner G, Özdamar N. Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion *Res Exp Med*; 1999 (3):167-76,1999.
107. Athar M., Abdulla H., Sultana S., Favier A. and Pero R. Free radicals and trace elements. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, ; 6: 65-73, 1993.
108. Marnett L J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000, 21;3:361-370.
109. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711-760.
110. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(9-10): 916-921.
111. Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in

oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002; 133(4): 537-556.

112. Ilavazhagan G, Bansal A, Prasad D, Thomas P, Sharma SK, Kain AK, et al. Effect of vitamin E supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats. *Aviat Space Environ Med* 2001; 72(10): 899-903.

113. El-Bassiouni EA, Abo-ollo MM, Helmy MH, Ismail S, Ramadan MI. Changes in the defense against free radicals in the liver and plasma of the dog during hypoxia and/or halothane anaesthesia. *Toxicology*. 1998; 128(1): 25-34.

114. Schneider M; Hilgers KF, Arnfried U, et al. Plasma endothelin is increased in early essential hypertension. *Am J Hypertension* 2000;13:579-585.

115. Scheider MP, Hilgers KF, Klingbeil AU, John S, Veelken R, Schneider RE. Plasma endothelin is increased in early essential hypertension. *Am J Hypertension* 2000;13:579-585.

116. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988,332:411-415.

117. Luscher TF, Oemar BS, Boulanger CM, Hahn AW. Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors--Part II. *J Hypertens* 1993 Feb;11(2):121-6.

118. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, Von Segersen L, Luscher TF. Both ET-A and ET-B receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessel. *Circulation* 1994;89:1203-1208.

119. Jarolim P., Serum biomarkers for heart failure. *Cardiovascular Pathology* 15 (2006) 144– 149.

120. Boulanger C and Lüscher TF. Endothelin is released from the porcine aorta: inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 85: 587–590, 1990.
121. Gonon AT, Bulhak A, Broijersen A, Pernow J. Cardioprotective effect of an endothelin receptor antagonist during ischaemia/reperfusion in the severely atherosclerotic mouse heart. *Br J Pharmacol* 2005 Mar;144(6):860-6.
122. Brunner F, Opie LH. Role of endothelin-A receptors in ischemic contracture and reperfusion injury. *Circulation* 1998 Feb 3;97(4):391-8.
123. Barton M, Haudenschild C, D'Uscio L, Shaw S, Münter K, and Lüscher T. Endothelin ET_A receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14367–14372, 1998.
124. Bohm F, Ahlborg G, Pernow J. Endothelin-1 inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the human forearm: reversal by ETA receptor blockade in patients with atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)* 2002 Mar;102(3):321-7.
125. Brunner F, Leonhard B, Kukovetz WR, and Mayer B. Role of endothelin, nitric oxide and L-arginine release in ischemia/reperfusion injury of rat heart. *Cardiovasc Res* 36: 60–66, 1997.

126. Gonon AT, Gourine AV, Pernow J. Cardioprotection from ischemia and reperfusion injury by an endothelin A-receptor antagonist in relation to nitric oxide production. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000 Sep;36(3):405-12.
127. Wang QD, Li XS, Pernow J. The nonpeptide endothelin receptor antagonist bosentan enhances myocardial recovery and endothelial function during reperfusion of the ischemic rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 Suppl 3:S445-7.
128. Böhm F, Ahlborg G, Johansson BL, Hansson LO, and Pernow J. Combined endothelin receptor blockade evokes enhanced vasodilatation in patients with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 674–679, 2002.
129. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Ankara. Palme Yayıncılık; 2003.
130. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR Jr. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jan 2;98(1):355-60.
131. Dişçigil B, Pearson PJ, Chua YL, Evora PRB, Seccombe JF, Schaff HV. Novel technique to bioassay endocardium-derived nitric oxide from the beating heart. *Ann Thorac Surg* 1995; 59: 1182-6.
132. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP et al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J*

Biol Chem 1994;269: 6765-72.

133. Braunwald E. Hemostasis, thrombosis, fibrinolysis and cardiovascular disease. In: Valantin F, Verstraete M (eds). Heart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine, 3rd ed. Pannsylvania: WB Saunders Company, 1997:60.

134. Ko W, Hawes AS, Lazenby WD, et al. Myokardial reperfusion injury. J Thorac Cardiovasc Surg 1991; 1020:297-308.

135. Ozkan M, Dweik R. Nitric Oxide and Airway Reactivity. Clin Pulm Med 2001;8:199-206.

136. Ozkan M, Yuksekol I. Nitrik Oksit ve akciğerler. Toraks dergisi [serial online] Nisan 2003 [cited April 2003] 4 (1) [1 screens] Available from: URL : <http://www.toraks.org.tr/journal/text.php3id=312>

137. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. J Biol Chem 1993; 268: 17 478-88.

138. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. J Biol Chem. 1995 Jun 16;270(24):14582-6.

139. Smith TW, Balligand JL, Kaye DM, Wiviott SD, Simmons WW, Han X, Michel T, Singh K, Kelly RA. The role of the NO pathway in the control of cardiac function. *J Card Fail* 1996 Dec;2 (4 Suppl):S141-7. Review.
140. Balligand JL, Cannon PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Oct;17(10):1846-58. Review.
141. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, Mann MJ, Keeling PJ, Trindade PT, Lewis NP, Byrne CD, Rickenbacher PR, Bishopric NH, Cooke JP, McKenna WJ, Fowler MB. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996 Mar 15;93(6):1087-94.
142. Depre C, Fierain L, Hue L. Activation of nitric oxide synthase by ischaemia in the perfused heart. *Cardiovasc Res* 1997 Jan;33(1):82-87.
143. Pevni D, Frolkis I, Shapira I, Schwartz D, Schwartz IF, Chernichovski T, Lev-Ran O, Sharony R, Uretzky G. Ischaemia or reperfusion: which is a main trigger for changes in nitric oxide mRNA synthases expression? *Eur J Clin Invest* 2005 Sep;35(9):546-50.
144. Schulz R, Wambolt R. Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1995;30:432-439.

145. Oddis CV, Finkel MS. Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits mitochondrial activity in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Aug 24;213(3):1002-9.
146. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992 Jul 17;257(5068):387-9.
147. Johnson G 3rd, Tsao P, Lefer AM. Synergism between superoxide dismutase and sodium nitrite in cardioprotection following ischemia and reperfusion. *Am Heart J* 1990 Mar;119(3 Pt 1):530-7.
148. Parks D. A., Granger D. N.: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesions formation. *Am. J. Physiol*, 250: G749-753, 1986.
149. Wang PH, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart: evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 1996, 271: 29223-29230.
150. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991 Aug 1;288(2):481-7.
151. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun 1;88(11):4651-5.

152. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1992 Sep;90(3):1116-21.
153. Johnson G 3rd, Tsao PS, Lefer AM. Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Crit Care Med* 1991 Feb;19(2):244-52.
154. Han H, Kaiser R, Hu K, Laser M, Ertl G, Bauersachs J. Selective modulation of endogenous nitric oxide formation in ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts--effects on regional myocardial flow and enzyme release. *Basic Res Cardiol* 2003 May;98(3):165-74.
155. Kobara M, Tatsumi T, Takeda M, Mano A, Yamanaka S, Shiraishi J, Keira N, Matoba S, Asayama J, Nakagawa M. The dual effects of nitric oxide synthase inhibitors on ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res Cardiol* 2003 Sep;98(5):319-28. Epub 2003 Jun 20.
156. Li J, Wang J, Russell FD, Molenaar P. Activation of calcineurin in human failing heart ventricle by endothelin-1, angiotensin II and urotensin II. *Br J Pharmacol* 2005 Jun;145(4):432-40.
157. Suzuki N, Sakamoto A, Ogawa R. Effect of L-canavanine, an Inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on myocardial dysfunction during septic shock. *J Nippon Med Sch* 2002 Feb;69(1):13-8.

158. Kirstein M, Rivet-Bastide M, Hatem S, Benardeau A, Mercadier JJ, Fischmeister R. Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin Invest* 1995 Feb;95(2):794-802.
159. Sheng Li Xue Bao, Zhou P, Wu SY, Yu CF, Wang H, Tang CS, Lin L, Yuan WJ. Effects of urotensin II on isolated rat hearts under normal perfusion and ischemia reperfusion] Cardiovascular Institute, First Hospital, Peking University, Beijing 100034. 2003 Aug 25;55(4):442-8.
160. Li L, Yuan WJ, Su DF. Effects of rat urotensin II on coronary flow and myocardial eNOS protein expression in isolated rat heart. *Acta Pharmacol Sin* 2004 Nov;25(11):1444-9.
161. Kurtel H, Granger DM, Tso P, Grisham MB. Vulnerability of intestinal interstitial fluid to oxidant stress. *Am J Physiol* 1992; 263: 573-578.
162. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide Biol Chem* 2001; 5: 62-71.
163. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982 126(1):131-8.
164. Casini A, Ferrali M, Pompelam A, Maellaro A, Comborti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol* 1986; 123: 520-531.

165. Aykaç G, Uysal M, Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A, Öz, H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 1985; 36: 71-76.
166. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464—78.
167. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 ,193(1):265-75.
168. Wahida Yasmin, Ken D. Strynadka, Richard Schulz Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts *Cardiovascular Research* 1997; 33 ; 422–432.
169. Bejma J, Ramires P, Ji LL. Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol Scand* 2000 Aug;169(4):343-51.
170. Ishihata A, Ogaki T, Aita T, Katano Y. Role of prostaglandins in urotensin II-induced vasodilatation in the coronary arteries of aged rats. *Eur J Pharmacol* 2005 Oct 31;523(1-3):119-26. Epub 2005 Oct 13.
171. Guo-Wei H., Endothelial Function Related to Vascular Tone in Cardiac Surgery *Heart Lung and Circulation* 2005;14:13–18.

172. Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004 Feb 15;61(3):402-13. Review.
173. Yamamoto T, Bing RJ. Nitric oxide donors. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000 Dec;225(3):200-6. Review.
174. Nonami Y. The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jpn Circ J* 1997 Feb;61(2):119-32. Review.
175. Gupta SK, Saxena A, Singh U, Arya DS. Bosentan, the mixed ETA-ETB endothelin receptor antagonist, attenuated oxidative stress after experimental myocardial ischemia and reperfusion. *Molecular and Cellular Biochemistry* 275: 67-74, 2005.
176. Bagdatoglu OT, Polat G, Bagdatoglu C, Atik U. Roles of nitric oxide, malondialdehyde, and fibronectin in an experimental peripheral nerve ischemia-reperfusion model. *Microsurgery* 2006;26(3):207-11.
177. Ozokutan BH, Kucukaydin M, Muhtaroglu S, Tekin Y. The role of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 2000 Jan;35(1):101-3.
178. Chen XJ, Wang X, Xia ZY, Luo T, Tu ZF. Protective effects of hypovolemic hypotension preconditioning on cardiopulmonary function after myocardium ischemia/reperfusion injury. *Chin J Traumatol* 2004 Dec;7(6):368-71.

179. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006 Apr-Jun;10(2):389-406. Review.
180. Gonon AT, Wang QD, Pernow J. The endothelin A receptor antagonist LU 135252 protects the myocardium from neutrophil injury during ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 1998 Sep;39(3):674-82.
181. Gourine AV, Gonon AT, Pernow J. Involvement of nitric oxide in cardioprotective effect of endothelin receptor antagonist during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 Mar;280(3):H1105-12.
182. Bousette N, Giaid A. Urotensin-II and cardiovascular diseases. *Curr Hypertens Rep* 2006 Dec;8(6):479-83. Review.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Mehmet
Soyadı	ÜNAL
Doğum Yeri ve Tarihi	Ankara 18/06/1966
Eğitimi	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D Doktora Öğrencisi Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 1993 Ankara Atatürk Anadolu Lisesi
Yabancı Dili	İngilizce