

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

**HÜCRE İÇİ AŞIRI SODYUM YÜKLEMESİNİN
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDAKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Selcen SELAMOĞLU

Tez Danışmanı
Öğr. Gör. Dr. Bilgen BAŞGUT

ANKARA
Ocak 2011

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

**HÜCRE İÇİ AŞIRI SODYUM YÜKLEMESİNİN
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDAKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Selcen SELAMOĞLU

Tez Danışmanı
Öğr. Gör. Dr. Bilgen BAŞGUT

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından,
BAP-02/2008-15 proje numarası ile desteklenmiştir.

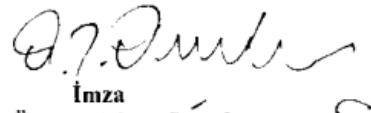
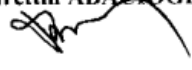
ANKARA
Ocak 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 09/02/2011

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı
Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU



İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Ankara Üniversitesi
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY



İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Öğr.Gör.Dr. Bilgen BAŞGUT

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller	iv
Kısaltmalar	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İskemi - Reperfüzyon Hasarı	4
2.1.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi	5
2.1.1.1. Miyokardiyal Enerji Metabolizması	5
2.1.1.2. Oksidatif Hasar	9
2.1.1.3. İyonik Değişiklikler	12
2.1.1.3.1. İ/R 'de Sitoplazmik İyonik Değişiklikler	13
2.1.1.3.2. İ/R'de Mitokondriyal İyonik Değişiklikler	15
2.2. İ/R Hasarının Klinik Sonuçları	16
2.2.1. Vasküler Hasar ve “Yeniden akışın olmaması (No Reflow)” Fenomeni	17
2.2.2. Miyokardiyal Sersemleme	17
2.2.3. Reperfüzyon Aritmileri	18
2.3. Na⁺ ve Ca⁺² aşırı yüklenmesine etki eden ilaçların iskemi-reperfüzyon hasarındaki koruyucu rolü	19
2.3.1. Na ⁺ kanal blokörleri	21
2.3.1.1.44Bu	25
2.3.2. Na ⁺ -H ⁺ antiport inhibitörleri	26
2.3.3. Na ⁺ -Ca ⁺ antiport inhibitörleri	29

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	31
3.1. Gereçler	31
3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları	31
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	31
3.1.3. Kullanılan Deney araçları	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Sıçan İzole Kalp Preparatının Hazırlanması	34
3.2.2. İskemi-Reperfüzyon Protokolü	36
3.2.2. Deney Grupları	36
3.2.2. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. 60 dk global iskemi 30 dk reperfüzyon protokolünün kontraktıl fonksiyon üzerindeki etkileri	39
4.2. Hücre içi aşırı Na^+ ve Ca^{+2} yüklenmesini etkileyen ilaçlarla tedavinin I/R ile indüklenen kontraktıl disfonksiyon üzerindeki etkileri	40
4.3. KBR'nin çözücüsü DMSO'nun I/R uygulanmış izole perfüze kalplerde ölçülen kardiyak parametreler üzerine etkisi	42
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ	58
7. ÖZET	59
8. SUMMARY	61
9. KAYNAKLAR	63
10.EKLER	
10.1.Etik Kurul İzni	82
10.2.Teşekkür	83
11. ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER

Şekil 1: İ/R ile indüklenen miyokardiyal hasarın dereceleri	5
Şekil 2: Miyokardiyal enerji metabolizması yolları	7
Şekil 3: İ/R sırasındaki metabolik değişiklikler	8
Şekil 4 : İ/R hasarından sonra kardiyak miyositlerin ölümünde mPTP'nin rolü	12
Şekil 5: Selüler ve mitokondriyal membran potansiyelinin kontrolünde rol oynayan anahtar iyon kanalları	13
Şekil 6: İ/R'de sitoplazmik ve mitokondriyal iyonik değişiklikler	15
Şekil 7: İ/R sırasında kalpte $[Na^+]_i$ ve pH regülasyonunda rol oynayan yollar	20
Şekil 8: Sabit-akışlı Langendorff düzeneği	35

Şekil 9: İ/R uygulanmış izole kalplerde, kaydedilen SVB'na ait orjinal traseler	44
Şekil 10: İlaç uygulanmamış (Kontrol) ve 44Bu (0.3µM), Ranolazin (10µM), Zoniporid (0.1µM) veya KBR (1 µM) uygulanmış izole perfüze kalplerde İ/R protokolü boyunca SVGB'nin % değişimi	45
Şekil 11: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3µM), Ranolazin (10µM), Zoniporid (0.1µM) ve KBR (1 µM)'nin SVGB üzerine etkileri (n=5-9)	45
Şekil 12: İlaç uygulanmamış (Kontrol) ve 44Bu (0.3µM), Ranolazin (10µM), Zoniporid (0.1µM) veya KBR (1 µM) uygulanmış izole perfüze kalplerde İ/R protokolü boyunca diyastol sonu basıncı SVDSB'nin % değişimi	46
Şekil 13: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3µM), Ranolazin (10µM), Zoniporid (0.1µM) ve KBR (1 µM)'nin SVDSB üzerine etkileri (n=5-9)	46
Şekil 14: İlaç uygulanmamış (Kontrol) ve 44Bu (0.3µM), Ranolazin (10µM), Zoniporid (0.1µM) veya KBR (1 µM) uygulanmış izole perfüze kalplerde İ/R protokolü boyunca +dp/dt'nin % değişimi	47

Şekil 15: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3µM), Ranolazin (10µM), Zoniporid (0.1µM) ve KBR (1 µM)'nin +dp/dt üzerine etkileri 47

Şekil 16: İlaç uygulanmamış (Kontrol) ve 44Bu (0.3µM), Ranolazin (10µM), Zoniporid (0.1µM) veya KBR (1 µM) uygulanmış izole perfüze kalplerde İ/R protokolü boyunca -dp/dt'nin % değişimi(n=5-9). 48

Şekil 17: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3µM), ranolazin (10µM), zoniporid (0.1µM) ve KBR (1 µM)'nin -dp/dt üzerine etkileri 48

Şekil 18: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3µM), ranolazin (10µM), zoniporid (0.1µM) ve KBR (1 µM)'nin iskemi sırasındaki A.Maksimum kontraktüre ulaşma zamanı, B.Maksimum kontraktür üzerine olan etkileri 49

Şekil 19: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3µM), ranolazin (10µM), zoniporid (0.1µM) ve KBR (1 µM)'nin koroner perfüzyon basıncı üzerine etkileri 50

KISALTMALAR

KKH:	Koroner kalp hastalığı
AMI:	Akut miyokard infarktüsü
İ/R:	İskemi-reperfüzyon
PCI:	Perkutanöz koroner girişim
NHE:	Na^+ - H^+ antiportu
NCX:	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ antiportu
I_{NaT}:	Geçici Na^+ akımı
I_{to} :	Dışa yönelik geçici K^+ akımı
SR:	Sarkoplazmik retikulum
PDH:	Pirüvat dehidrogenaz
LDH:	Laktat dehidrogenaz
ETC:	Elektron transport zinciri
ATP:	Adenozin trifosfat
O_2^-:	Süperoksit anyonları
OH^-:	Hidroksil radikalleri
HOCl:	Hipoklorik asit
H_2O_2:	Hidrojen peroksit
EAD:	Erken-ard depolarizasyon
mPTP:	Mitokondriyal geçiş poru
$\Delta\psi_m$:	Mitokondriyal membran potansiyeli
$\Delta[\text{H}^+]$:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu farkı
ROT:	Reaktif oksijen türevleri
I_{NaP}:	Sürekli Na^+ akımı
TTX:	Tetradotoksin
44Bu:	(2- hidroksi- 3- (butilaminopropil-4- [(butoksikarbonil) amino] benzoat) hidroklorit)
EIPA:	Etil izopropil amilorid

KBR: KB-R7943

2-[2-[4-(4-Nitro benziloksi)fenil]etil]iso tiyoüre mesilat

SEA: SEA0400

SVGB: Sol ventrikül gelişen basıncı

SVDSB: Sol ventrikül diyastol sonu basıncı

± dp/dt: Kasılma ve Gevşeme hızları

İngilizce terimler için önerilen Türkçe karşılıkları

geçici (transient)^a
sürekli (persistent)^a
miyokardiyal sersemleme (myocardial stunning)
geri dönüşümlü (reversibl)
geri dönüşümsüz (irreversibl)
patlama (burst)
endotele yapışma (endothelial adherence)
çıkış (upstroke)
erken-ard depolarizasyon (early after depolarization, EAD)^a
yeniden akışın olmaması (no-reflow)
hiberne miyokard (hibernating myocardium)
aşırı yüklenme (overload)^a
düşük akışlı iskemi (low-flow ischemia)
enerji koruyucu etki (energy sparing effect)
eşleşmemiş değiş-tokuşçu teorisi (uncoupled exchanger theory)

^a Türk Kardiyoloji Derneği Yayınları, Genişletilmiş ve Açıklamalı 2. Baskı, TKD Nomenklatür Kurulu, Yayına Hazırlayan: Prof. Dr. Güngör Ertan İstanbul,1998. Kardiyoloji Terimleri Sözlüğü, TKD Yayınları

1. GİRİŞ

Koroner kalp hastalığı (KKH), dünyada birçok ülkede ölümlerin majör nedenidir ve Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre her yıl ortalama 3.8 milyon erkeğin, 3.4 milyon kadının bu hastalıktan öldüğü bildirilmiştir. KKH'ye neden olan en önemli faktörlerden biri de, akut miyokard infarktüsü (AMI) sonucu miyokardiyal iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarının oluşmasıdır. AMI'ya bağlı miyokardiyal infarkt oluşumunun klinik göstergesi sol ventrikül sistolik fonksiyonunda azalmadır¹. Tromboliz, perkutanöz koroner girişim (PCI) ve yardımcı tedavi stratejileri (antitrombotik ve antiplatelet ajanlar) erken veya zamanında uygulandığında, miyokardiyal İ/R hasarına bağlı infarkt alan oluşumunu azaltmakta ve miyokardiyal disfonksiyonu engelleyebilmektedir². Bu nedenle kalpte İ/R hasarına neden olan hücresel mekanizmaların anlaşılması, halen klinikte kullanılan uygulamaların yanı sıra, bu hasarı önlemek için düşünülen moleküler ve farmakolojik spesifik tedavi protokollerinin geliştirilebilmesi açısından oldukça önemlidir.

Miyokardiyal iskemi, kalbe oksijen sunumu ve gereksinimi arasındaki dengesizlikle karakterize edilen, miyokardiyal hücrelerde iyonik homeostazın bozulması sonucu belirgin fonksiyonel bozukluk ve hücre ölümüyle sonuçlanan patolojik bir durumdur³. Bugüne kadar yayımlanmış bilgilere göre, hücre içi aşırı Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışın ve oksidatif stresin kalpte İ/R hasarına yol açan başlıca mekanizmalar olduğu kabul edilmektedir. Miyokardiyal hücrelere aşırı Ca^{+2} yüklenmesi (Ca^{+2} overload), iskemik miyokardiyumun mekanik ve elektriksel disfonksiyonunun primer nedeni olarak gösterilmektedir^{4,5,6}.

İskemik miyositlerde, intraselüler asidifikasyon sonucunda membranda bulunan $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiportu (NHE) ve gecikmiş Na^+ akımı aracılığıyla hücre içi Na^+ miktarının arttığı bilinmektedir^{7,8}. İ/R sırasında hücre içi Na^+ konsantrasyonundaki bu artışın, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ antiportunun (NCX) ters modda çalışması sonucu, hücre içi aşırı Ca^{+2} yüklenmesine yol açtığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır^{9,10,11}. Yapılan çalışmalarda, iskemi ve reperfüzyonda oluşan aşırı Ca^{+2} yüklenmesinin, NCX'in^{12,13} engellenmesi, membrandaki Na^+ kanallarının bloke edilmesi^{14,15,16} ve NHE'nin azaltılması¹⁶ ile önlenemediğinin saptanması da intraselüler Na^+ konsantrasyonundaki artışın aşırı Ca^{+2} yüklenmesinin nedeni olduğu görüşünü desteklemektedir. Bu nedenle, hücre içi aşırı Na^+ yüklenmesinden sorumlu yolların bloke edilmesi, miyokardiyal İ/R hasarının azaltılması ya da önlenmesinde olası tedavi stratejileri arasında düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda, İ/R sırasında oluşan aşırı Ca^{+2} yüklenmesinin, NCX'in^{12,13} engellenmesi, membrandaki Na^+ kanallarının bloke edilmesi^{14,15,16} ve NHE'nin azaltılması⁸ ile çeşitli derecelerde önlenemediği gösterilmiştir. Literatürde, Na^+ ve Ca^{+2} aşırı yüklenmesini etkileyen mekanizmalardan birkaçının (Na^+ kanalları/NHE; NHE/NCX) aynı deneysel koşullarda karşılaştırıldığı yayınlar olmasına karşın, bütün mekanizmaları aynı şartlarda inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında; İ/R sırasında hücre içi Na^+ ve Ca^{+2} aşırı yüklenmesinden sorumlu yolları inhibe ettiği bilinen çeşitli ajanların (44Bu, geçici Na^+ blokörü; ranolazin, sürekli Na^+ kanal blokörü; zoniporid, NHE inhibitörü ve KBR-7943, NCX inhibitörü) İ/R hasarına karşı kardiyoprotektif etkinliklerinin aynı deneysel koşullar altında karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu karşılaştırmanın

yapılması, yeni bir Na^+ kanal blokörü olan ve İ/R hasarına karşı koruyucu etkisi bilinen 44Bu'nun¹⁷⁻²¹ diğer Na^+ - Ca^{+2} aşırı yüklenmesini azaltan ilaçlar arasındaki yerinin belirlenmesine ve klinik açıdan önemi olup olmadığına işaret edebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi - Reperfüzyon Hasarı

İ/R hasarı, uzun süreli iskemi periyodunu takiben kan akımının restorasyonu (reperfüzyon) sonucunda oluşur²². Birçok bireyde, miyokardiyal hasar, aterosklerotik plağın da eşlik ettiği trombotik bir koroner arter oklüzyonundan kaynaklansa da, genellikle MI'ya yol açan İ/R, herhangi bir koroner arter hastalığı olmaksızın uzun süren koroner spazma bağlı olarak oluşur. En önemli tetikleyicilerinden biri, ciddi emosyonel streştir, nadir olarak da alerjik reaksiyonlar ve hiperkoagülasyon sonucunda oluşabilir²³.

İskemi ve reperfüzyonun süresine göre İ/R ile indüklenen kardiyak hasar 3 farklı derecede tanımlanmıştır²⁴.

1. **Derece İ/R Hasarı:** Hasarın en düşük olduğu düzeydir. İskemi periyodu 5dk'dan kısa olduğunda oluşur. Bu düzeydeki hasarda kardiyak aritmiler gözlenirken, ventriküler kontraktıl disfonksiyon veya kardiyak hücre ölümü oluşmaz²⁴.
2. **Derece İ/R Hasarı:** İskemik periyot, 5-20 dk'ya uzadığında oluşur ve bu düzeydeki kardiyak hasar, miyokardiyal sersemleme (stunning) olarak tanımlanır. Miyokardiyal sersemleme, kardiyak miyosit ölümü olmaksızın oluşan geri dönüşümlü (reversibl) ventriküler kontraktıl disfonksiyonla karakterize edilir²⁵.

3. **Derece İ/R Hasarı:** Hasarın en şiddetli olduğu düzeydir. İskemi süresi 20dk'nın üzerine çıktığında oluşur. Bu aşamada, kardiyak miyositlerde hücre ölümüyle sonuçlanan geri dönüşümsüz (irreversibl) hasar meydana gelir. Bu düzeyde hasar, infarkte dokunun kontraktilitesi bozulduğundan dolayı şiddetlidir ve böylece kalbin pompalama fonksiyonu bozulur²⁴.



Şekil 1: İskemi reperfüzyonla indüklenen miyokardiyal hasarın dereceleri²²

2.1.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi

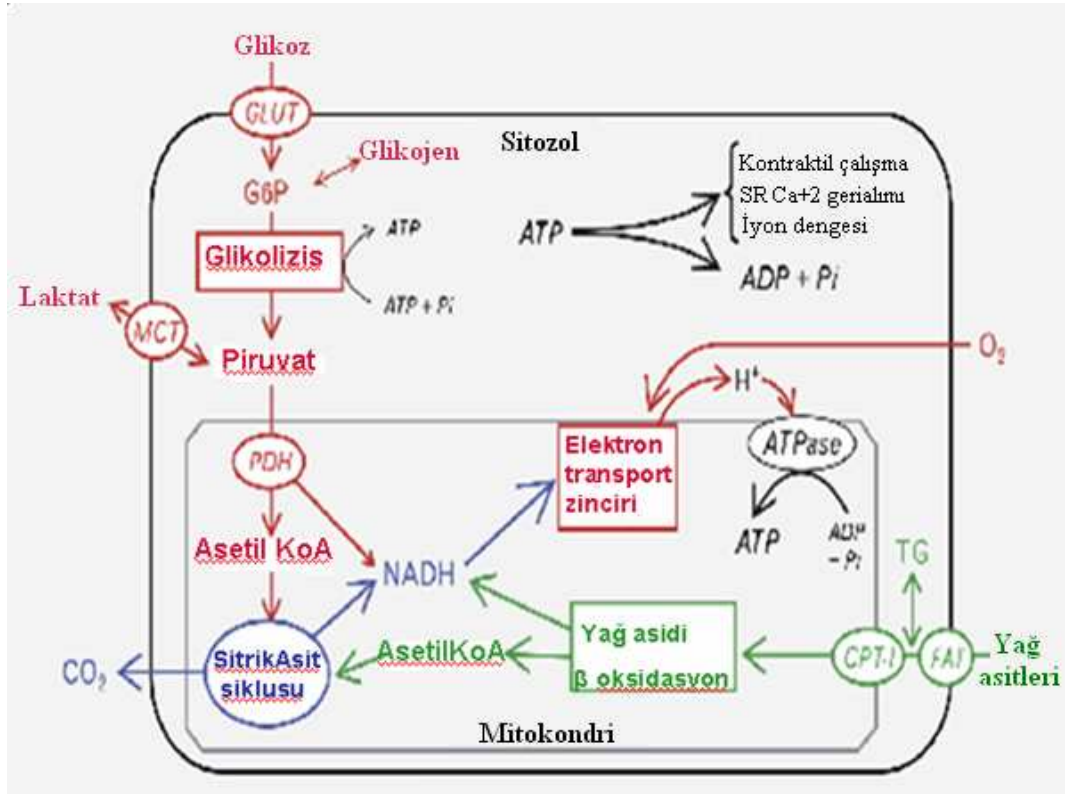
2.1.1.1. Miyokardiyal Enerji Metabolizması

Kalp, oksidatif bir doku olduğundan, kardiyak metabolizmanın %90'dan fazlası aerobiktir^{26,27}. Aerobik metabolizmanın baskın olmasından dolayı, kalp hücreleri, hücresel volumün yaklaşık %25-

35'i kadar çok sayıda mitokondri içerirler²⁶. Kardiyak kasta, selüler yerleşimlerine göre subsarkolemmal ve intermiyofibriller olmak üzere 2 tip mitokondri tanımlanmıştır²⁸. Subsarkolemmal mitokondri, iyonların aktif transportla sarkolemmaya geçişi için gerekli olan ATP oluşumunu sağlarken; intermiyofibriller mitokondri, kontraksiyon için gerekli olan ATP üretiminden sorumludur²⁷. Kardiyak miyositte, hidroliz edilen ATP'nin 2/3'ü kontraktıl aparat tarafından kullanılır, diğer 1/3'lük kısmı ise iyon pompalarıyla iyon dengesinin sürdürülmesinde rol oynayan aktif transportta kullanılır²⁷. Sarkoplazmik retikulumdaki (SR) $\text{Ca}^{+2}\text{ATPaz}$ bu transport sistemleri arasında sayılabilir²⁹. Sağlıklı bir kalpte, yağ asitleri primer enerji kaynağıdır ve enerji gereksiniminin %60-80'ini karşılar²⁷. Diğer enerji kaynakları laktat ve glikozdur³⁰.

Normal fizyolojik koşullarda (aerobik koşullarda), glukoz metabolizması sitoplazma içinde gerçekleşen glikoliz reaksiyonu ile başlar. Glikoliz reaksiyonunun son ürünü olan pirüvat, mitokondri içerisine alınır ve pirüvat dehidrogenazla (PDH) Asetil KoA'ya dönüştürülür. Aynı koşullarda laktat da mitokondri içine kolaylıkla taşınır ve burada laktat dehidrogenaz (LDH) aracılığıyla pirüvata dönüştürülür. Yağ asitleri, plazma membranını difüzyon ya da protein aracılı taşıma ile geçtikten sonra, koenzim A esterlerine çevrilirler (yağ asidi aktivasyonu). Bundan sonra, mitokondri içine alınırlar ve β -oksidasyonla Asetil KoA'ya dönüştürülürler. Glukoz, laktat ya da yağ asitinden elde edilen Asetil KoA, krebs siklusuna girerek CO_2 , NADH, FADH_2 oluşturur. Glikoliz reaksiyonunda, β -oksidasyonda ve krebs siklusunda oluşan NADH ve β -oksidasyonda oluşan FADH_2 , elektron transport zincirinde (ETC) reaksiyona girerek üzerlerindeki protonu (H^+) oksijen ve ADP varlığında H_2O 'ya transfer ederler ve sonuçta enerji (ATP) elde edilir. Yağ asiti düzeylerinin artması yani β -oksidasyonun artması, çok sayıda mekanizma ile miyokardın glikoz alımını azaltır ve glikoz oksidasyonu baskılanır. Yağ

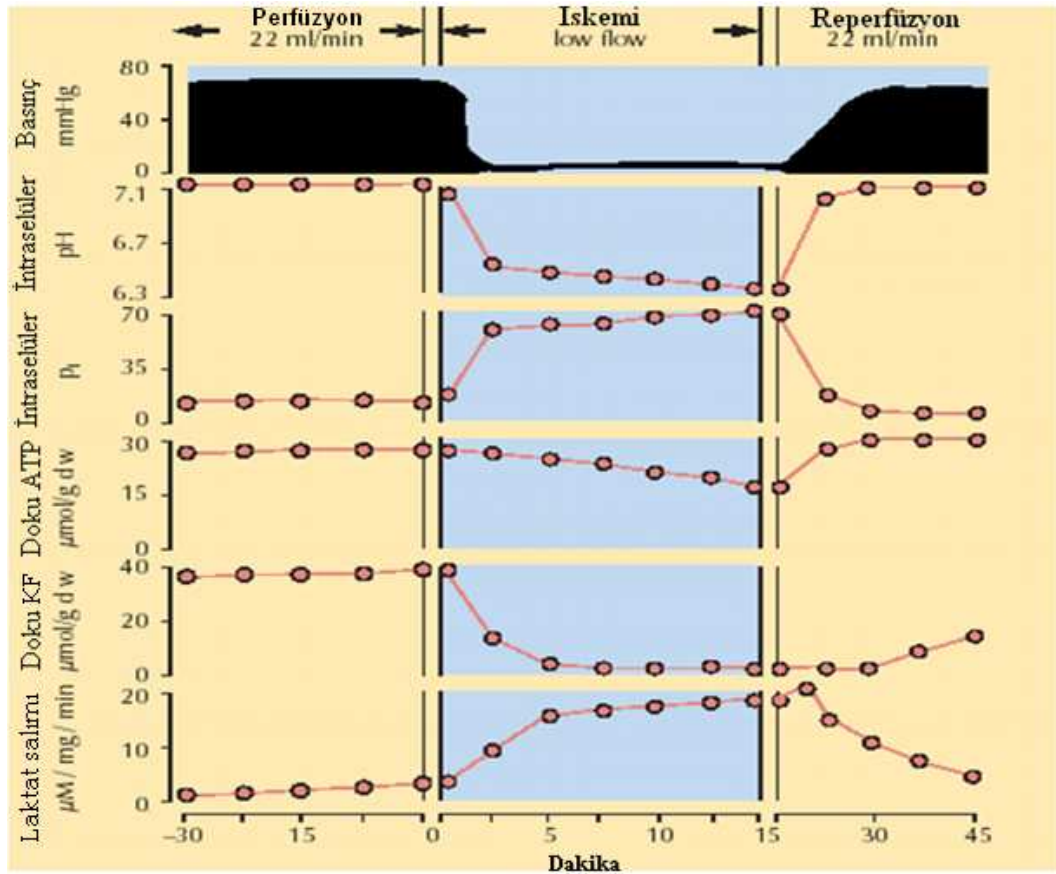
asidi oksidasyonunun artması, mitokondri içindeki Asetil KoA ve NADH miktarını artırarak PDH etkinliğini azaltır³¹.



Şekil 2: Miyokardiyal enerji metabolizması yolları³¹

Uzun süreli iskemi sırasında ise, mitokondriye oksijen taşınması ve Krebs siklusu durur ve böylece oksidatif fosforilasyonla enerji elde edilemez. Böylece iskemide anaerobik glikoliz önem kazanır. Doymamış yağ asitlerinin selüler düzeyleri artmaya başlar, NADH'ın sitozolik düzeyleri artar, bu da NADH/NAD⁺ oranının birkaç kat artmasına yol açar²⁷. İskeminin ilk dakikalarında, selüler ATP düzeyleri glikolizle sürdürülebilir. Fakat, glikolitik akışta artışa sitozolik laktat düzeylerindeki artış ve selüler pH'da azalma eşlik eder. 30 dk'lık iskemiden sonra,

sitozolik H^+ iyonu konsantrasyonu belirgin olarak artar ve selüler pH 5,5 – 6'ya düşer. Bu da, glikolitik enzim aktivitesinin inhibisyonu ve glikolitik akışta azalmayla sonuçlanır^{27,31,32}. Kreatin fosfatın selüler düzeyleri iskeminin başlangıcında azalır ve kreatin fosfat depolarının yaklaşık %90'ı iskeminin 10.dk'sına kadar boşalır³³. İskemi sırasında selüler ADP düzeyleri artmasına rağmen, ATP düzeyleri yavaş olarak azalır ve iskeminin 30. dk'sından sonra ATP düzeylerinin %50-60 oranında azaldığı gösterilmiştir³³.



Şekil 3: İskemi ve reperfüzyon sırasındaki metabolik değişiklikler³¹
(KF: Kreatin fosfat)

2.1.1.2. Oksidatif Hasar

Hem iskemi hem de reperfüzyon sırasında ROT oluşumu, İ/R ile indüklenen kardiyak hasara katkıda bulunan majör faktördür^{24,34,35,36,37,38}. İ/R sırasında ROT ve reaktif nitrojen türlerinin oluşumu, gerek lipid peroksidasyonu, gerekse nitrasyon veya oksidasyon gibi olaylarla protein hasarı aracılığı ile lipid membranda hasar oluşturur. Oksidan aracılıklı selüler hasar, hücre membranında hasara yol açar, hücrenin iyonik homeostazını regüle etme yeteneğini bozar ve mitokondriyal hasara da aracılık eder. Sonuçta oksidatif fosforilasyon azalır ve mitokondriyal geçiş poru açılır³⁶. İ/R, farklı yollar aracılığı ile (mitokondri, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz) ROT oluşumunu başlatır³⁶. Mitokondriyal ROT oluşumu, İ/R sırasında anahtar rol oynar^{24,36,39}. Özellikle mitokondriyal süperoksit radikallerinin oluşumu, hem iskemi hem de reperfüzyonda kompleks 1 ve 3'de artar. İskemide, süperoksit düzeyleri dereceli olarak artarken, reperfüzyonun ilk dakikalarında respiratuvar patlama (burst) gerçekleşir^{36, 39}.

İskemik dokuların reperfüzyonu, süperoksit anyonları (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^- , hipoklorik asit ($HOCl$)), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit türevi nitrik oksiti içeren toksik ROT'un oluşumuna sebep olur. İskemi sırasında selüler ATP, hipoksantin formuna indirgenir. Normalde hipoksantin, ksantin dehidrogenaz tarafından ksantine oksitlenir (yükseltgenir). Bununla birlikte, iskemi sırasında, ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür. Ksantin oksidaz, nikotinamid adenin dinükleotidi substratı gibi kullanan ksantin dehidrogenazın tersine, substrat olarak oksijeni kullanır. Bundan dolayı, iskemi sırasında, hipoksantin ksantine dönüşümü katalizlenemez, bu da aşırı düzeyde hipoksantin birikimine sebep olur. Reperfüzyonla yeniden sağlanan oksijenle, aşırı hipoksantin,

ksantin oksidaza dönüşümü sonucu toksik ROT oluşur. Reaktif oksijen türevleri, kuvvetli yükseltgen ve indirgeyici ajanlardır ve lipid peroksidasyonu ile selüler membran hasarına yol açarlar⁴⁰. Ayrıca, lökosit aktivasyonunu ve eikosanoid (TXA₂, LTB₄) sentezinde önemli bir prekürsör olan araşidonik asidin oluşumunu sağlayan plazma membran fosfolipaz A₂ nin aktivasyonu ile kemotaksisi uyarırlar⁴⁰. ROT, lökosit adhezyon moleküllerini ve transkripsiyon faktörlerinin (nükleer faktör- KB gibi) aktivasyonu yolu ile sitokin gen ekspresyonunu uyarır ve İ/R sonrası lökositlerin endotele yapışması (endotelial adherens) artar⁴⁰.

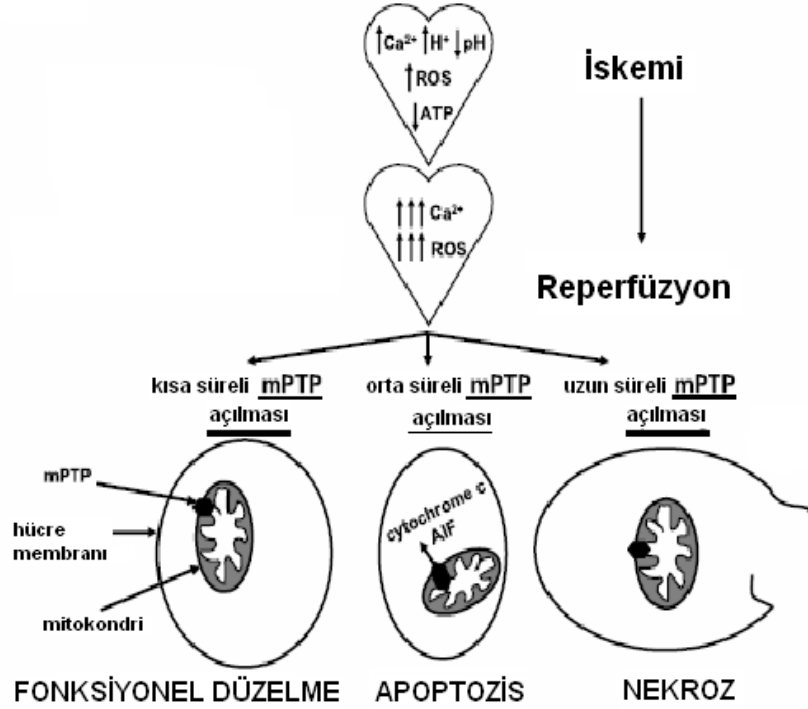
İskemi sırasında ve özellikle reperfüzyon sırasında, oksidatif stres, radikallerin aşırı oluşumuna, koruyucu enzimler ve radikal temizleyicilerin eksikliğine sebep olur^{41,42}. Oksijen radikalleri, proteinlere saldırır ve K⁺ kanallarının bloke edilmesine, SR'deki Ca⁺² saliverici kanalların aktivasyonuna ve mitokondriyal mega kanalın aktivasyonuna yol açar. Bu da, lipid peroksidasyonuna sebep olur. Elektrofizyolojik olarak, aksiyon potansiyelinin çıkış (upstroke) hızı ve ileti hızı azalır, erken ard-depolarizasyonun (early after depolarization, EAD) oluşması ile plato uzar ve sonuç olarak plato seviyesinde depolarizasyon oluşur. İkinci aşamada, hücre repolarize olabilir, tekrar çok kısa aksiyon potansiyelleri gözlenir ve sonuç olarak hücre uyarılır ve kas devamlı kasılma halinde kalır⁴³.

İ/R ile indüklenen miyokardiyal oksidan oluşumu, birçok mitokondriyal proteinin oksidasyonunda rol oynar. Elektron transport zinciri bozulur (kompleks I ve IV'de hasar oluşur), mitokondriyal şişme ve mitokondriyal membran permeabilitesi artar. İ/R ile indüklenen oksidatif stres, hem nekroz hem de apoptozis de mitokondri aracılıklı hücre ölümünü tetikler.²⁷

İskeminin ardından reperfüzyon, iskemi sırasındaki serbest radikal oluşumunu daha fazla artırır. Ksantin oksidaz reaksiyonu, mitokondriyal solunum zinciri (yükseltgenme/indirgenme reaksiyonları), nötrofil aktivasyonu ve katekolaminlerin oto-oksidasyonu serbest radikal üretiminden sorumlu olan mekanizmalardır. Serbest radikaller, kimyasal yönden çok reaktiftirler, doymamış yağ asitlerinin ve fosfolipitlerin oksidasyonuna, mitokondriyal ve selüler membranların bozulmasına, membran enzimlerinin inaktivasyonuna neden olurlar⁴³.

İ/R ile indüklenen ROT oluşumu, Ca^{+2} aşırı yüklenmesi, iyonik dengesizlik, ATP oluşumunda azalma ve selüler pH'da azalma sonucunda mitokondri iç membranında bulunan mitokondriyal geçiş porunun (mPTP) açılımına yol açar. Bu da, mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonuna ve mitokondriyal matriks içerisine su girişi sonucu mitokondriyal şişmeyle sonuçlanır. Fizyolojik koşullarda, mitokondri iç membranı, iyonlara karşı geçirgen değildir^{22, 27}.

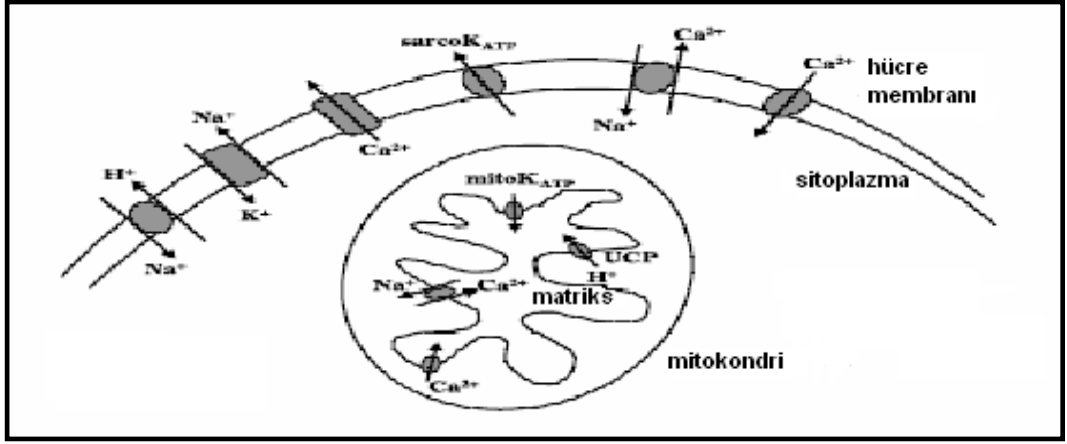
İ/R hasarında, kardiyak miyosit ölümü, mitokondriyal hasarın derecesiyle ve mPTP'nin açık kalma süresiyle ilişkilidir. Şöyle ki, sınırlı sayıda por, kısa süreli açıldığında, mitokondride anlamlı derecede hasar oluşmaz ve hücre, İ/R'dan sonra iyileşir. mPTP açılımının uzun sürmesi mitokondri dış membranının yırtılmasıyla sonuçlanır ve mitokondriden apoptotik proteinlerin salıverilmesine yol açar. Bunun sonucunda hücre programlı ölüme (apoptozis) gider, bu evrede enerji üretimi yeterli düzeydedir. mPTP açılımı daha da yaygınlaşır ve uzarsa, mitokondri önemli derecede hasar görür, ATP üretimi azalır ve hücre ölümü nekroz aracılığıyla oluşur (Şekil-4)^{18, 22, 27}.



Şekil 4 : İ/R hasarından sonra kardiyak miyositlerin ölümünde mPTP'nin rolü¹⁸

2.1.1.3. İyonik Değişiklikler

Kardiyak miyosit sarkolemması, selüler pH'nın ve membran potansiyelinin sürdürülebilmesi için çeşitli uniport ve antiport iyon kanalları ve aktif transport mekanizmaları içerir. Miyokardiyal inner membranda da aynı familyadan uniport ve antiportlar bulunur²⁷.



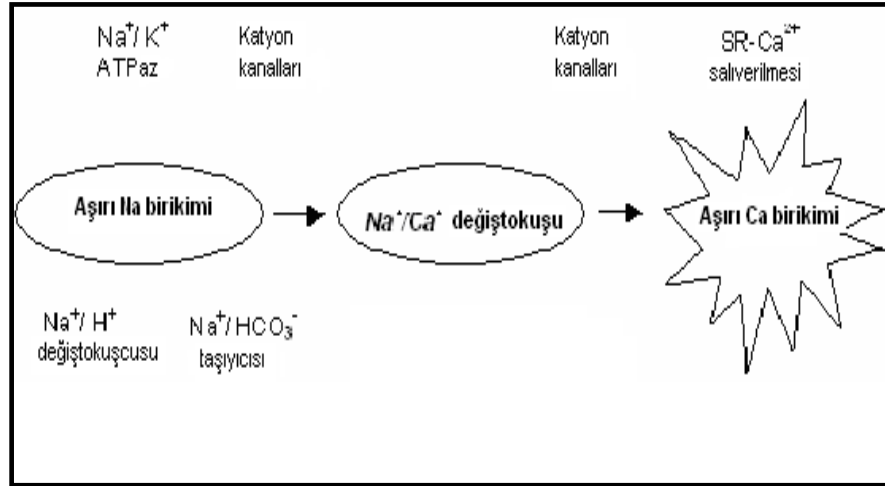
Şekil 5: Selüler ve mitokondriyal membran potansiyelinin kontrolünde rol oynayan anahtar iyon kanalları¹⁸

2.1.1.3.1. İ/R 'de Sitoplazmik İyonik Değişiklikler

Sitoplazmadaki iyonik içerik, uzun süreli iskemi sırasında belirgin olarak değişir. Örneğin, iskemi sırasında ATP düzeyleri azalır, sarkolemmal Na^+/K^+ ATPaz ve SR'deki Ca^{+2} -ATPaz etkisiz olmaya başlar, bu da hem Ca^+ hem Na^+ düzeylerinde artışla sonuçlanır. Bununla birlikte, iskemik miyositte düşük parsiyel O_2 basıncından dolayı, mitokondrideki oksidatif fosforilasyon azalmıştır. Sonuçta laktik asit üretimi artar ve H^+ iyonu akümüülasyonu ile sonuçlanır. Sitozolik H^+ iyonunda artış, sarkolemmadaki Na^+/H^+ taşıyıcısının etkisinden dolayı, sitozolik Na^+ artışıyla sonuçlanır. Sitozolik Na^+ artışı, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ antiportunun ters çalışmasına yol açar ve iskemide sitozolik Ca^{+2} aşırı yüklenmesine neden olur. Sitozolik Ca^{+2} homeostazisine katılan diğer faktörlerden biri L-tipi Ca^+ kanallarıdır ki, miyosit kontraksiyonu sırasında sitozole Ca^{+2} girişini sağlarlar, diğeri ise, hücre dışına Ca^{+2} un aktif transportunu sağlayan sarkolemmal Ca^{+2} -ATPaz'dır. İ/R ile indüklenen ROT oluşumu, ekstraselüler Ca^{+2} 'nin miyosit içerisine girişini artırır. İ/R ile indüklenen

radikal oluşumu, direkt olarak reaktif aldehitlerin oluşumu aracılığıyla sitozolik Ca^{+2} aşırı yüklenmesine katkıda bulunur. Reaktif aldehitler, plazma membranındaki Ca^{+2} -ATPaz aktivitesini inhibe eder ve hücre dışına Ca^{+2} transportunu geciktirir⁴⁷. Sitozolik Ca^{+2} artışı, kardiyak miyositlerde çeşitli yollarla hasar oluşturur. Örneğin, sitozolik serbest Ca^{+2} artışı, kardiyak miyosit kontraktürünü promote eder ve kalbin normal kontraktil aktivitesi engellenir. Ayrıca, sitozolik Ca^{+2} artışı, kalpain ve katepsin gibi miyokardiyal hücre ölümünde (hem apoptozis hem de nekrozda) rol oynayan proteazların aktivasyonuna yol açar⁴⁸. Son olarak iskemi, ATP ile inhibe olan sarkolemmal ATP duyarlı K^{+} kanalları aracılığıyla, K^{+} akışındaki değişiklikleri tetikler. Bu kanallar, yapısal olarak iki farklı protein içerir: İçeriyi yönlendirerek K^{+} kanal poru ve sülfonilüre reseptör alt ünitesi. Sarko K_{ATP} 'nin farmakolojik ajanlarla açılması, miyositlerden dışarı K^{+} çıkmasına yol açar ve kardiyoproteksiyon oluşturur. Hem iskemi hem de reperfüzyon sırasında kardiyak aksiyon potansiyelinin süresini kısaltır (faz 3 repolarizasyonu hızlandırır) ve L-tipi Ca^{+} kanallarından hücre içine Ca^{+2} girişini azaltarak Ca^{+2} aşırı yüklenmesini önler⁴⁹.

Ca^{+2} aşırı yüklenmesinin ve artmış serbest radikal üretiminin (özellikle oksijen radikalleri) reperfüzyon hasarında en önemli mekanizmalar olduğu hakkında birçok kanıt vardır. İskemi sırasında, intraselüler asidoz $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiport aktivitesini uyarır. Enerji bağımlı Na^{+} - K^{+} ATP_{az} 'ın inhibisyonundan dolayı, Na^{+} artar ve $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+}$ antiportunun aktivasyonu ile intraselüler Ca^{+2} yükselir⁴⁴. İnterselüler Ca^{+2} içeriğinde artış, membran fosfolipidlerinde değişiklik yapabilen, fosfolipazları aktive eder. Sitozolik Ca^{+2} aşırı yüklenmesi, endojen kaynaklardan bilhassa SR'den salıverilen veya sarkolemmal katyon kanallarından akışından kaynaklanır. İskemi ve reperfüzyonda aşırı intraselüler Ca^{+2} aşırı yüklenmesinden sorumlu mekanizmalar Şekil-5'te gösterilmiştir⁴³.



Şekil 6: İ/R'de sitoplazmik ve mitokondriyal iyonik değişiklikler¹⁸

2.1.1.3.2. İ/R'de Mitokondriyal İyonik Değişiklikler

Mitokondriyal inner membrandaki H^+ , Ca^{+2} ve K^+ kanalları, İ/R ile indüklenen mitokondriyal iyonik homeostazın bozulmasında anahtar rol oynar. İskeminin başlangıcında inner membran yüzeyi ve mitokondriyal matriks arasında $\Delta[H^+]$ ve mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\psi_m$), ATP_{az} aracılığıyla sitozolik ATP hidrolizinden dolayı birkaç dakika için korunur. ATP hidrolizi dereceli olarak sonlanır ve uzun süreli iskemide mitokondriyal elektron transferi durur. Bu da, mitokondriyal matriks ve inner membran yüzeyi arasında $\Delta[H^+]$ 'da yavaş bir azalmayla sonuçlanır²⁷. Sonuçta, mitokondri membran potansiyeli düşer. $\Delta[H^+]$ 'daki azalma, mitokondri matriksi üzerindeki protonların sızmasını başlatan eşlenmemiş proteinler aracılığıyla olur. İskemi ile indüklenen mitokondriyal membran potansiyelindeki depresyon, Ca^{+2} influksunu ve ROT oluşumunu azaltarak reperfüzyonun erken fazında protektif bir rol oynayabilir²⁷. Mitokondriyal inner membrandaki Ca^{+2} uniportu, Ca^{+2} 'a göreceli olarak düşük afinite

gösterir ve elektroforetik olarak çalışır, böylece mitokondri içine Ca^{+2} influsu, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonuna ve mitokondriyal membran potansiyeline bağlıdır. Normal perfüzyon koşullarında, sitozolik Ca^{+2} ($\sim 10^{-7}$ M) düşüktür, bundan dolayı mitokondriyal inner membrandan Ca^{+2} sınırlı bir şekilde geçer. Bununla birlikte, mitokondriyal IR hasarında sitozolik Ca^{+2} artar ve mitokondri membran potansiyeli değişir, mitokondriyal matrikse Ca^{+2} influsu artar^(27,45). İskemide mitokondriyal Ca^{+2} artmış olmasına rağmen, mitokondriyal membran repolarize olduğunda majör Ca^{+2} influsu, reperfüzyon sırasında oluşur. Daha spesifik olarak, iskemi sırasında mitokondriyal Ca^{+2} , bazalin %50'si kadar artar, oysa reperfüzyonda, bazalin 4-5 katı kadar artar. Mitokondriyal Ca^{+2} 'daki bu büyük artış, İ/R ile indüklenen selüler hasara majör olarak katılır⁴⁵.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, mitoK_{ATP} kanalları üzerinde yoğunlaşmıştır. MitoK_{ATP}, mitokondri inner membranda lokalizedir ve sarko K_{ATP}'ye benzer olarak geçici iskemiye cevap olarak açılır. Bu kanalların açılımının kardiyoproteksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir. MitoK_{ATP} aktivasyonu, reperfüzyon sırasında ROT oluşumunu azaltır, iskemi sırasında mitokondriyal Ca^{+2} akümüülasyonunu azaltır, iskemiden sonra mitokondriyal enerji oluşumunu sağlar⁴⁹.

2.2. İ/R Hasarının Klinik Sonuçları

İ/R hasarının klinik sonuçları, geçici reperfüzyon aritmilerinden ölümcül (fatal) çoklu organ disfonksiyonu sendromunun gelişimine kadar birçok patolojiyi içerir. İ/R'ye cevapta bireyler arasında büyük farklılıklar olmakla birlikte, hiperkolesterolemi, hipertansiyon veya

diyabet gibi mevcut risk faktörlerinin varlığı, İ/R hasarının zararlı etkilerine karşı mikrovaskülatürün duyarlılığını artırır⁴⁹.

2.2.1. Vasküler Hasar ve “Yeniden akışın olmaması (No-Reflow)” Fenomeni

Klinikte, vasküler oklüzyonun açılmasından sonra iskemik organa kan akışının genellikle tamamen sağlanamaması “no reflow” fenomeni olarak tanımlanır. Lökosit endotelyal hücre adhezyonunda, platelet-lökosit agregasyonunda, interstisyel sıvı birikiminde artış ve mekanik kan akışının obstrüksiyonu ile birlikte endotel bağımlı vazorelaksasyonun azalması bu fenomenin oluşumuna aracılık eder. Klinik olarak bu fenomen, reperfüzyon sonrasındaki dönemde kalıcı organ disfonksiyonuna (örn. miyokardiyal stunning- sersemleme), organ naklinde başarısızlığa veya infarkt alanının artmasına yol açabilir⁵⁰.

2.2.2. Miyokardiyal Sersemleme

Miyokardiyal sersemleme, reperfüzyondan sonra kötüleşen ve geri dönüşümsüz olmayan miyokardiyal disfonksiyon olarak tanımlanır. Doğası gereği, geçici kontraktıl disfonksiyon, inotropik veya mekanik dolaşım desteğine de ihtiyaç duyulmakla birlikte, zamanla geri dönüşümlüdür. Miyokardiyal sersemlemenin kabul edilen mekanizmaları, reperfüzyon sonrası ATP'nin yeniden sentezinin azalmasını, koroner mikrovasküler spazmı veya tıkanmayı, ROT bağımlı sitotoksik hasarı ve anormal kalsiyum metabolizmasını içerir⁵¹. Hiberne miyokart(hibernating myocardium) terimi, miyokardiyal sersemlemenin tersine, istirahat halinde

kalıcı miyokardiyal disfonksiyonu ifade eder ve reperfüzyona değil iskemiye bağı olarak gelişir⁵².

2.2.3. Reperfüzyon Aritmileri

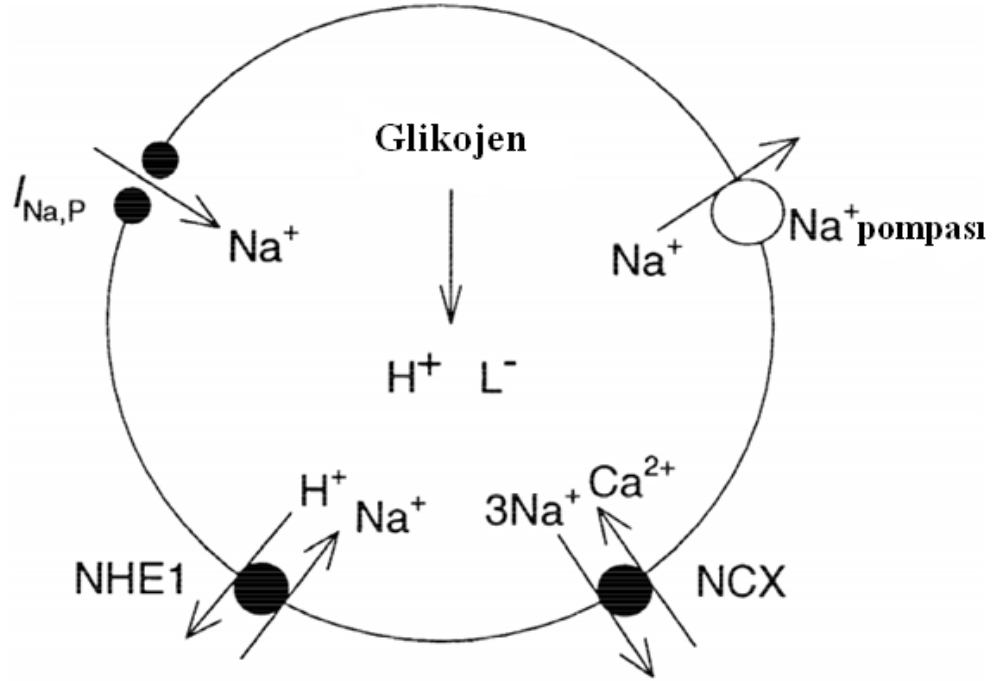
Reperfüzyon aritmeleri, genellikle trombolitik tedavi alan veya kardiyak operasyon geçiren hastalarda gözlemlenir ve koroner iskeminin hafifletilmesinden sonraki ani ölümlerin nedeni olarak kabul edilir.

Deney hayvanlarında yapılan İ/R çalışmaları da göstermiştir ki, herhangi bir koroner hasar taşımayan deneklerde, 15-20dk süreyle iskemiye maruz kalan miyokardın reperfüzyonu, sıklıkla ventriküler taşikardi ve fibrilasyon oluşumuna yol açar ve idiyoventriküler ritim oluşumunu hızlandırır⁵³. İskemik bölgenin reperfüzyonu sırasında iyon konsantrasyonlarının hızlı ve ani değişimi de kısmen reperfüzyon aritmelerinin oluşumuna yol açabilir. Dereceli yeniden akış veya geçici asidik reperfüzyon malign aritmelerin frekansını azaltır^{53,54}. Reperfüzyon aritmelerinin çoğu klinik açıdan önemli olmamakla birlikte, trombolitik tedavi alan AMI geçirmiş hastalarda, ventriküler fibrilasyon veya taşikardi insidansının tedavi almamış hastalara göre daha düşük olması, reperfüzyonun miyokardiyal aritmi riskini azalttığını düşündürmektedir⁵¹.

2.3. Na^+ ve Ca^{+2} aşırı yüklenmesine etki eden ilaçların İ/R hasarındaki koruyucu rolü

İ/R hasarına karşı etkin tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için, bu patolojide rol oynayan hücresel sinyal yollarının iyi anlaşılması gerekir.

İ/R hasarının temelinde, hücrede meydana gelen iyonik değişiklikler eşleşmiş değiş-tokuşçu teorisiyle (coupled exchanger theory) açıklanır⁵⁵. Buna göre, iskemi sırasında oksidatif fosforilasyon hızla durur ve anaerobik glikoliz başlatılır. Anaerobik glikolizin net ürünleri, laktat ve protonlardır. Anaerobik glikoliz sırasında 10dk içinde pH 1 birim düşer ve asidoz gelişir⁵⁶. İntraselüler asidoz NHE1 ve $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ kotransportunu da içeren asit uzaklaştırma mekanizmalarını stimüle eder. Bu da uzaklaştırılan her bir H^+ iyonuna karşı bir Na^+ iyonunun hücre içine girişine yol açar. İntraselüler Na^+ konsantrasyonundaki artış, membranda bulunan Na^+ pompasının aktivasyonu ile minimize edilmeye çalışılsa da iskeminin geç döneminde Na^+ pompası inhibe edilir⁵⁷. Ayrıca, iskemi sırasında özellikle sürekli (persistent) Na^+ akımını ($I_{\text{Na,P}}$) içeren, hücre içine Na^+ girişine yol açan diğer kaynaklar da intraselüler Na^+ artışına katkıda bulunur. Kaynağı her ne olursa olsun, intraselüler Na^+ konsantrasyonundaki artış, NCX'in ters moda çalışmasını aktive ederek intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun artmasına yol açar. Hücre içinde Ca^{+2} birikmesi ise, kardiyak miyosit kontraktürünü başlatarak ve ayrıca kalpain ve katepsin gibi miyokardiyal hücre ölümünde rol oynayan proteazların ve fosfolipazların aktivasyonuna yol açarak, hücre hasara neden olur⁵⁸.



Şekil 7: İ/R sırasında kalpte $[Na^+]_i$ ve pH regülasyonunda rol oynayan yollar⁵⁹

İ/R hasarının oluşumuna aracılık eden ve yukarıda bahsedilen iyonik değişiklikler göz önünde bulundurulduğunda, intraselüler Na^+ girişini ve/veya sonuçta intraselüler Ca^{2+} aşırı yüklenmesini azaltan ilaçlar, miyokardiyal İ/R hasarının azaltılması ya da önlenmesinde olası tedavi yaklaşımları arasında yer alabilir.

2.3.1. Na⁺ kanal blokörleri

Hücre içine Na⁺ girişinden sorumlu ana kanal, voltaja duyarlı Na⁺ kanallarıdır (I_{Na}). Kalpte Na⁺ akışı, tek bir kanal tarafından kontrol edilmez, ya kanalın farklı popülasyonları ya da tek bir kanalın modülasyonu ile düzenlenir. Başlıca iki tip Na⁺ akışından söz edilebilir: Geçici Na⁺ akışı (I_{NaT}) ve sürekli Na⁺ akışı (I_{NaP}). Biyofiziksel olarak, inaktivasyon komponenti dışında, bu iki tip akışın özellikleri benzerdir. I_{NaT} , istirahat potansiyelinden daha pozitif membran potansiyellerinde inaktive olurken, I_{NaP} , repolarizasyon sırasında inaktive olur. Sıçan ventriküler hücrelerinde, I_{NaP} 'nin aktivasyonu için gereken membran potansiyeli, 20mV civarındayken I_{NaT} için bu değer, (-52)-(-34)mV'dur⁶⁰. Kardiyak hücrelerde I_{NaP} , I_{NaT} ile aynı iyonik selektiviteye, kondüktansa, ortalama açık kalma süresine sahiptir⁶¹. I_{NaP} 'nin büyüklüğü, geçici komponentin %1'i kadardır ki, sıçan miyositlerinde yapılan bir çalışmada -40mV'a depolarizasyondan sonra 140ms içerisinde pik I_{NaT} 'nin 53nA, I_{NaP} 'nin ise 300pA olduğu bildirilmiştir^{60, 62, 63, 64}.

İskemi sırasında ekstraselüler K⁺'un akümüasyonu, dereceli olarak membran depolarizasyonuna neden olur ki, bu da aksiyon potansiyelinin bozulmasına yol açan geçici Na⁺ akışının inaktivasyonu ile sonuçlanır. Bunun yanı sıra, depolarizasyonla inhibe olmayan, yavaş olarak inaktive olan ve Na⁺ akışının çok küçük bir miktarından sorumlu olan sürekli Na⁺ akışı uyarılır ve bu akış, iskemi sırasında hücre içine Na⁺ girişinin majör kaynağıdır^{65,66,67}.

Yapılan çalışmalarda, I_{NaP} 'nin hipoksi veya iskeminin yanı sıra^{65,68,69}, iskemi veya reperfüzyon sırasında salıverildiği bilinen

lizofosfatidilkolin, palmitoil-L-karnitin ve hidrojen peroksitle^{70,71} arttığı bildirilmiştir.

I_{NaP} , tetradotoksin (TTX), lidokain ve kinidin gibi ajanlarla blokasyona I_{NaT} 'den daha duyarlıdır^{60,64}. TTX'in düşük konsantrasyonlarında, izole kobay kalbinde, iskeminin neden olduğu kontraktıl disfonksiyonun düzeldiğinin gösterilmesi⁶⁷, I_{NaP} kanallarının blokajına neden olan ilaçların İ/R hasarının tedavisinde faydalı olabileceğini düşündürmüştür. Tanonaka ve arkadaşları tarafından izole sıçan kalbinde yapılan çalışmada, TTX'in (0.1-1 μ M) konsantrasyon bağımlı olarak İ/R ile indüklenen miyokardiyal sodyum içeriğini azalttığı ve sol ventrikül gelişen basıncındaki (SVGB) post-iskemik iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, düşük konsantrasyonda TTX'in (0.1-0.3 μ M) kontraksiyon büyüklüğünü değiştirmeksizin, kalbi İ/R hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, 0.1 ve 0.3 μ M TTX'in I_{NaT} üzerine daha düşük inhibitör etki gösterirken, I_{NaP} 'yi inhibe ettiğini gösteren çalışmaları^{60,72} destekler. Ayrıca, 60 μ M TTX'in izole sıçan miyositlerinde hipoksiyle indüklenen Na^+ artışını azalttığı saptanmıştır⁷³. 200 μ M lidokainin de izole sıçan kalbinde iskemiyle indüklenen Na^+ artışını inhibe ettiği ve buna bağlı olarak post iskemik kontraktıl disfonksiyonu düzelttiği ve infarkt alanını azalttığı gösterilmiştir^{73,74}.

Takeo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Na^+ kanallarını bloke eden sınıf-I antiaritmik ajanların (kinidin, disopramid, prokainamid, lidokain, meksiletin, flekainid ve pilsikainid) post-iskemik kontraktıl fonksiyonu arttırdığı ve bu etkinin Na^+ kanallarını bloke etme gücüyle doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Buna göre kinidin, flekainid ve pilsikainid en güçlü kardioprotektif etki gösterirken, bu ajanları disopramid, meksiletin ve daha sonra da lidokain, prokainamid izlemiştir. Buna paralel

olarak da lidokain ve prokainamidin pre-iskemik kalpte sol ventrikül gelişen basıncını diğer ajanlara göre minimal düzeyde azalttığı saptanmıştır ve sınıf-I antiaritmik ajanların negatif inotropik etkileriyle post iskemik kontraktıl gücü arttırmaları arasında ilişki olduğu öne sürülmüştür⁷⁵. Birçok çalışmada da, kardiyoprotektif ajanlar için negatif inotropik etki ve enerji koruyucu etkinin (energy sparing effect) önemli olduğu rapor edilmiştir^{76,77}. Ancak yukarıda bahsedilen çalışmada, kinidin varlığında miyokardiyal yüksek enerjili fosfat düzeylerinin değişmediğinin gösterilmesi ise kardiyoprotektif etki için negatif inotropik etkinin yanı sıra enerji koruyucu etkinin mutlaka gerekli olmadığını göstermektedir. Ayrıca I_{NaP} 'nin, İ/R hasarı sonucunda oluşan aritmilerden sorumlu olduğu da gösterilmiştir⁶⁸. Bütün bu bilgiler ışığında I_{NaP} 'nin blokajı, İ/R hasarına karşı terapötik yaklaşım için önemli bir hedef olarak görülmektedir. Bu akışı bloke eden ajanlardan ranolazin, 2006 yılında kronik anjina tedavisi için FDA'den onay almıştır. Akut miyokardiyal iskemi sırasında, ranolazin uygulanmasının kardiyoprotektif etkili olduğu, düşük akışlı iskemiye maruz bırakılan izole kobay kalbinde gösterilmiştir. Bu çalışmada, ranolazin varlığında selüler ATP düzeylerinin korunduğu ve hücre ölümünün belirteçleri olan kreatin kinaz ve laktat dehidrogenaz salıverilmesinin azaldığı ve böylece miyositlerin iskemiye toleransının arttığı bulgulanmıştır⁷⁸. İskemi sırasında ranolazin uygulanması, miyokardiyal hücre ölümünü azaltır ve sol ventrikül fonksiyonunu düzeltir. Global iskemi modelinin kullanıldığı Langerdorff-perfüze tavşan kalbinde de ranolazinin iskemi öncesinde uygulanmasının, kreatin kinaz salıverilmesini anlamlı olarak azalttığı ve reperfüzyon sırasında, sol ventrikül gelişen basıncı ile kasılma-gevşeme hızını düzelttiği gösterilmiştir⁷⁹. Bunun yanı sıra, başka bir çalışmada da, ranolazin uygulanmasının normoksik koşullarda hemodinamik ve kontraktıl parametreleri etkilemediği, İ/R sonrasında ise kardiyak işi ve hız-basınç ürününü koruduğu gösterilmiştir⁸⁰.

İn vivo İ/R çalışmaları da, koroner arter oklüzyonu ve reperfüzyonundan sonra ranolazinin, miyokardiyal kreatin kinaz ve laktat dehidrogenaz saliverilmesini⁸¹, infarkt alanını ve kardiyak troponin-T saliverilmesini azalttığı ve sol ventriküler disfonksiyonunu düzelttiği gösterilmiştir⁸². Ranolazinin infarkt alanı üzerine etkisini inceleyen çalışmaların sonuçları birbiriyle çelişkilidir. Black ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 90 dk koroner arter oklüzyonu ve 18 saat reperfüzyon uygulanan kanin modelinde, ranolazinin kreatin kinaz saliverilmesini ve infarkt alanını etkilemediği bulgulanmıştır⁸³. Bu farklılık, farklı türlerde ilacın etkisinin de farklı olmasından veya iskemi süresinin uzunluğundan kaynaklanabilir. 15 dk koroner arter oklüzyonu ve 3 saat reperfüzyonun uygulandığı tavşan kalbinde yapılan bir çalışmada da, ranolazinin kontraktıl fonksiyonu düzeltirken, miyokardiyal nekrozu veya bölgesel miyokardiyal kan akışını değıştirmedeğinin gösterilmesi⁸⁴ ise, infarkt alanı üzerine olan etkisizliğinin iskemi süresinin uzunluğuyla alakalı olmadığını göstermektedir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, kontraktıl fonksiyondaki düzelmenin nekrozdan bağımsız olduğunu düşündürmektedir.

Selektif olarak I_{NaP} 'yi bloke eden bir başka ajan riluzolun de iskemi ve reperfüzyon sırasındaki kontraktürün büyüklüğünü azaltarak ve reperfüzyon sırasında sol ventrikül basıncının normale dönüş süresini kısaltarak, kardiyak İ/R hasarını önlediği gösterilmiştir. Ayrıca reperfüzyon sonrasında sistolik basıncı arttırdığı ve diyastolik basıncı azalttığı ve bunlara bağılı olarak da ventriküler kasılma ve gevşeme hızını arttırdığı gösterilmiştir⁸⁵.

2.3.1.1.44Bu

44Bu (2- hidroksi- 3- (butilaminopropil- 4- [(butoksikarbonil) amino] benzoat) hidroklorit), yeni sentezlenmiş bir bileşik olup, sıçanlarda izoprenalinle indüklenen taşikardiyi önlediği ve bu etkisinin, kimyasal olarak çok kısa etkili bir β blokör olan esmolole kimyasal olarak benzerliğinden dolayı, potansiyel olarak β reseptörleri çok kısa süreli bloke etmesine bağlı olabileceği öne sürülmüştür¹⁷. Bunun yanı sıra, sıçan izole ventriküler miyositlerinde 10 μ m 44Bu'nun geçici Na⁺ akımını (I_{NaT}) %100, geçici dışı doğru K⁺ akımını (I_{to}) %50 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir¹⁸. 44Bu'nun membran iyon akımı üzerindeki inhibitör etkisinin esmolol¹⁸ ve sınıf Ia antiaritmik ilaçlardan biri olan ajmalinden¹⁹ daha potent olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise 44Bu'nun akonitin ile indüklenen aritmileri ve mortalite oranını azaltmada lidokaine göre daha etkili olduğu bulgulanmıştır²⁰.

Biz de daha önce yaptığımız çalışmada, 44Bu'nun (0.3-1 μ M) iskemi öncesinde 10dk ve iskemi sonrasında 5dk uygulandığında kardiyodinamik fonksiyonları önemli derecede düzelttiğini gösterdik. Bu çalışmada 44Bu'nun fonksiyonel parametreler üzerindeki koruyucu etkisiyle uyumlu olarak, aynı konsantrasyonlarda 44Bu, infarkt alanını ve LDH saliverilmesini azaltmıştır. 0.1 μ M konsantrasyonunda uygulandığında ise, hiçbir kardiyoprotektif etki gözlenememiştir. Ayrıca reperfüzyon hasarına karşı izole kalp preparatında gerek kardiyoprotektif, gerekse elektrofizyolojik olarak ölçtüğümüz geçici sodyum akımı üzerine inhibe edici etkisinin, lidokaine göre daha potent olduğu bulgulanmıştır. Bunun yanı sıra 44Bu'nun NHE aktivitesini ve Ca⁺² akımını etkilemediğinin de saptanması, kardiyoprotektif etkisinden Na⁺ kanal blokasyonunun sorumlu olduğu hipotezini desteklemektedir²¹.

2.3.2. Na⁺-H⁺ antiport inhibitörleri

Na⁺-H⁺ antiportu (NHE), bütün dokularda intraselüler pH'nın regülasyonunda rol oynar. NHE'nin 6 farklı izoformu bulunmaktadır. Ancak NHE1, kardiyak dokuda predominant izoformdur ve iskemiye takiben kardiyak hücrelerden protonların uzaklaştırılmasını sağlayan en önemli mekanizmadır^{86,87}. NHE1, protonları hücre dışına atarken, Na⁺ iyonlarını kimyasal gradiyente göre hücre içine alır. Değiş tokuş hızı, kısmen intraselüler pH'nın derecesine bağlıdır ki intraselüler pH 7.2 civarındayken veya daha alkali iken 0'dır. Buna karşın, intraselüler pH 6.5 veya daha asidikken değiş tokuş hızı maksimumdur⁸⁸. NHE1 aktivitesi, iskemi sırasında ve reperfüzyon başlangıcında Na⁺-K⁺-ATPaz inhibe olduğunda, Na⁺'nın akümüülasyonu ile sonuçlanan intraselüler Na⁺'nın artışına yol açar. İntraselüler Na⁺'daki artış, Na⁺/Ca⁺² antiportu aracılığı ile intraselüler Ca⁺²'un artmasına ve sonuçta kontraktıl disfonksiyona yol açar^{89, 90, 91, 92}. Bütün bu bilgiler ışığında, özellikle reperfüzyon sırasında, NHE1'in aktivasyonunun kalpte hasara yol açtığı açıktır ve reperfüzyondan önce bu antiportun inhibisyonu, miyokardiyal hasarı azaltabilir. Bu hipotez, etil izopropil amilorid (EIPA), karpiorid, eniporid ve zoniporid gibi^{89, 91, 92, 93, 94} NHE1 inhibitörlerinin çeşitli modellerde İ/R hasarını azalttığını veya önlediğini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir.

Amilorid, tanımlanan ilk NHE1 blokörüdür. NHE1 üzerine rölatif olarak düşük afinite gösterirken, aynı zamanda epitelyal Na⁺ kanalları gibi diğer kanalları da inhibe ettiği gösterilmiştir⁹⁵

Karmazyn ve arkadaşları tarafından 1988 yılında yapılan çalışmada, NHE1 inhibitörü amiloridin izole sıçan kalbinde iskemi

reperfüzyonun neden olduğu miyokardiyal hasarı azalttığı ve ventriküler fonksiyonun düzelmesini arttırdığı ilk olarak gösterilmiştir⁹⁶. Amiloridin (1 mM) intraselüler Na^+ 'nın iskemi sırasındaki artışını tamamen bloke ettiği de bulgulanmıştır⁹⁷.

30 dk. iskemi, 30 dk. reperfüzyon yapılmış izole sıçan kalbinde, amiloridin (100 mM) zoniporidden (100 nM) kardiyoprotektif açıdan daha etkili olduğu gösterilmiştir⁹⁸. Daha önce yapılan çalışmalarda, bu iki ilaç, yukarıdaki konsantrasyonlarında kullanıldığında, NHE1'i eşit düzeyde inhibe ettikleri gösterilmiştir^{99,100}. Bu nedenle, amiloridin kardiyoprotektif etkisinin zoniporidden daha güçlü olması, NHE1 üzerindeki inhibitör etki güçleri yerine, intraselüler Na^+ konsantrasyonunu ne kadar azalttıklarıyla ilişkili olabilir. Williams ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, amiloridin iskemi sırasında intraselüler Na^+ artışını tamamen bloke ettiği, oysa zoniporidin intraselüler Na^+ artışını anlamlı düzeyde etkilemediği ancak reperfüzyon sırasındaki geçici intraselüler Na^+ artışını tamamıyla önlediği gösterilmiştir⁹⁸.

İn vitro ve in vivo tavşan miyokardiyal iskemik hasar modelinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise, zoniporidin izole kalpte infarkt alanını konsantrasyon bağımlı olarak azalttığı ($\text{EC}_{50} = 0.25 \text{ nM}$) ve 50 nM konsantrasyonunda kullanıldığında infarkt alanını kontrole göre %83 oranında azalttığı saptanmıştır. Ayrıca zoniporidin, bu etki bakımından eniporid ($\text{EC}_{50} = 0.69 \text{ nM}$) ve kariporid ($\text{EC}_{50} = 5.11 \text{ nM}$) den 2.5-20 kat daha potent olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın in vivo kısmı da in vitro kısmı ile uyumlu sonuçlar içermektedir¹⁰¹.

2007 yılında, Ten Hove ve arkadaşları sıçan kalbinde yaptıkları çalışmada, Na⁺ kanal blokörü lidokain (200 µM) ve NHE inhibitörü eniporidin (3 µM) kombine kullanıldığında infarkt alanı ve kontraktıl fonksiyon üzerindeki kardiyoprotektif etkinliklerinin bu ilaçların tek başına kullanılmalarına göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır⁷⁴.

Deneyssel olarak I/R hasarına karşı NHE1 inhibitörlerinin kardiyoprotektif etkilerinin gösterilmesi, bu ajanların akut koroner sendromdaki miyokardiyal iskemik hasarı ve perioperatif miyokardiyal hasarı azaltmada klinik olarak faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Kariporid ve eniporid, klinik deneme aşamasında olan NHE1 inhibitörleridir. ESCAMI denemesinde, eniporidin infarkt alanını azaltmadığı gösterilmiştir¹⁰². Bununla birlikte, 11590 hastada yapılan GUARDIAN denemesinde ise, kariporid uygulanmasının koroner arter bypass graft cerrahisi geçiren hastalarda sekonder olarak miyokard infarktüsü geçirme riskini ve mortalite oranını azalttığı gösterilmiştir. Benzer olarak EXPEDITION denemesinde de, kariporid uygulanmasının miyokard infarktüsü insidansını azalttığı saptanmıştır¹⁰³.

2.3.3. Na⁺-Ca⁺² antiport inhibitörleri

Kardiyak Na⁺/Ca⁺² antiportu (NCX), fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda, Ca⁺² homeostazının sürdürülmesinde önemli rol oynar¹⁰⁴. Fizyolojik koşullarda, bu antiport aracılığıyla 3 Na⁺ iyonu hücre içine alınırken, 1 Ca⁺² iyonu hücre dışına atılır¹⁰⁵. İntraselüler Na⁺ konsantrasyonu arttığında, bu antiport mekanizma ters modda çalışır ve 1 Ca⁺² iyonunu hücre içine alırken, 3 Na⁺'u hücre dışına atar¹⁰⁶. NCX'in ters modda çalışması, İ/R hasarına yol açan Ca⁺² aşırı yüklenmesinde rol oynayan major mekanizmadır^{107, 108, 109}.

KB-R7943 (KBR), µM konsantrasyonlarda selektif olarak NCX'in ters modunu inhibe eder^{110,111}. KBR'nin kardiyak İ/R hasarına karşı etkisinin incelendiği çalışmalarda, post-iskemik kontraktıl disfonksiyonu iyileştirdiği¹¹², miyosit hiperkontraktürünü¹¹³, infarkt alanını¹¹⁴ ve reperfüzyon aritmilerini¹¹⁵ azalttığı gösterilmiştir.

SEA0400 (SEA) KBR'den daha potent ve selektif NCX inhibitörü olarak tanımlanmış ve serebral iskeminin in vitro ve in vivo modellerinde protektif etkili olduğu gösterilmiştir¹¹⁶. SEA0400'ün bölgesel iskemiye maruz kalan izole perfüze tavşan kalbinde infarkt alanını¹¹⁷, izole tavşan¹¹⁷ ve sıçan¹¹⁸ kalplerinde İ/R ile indüklenen ventriküler disfonksiyonu azalttığı, anesteziye sıçanda ise koroner ligasyonla oluşturulan İ/R modelinde, ventriküler fibrilasyon insidansını ve mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir¹¹⁸.

KBR ve SEA'nın kardiyoprotektif etkilerinin gösterildiği yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak, Motegi ve arkadaşları 35 dk iskemi, 60 dk reperfüzyon veya 20 dk iskemi 60 dk reperfüzyon uyguladıkları izole sıçan kalbinde, KBR (3-30 μ M) ve SEA'nın (0.3-1 μ M) etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmaya göre, KBR veya SEA'nın 35 dk iskemi, 60 dk reperfüzyon uygulanan kalplere pre veya post-iskemik olarak uygulanması, post-iskemik kontraktıl disfonksiyonu düzeltmemiştir. Ayrıca iskemi veya reperfüzyonla indüklenen Na^+ akümülyasyonunu azaltmamıştır. Aynı çalışmada, 20 dk iskemi 60 dk reperfüzyon uygulanan kalplere 10 μ M KBR veya 1 μ M SEA'nın pre veya post-iskemik uygulanmasının, post-iskemik kontraktıl yanıtı anlamlı olarak arttırdığı ve bununla beraber reperfüzyonla indüklenen Ca^{+2} akümülyasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca KBR 10 μ M ve SEA 1 μ M kısmen Na^+ influksunu azaltmıştır. Bu sonuçlar göstermiştir ki, NCX inhibitörleri, göreceli olarak orta derecedeki İ/R hasarına karşı kardiyoprotektif etki gösterebilir¹¹⁹.

NCX'i inhıbe eden bir başka ajan MCC-135'in de Ca^{+2} aşırı yüklenmesini baskıladığı ve izole sıçan kalbinde kardiyoprotektif etkiler gösterdiği saptanmıştır¹²⁰. Bu ajanın ayrıca perkütanöz girişim yapılan miyokard infarktüsü geçirmiş hastalarda sistolik sol ventrikül disfonksiyonunun frekansını azalttığı da gösterilmiştir¹²¹.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Deneylerde Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş. tarafından üretilen 300-450 g ağırlığında Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Bu çalışma için, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'ndan G.Ü.ET-10.011 kod numaralı ve 172-16792 sayılı etik kurul izni alınmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler:

Ketamin (Ketasol %10 Enjektabl, 60mg/kg): Anestezi oluşturmak amacıyla i.p. olarak kullanılmıştır. Doz ayarlaması, kullanılan ticari preparattan hacim hesaplanarak yapılmıştır.

Ksilazin (Alfazyne %2 Enjektabl, 10mg/kg): Anestezi oluşturmak amacıyla i.p. olarak kullanılmıştır. Doz ayarlaması, kullanılan ticari preparattan hacim hesaplanarak yapılmıştır.

44Bu (2- hidroksi- 3- (butilaminopropil- 4- [(butoksikarbonil) amino] benzoat) hidroklorit, M.A: 403): Çek Cumhuriyeti, Brno'da bulunan Veteriner ve Farmasötik Bilimler Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Laboratuvarlarında sentezlenmiştir. 10^{-4} M (0.1 mM)'lık stok çözeltisi distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Krebs-Henseleit çözeltisiyle 3×10^{-7} M (0.3 μ M)'a dilüe edilerek kullanılmıştır. Dilüe çözelti, ilaç hazırlanacağı zaman taze olarak hazırlanmıştır.

Ranolazin-2HCl (Sigma, R6152, M.A: 500,46): Distile suda çözülerek 10^{-3} M (1 mM) stok çözeltisi hazırlandıktan sonra, ilaç uygulanacağı zaman 10^{-5} M (10 μ M)'a Krebs Henseleit çözeltisi ile dilüe edilmiştir.

Zoniporid-2HCl (Tocris 2727, M.A: 397,77): Distile suda çözülerek 10^{-4} M (0.1 mM) stok çözeltisi hazırlandıktan sonra ilaç uygulanacağı zaman 10^{-7} M (0.1 μ M)'a Krebs-Henseleit çözeltisi ile dilüe edilmiştir.

KB-R 7943 mezilat (Tocris 1244, M.A: 427,49): 10^{-3} M (1mM)'lık stok çözeltisi 1/10 DMSO'da çözülerek hazırlanmıştır. İlaç uygulanacağı zaman 10^{-6} M (1 μ M)'a Krebs-Henseleit çözeltisi ile dilüe edilmiştir. Dilüsyondaki final DMSO konsantrasyonu %0.01'dir.

Krebs-Henseleit Çözeltisinin Bileşimi (mM)

Sodyum Klorür (NaCl) : 120

Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃) : 25

Anhidr Glukoz : 11

Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄) : 1.2

Potasyum Klorür (KCl) : 4.8

Magnezyum Sülfat (MgSO₄.7H₂O) : 1.2

Kalsiyum Klorür (CaCl₂.2H₂O) : 1.25

3.1.3. Kullanılan Deney araçları

Langendorff sabit akışlı perfüzyon sistemi (Commat Ltd., Türkiye)

Bilgisayarlı veri kayıt sistemi (BSL Pro36, Commat Ltd., Türkiye)

Amplifier modülü (Biopac Systems, Model MP30, Commat Ltd., Türkiye)

Sirkülasyonlu su banyosu (MAY WBC3446V2, Commat Ltd., Türkiye)

Peristaltik pompa (Peri-Star, WPI)

Kan basıncı transduseri (Commat Ltd., Türkiye)

Sol ventrikül basıncı transduseri (Commat Ltd. , Türkiye)

Stimülatör (MAY ISO150-C 220V 50-60Hz)

Vakumlu filtrasyon pompası (KnF Nevberger Type: NO22AN.18)

pH metre (Venco 6173pH)

Vorteks (FIRLABO.sa Type:AGITATEUR)

Hassas terazi (Schimadzu)

Mikropipet (Eppendorf Research)

%95 O₂ %5 CO₂ içeren gaz karışım tüpü

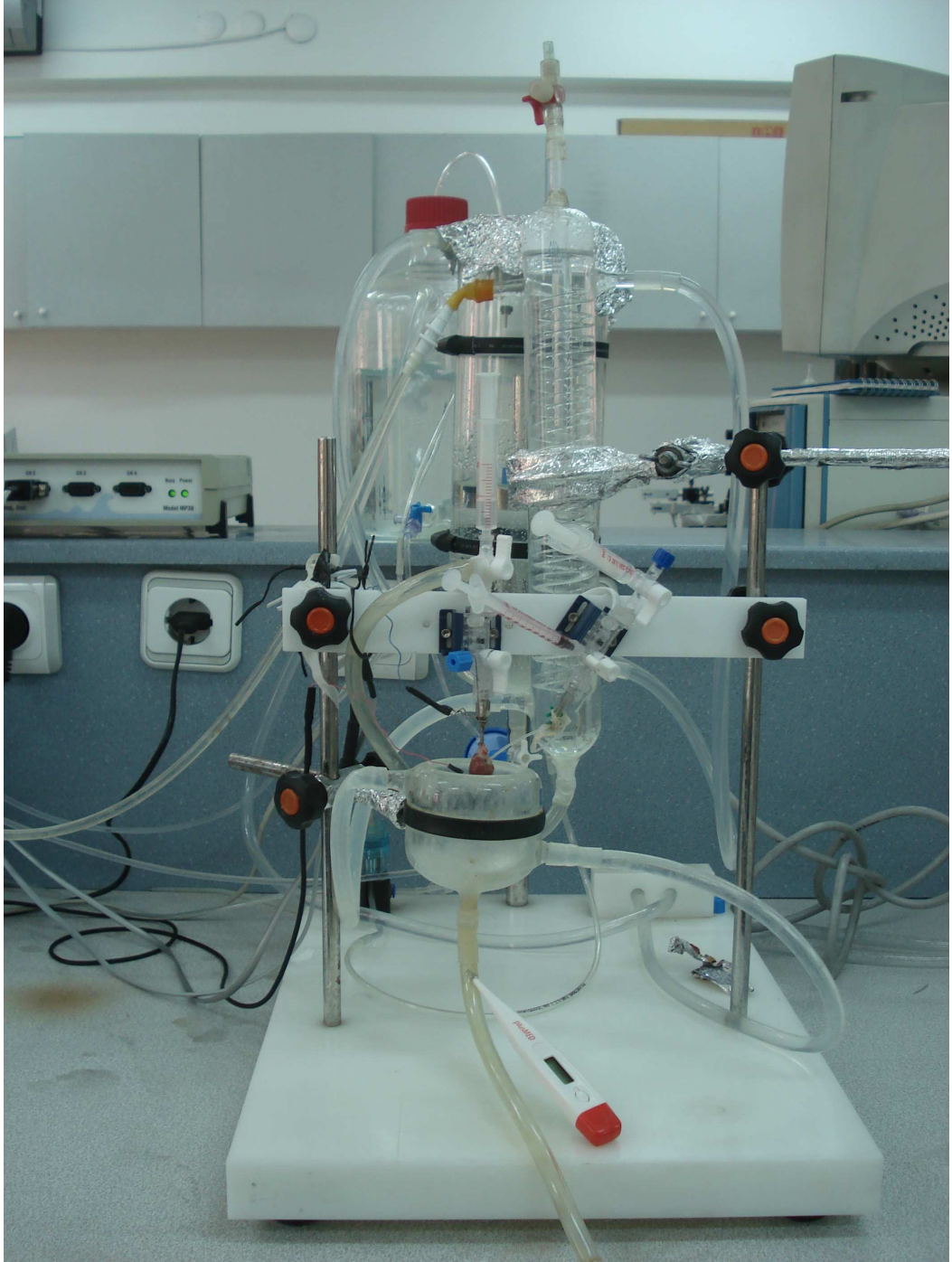
Cerrahi malzeme (makas, forseps, bulldog klemp)

3.2. Yöntem

3.2.1. Sıçan İzole Kalp Preparatının Hazırlanması

Sıçanlar, ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) karışımının i.p. olarak uygulanmasıyla anesteziye edilmiştir. Toraks açılıp perikardiyektomi yapılarak kalp çıkarılmıştır. Çıkarılan kalp, taze hazırlanmış ve +4°C'de soğutulmuş buzlu Krebs Henseleit (pH= 7.4) çözeltisi içerisine alındıktan sonra, 1 dk içerisinde sabit-akışlı Langendorff perfüzyon sistemine asılmış, sıcaklığı 37°C olan ve %95 O₂ %5 CO₂ gaz karışımı ile havalandırılan Krebs-Henseleit çözeltisi ile aortadan retrograd olarak sabit akışla (10ml/dk) perfüze edilmiştir. Atriyumlar uzaklaştırıldıktan sonra kalpler, kalp hızı 300 bpm olacak şekilde apekse yerleştirilen platin elektrot vasıtasıyla stimüle edilmiştir (5 Hz, 1.5 msn, 30V). Sol ventrikül basıncı ölçümü için, ucunda streç film kullanılarak yapılmış balon bulunan ve diğer ucu basınç transdüseri ile bağlantılı olan kanül, sol ventriküle yerleştirilmiştir. Ventrikül içerisine yerleştirilen balon, distile suyla şişirilerek, kalbin sol ventrikül diyastol sonu basıncı 5-10 mmHg'a ayarlanmıştır.

Laboratuvarımızda kullandığımız Langendorff düzeneği şekil-8'de gösterilmiştir.



Şekil 8: Sabit-akışlı Langendorff düzeneği

3.2.2. İskemi-Reperfüzyon Protokolü

20 dk.lık dengelenme periyodundan sonra aortadan perfüzyon kesilerek 60 dk süreyle global iskemi yapılmıştır. 60 dk.lık global iskemi sonunda perfüzyon açılarak 30 dk süreyle kalpler reperfüze edilmiştir. İskemi ve reperfüzyon süresince perfüzyon basıncı, sol ventrikül basıncı ve kalp hızı kaydedilmiştir.

Bütün ilaçlar, iskemiden önce 10 dk ve reperfüzyonun başlangıcında 5 dk süreyle uygulanmıştır.

3.2.2. Deney Grupları:

Çalışmada 6 grup deney yapılmıştır. Her bir deney grubunda 2-9'ar adet sıçan kullanılmıştır.

1. grup (Kontrol): 20 dk'lık dengelenme periyodunu takiben 60 dk'lık uzun süreli global iskemi ve 30 dk.lık reperfüzyon uygulanmıştır (n=8).
2. grup (44 Bu): Kalpler, 10 dk.lık dengelenme periyodunu takiben iskemi öncesi 10 dk, reperfüzyonun başlangıcında 5 dk süreyle 0.3 μ M 44 Bu ile perfüze edilmişlerdir. (n=9)

3. Grup (Ranolazin): Kalpler, 10 dk.lık dengelenme periyodunu takiben iskemi öncesi 10 dk, reperfüzyonun başlangıcında 5 dk süreyle 10 μ M ranolazin ile perfüze edilmişlerdir. (n=5)
4. Grup (Zoniporid): Kalpler, 10 dk.lık dengelenme periyodunu takiben iskemi öncesi 10 dk, reperfüzyonun başlangıcında 5 dk süreyle 0.1 μ M zoniporid ile perfüze edilmişlerdir. (n=5)
5. Grup (KBR): Kalpler, 10 dk.lık dengelenme periyodunu takiben iskemi öncesi 10 dk, reperfüzyonun başlangıcında 5 dk süreyle 1 μ M KBR ile perfüze edilmişlerdir. (n=6)
6. Grup (DMSO): Kalpler, 10 dk.lık dengelenme periyodunu takiben iskemi öncesi 10 dk, reperfüzyonun başlangıcında 5 dk süreyle Krebs-Henseleit çözeltisi içerisinde % 0.01'lik DMSO ile perfüze edilmişlerdir. (n=2)

Her bir deney boyunca perfüzyon basıncı, sol ventrikül basıncı ve kalp hızı kaydedilmiştir. Kaydedilen sol ventrikül basıncı değerlerinden sol ventrikül gelişen basıncı (SVGB), sol ventrikül diyastol sonu basıncı (SVDSB), sol ventrikül kasılma ve gevşeme hızları ($\pm dp/dt$) hesaplanmıştır. Ayrıca, bu değerler kullanılarak dengelenme sırasındaki değerlere göre % düzelme değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerle ilgili yapılan analizlerde, 30dk'lık reperfüzyon sonunda ölçülen değer, dengelenme sırasında ölçülen değere göre yüzdesi hesaplanarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası(S.H) şeklinde ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılarak karşılaştırılmıştır. Hangi gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığı ise, Student-Newman Keuls post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. 60 dk global iskemi 30 dk reperfüzyon protokolünün kontraktıl fonksiyon üzerindeki etkileri:

20 dk dengelenme periyodundan sonra, 60 dk global iskemi ve 30 dk reperfüzyon uygulanmış kontrol kalplere ilişkin SVB'nin kaydedildiği orjinal traseler Şekil 9'da verilmiştir.

Kontrol kalplerde, reperfüzyon sonunda SVGB belirgin olarak azalmış ve başlangıç değerine göre kalplerin % 34.4 ± 5.8 oranında kontraktıl fonksiyonunu koruduğu gözlenmiştir (Şekil 10, 11). Bu bulguyla paralel olarak, reperfüzyon sonunda kalplere ilişkin kasılma ve gevşeme hızlarının ($\pm dp/dt$) da reperfüzyon sonunda azaldığı saptanmıştır. Reperfüzyon sonunda kasılma hızı % 28 ± 7.1 , gevşeme hızı ise % 40.9 ± 4.7 oranında korunmuştur (Şekil 14, 15, 16, 17).

İ/R hasarı sonrasında gözlenen miyokardiyal disfonksiyonun tanımıyla uyumlu olarak da kontrol kalplerde beklendiği gibi kalbin gevşeme yanıtına ilişkin SVDSB'nin reperfüzyon sonunda başlangıç değerine göre % 1237 ± 262 oranında arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 12, 13).

İskemi sırasında, aşırı Na^+ yüklenmesinin ardından hücre içi aşırı Ca^{+2} yüklenmesine bağlı olarak gelişen hiperkontraktürün belirleyicisi olan SVDSB değerlendirildiğinde, kontrol kalplerin 37.5 ± 2.6 dk'da

maksimum kontraktüre ulaştığı ve SVDSB'nin 103.2 ± 3.6 mmHg'ya kadar yükseldiği belirlenmiştir (Şekil 18).

İskemiye girmeden hemen önce ve reperfüzyon sonunda koroner perfüzyon basıncının başlangıçtaki değerine göre değişmediği bulgulanmıştır (Şekil 19).

4.2. Hücre içi aşırı Na^+ ve Ca^{+2} yüklenmesini etkileyen ilaçlarla tedavinin I/R ile indüklenen kontraktıl disfonksiyon üzerindeki etkileri

20 dk dengelenme periyodunun ardından, 60 dk global iskemi ve 30 dk reperfüzyona maruz bırakılan kalpler, iskemi öncesi 10 dk ve reperfüzyon başlangıcında 5 dk boyunca 44Bu ($0.3 \mu\text{M}$), ranolazin ($10 \mu\text{M}$), zoniporid ($0.1 \mu\text{M}$) veya KBR ($1 \mu\text{M}$) ile tedavi edilmiştir.

İlaçla tedavi edilen deney gruplarında kaydedilen SVB'na ilişkin orijinal trase örnekleri şekil 9'da verilmiştir.

İskemi öncesinde 10 dk ilaç uygulanması sonucunda hiçbir ilaç, incelenen kardiyodinamik parametreleri (SVGB, SVDSB, $\pm dp/dt$) anlamlı olarak değiştirmemiştir. (Şekil 10, 12, 14, 16).

44Bu ve ranolazinle tedavi edilen kalplerde, SVGB'nin reperfüzyon sonunda $\% 72.6 \pm 3.8$ ve $\% 95 \pm 6.7$ oranında düzeldiği ve bu düzelmenin kontrol ($\% 34.4 \pm 5.8$), zoniporid ($\% 54.4 \pm 5.5$) ve KBR ($\%$

52.6±7.7) grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Ayrıca, ranolazinin SVGB üzerindeki iyileştirici etkisi, 44Bu'ya göre anlamlı olarak daha fazladır (Şekil 10, 11).

SVDSB, 44Bu, Ranolazin, Zoniporid ve KBR uygulanan gruplarda İ/R sonrasında bazal değerine göre % 681.7±81.7 , % 536±128, % 666.4±84.4 ve % 852.4±128.8 oranında artmıştır. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmazken, bütün gruplardaki SVDSB artışı, kontrol gruplarındaki SVDSB artışıyla (% 1503±267.6) karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha azdır (Şekil 12, 13).

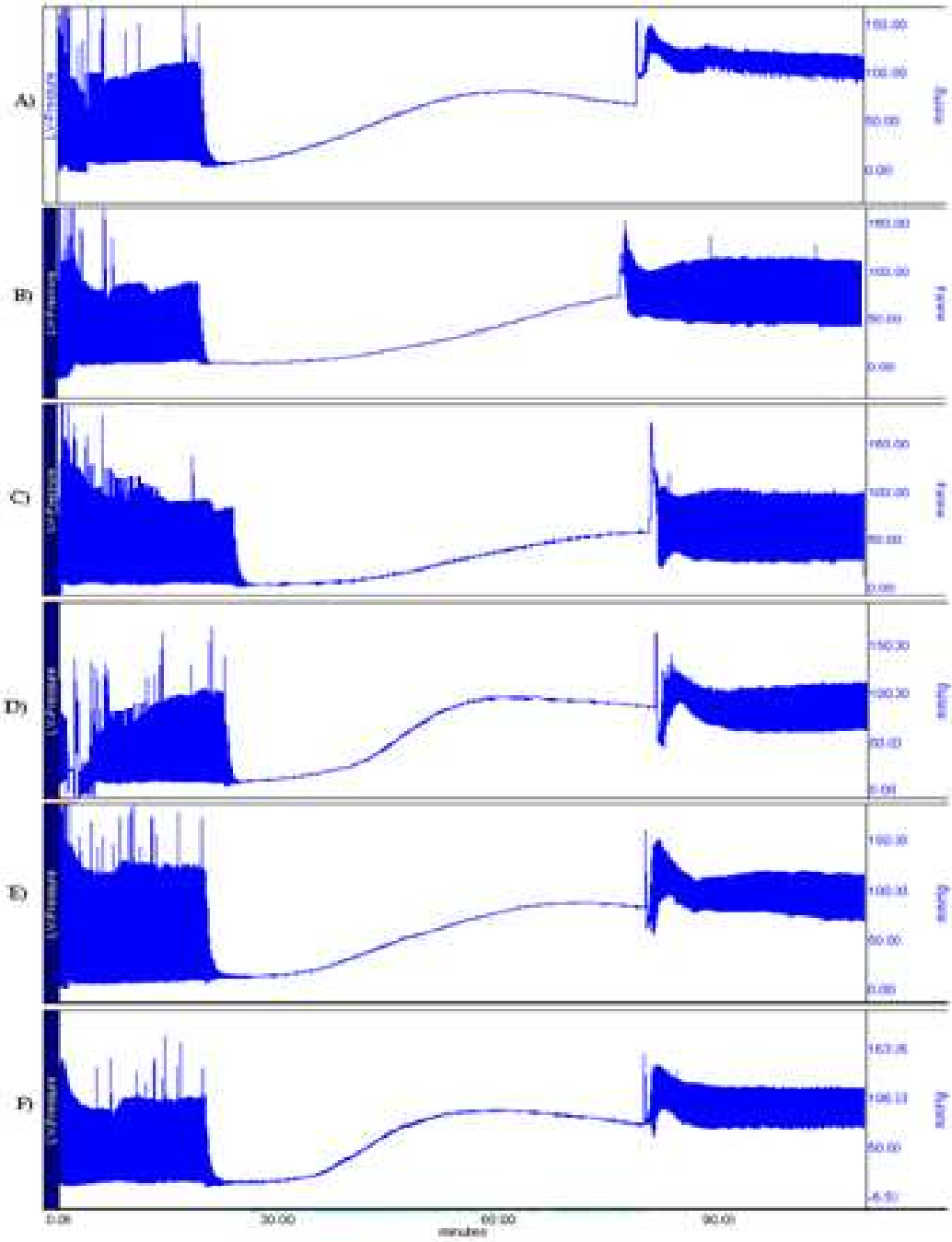
İlaçlarla tedavinin kasılma ve gevşeme hızları üzerindeki etkisi, SVGB üzerindeki etkileriyle de paralel olarak bulgulanmıştır. Buna göre reperfüzyon sonundaki kasılma ve gevşeme hızlarındaki düzelme açısından kontrol, zoniporid ve KBR grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, ranolazin ve 44Bu grubundaki düzelmenin diğer bütün gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha fazla olduğu bulgulanmıştır. Ayrıca ranolazinin kasılma ve gevşeme hızları üzerindeki iyileştirici etkisinin 44Bu'dan anlamlı olarak daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 15, 17). Kasılma ve gevşeme hızlarının deney boyunca zamana bağlı olarak değişimi Şekil 14 ve 16'da gösterilmiştir.

İskemi sırasındaki hiperkontraktür değerlendirildiğinde ise, ranolazine tedavi edilmiş kalplerde maksimum kontraktüre ulaşma zamanı (56.7±2.9 dk), kontrol (37.5±2.6 dk), 44Bu (44.5±3.9 dk), zoniporid (42.3±3.2 dk) ve KBR (48.4±4.2 dk) grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha geçtir. İskemi sırasında ulaşılan pik kontraktür ise 44Bu (78.5±7.0 mmHg), ranolazin (79.4±16.4 mmHg) ve zoniporid (74.7±5.0

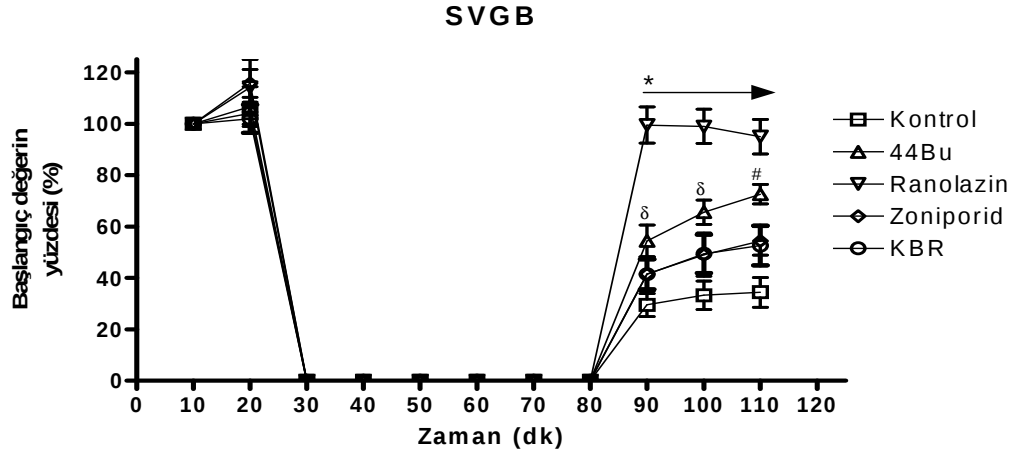
mmHg) uygulanan gruplarda, kontrole göre (103.2 ± 3.9 mmHg) anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. KBR grubunda da bu değer 96.6 ± 5.2 mmHg'a kadar yükselmiş olmasına rağmen diğer gruplarla arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 18). Koroner perfüzyon basıncı, gerek iskemiden önce 10 dk ilaç uygulanması boyunca, gerekse ilaçla tedavi edilen tüm gruplarda reperfüzyon sonunda başlangıç değerine göre anlamlı olarak değişmemiştir (Şekil 19).

4.3. KBR'nin çözücüsü DMSO'nun İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde ölçülen kardiyak parametreler üzerine etkisi

DMSO (%0.01) uygulanması reperfüzyon sonunda başlangıç değerine göre SVGB'da $\%27.83 \pm 16.1$ oranında düzelme sağlamıştır. DMSO'nun SVB'ı üzerine etkisine ilişkin orijinal trase Şekil 9'da verilmiştir. $\pm dp/dt$ üzerine olan etkisi de SVGB üzerine olan etkisiyle paralel bulunmuştur. DMSO'nun İ/R uygulanmış kalplerde kardiyak parametreler üzerindeki etkisi kontrol grubuyla benzer olarak bulgulanmıştır. DMSO, deney boyunca koroner perfüzyon basıncını da anlamlı olarak değiştirmemiştir.

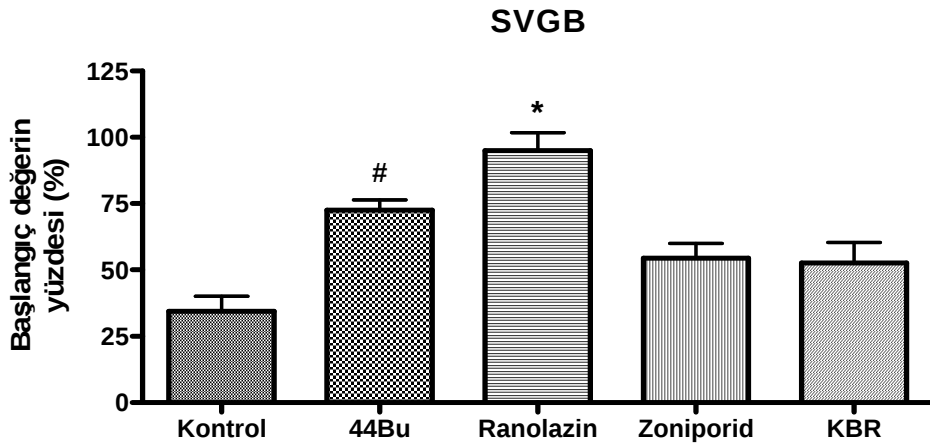


Şekil 9: İ/R uygulanmış izole kalplerde, kaydedilen SVB'na ait orjinal traseler A. Kontrol, B. 44Bu (0.3µM), C. Ranolazin(10µM), D. Zoniporid (0.1µM), E. KBR (1 µM), F. DMSO (%0.01).



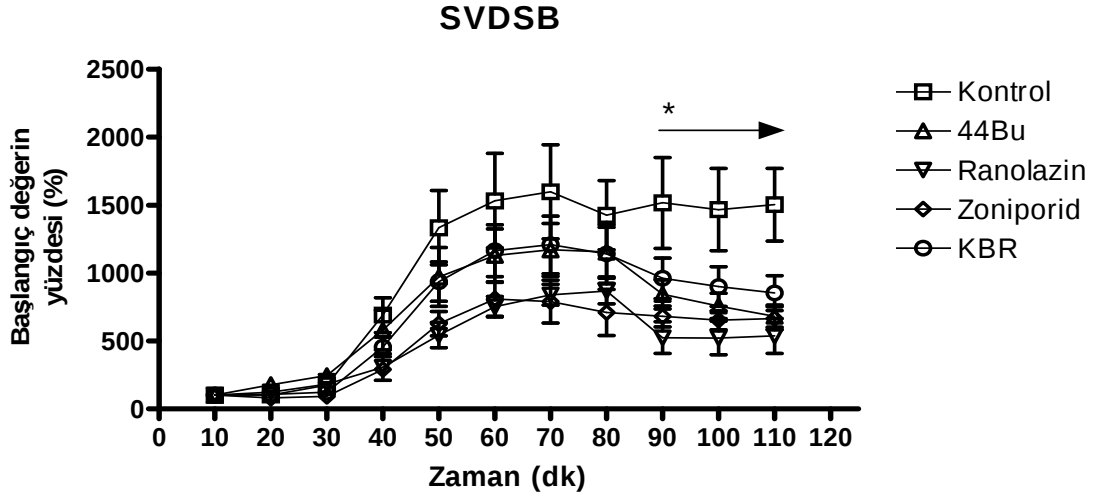
* Diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı
 δ Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı
 # Kontrol, Zoniporid ve KBR gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı

Şekil 10: İlaç uygulanmamış (Kontrol) ve 44Bu (0.3μM), Ranolazin (10μM), Zoniporid (0.1μM) veya KBR (1 μM) uygulanmış izole perfüze kalplerde İ/R protokolü boyunca SVGB'nin % değişimi (n=5-9).



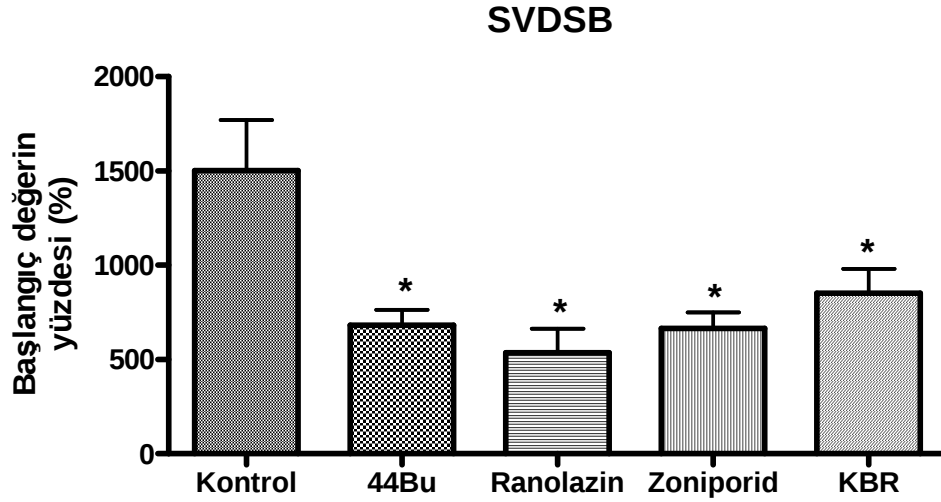
* Diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı
 # Kontrol, Zoniporid ve KBR grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı

Şekil 11: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3μM), Ranolazin (10μM), Zoniporid (0.1μM) ve KBR (1 μM)'nin SVGB üzerine etkileri (n=5-9)



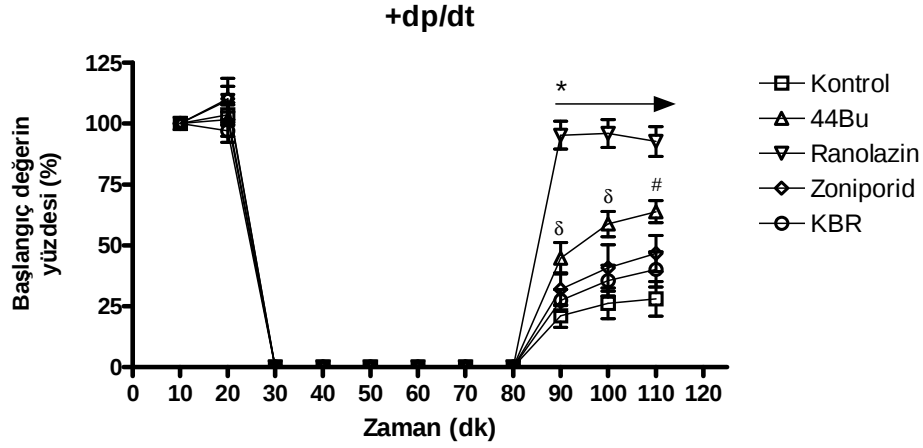
* Diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı

Şekil 12: İlaç uygulanmamış (Kontrol) ve 44Bu (0.3 μ M), Ranolazin (10 μ M), Zoniporid (0.1 μ M) veya KBR (1 μ M) uygulanmış izole perfüze kalplerde İ/R protokolü boyunca SVDSB'nin % değişimi (n=5-9).



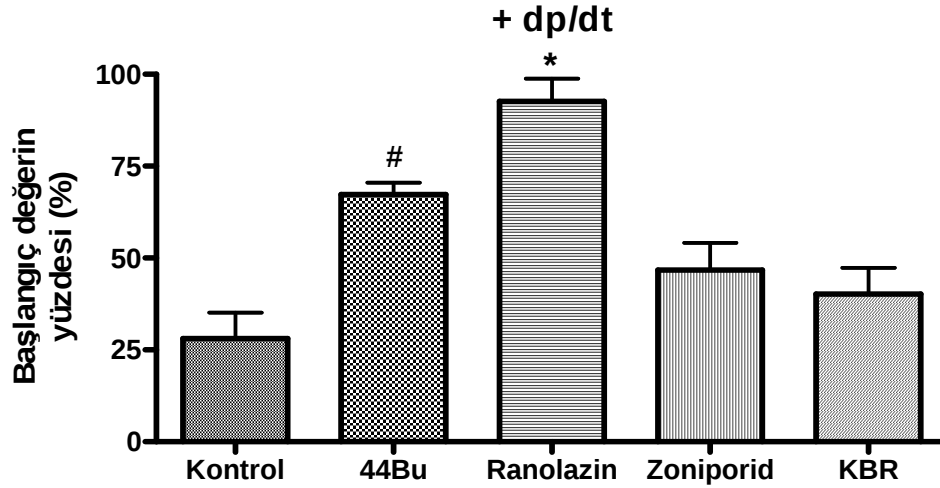
* Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı

Şekil 13: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3 μ M), Ranolazin (10 μ M), Zoniporid (0.1 μ M) ve KBR (1 μ M)'nin SVDSB üzerine etkileri (n=5-9).



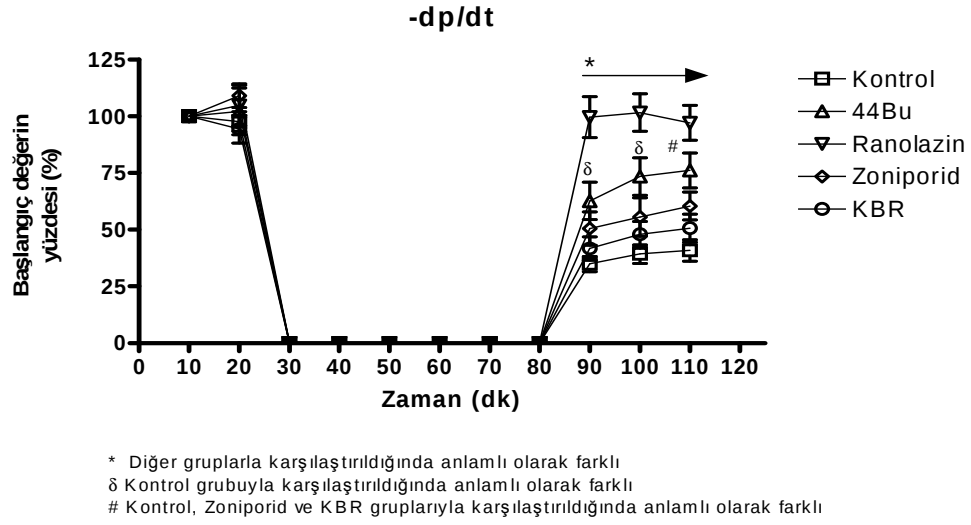
* Diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı
 δ Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı
 # Kontrol, Zoniporid ve KBR gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı

Şekil 14: İlaç uygulanmamış (Kontrol) ve 44Bu (0.3μM), Ranolazin (10μM), Zoniporid (0.1μM) veya KBR (1 μM) uygulanmış izole perfüze kalplerde I/R protokolü boyunca +dp/dt'nin % değişimi (n=5-9).

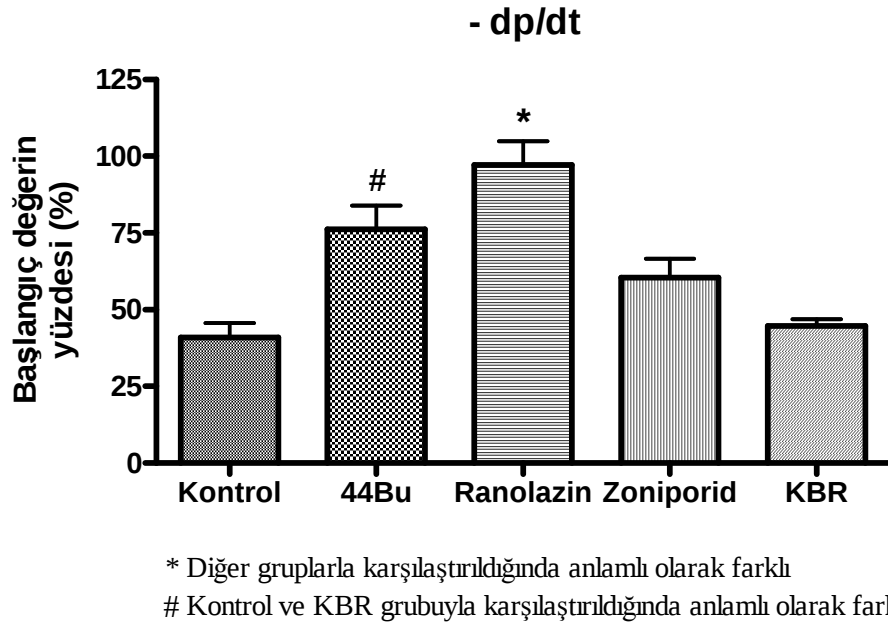


* Diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı
 # Kontrol, Zoniporid ve KBR grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı

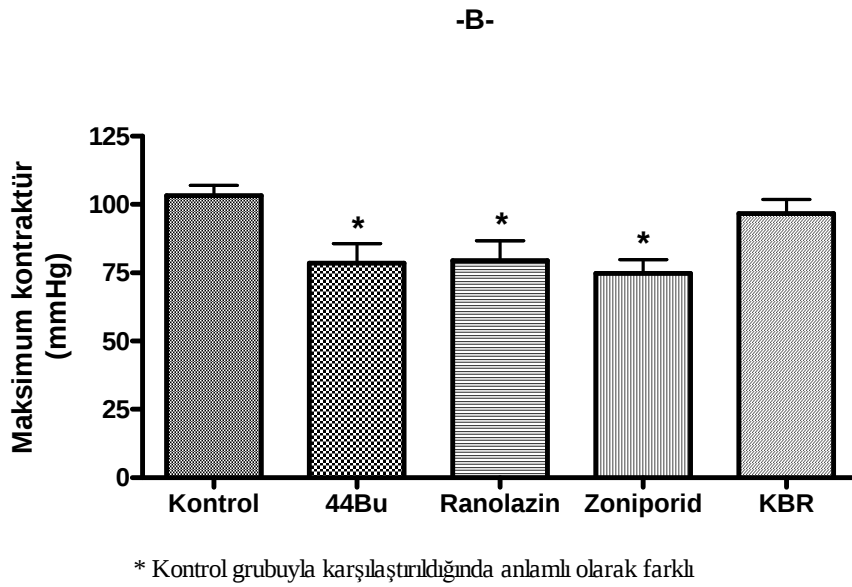
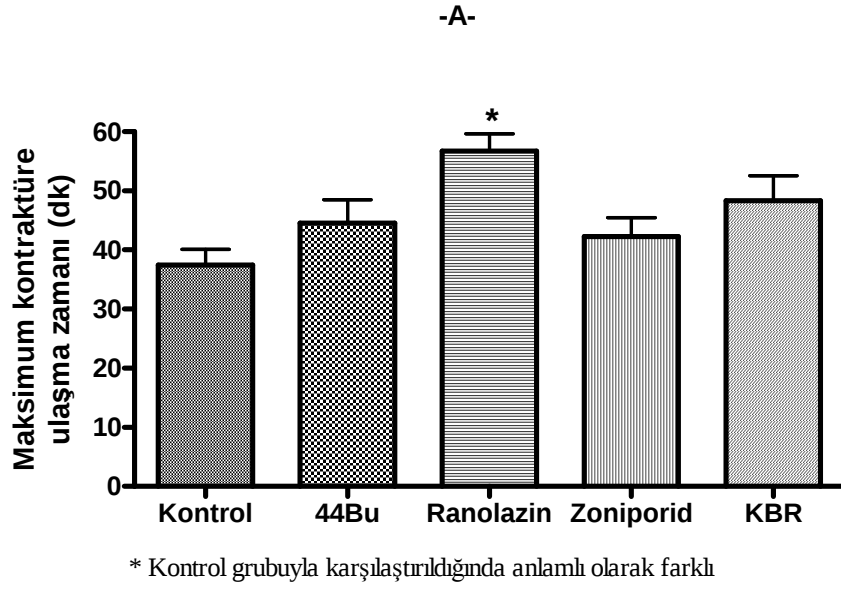
Şekil 15: I/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3μM), Ranolazin (10μM), Zoniporid (0.1μM) ve KBR (1 μM)'nin +dp/dt üzerine etkileri (n=5-9).



Şekil 16: İlaç uygulanmamış (Kontrol) ve 44Bu (0.3µM), Ranolazin (10µM), Zoniporid (0.1µM) veya KBR (1 µM) uygulanmış izole perfüze kalplerde İ/R protokolü boyunca -dp/dt'nin % değişimi (n=5-9).

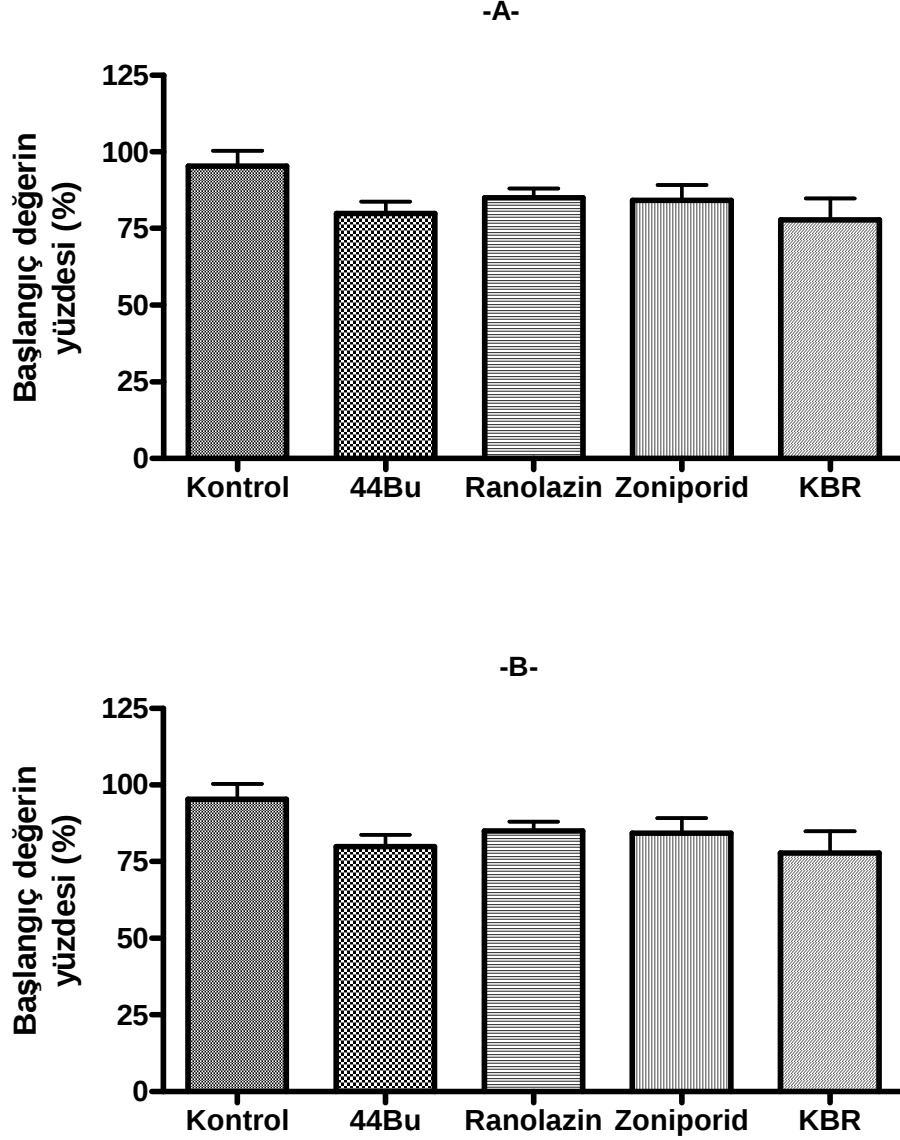


Şekil 17: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3µM), ranolazin (10µM), zoniporid (0.1µM) ve KBR (1 µM)'nin -dp/dt üzerine etkileri (n=5-9).



Şekil 18: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3µM), ranolazin (10µM), zoniporid (0.1µM) ve KBR (1 µM)'nin iskemi sırasındaki A.Maksimum kontraktüre ulaşma zamanı, B.Maksimum kontraktür üzerine olan etkileri (n=5-9).

Koroner perfüzyon basıncı



Şekil 19: İ/R uygulanmış izole perfüze kalplerde, 44Bu (0.3 μ M), ranolazin (10 μ M), zoniporid (0.1 μ M) ve KBR (1 μ M)'nin koroner perfüzyon basıncı üzerine etkileri. A. İskemi öncesinde 10 dk ilaç uygulanması sonrasında, B. Reperfüzyon sonunda başlangıç değerine göre % değişim (n=5-9).

5. TARTIŞMA

Miyokardiyal iskemi, kalbe oksijen sunumu ve gereksinimi arasındaki dengesizlikle karakterize edilen, miyokardiyal hücrelerde iyonik homeostazın bozulması sonucu, belirgin fonksiyonel bozukluk ve hücre ölümüyle sonuçlanan patolojik bir durumdur³. İ/R hasarı ise, uzun süreli iskemi periyodunu takiben kan akımının restorasyonu sonucunda oluşur⁶.

İ/R hasarının temelinde, hücrede meydana gelen iyonik değişiklikler rol oynar. İskemi sırasında oluşan intraselüler asidoz, membranda bulunan asit uzaklaştırma mekanizmalarından NHE1'i aktive eder ve böylece her bir H^+ iyonuna karşı, bir Na^+ iyonu hücre içine girer. İntraselüler Na^+ konsantrasyonundaki artışa, NHE1'in yanısıra membranda bulunan Na^+ kanalları da katkıda bulunur. Kaynağı ne olursa olsun, intraselüler Na^+ konsantrasyonundaki artış, NCX'in ters modda çalışmasını aktive ederek, intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun artışına yol açar⁵⁷. Hücre içinde Ca^{+2} birikmesi ise, kardiyak miyosit kontraktilitesini başlatır ve miyokardiyal hücre ölümünde rol oynayan proteazların ve fosfolipazların aktivasyonuna yol açarak hücre hasara neden olur⁵⁸. İ/R hasarının oluşumuna aracılık eden bu iyonik değişiklikler göz önünde bulundurulduğunda, intraselüler Na^+ girişini ve/veya sonuçta intraselüler Ca^{+2} 'nin aşırı yüklenmesini azaltan ilaçlar, miyokardiyal İ/R hasarının azaltılması ya da önlenmesinde olası tedavi yaklaşımları olarak görülmektedir.

Yayımlanmış birçok çalışmada, Na^+ kanallarının blokajının, özellikle sürekli Na^+ akışının inhibisyonunun, NHE ve NCX inhibisyonunun

İ/R hasarına karşı kalbi koruduğu gösterilmiştir^{73,74,75,98,119}. Söz konusu araştırmalarda Na^+ ve Ca^{+2} aşırı yüklenmesini etkileyen mekanizmaların birkaçı (Na^+ kanalları/NHE; NHE/NCX) aynı deneysel koşullarda karşılaştırılmış olmasına karşın, bütün mekanizmaları aynı şartlarda inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu bilgiler ışığında, miyokardiyal İ/R hasarına karşı koruyucu etkileri bilinen, hücre içi Na^+ ve Ca^{+2} aşırı yüklenmesini engelleyen ilaçlardan 44Bu (geçici Na^+ kanal blokörü), Ranolazin (sürekli- Na^+ kanal blokörü), Zoniporid (NHE inhibitörü) ve KBR (NCX inhibitörü)'nin kardioprotektif etkinliklerinin aynı deneysel koşullar altında karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu karşılaştırılmanın yapılması, yeni bir Na^+ kanal blokörü olan 44Bu'nun diğer Na^+ - Ca^{+2} aşırı yüklenmesini azaltan ilaçlar arasındaki yerinin belirlenmesine ve klinik açıdan önemi olup olmadığına işaret edebilir.

Çalışmamızda, izole sıçan kalplerinde İ/R hasarını indüklemek amacıyla 20 dk dengelenme periyodunu takiben, 60 dk global iskemi 30 dk reperfüzyon protokolü uygulanmıştır. Bunun sonucunda, sadece İ/R protokolü uygulanmış olan kontrol kalplerde, reperfüzyon sonunda, SVGB'nin ve $\pm dp/dt$ 'nin belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. SVDSB ise, İ/R sonrasında başlangıç değerine göre artmıştır. Bu bulgular, gerek laboratuvarımızda daha önce yapılmış olan araştırmalarla^{122,123}, gerekse benzer deneysel metodun kullanıldığı literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur.^{21, 74, 124, 125}

44Bu'nun İ/R hasarına karşı kardioprotektif etkisinin ilk olarak gösterildiği çalışmada, 0.3 μM 44Bu'nun, negatif inotropik etki

oluşturmaksızın SVGB ve $\pm dp/dt$ 'yi %80-86 oranında düzelttiği, SVDSB'deki artışın ise 44Bu uygulanan kalplerde, kontrol İ/R uygulanan kalplerdekine göre yaklaşık %50 daha az olduğu bulgulanmıştır. Aynı çalışmada, 44 Bu'nun elektrofizyolojik olarak da geçici Na^+ akımını bloke ettiği, bunun yanı sıra Ca^{+2} akımını ve Na^+-H^+ antiport aktivitesini etkilemediği de gösterilmiştir. Bu bulgu, 44Bu'nun kardiyoprotektif etkisinden geçici Na^+ akımı üzerindeki inhibitör etkisinin sorumlu olabileceğini açıkça göstermektedir. Ayrıca, 44Bu'nun lidokaine göre gerek elektrofizyolojik olarak Na^+ kanalları üzerindeki etkisinin, gerekse kardiyoprotektif etkisinin daha potent olduğu saptanmıştır. Bu tez çalışmasında da, 0.3 μM 44Bu, yukarıda bahsedilen çalışmayla uyumlu olarak, negatif inotropik etki oluşturmaksızın, İ/R sonrasında, kalbin kontraktıl fonksiyonunda kontrole göre anlamlı bir düzelme sağlamıştır.

Ranolazin, 2006 yılında FDA'dan antianjinal olarak kullanılmak üzere onay almış¹²⁶ ve terapötik konsantrasyonlarında ($\leq 10 \mu M$ da) kullanıldığında, selektif olarak sürekli Na^+ akımını önemli düzeyde inhibe ettiği bilinen bir ajandır.^{127,128} Literatürde deneysel olarak çeşitli hayvan modellerinde iskemik hasarı azalttığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır^{81,127,128,129}. Bu tez çalışmasında da ranolazin, İ/R hasarına karşı kardiyoprotektif etkinliğinin incelenmesi amacıyla 10 μM konsantrasyonda kullanılmıştır. Bu konsantrasyon, ranolazinle yapılan pre-klinik çalışmalarda en sık kullanılan konsantrasyondur ve ranolazin için önerilen terapötik konsantrasyon aralığının üst sınırıdır.¹³⁰

McCormeck ve arkadaşları (1996), izole perfüze sıçan kalbinde yaptıkları çalışmada, normoksik koşullarda ranolazin (10 μM) uygulanmasının bazal hemodinamik ve kontraktıl parametreleri etkilemediğini göstermişlerdir. Bununla birlikte, 30 dk global iskemi/60 dk

reperfüzyon uygulanan kalplere, ranolazinin iskemi öncesinde 10 dk süreyle uygulanması, kardiyak yük ve hız-basınç ürünündeki fonksiyonel düzelmeyi kontrole göre anlamlı olarak arttırmıştır.⁸⁰ Bu bulgular, global iskemi metodunun kullanıldığı izole-perfüze tavşan kalbinde, ranolazinin (10-20 µM) iskemi öncesinde uygulandığında, konsantrasyon bağımlı olarak kreatin kinaz salıverilmesini azalttığını, SVGB ve dp/dt'yi düzelttiğini gösteren çalışmayı desteklemektedir. Söz konusu çalışmada da gerek 10 µM, gerekse 20 µM ranolazin uygulanması, bazal hemodinamik parametreleri değiştirmemiştir.⁷⁹ Bu verilerle uyumlu olarak araştırmamızda da 10 µM ranolazinin pre-iskemik olarak 10 dk uygulanması bazal sol ventrikül fonksiyonunu etkilememiştir. Ayrıca, koroner perfüzyon basıncı da ilaç uygulandıktan sonra değişmemiştir. Ranolazin, iskemiden önce 10 dk, reperfüzyon başlangıcında 5 dk süreyle uygulandığında, SVGB'nı başlangıç değerine göre %95 oranında düzeltmiştir. Kasılma ve gevşeme hızı üzerine olan etkisi de buna paralel olarak bulgulanmıştır. Global iskemi yönteminin kullanıldığı bu çalışmaların yanı sıra, düşük-akışlı iskemi (low-flow ischemia) metodunun kullanıldığı izole sıçan kalbinde yapılan bir çalışmada da İ/R sonunda, sol ventrikül fonksiyonundaki düzelme bakımından benzer sonuçlar elde edilmiştir¹²⁹. Bu çalışmada 10 µM ranolazinin glukoz, yağ asidi oksidasyonu veya glikolizisi etkilemediğinin gösterilmesi de ayrıca, ranolazinin kardiyoprotektif etkisinde yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonunun rolü olmadığını göstermekte ve sürekli Na⁺ akımının inhibisyonunun ve buna bağlı olarak Ca⁺² akümüülasyonundaki azalmanın bu etkiden sorumlu olduğu görüşünü ön plana çıkarmaktadır.

Ranolazinin İ/R ile indüklenen sol ventrikül disfonksiyonu üzerindeki koruyucu etkisi, in-vitro çalışmaların yanı sıra in-vivo İ/R çalışmalarıyla da kanıtlanmıştır^{82,84}. Fonksiyonel parametreler üzerindeki etkisiyle ilgili bulgularda bizim çalışmamız da dahil olmak üzere çelişki

olmamasına rağmen, infarkt alanı üzerine koruyucu etkisinin incelendiği çalışmaların sonuçları birbiriyle çelişkilidir. 90 dk koroner arter oklüzyonu ve 18 sa reperfüzyon uygulanan kanin modelinde iskemiden önce 30 dk süreyle (7.2 mg/kg/h) ranolazin uygulanmasının kreatin kinaz salıverilmesini ve infarkt alanını etkilemediği gösterilmiştir⁸³. Buna karşın, 60 dk iskemi 3 sa reperfüzyonun uygulandığı in-vivo tavşan İ/R modelinde ranolazin, infarkt alanını azaltmış ve sol ventrikül fonksiyonunda kontrole göre anlamlı olarak düzelme sağlamıştır⁸². Bu çelişki, kullanılan iskemi süresinin farklılığına bağlı olabilir. Bununla birlikte, daha kısa süreli (15dk) iskeminin uygulandığı bir başka çalışmada ise, ranolazinin hemodinamik parametrelerden (kalp hızı, arteriyel basınç ve kontraktilite) ve nekrozdan bağımsız olarak, İ/R sonunda post-iskemik duvar kalınlığını düzelttiği ve ejeksiyon fraksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir⁸⁴. Yapılan çalışmalarda, ranolazinin kardiyoprotektif etki mekanizmasının sürekli-sodyum akımının inhibisyonuna sekonder olarak, intraselüler sodyum bağımlı kalsiyum aşırı yüklenmesinin azaltılması olabileceği öne sürülmüştür^{130,131}. Bu hipotezi destekler nitelikte, Wang ve arkadaşlarının izole perfüze sıçan kalbinde yaptıkları çalışmada ranolazine (10 µM) tedavinin iskemik kontraktürü geciktirdiği, iskemi sırasında ortalama SVDSB'nı azalttığı ve reperfüzyon sırasında SVDSB'nı düşürdüğü gösterilmiştir¹²⁹. Bununla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da ranolazin, iskemik kontraktüre ulaşma zamanını kontrole göre anlamlı olarak geciktirmiş ve iskemi sırasındaki maksimum kontraktürü yine kontrole göre anlamlı olarak azaltmıştır.

Ranolazin (10 µM), 60 dk global iskemi/ 30 dk reperfüzyon uyguladığımız izole sıçan kalbinde, reperfüzyon sonunda, sol ventrikül fonksiyonunda, 44Bu (0.3 µM)'ya göre anlamlı olarak daha iyi bir düzelme sağlamıştır. 10 µM ranolazinin¹³² ve 44Bu'nun²¹ normoksik koşullarda, Ca^{+2} akımını etkilemediği bilinmektedir. Ancak ranolazinin İ/R ile veya sürekli- Na^{+} akımını uyaran anemon toksiniyle indüklenen diyastolik Ca^{+2}

akümülasyonunu azalttığı gösterilmiş olmasına rağmen^{11,79}, 44Bu'nun İ/R ile indüklenen intraselüler Ca^{+2} artışı üzerine etkisi henüz incelenmemiştir. Ranolazinin gerek reperfüzyon sonunda SVDSB'nı, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, kontrole göre 44Bu'dan daha az yükseltmiş olması ve gerekse iskemi sırasında maksimum kontraktüre ulaşma zamanının ranolazin uygulanan grupta 44Bu'ya göre daha geç olması, ranolazinin Na^{+} 'a bağlı Ca^{+2} akümülasyonu üzerinde daha güçlü bir inhibitör etkinliğe sahip olabileceğini ve bu nedenle kardiyoprotektif etkinliğinin 44Bu'ya göre daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca 44Bu'nun sürekli- Na^{+} akımı üzerindeki etkisi de henüz bilinmemektedir. Dolayısıyla, 44Bu'nun ranolazine göre bu akım üzerindeki etki gücünün daha düşük olabileceği de, ranolazinin daha güçlü bir koruma sağlamanın nedeni olabilir.

Çalışmamızda NHE-inhibitörü Zoniporid'in İ/R hasarına karşı kardiyoprotektif etkisini incelediğimizde, 0.1 μ M zoniporid, kontrole göre SVB'de daha fazla bir düzelme sağlmasına rağmen, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Zoniporid uygulanması, intraselüler Na^{+} ve buna bağlı olarak Ca^{+2} aşırı yüklenmesinin sonucu olan iskemik hiperkontraktürü etkilememiştir. NHE inhibitörlerinden bazıları (kariporid, eniporid) akut koroner sendromlu hastalarda klinik deneme aşamasında olsalar da literatürde, İ/R hasarı sonucu infarkt alanını azalttıkları hemen her çalışmada doğrulanmış olmasına rağmen, kalbin mekanik fonksiyonu üzerine koruyucu etkilerine ilişkin sonuçlar birbiriyle çelişkilidir. NHE inhibitörlerinin miyokardiyal İ/R hasarına karşı ventrikül fonksiyonunu koruduğunu gösteren çalışmalara bakıldığında, uygulanan iskemi süresinin 30-40 dk arasında olduğu göze çarpmaktadır^{17,98,124,133}. Bizim çalışmamızda ise 1sa'lık iskemi protokolü kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, yine daha düşük süreli iskemi protokolünün kullanıldığı çalışmalarda da NHE inhibitörü ile tedavinin (eniporid) kontrole karşılaştırıldığında İ/R

hasarına karşı anlamlı bir koruma sağlamadığı gösterilmiştir⁷⁴. İlginç olarak, zoniporid, kariporid ve eniporidin hem in-vivo hem de in-vitro kardiyoprotektif etkinliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada¹⁰¹, her üç ilacın da infarkt alanına karşı anlamlı bir koruma sağladığı gösterilirken, hemodinamik parametreler açısından bizim de çalışmamızla uyumlu olarak herhangi bir etki saptanamamıştır.

NCX inhibitörü KBR'nin 10 μ M konsantrasyonda kullanıldığında, post-iskemik kontraktıl iyileşmeyi anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir¹¹⁹. Bununla birlikte çalışmamızda, bu konsantrasyonda KBR'nin kalbi tamamen durdurduğunu gözlemledik. Benzer şekilde, in vitro iskemi-reperfüzyon hasarına karşı KBR'nin koruyucu etkinliğinin incelendiği başka bir çalışmada da, 1 μ M'ın üzerindeki konsantrasyonlarda KBR'nin kardiyak fonksiyonu bozduğu, özellikle 5-20 μ M konsantrasyonlarında kalp hızını, SVGB'yi ve dp/dt'yi hızlı ve belirgin şekilde deprese ettiği gösterilmiştir¹¹⁴. Aynı çalışmada 1 μ M KBR'nin kalbi infarkt alanına karşı koruduğu da bulgulanmıştır. Bu nedenle çalışmamızda KBR'nin kardiyoprotektif etkinliği 1 μ M'lık konsantrasyonda incelenmiştir.

1 μ M KBR uygulanması, reperfüzyon sonunda SVGB'da kısmen bir düzelme sağlasa da, bu düzelme, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. KBR'nin kasılma ve gevşeme hızları üzerine etkisi de SVGB'ye paralel bulgulanırken, SVDSB'nin kontrol İ/R uygulanan kalplere göre, reperfüzyon sonunda anlamlı olarak daha düşük olduğu saptanmıştır. Literatürde, bu ajanın iskeminin şiddetine bağlı olarak kardiyak koruma sağladığına ilişkin bir çalışmada, 35dk iskemi/60 dk reperfüzyon protokolü uygulanan kalplerde 3-30 μ M KBR uygulanmasının sol ventrikül fonksiyonu açısından herhangi bir koruma sağlamadığı,

ancak 20 dk iskemi/60 dk reperfüzyon protokolü uygulanan kalplerde 3-30 μ M KBR'nin kalbi İ/R hasarına karşı koruduğu ve 10 μ M konsantrasyonda uygulandığında en iyi düzelme sağladığı gösterilmiştir¹¹⁹. Bizim çalışmamızda da iskemi süresinin 1 sa olması KBR ile kardiyoprotektif etki sağlanamamasının nedeni olabilir. Ayrıca, KBR'nin sıçan, tavşan ve köpek kalbinde İ/R hasarına karşı koruma sağladığını gösteren birçok çalışma olmakla birlikte^{114,118,134}, bu çalışmalarda da iskemi süresinin daha kısa olduğu göze çarpmaktadır.

İ/R hasarının mekanizmalarının ve bu hasara yönelik tedavi stratejilerinin incelendiği çalışmalarda, iskemi sonundaki intraselüler Na^+ konsantrasyonu ile kontraktıl fonksiyonun düzelmesi arasında ters ilişki olduğu⁷⁴ ve Na^+ kanallarının blokajının Na^+ aşırı yüklenmesini azaltmada NHE blokajından daha etkili olduğu¹²⁴ ortaya konmuştur. Ayrıca iskemi sırasındaki Na^+ aşırı yüklenmesinden primer olarak sürekli- Na^+ akımının sorumlu olduğu da bilinmektedir^{67,98}. Sonuç olarak, bu tez çalışmasından elde ettiğimiz bulgular da yukarıdaki hipotezleri destekler tarzdadır. Buna göre, Na^+ kanal blokörlerinden 44Bu ve ranolazinin, NHE inhibitörü zoniporid ve NCX inhibitörü KBR'ye göre, İ/R sonrasında gelişen miyokardiyal disfonksiyonu anlamlı olarak daha iyi düzelttiği gösterilmiştir. Ek olarak, spesifik olarak sürekli- Na^+ akımını inhibe eden ranolazinin de 44Bu'ya göre daha güçlü bir kardiyoprotektif etkiye sahip olduğunun saptanması da, bir kez daha İ/R hasarının tedavisinde sürekli Na^+ akımının inhibisyonunun önemine dikkat çekmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, yeni bir Na⁺ kanal blokörü 44 Bu ile sürekli Na⁺ akımı inhibitörü ranolazin, NHE inhibitörü zoniporid ve NCX inhibitörü KBR'nin İ/R hasarına karşı kardiyoprotektif etkileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, bu ajanlar kardiyoprotektif etkilerinin şiddetine göre Ranolazin>44Bu>Zoniporid>KBR şeklinde sıralanabilir. Bu sıralama, İ/R hasarına karşı tedavi stratejilerinde, sürekli Na⁺ akımının inhibisyonunun, hasardan sorumlu olan Na⁺ ve Ca⁺² aşırı yüklenmesini azaltan diğer tedavi yaklaşımlarına göre daha etkin olduğunu ortaya koymaktadır.

7. ÖZET

Bu çalışmanın amacı, miyokardiyal İ/R hasarına karşı koruyucu etkileri iyi bilinen, hücre içi Na^+ ve Ca^{+2} aşırı yüklenmesini engelleyen ilaçlardan 44Bu (geçici- Na^+ kanal blokörü), Ranolazin (sürekli- Na^+ kanal blokörü), Zoniporid (NHE inhibitörü) ve KBR (NCX inhibitörü)'nin kardiyoprotektif etkinliklerinin aynı deneysel koşullar altında karşılaştırılmasıdır.

İ/R hasarının oluşturulması için, izole sıçan kalbine 60 dk global iskemi-30 dk reperfüzyon protokolü uygulanmıştır. Deney boyunca kalpler, sabit akışlı (10 ml/dk) Langendorff düzeneğinde perfüze edilmiş ve elektrik stimülasyonu (5 Hz, 1.5 msn, 30 V) ile uyarılmıştır. Bütün ilaçlar, kalplere iskemi öncesinde 5 dk ve reperfüzyon başlangıcında 10 dk süreyle uygulanmıştır. Post-iskemik kontraktıl fonksiyonda düzelme, sol ventrikül gelişen basıncı (SVGB), sol ventrikül diyastol sonu basıncı (SVDSB), kasılma ve gevşeme hızlarının ($\pm\text{dp}/\text{dt}$) ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Bütün bu parametreler, iskemi öncesindeki değerlerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Ayrıca, iskemik hiperkontraktür, iskemi sırasında maksimum kontraktüre ulaşma zamanı (MKUZ) ve maksimum kontraktür (MK) ölçülerek değerlendirilmiştir.

Kontrol kalplerde, reperfüzyon sonunda SVGB ve $\pm\text{dp}/\text{dt}$ belirgin olarak azalırken, SVDSB'ı artmıştır. Ranolazin (10 μM) ve 44 Bu (0.3 μM), İ/R hasarı sonucunda gelişen miyokard disfonksiyonuna ilişkin bu parametrelerde kontrole göre anlamlı bir düzelme sağlarken, zoniporid (0.1 μM) ve KBR (1 μM) uygulanması herhangi bir etki oluşturmamıştır. Ayrıca ranolazin, 44Bu'ya göre de İ/R hasarına karşı daha iyi bir koruma

sağlamıştır. İskemi sırasında maksimum kontraktüre ulaşma zamanı, yalnızca ranolazin uygulanan grupta gecikirken, maksimum kontraktür KBR hariç bütün ilaç gruplarında kontrole göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptanmıştır.

Bulgularımız, İ/R hasarına karşı Na^+ kanal blokörlerinin ve özellikle sürekli-akımdan sorumlu Na^+ kanalının inhibisyonunun, Na^+ ve Ca^{+2} aşırı yüklenmesini azaltan diğer ilaçlara göre daha güçlü kardioprotektif etki oluşturduğunu göstermektedir.

8. SUMMARY

The investigation of the role of intracellular sodium overload in ischemia reperfusion injury

The aim of the present study, was to compare cardioprotective effects of 44Bu (transient Na⁺ channel blocker), ranolazine (persistent Na⁺ channel blocker), zoniporide (NHE inhibitor) and KBR-7943 (NCX inhibitor) which prevent intracellular Na⁺ and Ca⁺² overload against ischemia-reperfusion injury(I/R), in the same experimental conditions.

For inducing I/R injury, isolated rat hearts were subjected to 60 min global ischemia and 30 min reperfusion. Hearts were perfused at a constant flow rate of 10 ml/dk in a Langendorff apparatus and paced with electrical stimulation (5 Hz, 1.5 ms duration, 30 V) throughout the experiments. All drugs were given for 5 min prior to ischemia and for 10 min after the onset of reperfusion. Recovery of post-ischemic contractile function was assessed by the left ventricular developed pressure (LVDP), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), and the rates of pressure development (+dp/dt) and pressure decay (-dp/dt). All parameters were expressed as percentage of their pre-ischemic values. Additionally, ischemic hypercontracture was evaluated by measuring the time to maximum contracture (TMC) and maximum contracture (MC) during ischemia.

In control hearts, LVDP and $\pm dp/dt$ markedly decreased and LVEDP increased at the end of the reperfusion. Ranolazine (10 μ M) and

44Bu (0.3 μ M) elicited a significant recovery in the LVDP, LVEDP and $\pm$ dp/dt compared to control hearts, but recovery in any of the parameters was not significant after the treatment with zoniporide (0.1 μ M) and KBR (1 μ M). Also, ranolazine providing better functional recovery than 44Bu against I/R injury. While TMC delayed only ranolazine administrated group, MC was significantly lower than control in all other groups.

Our results demonstrate that Na⁺ channel blockers and especially inhibition of persistent sodium current have more potent cardioprotective effect than other drugs which prevent intracellular Na⁺ and Ca⁺² overload against I/R injury.

10. KAYNAKLAR

1. Weir RA, McMurray JJ, Velazquez Ej, Epidemiology of heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction: prevalence, clinical characteristics, and prognostic importance. *Am J Cardiol* 2006;97:13F-25F
2. Andersen HR, Nielsen TT, Rasmussen K et al. A comparison at coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;349:733-742
3. Silverman HS, Stem MD. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc Res* 1994;28:581-97
4. Solaini G, Harris D.A. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem.J.*390:377-394,2005.
5. Ver Donck L, Borgers M, Verdonck F. Inhibition of sodium and calcium overload pathology in the myocardium: a new cytoprotective principle. *Cardiovasc Res.*1993;27:349-57.
6. Powers SK, Murlasits Z, Wu M, Kavazis AN. Ischemia-reperfusion-induced cardiac injury: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(9):1529-36.
7. Eigel BN, Hadley RW. Contribution of the Na⁺ channel and Na⁺/H⁺ exchanger to the anoxic rise of [Na⁺] in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;46:H1817-22.

8. Noble D, Noble PJ. Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. *Heart* 2006;92:iv1-5.
9. Bers DM, Barry WH, Despa D. Intracellular Na^+ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2003;57:897-912.
10. Piper, H.M., Abdallah Y., Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61:365-371, 2004.
11. Tani M., Mechanisms of Ca^{+2} overload in reperfused ischemic myocardium, *Annu. Physiol.* 52 (1990), pp. 543–559.
12. Imahashi K, Pott C, Goldhaber JI, Steenbergen, Philipson KD, Murphy E. Cardiac-specific ablation of the Na^+ - Ca^{+2} exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2005;97:916-21.
13. Zeitz O, Maass AE, Nguyen PV, Hensman G, Kogler H, Moller K. Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na^+ - Ca^{+2} exchange. *Circ Res* 2002;90:988-95.
14. Ver Donck L, Borgers M. Myocardial protection by R56865: a new principle based on prevention of ion channel pathology. *Am J Physiol* 1991;261:H1828-35.
15. Haigney MCP, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. Sodium channel blockade reduces hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading. *Circulation* 1994;90:391-9.

16. Xiao X, Allan DG. Role of Na^+/H^+ exchanger during ischemia and preconditioning in the isolated rat heart. *Circ res* 1999;85:723-30.
17. Bartosova, L., Frydrych, M., Hulakova, G., Berankova, M., Strnadova, V., Mokry, P., Brunclik, V., Kolevska, J., Bebarova, M. Efficacy of newly synthesized 44Bu ultrashort-acting, beta-adrenergic antagonist to isoprenaline-induced Tachycardia-comparison with esmolol. *Acta Vet. Brno*, 2004, 73, 171-179.
18. Bartosova, L., Frydrych, M., Hulakova, G., Berankova, M., Bebarova, M., Opatrilova, R., Strnadova, V., Mokry, P., Brunclik, V., Kremar, J., Bartosikova, L., Florian, T., Nejas, J., Ultrashort bradycardic effect of newly synthesized compounds. *Acta Vet. Brno* 2006; 75, 295-308.
19. Bebarova, M., Matejovic, P., Pasek, M., Simurdova, M., Simurda, J. Effect of ajmaline on action potential and ionic currents in rat ventricular myocytes. *Gen. Physiol. Biophys.* 2005, 24, 311-325.
20. Bartosova, L., Novak, F., Bebarova, M., Frydrych, M., Brunclik, V., Opatrilova, R., Kolevska, J., Mokry, P., Kollar, P., Strnadova, V., Suchy, P. Antiarrhythmic effect of newly synthesized compound 44Bu on model of aconotine-induced arrhythmia- Compared to lidocaine. *Eur. J. Pharmacol.* 2007, 575, 127-133.
21. Basgut B, Kayki G, Bartosova L, Ozakca I, Seymen A, Kandilci HB, Ugur M, Turan B, Ozelikay AT. Cardioprotective effects of 44Bu, a newly synthesized compound, in rat heart subjected to ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol.* 2010;640(1-3):117-23.
22. Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1047:248-258.

23. Stein, J., J. Klippel, H. Reynolds, et al. Internal Medicine. New York, NY: Mosby, 1998.
24. Downey JM. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annu Rev Physiol.* 1990;52:487-504.
25. Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999 ;79(2):609-34.
26. Dobson GP, Himmelreich U. Heart design: free ADP scales with absolute mitochondrial and myofibrillar volumes from mouse to human. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1553(3):261-7.
27. Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J.* 2005;390(Pt 2):377-94.
28. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem.* 1977 ;252(23):8731-9.
29. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res.* 2004;94(4):420-32.
30. Stanley WC. Cardiac energetics during ischaemia and the rationale for metabolic interventions. *Coron Artery Dis.* 2001;12 Suppl 1:S3-7.
31. Ferrari R, Metabolic changes in stunning and hibernation, http://www.heartandmetabolism.org/issues/HM10/hm10_basic_metabolism.asp-)

32. Vuorinen K, Ylitalo K, Peuhkurinen K, Raatikainen P, Ala-Rämi A, Hassinen IE. Mechanisms of ischemic preconditioning in rat myocardium. Roles of adenosine, cellular energy state, and mitochondrial F1F0-ATPase. *Circulation*. 1995;91(11):2810-8.
33. Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia PP, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, Chiariello M. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem*. 1993;268(25):18532-41.
34. French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KK, Powers SK. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(1):H128-36. Epub 2005.
35. Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(7):800-9.
36. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(2):C227-41.
37. Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, Jessup J. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Physiol*. 1998;275(5 Pt 2):R1468-77.
38. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2006;70(2):181-90. Epub 2006.

39. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):461-70.
40. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 1999;49(2):91-102.
41. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985;312(3):159-63.
42. Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation.* 1989;80(4):1049-62.
43. Peuhkurinen K., Ischemic heart disease at the cellular level. *IJBEM* 2000; Vol 2, Nr 1
44. Piper HM. The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value. *Cardiovasc Res.* 2000;45(1):123-7.
45. Varadarajan SG, An J, Novalija E, Smart SC, Stowe DF. Changes in $[Na^{+}]_i$, compartmental $[Ca^{+2}]$, and NADH with dysfunction after global ischemia in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(1):H280-93.
46. Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res.* 1987;60(2):153-68.
47. Siems, W., and T. Grune. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol. Aspects Med.* 2003;24:167-175

48. Goll, D. E., V. F. Thompson, H. Li, W. Wei, and J. Cong. The calpain system. *Physiol.* 2003;83:731-801
49. Gross, G. J., and J. N. Peart. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;285:H921-H930
50. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation.* 1983;67(5):1016-23.
51. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol.* 1997;58(2):95-117.
52. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-8.
53. Yamazaki S, Fujibayashi Y, Rajagopalan RE, Meerbaum S, Corday E. Effects of staged versus sudden reperfusion after acute coronary occlusion in the dog. *J Am Coll Cardiol.* 1986;7(3):564-72.
54. Ibuki C, Hearse DJ, Avkiran M. Mechanisms of antifibrillatory effect of acidic reperfusion: role of perfusate bicarbonate concentration. *Am J Physiol.* 1993;264(3 Pt 2):H783-90.
55. Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17(11):1029-42.

56. Neely JR, Grotyohann LW. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ Res.* 1984;55(6):816-24.
57. Cross HR, Radda GK, Clarke K. The role of Na⁺/K⁺ ATPase activity during low flow ischemia in preventing myocardial injury: a ³¹P, ²³Na and ⁸⁷Rb NMR spectroscopic study. *Magn Reson Med.* 1995;34(5):673-85.
58. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol.* 2003;83(3):731-801.
59. Allen DG, Xiao XH. Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2003 15;57(4):934-41.
60. Saint DA, Ju YK, Gage PW. A sürekli sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 1992;453:219-31.
61. Gintant GA, Datyner NB, Cohen IS. Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys J.* 1984;45(3):509-12.
62. Nilius B, Benndorf K, Markwardt F. Effects of lidocaine on single cardiac sodium channels. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19(9):865-74.
63. Josephson IR, Sperelakis N. Tetrodotoxin differentially blocks peak and steady-state sodium channel currents in early embryonic chick ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* 1989;414(3):354-9.

64. Ju YK, Saint DA, Gage PW. Effects of lignocaine and quinidine on the persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 1992;107(2):311-6.
65. Ju YK, Saint DA, Gage PW. Hypoxia increases sürekli sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 1996;497 (Pt 2):337-47.
66. Saint DA, Ju YK, Gage PW. A sürekli sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 1992;453:219-31.
67. Le Grand B, Vie B, Talmant JM, Coraboeuf E, John GW. Alleviation of contractile dysfunction in ischemic hearts by slowly inactivating Na⁺ current blockers. *Am J Physiol.* 1995;269(2 Pt 2):H533-40.
68. Hammarstrom AKM, and Gage PW Hypoxia and persistent sodium current. *Eur Biophys J.* 2002;31:323-330
69. Saint DA. The role of the persistent Na⁺ current during cardiac ischemia and hypoxia. *J. Cardiovasc Electrophysiol* 2006;17 (Suppl 1);S96-S103
70. Song Y, s-Shryock JC, Wagner S, Maier LS, Belardinelli L. Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J Pharmacol Exp. Ther.* 2006;318:214-222
71. Wu Y, Song Y, Belardinelli L, and Shryock JC. The late Na⁺ current (INa) inhibitor ranolazine attenuates effects of Palmitoyl-L-carnitine to increase late INa and cause ventricular diastolic dysfunction. *J Pharmacol Exp. Ther.* 2009; 330:550-7

72. Williams IA, Xiao X, Ju Y, and Allen DG. The rise of $[Na^+]_i$ during ischemia and reperfusion in the rat heart-underlying mechanisms. *Pflügers Arch.* 2007; 454-903-912
73. Van Emous JG, Nederhoff MG, Ruigrok TJ, van Echteld CJ. The role of the Na^+ channel in the accumulation of intracellular Na^+ during myocardial ischemia: consequences for post-ischemic recovery. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(1):85-96.
74. Ten Hove M, Jansen MA, Nederhoff MG, Van Echteld CJ Combined blockade of the Na^+ channel and the Na^+/H^+ exchanger virtually prevents ischemic Na^+ overload in rat hearts. *Mol Cell Biochem.* 2007; 297(1-2):101-10.
75. Takeo S, Tanonaka K, Hayashi M, Yamamoto K, Liu JX, Kamiyama T, Yamaguchi N, Miura A, Natsukawa T. A possible involvement of sodium channel blockade of class-I-type antiarrhythmic agents in postischemic contractile recovery of isolated, perfused hearts. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;273(3):1403-9. Erratum in: *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275(1):527.
76. Lefer AM, Polansky EW, Bianchi CP, Narayan S. Influence of verapamil on cellular integrity and electrolyte concentrations of ischemic myocardial tissue in the cat. *Basic Res Cardiol.* 1979;74(5):555-67.
77. Nayler WG, Ferrari R, Williams A. Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium. *Am J Cardiol.* 1980;46(2):242-8.
78. Clarke B, Spedding M, Patmore L, McCormack JG. Protective effects of ranolazine in guinea-pig hearts during low-flow ischaemia and their

association with increases in active pyruvate dehydrogenase. *Br J Pharmacol.* 1993;109(3):748-50.

79. Gralinski MR, Black SC, Kilgore KS, Chou AY, McCormack JG, Lucchesi BR. Cardioprotective effects of ranolazine (RS-43285) in the isolated perfused rabbit heart. *Cardiovasc Res.* 1994;28(8):1231-7.

80. McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschuk GD. Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic, and reperfused ischemic rat hearts. *Circulation.* 1996;93(1):135-42.

81. Allely MC, Alps BJ. Prevention of myocardial enzyme release by ranolazine in a primate model of ischaemia with reperfusion. *Br J Pharmacol.* 1990;99(1):5-6.

82. Hale SL, Leeka JA, Kloner RA. Improved left ventricular function and reduced necrosis after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits treated with ranolazine, an inhibitor of the late sodium channel. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318(1):418-23. Epub 2006.

83. Black SC, Gralinski MR, McCormack JG, Driscoll EM, Lucchesi BR. Effect of ranolazine on infarct size in a canine model of regional myocardial ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;24(6):921-8.

84. Hale SL, Kloner RA. Ranolazine, an inhibitor of the late sodium channel current, reduces postischemic myocardial dysfunction in the rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2006;11(4):249-55.

85. Weiss S, Benoist D, White E, Teng W, Saint DA. Riluzole protects against cardiac ischaemia and reperfusion damage via block of the persistent sodium current. *Br J Pharmacol*. 2010;160(5):1072-82.
86. Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na^+/H^+ exchangers. *Physiol Rev*. 1997;77(1):51-74.
87. Vandenberg JI, Metcalfe JC, Grace AA. Mechanisms of pHi recovery after global ischemia in the perfused heart. *Circ Res*. 1993;72(5):993-1003.
88. Kaila K, Vaughan-Jones RD. Influence of sodium-hydrogen exchange on intracellular pH, sodium and tension in sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol*. 1987;390:93-118.
89. Ayoub IM, Kolarova J, Yi Z, Trevedi A, Deshmukh H, Lubell DL, Franz MR, Maldonado FA, Gazmuri RJ. Sodium-hydrogen exchange inhibition during ventricular fibrillation: Beneficial effects on ischemic contracture, action potential duration, reperfusion arrhythmias, myocardial function, and resuscitability. *Circulation* 107: 1804–1809, 2003.
90. Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells. Its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol* 17: 1029–1042, 1985.
91. Murphy E, Perlman M, London RE, Steenbergen C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* 68: 1250–1258, 1991

92. Yasutake M, Ibuki C, Hearse DJ, Avkiran M. Na^+/H^+ exchange and reperfusion arrhythmias: protection by intracoronary infusion of a novel inhibitor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 267: H2430–H2440, 1994
93. Cox CS Jr, Sauer H, Allen SJ, Buja LM, Laine GA. Sodium/hydrogen-exchanger inhibition during cardioplegic arrest and cardiopulmonary bypass: an experimental study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123: 959–966, 2002.
94. Knight DR, Smith AH, Flynn DM, MacAndrew JT, Ellery SS, Kong JX, Marala RB, Wester RT, Guzman-Perez A, Hill RJ, Magee WP, Tracey WR. A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, zoniporide, reduces ischemic myocardial injury in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 254–259, 2001.
95. Kleyman TR, Cragoe EJ Jr. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol.* 1988;105(1):1-21.
96. Karmazyn M. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na^+/H^+ exchange. *Am J Physiol.* 1988;255(3 Pt 2):H608-15.
97. Murphy E, Perlman M, London RE, Steenbergen C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res.* 1991;68(5):1250-8.
98. Williams IA, Xiao XH, Ju YK, Allen DG. The rise of $[\text{Na}^+]$ (i) during ischemia and reperfusion in the rat heart-underlying mechanisms. *Pflugers Arch.* 2007;454(6):903-12. Epub 2007.

99. Frelin C, Vigne P, Lazdunski M. The role of the Na^+/H^+ exchange system in cardiac cells in relation to the control of the internal Na^+ concentration. A molecular basis for the antagonistic effect of ouabain and amiloride on the heart. *J Biol Chem*. 1984;259(14):8880-5.
100. Marala RB, Brown JA, Kong JX, Tracey WR, Knight DR, Wester RT, Sun D, Kennedy SP, Hamanaka ES, Ruggeri RB, Hill RJ. Zoniporide: a potent and highly selective inhibitor of human Na^+/H^+ exchanger-1. *Eur J Pharmacol*. 2002;451(1):37-41.
101. Knight DR, Smith AH, Flynn DM, MacAndrew JT, Ellery SS, Kong JX, Marala RB, Wester RT, Guzman-Perez A, Hill RJ, Magee WP, Tracey WR. A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, zoniporide, reduces ischemic myocardial injury in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;297(1):254-9.
102. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, Linssen G, Tebbe U, Schroder R, Tiemann R, Machnig T, Neuhaus KL. The Na^+/H^+ exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol* 38: 1644–1650, 2001
103. Mentzer RM Jr. Effects of Na^+/H^+ exchange inhibition by cariporide on death and nonfatal myocardial infarction in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: The Expedition study (Abstract). *Circulation* 108: 2723, 2003

104. Lee C, Dhalla NS, Hryshko LV. Therapeutic potential of novel Na^+ - Ca^{+2} exchange inhibitors in attenuating ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol*. 2005 1;21(6):509-16.
105. Bers DM, Barry WH, Despa S. Intracellular Na^+ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2003;57:897-912.
106. Hryshko LV. The cardiac Na^+ - Ca^{+2} exchanger. In: Page E, Fozzard HA, Solaro RJ, eds. *Handbook of Physiology. Section 2: The Cardiovascular System. Volume 1: The Heart*. Oxford: Oxford University Press, 2002:388-419.
107. Singh RB, Dhalla NS. Mechanisms of cardioprotection against ischemia reperfusion injury. In: Dhalla NS, Rupp H, Angel A, Pierce GN, eds. *Pathophysiology of Cardiovascular Disease*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004:303-26.
108. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na^+ in Ca^{+2} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H^+ - Na^+ and Na^+ - Ca^{+2} exchange. *Circ Res* 1989;65:1045-56.
109. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T, Sandhu MS. Calcium overload in ischemia/reperfusion injury. In: Sperelakis N, Kurachi Y, Terzic A, Cohen MV, eds. *Heart Physiology and Pathophysiology*. San Diego: Academic Press, 2001:949-65.
110. Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem* 1996;271:22391-7.

111. Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No 7943, of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol* 1996;119:555-63.
112. Schäfer C, Ladilov Y, Inserre J, et al. Role of the reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 2001;51:241-50.
113. Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM, Soler-Soler J. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na^+ through gap junctions. *Circ Res* 1999;85:280-7.
114. Magee WP, Deshmukh G, DeNinno MP, Sutt JC, Chapman JG, Tracey WR. Differing cardioprotective efficacy of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchanger inhibitors SEA0400 and KB-R7943. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;284:H903-10.
115. Nakamura A, Harada K, Sugimoto H, Nakajima F, Nishimura N. Effects of KB-R7943, a novel $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchange inhibitor, on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1998;111:105-15.
116. Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, et al. SEA0400, a novel and selective inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:249-56.
117. Magee WP, Deshmukh G, DeNinno MP, Sutt JC, Chapman JG, Tracey WR. Differing cardioprotective efficacy of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibitors SEA0400 and KB-R7943. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H903-10.

118. Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, et al. Protective effects of SEA0400, a novel and selective inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchanger, on myocardial ischemia-reperfusion injuries. *Eur J Pharmacol* 2003;458:155-62.
119. Motegi K, Tanonaka K, Takenaga Y, Takagi N, Takeo S. Preservation of mitochondrial function may contribute to cardioprotective effects of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchanger inhibitors in ischaemic/reperfused rat hearts. *Br J Pharmacol*. 2007;151(7):963-78. Epub 2007.
120. Satoh N, Kitada Y. Cardioprotective effect of MCC-135 is associated with inhibition of Ca^{+2} overload in ischemic/reperfused hearts. *Eur J Pharmacol* 2004;499:179-87.
121. Hibberd M, Tzivoni D, Bar F, et al. Caldaret (MCC-135) lowers the frequency of severe systolic left ventricular dysfunction in STEMI patients undergoing PCI. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(Suppl 1):242A.
122. Nida Edevler. Yüksek Lisans Tezi. Levosimendan'ın miyokardiyal iskemide koruyucu rolünün incelenmesi, Ankara 2009
123. Saadet KURUÖZ. Yüksek Lisans Tezi. Miyokardiyal iskemi tedavisinde kombine ilaç kullanımı. Ankara 2010
124. Tanonaka K, Takasaki A, Kajiwara H, Takeo S. Contribution of sodium channel and sodium/hydrogen exchanger to sodium accumulation in the ischemic myocardium. *Gen Pharmacol*. 2000;34(3):167-74.
125. Zhang M, Xu YJ, Saini HK, Turan B, Liu PP, Dhalla NS. Pentoxifylline attenuates cardiac dysfunction and reduces TNF-alpha level in ischemic-

reperfused heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(2):H832-9. Epub 2005.

126. Abrams J, Jones CA, Kirkpatrick P. Ranolazine. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(7):548.

127. Antzelevitch C, Belardinelli L, Zygmunt AC, Burashnikov A, Di Diego JM, Fish JM, Cordeiro JM, Thomas G. Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation*. 2004;110(8):904-10. Epub 2004.

128. Allely MC, Alps BJ. The effects of the novel anti-anginal compound RS 43285 on myocardial conduction in the anaesthetized dog. *Br J Pharmacol*. 1988;93(2):375-82.

129. Wang P, Fraser H, Lloyd SG, McVeigh JJ, Belardinelli L, Chatham JC. A comparison between ranolazine and CVT-4325, a novel inhibitor of fatty acid oxidation, on cardiac metabolism and left ventricular function in rat isolated perfused heart during ischemia and reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(1):213-20. Epub 2007.

130. Belardinelli L, Shryock JC, and Fraser H (2006) The mechanism of ranolazine action to reduce ischemia-induced diastolic dysfunction. *Eur Heart J* 8 (Suppl A): A10–A13.

131. Fraser H, Belardinelli L, Wang L et al. Inhibition of late INa by ranolazine reduces Ca^{+2} overload and LV mechanical dysfunction in ejecting rat hearts. *Eur Heart J* 26 (Suppl): 414.

132. Fraser H, Belardinelli L, Wang L, Light PE, McVeighJJ, Clanachan AS. Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts. *J MolCell Cardiol* 2006;41:1031-8.
133. Eng S, Maddaford TG, Kardami E, Pierce GN. Protection against myocardial ischemic/reperfusion injury by inhibitors of two separate pathways of Na⁺ entry. Division of Stroke and Vascular Disease, St. Boniface General Hospital Research Centre, Winnipeg, Manitoba, Canada. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(4):829-35.
134. Yoshitomi O, Akiyama D, Hara T, Cho S, Tomiyasu S, Sumikawa K. Cardioprotective effects of KB-R7943, a novel inhibitor of Na⁺/Ca⁺² exchanger, on stunned myocardium in anesthetized dogs. *J Anesth*. 2005;19:124-130



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

11.12/2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/172-16792
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Nurettin ABACIOĞLU
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

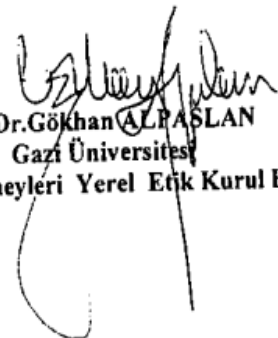
Araştırmacı grubu Nurettin ABACIOĞLU, Bilgen BAŞGUT ve Selcen SELAMOĞLU'ndan oluşan, G.Ü.ET-10.011 kod numaralı ve "*Hücre İçi Aşırı Sodyum Yüklemesinin İskemi Reperfüzyon Hasarındaki Rolünün İncelenmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-10.011 and entitled "*The investigation of the role of intracellular sodium overload in ischemia-reperfusion injury*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPAŞLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10.2. Teşekkür

Yüksek lisans eğitimine başlamamda değerli fikirleriyle bana yol gösteren, eğitimim boyunca yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarım ve tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen, desteğiyle hep yanımda olan tez danışmanım Öğr. Gör. Dr. Bilgen BAŞGUT'a,

Çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen ve yol gösteren Prof. Dr. Tanju ÖZCELİKAY'a,

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Ecz. Ebru HİÇDURMAZ'a,

Çalışmalarım sırasında bana destek olan bölümümüzdeki bütün hocalarım ile arkadaşlarıma,

EŞİM ve AİLEME,

Tesekkür ederim.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı Selcen

Soyadı SELAMOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi Afyon, 17.04.1983

Eğitimi Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, 2006
Mehmetçik Lisesi, Ankara, 2001

Yabancı Dili İngilizce