

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

**AT2 RESEPTÖR AGONİSTİ NOVOKİNİN'İN  
MİYOKARDİYAL İSKEMİ-REPERFÜZYONA  
BAĞLI OKSİDATİF STRES, İNFLAMASYON  
VE NEKROZ ALANI ÜZERİNE ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Esra GÜNDÜZ**

**2013**

## ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Engin ŞAHNA  
Anabilim Dalı Başkanı

.....

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Engin ŞAHNA

.....

Danışman

### Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ

Prof. Dr. Kadir SERVİ

Doç. Dr. Oktay BURMA

Yrd. Doç. Dr. Selçuk İLHAN

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## TEŞEKKÜR

Doktora eęitimim ve tez çalıŐmalarım sűresince bilgi ve deneyimleri ile bana her tűrlű desteęi saęlayan Anabilim Dalı BaŐkanımız ve DanıŐman Hocam Prof. Dr. Engin ŐAHNA' ya,

Tez çalıŐmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımız Őęretim Őyesi Yrd. Doç. Dr. Selçuk İLHAN 'a,

Uzm. Dr. Emre MUTLU ve ArŐ. Gör. Dr. Elif ONAT' a teŐekkűr ederim.

Esra GŪNDŪZ

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK SAYFASI</b> .....	<b>I</b>
<b>ONAY SAYFASI</b> .....	<b>II</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>III</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1.ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2.ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>3.GİRİŞ</b> .....	<b>5</b>
3.1. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon .....	6
3.1.1. İskemi ve Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi.....	9
3.1.1.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller .....	10
3.1.1.2. Polimorf Nükleer Lökositler .....	14
3.1.1.3. Endotelial Disfonksiyon ve Nitrik Oksit .....	15
3.1.1.4. pH Paradoksu ve Kalsiyum Yüklemeşi.....	16
3.2. İnflamasyon .....	16
3.3. Isı Şok Proteinleri.....	17
3.3.1. Isı Şok Proteinlerinin Görevleri .....	19
3.3.2. HSP çeşitleri .....	19
3.4. Kaveolin .....	21
3.5. Asimetrik Dimetil Arjinin .....	22
3.6. Rhokinaz.....	23
3.7. NADPH Oksidaz.....	25
3.8. Nükleer Faktör KAPPA B .....	26
3.9. Tool-Like Reseptörler .....	27
3.10. Nekroz .....	29
3.11. Renin-Anjiyotensin Sistemi.....	31
3.11.1. Sistemik RAS.....	31
3.11.2. Lokal RAS .....	32

3.11.3. AII ve Reseptörleri .....	33
3.11.3.1. AT1 Reseptörü .....	34
3.11.3.2. AT2 Reseptörü .....	34
3.12. Novokinin .....	38
3.13. Çalışmanın Amacı .....	39
<b>4. GEREÇ-YÖNTEM .....</b>	<b>40</b>
4.1. Deney Hayvanları .....	40
4.2. Deney Planı ve İlaç Uygulamaları .....	40
4.3. Cerrahi uygulama: İskemi-reperfüzyon .....	41
4.4. Hemodinamik Parametrelerin Değerlendirilmesi .....	42
4.5. Nekroz Alanının Ölçülmesi .....	42
4.6. Genetik Analizler .....	43
4.7. İstatistiksel Analiz .....	45
<b>5. BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
<b>6. TARTIŞMA.....</b>	<b>53</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>63</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>77</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Novokinin uygulamasının kan basıncı üzerine etkileri .....	46
--	----

## ŞEKİLLİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Oksijen paradoksu: Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu .....	12
<b>Şekil 2.</b> ADMA'nın endotel disfonksiyonu ile ilişkisi .....	23
<b>Şekil 3.</b> Novokinin uygulamasının HSP90 düzeylerine etkileri.....	47
<b>Şekil 4.</b> Novokinin uygulamasının CAV-1 düzeylerine etkileri .....	48
<b>Şekil 5.</b> Novokinin uygulamasının ADMA düzeylerine etkileri.....	48
<b>Şekil 6.</b> Novokinin uygulamasının Rhokinaz düzeylerine etkileri.....	49
<b>Şekil 7.</b> Novokinin uygulamasının NADPH oksidaz düzeylerine etkileri.....	50
<b>Şekil 8.</b> Novokinin uygulamasının NF <sub>κ</sub> B düzeylerine etkileri .....	51
<b>Şekil 9.</b> Novokinin uygulamasının TLR-4 düzeylerine etkileri.....	52
<b>Şekil 10.</b> Novokinin uygulamasının nekroz oranı üzerine etkileri.....	52

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ADE</b>	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
<b>ADMA</b>	Asimetrik Dimetil Arjinin
<b>PRMT</b>	Protein Arjinin Metil Transferaz
<b>AI</b>	Anjiyotensin I
<b>AII</b>	Anjiyotensin II
<b>AP-I</b>	Aktivatör Protein I
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Kalsiyum
<b>CAV</b>	Kaveolin
<b>CAV-1</b>	Kaveolin-1
<b>CAV-2</b>	Kaveolin-2
<b>CAV-3</b>	Kaveolin-3
<b>Cl</b>	Klor
<b>COX</b>	Siklooksijenaz
<b>DDAH</b>	Dimetil Arjinin Dimetil Aminohidrolaz
<b>DKB</b>	Diyastolik Kan Basıncı
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>eNOS</b>	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
<b>ET</b>	Endotelin
<b>GSH-Px</b>	Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH-redüktaz</b>	Glutasyon Redüktaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksid
<b>HOCl</b>	Hipoklorik Asit
<b>HSF</b>	Isı Şok Faktör
<b>HSP</b>	Isı Şok Protein
<b>ICAM-1</b>	İnterselüler Adhezyon Molekülü 1
<b>IL-1</b>	İnterlökin-1
<b>iNOS</b>	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
<b>İR</b>	İskemi-Reperfüzyon
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasyum
<b>KAH</b>	Koroner Arter Hastalığı
<b>KAT</b>	Katalaz
<b>KKY</b>	Konjestif Kalp Yetmezliği
<b>KMP</b>	Kardiyomyopati
<b>LOX</b>	Lipooksijenaz
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>MMP</b>	Matriks Metalloproteinaz
<b>IP3</b>	İnositoltrifosfat

<b>LT</b>	Lökotrien
<b>LT-B4</b>	Lökotrien B4
<b>MAPK</b>	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	Magnezyum
<b>MI</b>	Miyokard İnfarktüsü
<b>MPO</b>	Miyeloperoksidaz
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodyum
<b>NADH</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
<b>NFκB</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>SHR</b>	Spontan Hipertansif Rat
<b>NO</b>	Nitrik Oksid
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrat
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksid
<b>OH•</b>	Hidroksil Radikali
<b>OKB</b>	Ortalama Kan Basıncı
<b>ONOO</b>	Peroksinitrit
<b>PAF</b>	Trombosit Aktive Edici Faktör
<b>PG</b>	Prostaglandin
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E2
<b>PI<sub>2</sub></b>	Prostasiklin
<b>PMNL</b>	Polimorf Nükleer Lökosit
<b>RAS</b>	Renin-Anjiyotensin Sistemi
<b>RNT</b>	Reaktif Nitrojen Türleri
<b>sHSP</b>	Küçük Isı Şok Proteinler
<b>SKB</b>	Sistolik Kan Kasıncı
<b>SOD</b>	Süperoksit Dismutaz
<b>SOR</b>	Serbest Oksijen Radikali
<b>TEKHARF</b>	Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri
<b>TNF-α</b>	Tümör Nekrozis Faktör
<b>TxA<sub>2</sub></b>	Tromboksan A2

## ÖZET

İskemi ve reperfüzyon (İR) hasarı trombolitik tedavi, organ nakli, koroner anjioplasti ve kardiyopulmoner bypass gibi çeşitli tıbbi ve cerrahi girişimler sırasında görülen önemli bir problemdir ve Renin Anjiyotensin Sistemi bu hasarda önemli rol oynamaktadır. AT2 reseptörleri, AT1'lere zıt olarak, vazodilatör, antiproliferatif, proapoptotik etkiler göstermektedir. Kardiyak hipertrofi, miyokard infarktüsü, konjestif kalp yetmezliği gibi patolojik durumlarda AT2 reseptör sayısında artış olmaktadır. Çalışmamızda, AT2 reseptör agonisti Novokinin'in miyokardiyal İR da nekroz alanı, endotelyal disfonksiyon ve oksidatif stres ile ilişkili CAV-1, HSP90, ADMA, Rhokinaz, NADPH oksidaz ve inflamasyonla artan NFκB ve TLR-4 düzeylerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada 28 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan 4 gruba (n=7) ayrıldı: Kontrol, Novokinin, IR, IR+Novokinin (IRN). İlaç uygulamaları genel anestezi altında juguler vene yerleştirilen kanül yardımı ile infüzyon pompası kullanılarak iskemi öncesinde ve İR süresince yapıldı. Sol ana koroner arterin oklüzyonu ile 30 dk iskemiye takiben 120 dk reperfüzyon sağlandı. Deney sonunda kalp dokularından CAV-1, HSP90 ve NFκB düzeyleri RT-PCR, ADMA, TLR-4, Rhokinaz ve NADPH oksidaz düzeyleri ELISA yöntemi, nekroz alanı ImageJ görüntü analiz programı ile ölçüldü.

IRN grubununun ortalama kan basıncı değerleri iskemi ve reperfüzyon başlangıcında ve iskemi sonunda IR grubuna göre anlamlı olarak azaldı. NFκB, HSP90, NADPH oksidaz ve TLR-4 düzeyleri İR ile arttı ve novokinin uygulaması

ile anlamlı olarak azaldı. CAV-1 düzeylerinde gruplar arasında fark yoktu. İR grubunda ADMA ve Rhokinaz düzeylerindeki artışlar novokinin uygulaması ile engellendi. Novokinin İR'a bağlı nekroz oranını azalttı.

Sonuçlarımız, İR hasarında ADMA, HSP90, NFκB, TLR-4, Rhokinaz ve NADPH oksidaz düzeylerinin önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. AT2 reseptör agonisti Novokinin miyokardiyal İR hasarında oksidatif değişiklikleri, inflamasyonu ve endotel fonksiyonlarını olumlu yönde etkileyebilir.

**Anahtar Kelimeler:** İskemi-reperüzyon, AT2 reseptör, ADMA, NFκB, HSP90

## **2. ABSTRACT**

### **THE EFFECTS OF AT2 RECEPTOR AGONIST NOVOKININ ON OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION AND NECROSIS AREA DUE TO MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION**

Ischemia and reperfusion (IR) injury is a serious problem that is occurred during a variety of medical and surgical procedures, such as thrombolytic therapy, organ transplantation, coronary angioplasty, and cardiopulmonary bypass and the renin-angiotensin system plays an important role in this damage. In contrast to the AT1 receptors, AT2 receptors have vasodilator, anti-proliferative, proapoptotic effects. In pathological conditions such as cardiac hypertrophy, myocardial infarction, congestive heart failure there is an increase in the number of AT2 receptors. This study was designed to investigate the effects of AT2 receptor agonist Novokinin on necrosis area, CAV-1, HSP90, ADMA, NADPH oxidase and Rhokinase associated due to endothelial dysfunction and oxidative stress, and increased NF $\kappa$ B and Toll-like 4 receptor (TLR-4) levels induced by inflammation on myocardial IR.

The experimental animals were divided into four groups in this study: Control, Novokinin, IR and IR+Novokinin (IRN). Drug administrations was performed with infusion pump via cannula were placed the jugular vein under general anesthesia before ischemia, and during IR. The left main coronary artery was occluded for 30 minutes ischemia followed by 120 minutes reperfusion in rats. At the end of the experimental period, CAV-1, HSP90, and NF $\kappa$ B levels were measured by RT-PCR, ADMA, TLR-4, NADPH oxidase, and Rhokinase

levels were measured by ELISA, necrosis area was measured by ImageJ, an image analysis software, in the heart tissue.

Mean blood pressure significantly decreased at the beginning of ischemia and reperfusion and at the end of ischemia in IRN group compared to IR group. NF $\kappa$ B, HSP90, NADPH oxidase and TLR-4 levels increased with IR and significantly decreased with the application of novokinin. CAV-1 levels did not differ between the groups. The increases in the levels of ADMA and Rhokinase due to IR have been prevented by the application of novokinin. Novokinin reduced necrosis area due to IR.

Our results reveals that, ADMA, HSP90, NF $\kappa$ B, TLR-4, Rhokinase, and NADPH oxidase levels play important roles on IR injury. AT2 receptor agonist Novokinin may affect positively oxidative changes, inflammation, and endothelial function in myocardial IR injury.

**Keywords:** Ischemia-reperfusion, AT2 receptor, ADMA, NF $\kappa$ B, HSP90

### 3.GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2008 yılı “Dünyada İlk 10 Ölüm Nedeni Raporu”na göre ölüme neden olan hastalıklar arasında koroner arter hastalığı (KAH), gelir düzeyi yüksek ve orta düzeyde olan ülkelerde ilk sırada, düşük gelirlili ülkelerde ise çeşitli enfeksiyon hastalıklarından sonra dördüncü sırada yer almaktadır (1). Türkiye’ de, 1990 yılında başlatılan ve 18 yıllık sonuçlarının ele alındığı Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri (TEKHARF) 2009 raporuna göre de, hem erkeklerde hem de kadınlarda ölüm nedeni olarak KAH ilk sıradadır ve KAH’a bağlı ölümler tüm Avrupa ülkelerine göre daha yüksektir. KAH’a bağlı mortalite oranları özellikle majör risk faktörlerinin varlığına göre değişmektedir. Kardiyovasküler hastalıkların oluşmasında rol oynayan risk faktörlerinin ortaya konması ile bu faktörler yönünden toplumun ve yüksek riskli bireylerin primer olarak korunması, hastalanmış kişilerde ise mevcut risk faktörlerinin belirlenmesi ve sekonder korunma önlemlerinin uygulanması önem kazanmıştır (2). Tedavide sağlanan büyük gelişmelere rağmen, Türkiye’ de ölüm nedenleri arasında ilk sırayı 205.457 ölümlle kardiyovasküler hastalıklar (tüm ölüm nedenlerinin %47,73’ü) almaktadır ve toplam hastalık yükünün erkeklerde %20,5’ini, kadınlarda ise %18’ini oluşturmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar grubunda iskemik kalp hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar, romatizmal kalp hastalıkları, inflamatuvar ve hipertansif kalp hastalıkları yer almaktadır. Türkiye’de ulusal düzeyde %21,7 ve tüm yaş gruplarında kadınlarda %22,9 ve erkeklerde % 20,7 ile birinci ölüm nedeni iskemik kalp hastalığıdır.

### 3.1. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon

İskemi-reperfüzyon (İR) hasarı trombolitik tedavi, organ nakli, koroner anjioplasti ve kardiyopulmoner bypass gibi çeşitli tıbbi ve cerrahi girişimler sırasında görülen potansiyel olarak ciddi bir sorundur (3). Arteriyel kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (4). Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücrel yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit (DNA) molekülleridir (5).

Kalp normal fonksiyonunu sürdürebilmek için devamlı olarak oksijen teminine ihtiyaç duyar. Koroner arter kanının miyokarddan her geçişinde kalbe sunulan oksijenin %75'i harcanır. Buradan anlaşılacağı gibi kalp, oksijen sağlanmasında meydana gelecek kısıtlamalara karşı çok duyarlıdır. Damarlar içinde bulunan ve miyoglobine bağlı haldeki oksijen yalnız 2 ile 6 kalp vuruşu için yeterli olabilir. İnsanlarda koroner oklüzyonundan sonraki 10. vuruşta kalbin kontraktıl fonksiyonunda azalma oluşur (6). Böylece miyokardın oksijen rezervi iskeminin başlangıcından itibaren birkaç saniye içinde tüketilir ve doku oksijen basıncının 5 mmHg altına düşmesiyle oksidatif fosforilasyon, elektron transportu ve mitokondriyal Adenozin Trifosfat (ATP) yapımı durur. Mitokondriyal aktivitenin azalması sonucu aerobik metabolizma yerine anaerobik

glikolizis esas enerji kaynağı haline geçer. Glikolizis, glikolitik ara maddelerin birikmesi ve Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADH)'in azalmasına yol açar. Glikolitik aktivitenin devamı için gereken NAD'yi oluşturmak için piruvat, laktata indirgenir. Böylece miyokard hücrelerinde laktik asit birikir ve dolaşıma geçer. Miyokardda laktik asit birikimi glikolitik zincirin anahtar enzimlerinin inhibe olmasına ve doku pH'nın düşmesine ve şiddetli hücre içi asidozisin meydana gelmesine neden olur. Membran bütünlüğü bozulan hücrede potasyum ( $K^+$ ) kaybı ve hücre içinde aşırı miktarda sodyum ( $Na^+$ ), klor ( $Cl^-$ ), kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) ve su birikimi meydana gelir (7). Artan hücre içi  $Ca^{+2}$  ikinci mesajcılara ve çeşitli enzimlere etki eder. Bu durum öncü inflamatuvarların birikmesine, membranların işlev ve bütünlüğünün olumsuz etkilenmesine, ayrıca hücre iskeletinin organizasyonunun bozulmasına neden olur. Tüm bu değişiklikler sırasında dokuların enerji depoları tükenirken prostasiklin ( $PGI_2$ ), nitrik oksit (NO) gibi biyolojik aktif ajanların üretimi azalır, doku için toksik yeni bileşiklerin oluşum hızında artış meydana gelir. Öte yandan, süreç boyunca adhezyon molekülleri, sitokinlere ilişkin bazı genlerin sentez hızı azalırken, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), trombomodulin gibi bazı genlerin iskemik hücrelerde sentez hızı artar (8). İskemi sonrası kan akımının yeniden sağlanması anlamına gelen reperfüzyon iskemik organları daha fazla hücrel nekroz riskine sokabilir ve böylelikle fonksiyonun geri dönmesini kısıtlayabilir. İR döneminde aktive olan trombositler hasarlı bölgeye doğru göç eder ve birikirler. Trombositler ve trombosit ürünleri olan tromboksan  $A_2$  ( $TxA_2$ ) ve serotonin mikrosirkülatuar spazm, mikrovasküler konjesyon, trombozis ve koroner akımda yavaşlama gibi etkileriyle oluşturdukları vasküler disfonksiyonla İR hasarını ağırlaştırabilirler (9). Uzamış hipoksinin

membran potansiyelini değiştirdiği, iyonların dağılımını bozduğu, hücre içi volumü arttırdığı, membran akışkanlığını azalttığı ve endotel hücrelerinin hücre iskeleti organizasyonunu bozduğu bilinmektedir. Ayrıca, hipoksik endotel hücrelerinde bazı genlerin uyarıldığı (adhezyon molekülleri, sitokinler vb.), bazılarının (eNOS vb.) ise baskılandığı gösterilmiştir (3). Reperfüzyon hasarının başlangıç döneminde hızlıca ağır endotel hücre disfonksiyonu meydana gelmektedir. İR sonrası arteriyollerde endotel bağımlı, NO aracılı düz kas gevşemesinde bozulma meydana gelir (10). Vasküler yataktaki endotel hücreleri süperoksit ( $O_2^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) kaynağı olan ksantin oksidaz enzimi yönünden zengindir. İskemi sırasındaki hipoksantin birikimi reperfüzyon esnasında kan damarına tekrar oksijen girdiğinde bu enzim tarafından  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  üretiminde patlama meydana getirir.

Kalpte, İR hasarına bağlı olarak miyokardiyal sersemleme, reperfüzyon aritmileri, miyositlerde nekroz, koroner endotelyal ve mikrovasküler disfonksiyon gözlenebilir. Miyokardiyal sersemleme, İR'a bağlı olarak geri dönüşümsüz hasar olmamasına ve reperfüzyonun tam veya tama yakın bir şekilde sürmesine rağmen kalpte oluşan uzamış mekanik fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanır ve genellikle global iskemik ataklardan sonra gözlenir (11). Fakat kısa süreli iskemiye takip eden dönemlerde dahi miyokardiyal sersemleme beklenmedik derecede uzun sürebilir. İskemik periyodu takip eden reperfüzyon dönemi ölümcül aritmilere zemin hazırlayabilir. Oluşan aritmiler genellikle idioventrikülerdir ve en fazla ventriküler taşikardi ile fibrilasyon gözlenir (12). Kalp hücrelerinde nekroz gelişimi İR döneminde harekete geçen mekanizmaların ortak sonucudur (13). Reperfüzyonun erken dönemlerinde ortaya çıkan koroner

endotelial disfonksiyonla beraber NO sentezinde azalma ve 20 dakikadan sonraki bölümde ise lökosit varlığı gözlenebilir (12). İR sonrası oluşan endotelial disfonksiyon, trombositlerin yol açtığı mikrovasküler tıkanıklık, ödem ve oksidatif hasar mikrovasküler disfonksiyona yol açar (14).

### **3.1.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi**

Reperfüzyon hasarı geçici bir iskemi döneminden sonra reperfüzyon sırasında oluşan fonksiyonel, metabolik ve yapısal değişiklikleri kapsar. İskemi sırasında oluşan zararlı değişikliklerin reperfüzyonla daha şiddetli ve belirgin hale gelmesi ile kendini gösteren bu tablo, hücre içinde  $Ca^{+2}$  birikmesi, irreversibl hasar görmüş miyositlerin nekrozunun hızlanması, miyokardiyal ödem artışı, intramiyokardiyal kanama, no-reflow fenomeni, aritmiler, sitotoksik serbest oksijen radikali (SOR) oluşumu, kan akımı ve oksijen içeriği normale döndüğü zaman oksijeni kullanamama ile karakterizedir (15). Reperfüzyon hasarının patofizyolojisini belirlemedeki en önemli zorluk, iskemik fazda meydana gelen hasar ile reperfüzyon fazında oluşan hasarın tam ayrımının yapılmasının güç olmasıdır. Teorik olarak ölümcül reperfüzyon hasarı için iskemi şarttır ancak hücre ölümü için yeterli değildir. Pratik anlamda aynı miyokard örneğinde hem iskemide hem de reperfüzyonda olan değişiklikleri birbirinden ayırt etmek mümkün olmadığından reperfüze bir miyokarda hücre ölümünün iskemi periyodundan mı yoksa reperfüzyon periyodundan mı kaynaklandığını ortaya koymak zordur. Ölümcül reperfüzyon hasarının varlığını gösteren en önemli kriter, reperfüzyon sürecini modifiye etmeye yönelik girişimlerin hücre ölümünü engellediğinin gösterilmesi yani sonuçtan sebebe gidilmesidir (16).

### 3.1.1.1.Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Hücresele düzeyde ciddi miktarda üretilen SOR'un yol açtığı toksik etkiler vücuttaki antioksidan savunma sistemiyle yok edilmeye çalışılır. Antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan oksidatif stres, endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, hipertansiyon, kalp yetersizliği ve reperfüzyon hasarı gibi birçok önemli kalp hastalığının oluşumu ve ilerlemesinde rol oynar. Oksidatif stresin bu hastalıkların patofizyolojisindeki öneminin bilinmesi, hastalığın oluşmadan önce hücresele düzeyde tanınmasına veya antioksidan yaklaşımların klinik uygulamada yer almasına imkan verebilir. Moleküler, hücresele ve doku düzeyindeki oksidatif hasarın en aza inebilmesi için oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge sağlanmalıdır. Kalp hastalıklarına karşı miyokardiyal savunma bu açıdan birkaç aşama gösterir. Birincil savunma hücre içi antioksidanlardan [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSH-redüktaz), vb.] oluşur. İkincil savunma lipolitik ve proteolitik enzimleri (proteaz, fosfolipaz, vb.) içerir. Üçüncül savunma da, oksidatif stres sonucunda artan reaktif oksijen türleriyle başa çıkabilmek amacıyla, kalpteki gen ve proteinlerden nükleer faktör kappa B (NFκB) ve aktivatör protein I (AP-I) ile Bcl-2 geni sayesinde hücre içi antioksidanların üretimini artırılmasıdır (17).

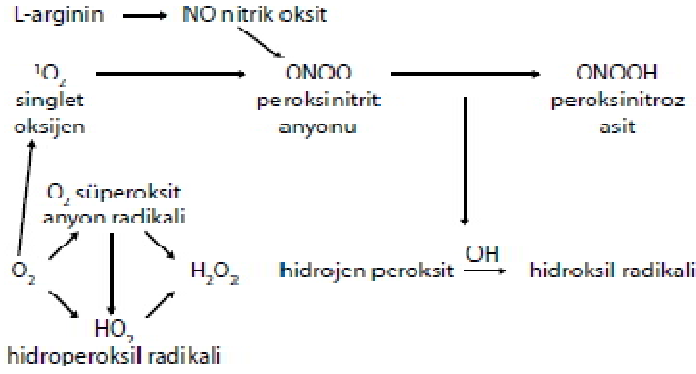
Reperfüzyon sağlandıktan hemen sonra re-oksijene dokuda oluşan reaktif oksijen türleri endotel hasarına, kemotaktik sitokinlerin salınımına ve endotel üzerinde hücresele adhezyon moleküllerinin ekspresyonuna neden olarak miyokardiyal hasar yapar. '*Oksijen paradoksu*' olarak adlandırılan bu durum

ölümcül reperfüzyon hasarında çok önemlidir çünkü reaktif oksijen türleri reperfüzyon hasarında rol alan diğer tüm mekanizmalarla ilişkilidir (18).

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal bileşiklerdir. Paylaşılmamış elektrona sahip moleküller kararsız haldedir ve başka bir molekülle etkileşime girerek, dış yörüngesindeki elektronu eşleme ve kararlı duruma gelme eğilimindedirler (19). Fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında belirli oranda oluşan radikallerin organizmaya vereceği muhtemel zararlı etkiler endojen mekanizmalarla önlenir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, NO, uyarılmış nötrofiller, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5'i de toksik serbest radikallere dönüşmektedir (Şekil 1) (20).

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir ve diradikal yapıya sahip bir moleküldür. Diradikal yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekül ile tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya sahip olması gereklidir. Oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan singlet oksijen,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  ve hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ) gibi aktive olmuş oksijen türleri kalp gibi organlarda toksik etkilere yol açar (21). SOR, hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürür, membran lipid ve proteinlerini denatüre ederek hücre fonksiyonunu engeller, çekirdek membranını parçalayarak DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirir, immün sistemdeki hücreleri yok ederek immün sistemi bozar. Sonuçta, oksidatif stres DNA mutasyonları, hücre ölümleri ve hastalıkları gibi hasarlara neden olur. Miyokard

infarktüsü (MI) sırasında İR hasarında serbest radikallerin rolü ortaya konmuş ve bunun sarkoplazmik retikulumdaki  $Ca^{+2}$  transportunda azalmayla oluştuğu gösterilmiştir (22).



**Şekil 1.** Oksijen Paradoksu: Moleküler Oksijenden Serbest Radikal Oluşumu (21).

$O_2^-$  radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve SOD aracılığı ile  $H_2O_2$ 'e indirgenir.  $H_2O_2$  eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir (23).  $H_2O_2$ ' in hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir.

1.  $H_2O_2$ , KAT veya GSHPx tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür.

2.  $H_2O_2$  geçiş metallerinin varlığında toksik  $OH$  radikaline dönüşür.

$OH$  oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir. Büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olur. Makromoleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir. *In vivo* herhangi bir  $OH$  radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle  $OH$  radikalının oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkilidir (24). Hücre membranında siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LOX) enzimleri ile

prostaglandin (PG) ve lökotrienlerin (LT) oluşumu sırasında hidrosi ve peroksi radikalleri açığa çıkabilmektedir (25).

Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni, artan serbest radikallerin plazma ve organel membranları üzerinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asitleri, oksijen ve metal katalizörler bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipid peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlanması bakımından çok uygundur. Lipid radikalleri veya malondialdehit (MDA) gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücresel yapı ve fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır. Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranında akışkanlığın azalması, membran geçirgenliğinin değişmesi, membran potansiyeli azalması, membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde azalma gözlenir. Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin hücre içine salınması sonucunda proteoliz hızlanır ve doku hasarı şiddetlenir. Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein sentezi için çok önemli olan  $K^+$  ve magnezyum ( $Mg^{+2}$ ) iyonlarının konsantrasyonları değişir ve buna bağlı olarak protein sentezinde inhibisyon gerçekleşir (26). Serbest radikallerin özellikle duyarlı amino asitler ile direkt etkileşimi sonucunda hücrenin protein yapıları hasara uğramaktadır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril grubu bulunduran aminoasitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik aminoasitler, oksidasyona en fazla maruz kalan moleküllerdir. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör

fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır (27). DNA'nın temel yapı taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (28).

### **3.1.1.2. Polimorf Nükleer Lökositler**

Reperfüzyon hasarının en önemli hücresel elemanı nötrofillerdir. Aktif nötrofiller, hücre zarlarındaki NADPH oksidaz enzimi aracılığı ile moleküler oksijeni  $O_2^-$  iyonuna indirgerler.  $O_2^-$  çoğu kez spontan dismutasyonla  $H_2O_2$ 'e dönüşür.  $H_2O_2$ ,  $Cl^-$  iyonlarının mevcudiyetinde, nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi aracılığı ile hipoklorik asite (HOCl) indirgenir. HOCl güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik moleküle kolayca reaksiyona girebilir (29).

PMNL'lerin aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığıyla olur. Selektinler olarak bilinen adhezyon moleküllerinin L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İR, endoteldeki P-selektin ekspresyonunu artırır (30). Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlökin-1 (IL-1), lökotrien B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve PG türleri vardır. Aktif lökositler  $NF_{\kappa}B$  aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör ( $TNF-\alpha$ ) sentezine yol açar (31). Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen bu maddeler, mast hücrelerinden selektin ve interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM) gibi adhezyon

moleküllerini mobilize eden inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını uyarırlar. Yapılan son çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korrelasyon olduğu bulunmuştur (32).

Serbest radikallerin oluşumunda ve İR hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz yanında, elastaz ve MPO ezimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir; aktif nötrofillerde ksantin oksidaz'ın artması ile SOR'un salınması “*solunum patlaması*” olayını meydana getirir (33).

### **3.1.1.3. Endotelial Disfonksiyon ve Nitrik Oksit**

Endotelyum, vasküler tonus, trombosit adezyonu, inflamasyon, fibrinoliz ve vasküler proliferasyonu düzenleyen lokal mediyatörler sağlayarak vasküler homeostazı korur. Endotelyum fonksiyonunun bozulması bu olayları olumsuz etkileyerek kardiyovasküler risk oluşturur (34). Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için hem potansiyel hedef konumunda hem de üretim kaynağıdır. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak IL-1, PAF, PGI<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), endotelin (ET), NO ve TxA<sub>2</sub> salgırlar. Yine oksidatif strese bağlı olarak endotel hücrelerinden büyüme faktörlerinin sekresyonunu hızlanması endotel hücre proliferasyonuna yol açar. Ayrıca, apoptotik sinyal aktivasyonu ile endotel hücre kaybına neden olur (35).

Aynı anda farklı hücre türlerinde sentezlenen NO, yağda çözünebilen ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilen bir moleküldür. Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir

hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi NO'e antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, NO' i ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir, derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır. Özellikle indüklenabilir NO sentaz (iNOS) enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Düşük düzeylerde sitoprotektif olan NO yüksek düzeylerde potansiyel olarak toksiktir (36). Oksidatif stres, NO'in biyoyararlanımını azaltarak onun nötrofil akümülyasyonunu önleme, O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalini inaktive etme ve vazodilatasyon yapma gibi kardiyoprotektif etkilerini engeller.

#### **3.1.1.4. pH Paradoksu ve Kalsiyum Yükleme**

İskemi sırasında düşen hücre içi pH'nın reperfüzyonda fizyolojik düzeye getirilmeye çalışılması ölümcül reperfüzyon hasarına katkıda bulunur. İskemi sırasında proton miktarının artması Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> pompasını inhibe eder. Reperfüzyonla beraber bu inhibisyon ortadan kalkar ve hücre içi Na<sup>+</sup> miktarı artar. Miyokardiyal reperfüzyon sarkolemmal membran hasarına ve oksidatif stresin indüklediği sarkoplazmik retikulum disfonksiyonuna bağlı olarak hücre içi Ca<sup>+2</sup> miktarında belirgin artış meydana gelir. (37).

#### **3.2. İnflamasyon**

Miyokard iskemisinin en yaygın nedeni olan koroner aterosklerozun gelişiminde inflamasyon ve intimal zedelenmenin önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (38). İnflamasyon aterosklerotik lezyonların ilerlemesine öncülük

eden bir süreç olup inflamasyon bölgesine kan sağlanmasında artış, kılcak geçirgenlikte artış ve inflamasyonun erken safhalarında öncelikle nötrofillerin, daha sonraları ise monosit ve lenfositlerin inflamasyon bölgesine göç etmesini kapsayan başlıca üç safhadan oluşur (39). Post-iskemik dokular dolaşan nötrofilleri aktive edebilen ve/veya kendine çekebilen inflamatuvar mediyatörler üretir. İR da miyokardiyal doku içine nötrofillerin göçü infarkt alanının genişliği ve iskemi süresiyle ilişkilidir. Doku hasarı PMNL birikimiyle beraber lokalize inflamatuvar yanıt oluşturur. Aktif nötrofiller IL-1, IL-3, IL-5, PAF ve TNF- $\alpha$  gibi önemli proinflamatuvar sitokinlerin kaynağıdır. İskemi sırasında hücre içi serbest  $Ca^{+2}$  miktarının hızla artması, plazma membranındaki fosfolipaz A2'yi aktive ederek reperfüzyon sırasında ortamda bol miktarda araşidonik asit birikimine neden olur. Araşidonik asit, COX veya LOX ile metabolize edilir ve PGG<sub>2</sub>'ye dönüştürülür. PGG<sub>2</sub>'den PGH<sub>2</sub>'ye dönüşüm sırasında O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikali oluşur. Adhezyon molekülleri İR hasarında inflamatuvar cevabın baskılanmasında ve devamında köşe taşı gibi rol oynar. İR hasarında plateletlerin vasküler yatağa adhezyonu ICAM-1 vasıtasıyla olur. Endovasküler temastan sonra plateletler aktive olur ve ortama inflamasyonda rol oynayan PAF gibi sitokinleri salgılar.

### **3.3. Isı Şok Proteinleri**

İlk kez 1962 yılında tanımlanan ısı şok proteinleri (HSP), hücrelerin ani ısı artışı, anoksi, reaktif oksijen bileşikleri ve glukoz düzeyindeki değişikliğe maruz kalmasıyla üretimi artan bir protein grubudur. Oksidasyon ve toksik bileşenlerin parçalanması gibi birçok stres faktörleri hücrelerde cevap olarak HSP sentezine neden olur. Yüksek HSP düzeyi hastalıklara karşı hücre savunma

mekanizmalarının uyarılması, gen tedavisi ve şaperon düzenleyici re ajanlar gibi tedavi yaklaşımları için muhtemel bir hedef olarak düşünölmektedir (40).

Artmış HSP seviyeleri mRNA sentezine, stabilitesine ve bu durumun devamına imkan sağlar. Yüksek HSP seviyeleri sadece stresin başlangıç dönemlerinde görülür. Hücre ilk şoktan sonra yüksek ısıya maruz kalmaya devam etse bile, HSP seviyeleri düşmeye başlar ve sonuçta normal seviyelerine iner. Çevresel faktörler değıştikçe, ısı şok cevabı da farklı adaptasyonların oluşmasına katkıda bulunur. Bu proteinlerin sadece ısı şokuna karşı değil hücreye yönelik stres yaratan değışik ajanların saldırılarına karşı da cevap olarak üretimlerinin artması "*stres proteinleri*" olarak adlandırılmalarına neden olmuş ve bazı stres proteinlerinin normal hücrelerde de biyolojik düzeyde bulunduğu tespit edilmiştir (41). Stres proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dahil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşır. Stres faktörlerine maruz kalan hücrelerde protein katlanmalarında açılmalar meydana gelir ve karşılaştığı diğer proteinlerle yapışarak kümeler meydana getirir. Konformasyon bozukluğu nedeniyle proteinler fonksiyonlarını kaybederler. HSP'ler bu denatüre proteinleri tutarak toplanmalarını engeller. Hücrede yeni üretilen proteinlerin doğru bir şekilde katlanmasına yardımcı olan maddelere "*moleküler şaperon*" denilmektedir. HSP'ler kuvvetli hidrojen bağları, güçlü hidrofobik etkileşimleri ve çift kutuplu heliks stabilitesinden dolayı denatüre olmazlar. (42). HSP regülasyonunda temel olarak ısı şok faktörleri (HSF) rol oynar ve insanlarda üç alt grubu tanımlanmıştır. HSF-1, HSP üretimini başlatır. Ayrıca hücre içi artan denatüre proteinler doğrudan HSF-1 genini de indükleyerek daha çok HSF-1 üretimine yol açarlar. Yeni üretilen HSP, denatüre ya da yaşlanmış proteini

bağlayarak etkisiz hale getirir. Bu işlem tamamlanınca HSF inaktive edilir ve hücre fizyolojik konumuna geri döner. HSP-HSF-1 kompleksi HSF-1 genine negatif feedback uygular ve HSF-1 üretimi de durur (43).

### **3.3.1. Isı Şok Proteinlerinin Görevleri**

HSP'ler hücre içerisinde normal olarak bulunurken hücre dışında hücrelerin öldüğü ve içeriğin dışarı atıldığı durumlarda bulunurlar. Hücre dışındaki HSP'lerin hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmak için çok güçlü indükleyici etkileri vardır. HSP'ler hücre içerisinde proteinlerin katlanmasına yardım ederek proteinlerin hazırlanmasını düzenler, hücrel korumada tamamlayıcı rol oynar ve bazen bir arada çalışmak suretiyle proteinleri stresten korurlar (44). HSP çeşitlerinin antioksidan özellikleri ile sadece oksidatif strese karşı korunmada değil, aynı zamanda apoptozis ve farklılaşma gibi diğer hücrel fonksiyonların modülasyonunda görev aldığı bilinmektedir (45).

### **3.3.2. HSP Çeşitleri**

HSP'ler molekül ağırlıkları, yapıları ve fonksiyonlarına göre 5 sınıfa ayrılırlar. Bunlar HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 ve küçük ısı şok proteinleridir.

#### **3.3.2.1. HSP100**

Fizyolojik koşullar altında moleküler şaperonlar gibi fonksiyon göstererek, proteinlerin yeniden düzenlenmesinde görev alır. Özellikle HSP100 ailesi içinde yer alan HSP104 yeni toplanan proteinleri kurtarma yeteneğine sahiptir (44).

#### **3.3.2.2. HSP70**

Üzerinde en çok çalışma yapılmış olan HSP molekülüdür. HSP60 ile beraber hücre dışı ortamda bulunabilir. Protein katlanması ile ilgili olarak geniş bir etki spektrumları vardır. HSP70 sitoplazma, çekirdek, endoplazmik retikulum

ve mitokondride protein taşınmasına katılır. Stres altında proteinleri korur, katlanmamış proteinlerin kümeleşmesini önler, katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengeyi sağlar, polipeptitleri birbirine bağlar. HSP70 HSF'nin aktivitelerini düzenler ve HSP türlerinin transkripsiyonunun kontrolünü sağlar (44). Özellikle HSP90 ile beraber hücre ölümü, differensiasyon, proliferasyon ve hücre homeostasis devamı konusunda görev alır (46).

### **3.3.2.3. HSP60**

HSP70 ile birlikte proteinin doğal katlanmasına aracılık yapar. Hatalı katlanan polipeptidlere bağlanarak doğru katlanmalarına yardım eder (44). HSP60 mitokondride yer alan en önemli protein katlayıcı moleküldür ve mitokondrinin hücrel strese tolerans göstermesini sağlar (47).

### **3.3.2.4. Küçük Isı Şok Proteinler**

Küçük ısı şok proteinler (sHSP) monomer molekülü 15-40 kDA`luk kütleler halinde sitoplazma ve çekirdekte yerleşmişlerdir. Daha çok hücre iskelet yapısı ve zarlarla etkileşerek koruyucu olarak görev yaparlar. Isı stresi görülen hücrelerde belirgin olarak artış gösterir. Ayrıca antioksidan özelliği vardır. HSP60, 70, 90 ve 110 ile birlikte çalışarak yeni üretilen proteinlerin çökmesini önlerler (48).

### **3.3.2.5. HSP90**

HSP90 proteinlere bağlanarak onların aktivasyonunu ve katlanmasını düzenler. Geri katlanan peptidlerin kümeleşmesini önler. Sitoplazma ve endoplazmik retikulumda bulunur. Endoplazmik retikulumda en fazla bulunan ısı şok proteinidir (endoplazmik versiyon). HSP90, HSF-1'in fizyolojik koşullarda durumunun dengelenmesinde görev alır. HSP90 $\beta$  ve HSP100 birbirine çok benzer etkiler göstermektedir. En iyi bilinen etkileri kalmodulin bağlayıcılıklarıdır

Etkilerini gösterebilmeleri için  $Ca^{+2}$  ihtiyaç duyarlar (49). HSP90 daha çok HSP70, HSP40 ve HSP organize edici protein ile birlikte çoklu şaperon yapısı şeklinde bulunur. Hücrelerin iletişimi ve normal morfolojik yapılarının korunmasında önemli rolleri vardır (50).

### **3.4. Kaveolin**

Kaveola ve kaveolin (CAV) kardiyovasküler hastalıklarda ve kardiyak disfonksiyonda önemli bir rol oynamaktadır. 50-100 nm çapındaki membran girintileri olan kaveolaların kolesterol ve protein içeriği yüksektir. Çoğu dokuda mevcut olsalar da en önemli varlıklarını adipositler, düz kas, endotel hücreleri ve fibroblastlarda gösterirler ve endositoz, transitoz,  $Ca^{+2}$  sinyali, kolesterol taşınımı gibi birçok sinyal iletim yolağında rol oynarlar. Düz kas hücrelerinin kasılma/gevşeme döngüsü süresince  $Ca^{+2}$  un hücre dışından sitoplazmaya translokasyonunda kaveolanın rol oynadığı bildirilmiştir (51). CAV proteinleri, kaveolin-1 (CAV-1), kaveolin-2 (CAV-2) ve kaveolin-3 (CAV-3) gibi bilinen üç izoformu bulunmaktadır. CAV-1 ve CAV-2 kardiyovasküler sistemde hâkimdir. Kardiyovasküler endotelde CAV-1 eNOS ve  $Ca^{+2}$  ile NO'in önemli bir düzenleyicisidir (52).

Ateroskleroz, kanser, lipid bozuklukları, kalp hastalıkları ve solunum hastalıkları gibi bazı patolojiler ile ilişkili olmalarına rağmen, CAV'ların kalbin korunmasında bir role sahip olduğu bilinmektedir. Birçok sinyal molekülünce zengin bölgeler olan kaveolada eNOS aktivitesini düzenleyen  $Ca^{+2}$  bağlayan protein kalmodulin de bol miktarda bulunmaktadır. eNOS CAV-1'e bağlı iken inaktif durumdadır. Endotel hücresinin uyarılmasına yanıt olarak  $Ca^{+2}$  un kalmoduline bağlanması CAV-1' in eNOS'tan ayrılmasına neden olur. CAV-1

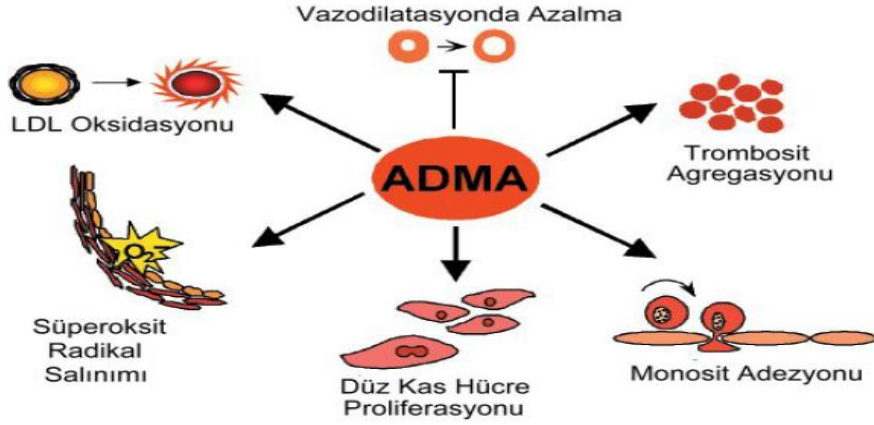
peptidinin NO mekanizması ile miyokardiyal İR'da kalp için koruyucu olduğu gösterilmiştir (53). CAV-1 eksikliğinin kardiyak disfonksiyonu şiddetlendirdiği ve MI geçiren farelerde hayatta kalma oranını azalttığı tespit edilmiştir (54).

### **3.5. Asimetrik Dimetil Arjinin**

Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) önemi giderek artan ve klinik tanıda kullanabilmek amacıyla üzerinde çalışmaların yoğun olarak devam ettiği bir moleküldür. ADMA, nükleoproteinlerde bulunan arjinin rezidülerine, protein arjinin metil transferaz (PRMT) enzimi tarafından metil gruplarının sentez sonrası düzenlemeyle eklenmesi ve bu proteinlerin yıkılması sonucunda meydana gelen metilenmiş arjinin türevidir. ADMA'nın %10'luk kısmı böbrekler yoluyla uzaklaştırılırken, geriye kalan %90'luk kısım ise dimetil arjinin dimetil aminohidrolaz (DDAH) tarafından metabolize edilmektedir (55). DDAH enziminin DDAH-1 ve DDAH-2 olmak üzere iki izoformu vardır. Bu izoformlar benzer gen yapısı ve benzer enzim aktivitesine sahiptirler ancak farklı dokularda yer alırlar. DDAH-1 enzimi beyin, karaciğer, adrenal bez, testis ve böbrek gibi nNOS ekspres eden dokularda; DDAH-2 enzimi kalp, aorta, plasenta gibi eNOS ve iNOS ekspres eden dokularda bulunmaktadır. DDAH enziminin inaktivasyonu ADMA eliminasyonu bozulmasına ve ADMA seviyelerinin artmasına ve NO üretiminin azalmasına sebep olur (56).

Oksidatif stres ADMA yapımında rol alan enzimlerin aktivitelerini değiştirerek ADMA miktarlarında artışa yol açmaktadır. ADMA düzeylerindeki bu artış DDAH enzim aktivitesindeki azalmaya bağlı olabilir. (56). Reaktif oksijen türleri (ROS), PRMT aktivitesini ve ADMA düzeylerini artırır ve NO düzeylerinde azalmaya yol açar (57). Klinik ve deneysel çalışmalar endotel

disfonksiyonu, artmış oksijen kökenli serbest radikal üretimiyle ilişkilendirmektedir (Şekil 2) (58).



Şekil 2. ADMA'nın endotel disfonksiyonu ile ilişkisi (58).

Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde rol oynayan risk faktörlerine sahip bireylerde ADMA düzeyleri yüksek bulunmuştur. Vazospastik anjinalı hastaların koroner damarlarında ADMA düzeyleri yüksek, NO düzeyleri ise düşük bulunmuştur (59). ADMA ventriküler kontraksiyonu, kalp hızını azaltmaktadır ve kalp yetmezliğinde ADMA düzeyleri artmaktadır (60). ADMA'nın endotel disfonksiyonu ve aterosklerozda rol aldığı ve kardiyovasküler hastalık riskini tahmin etmede belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (61).

### 3.6. Rhokinaz

Son yıllarda yapılan çalışmalar, GTP'ye bağlı küçük proteinlerin (G proteinleri) hücre içi sinyal yollarında önemli rol oynadıklarını göstermiştir. Küçük G proteinleri hücre farklılaşması, bölünmesi, hücre iskeletinin kontrolü gibi çeşitli hücresel işlevlerde görev yapmaktadır. G proteinleri Rho, Ras, Rab, Sarl/Arf ve Ran ailelerinden oluşur. Rho ailesinin memelilerde en az 10 üyesi tanımlanmıştır. Bunlar arasında Rho izoformlarından Rho A, Rho B, Rho C, Rho D, Rho E ve Rho G; Rac izoformlarından Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42 ve TC10

bulunur. Rho izoformları arasında vücutta birçok hücrede varlığı belirlenen ve üzerinde en fazla araştırma yapılan Rho A proteindir (62). Rho proteinleri, hücre iskeleti kontrolü, stres liflerinin yapılanması, fibroblastların yapışması ve düz kas kasılmasında  $Ca^{+2}$ 'a duyarlılığın artması gibi işlevlerde rol üstlendiği bildirilmiştir (63). Rhokinazlar, Rho'nun ilk efektörleri yani uyarıya cevap veren hedef molekülleri olarak keşfedilmiştir. Rhokinaz yaklaşık 1388 aminoasit dizisinden oluşur. Rhokinazların ROCK I ve ROCK II olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. İnsanda ROCK1 ve ROCK2 genleri sırasıyla 18. kromozom (18q11.1) ve 2. kromozomda (2p24) yer almaktadır (64). Rhokinazın N-terminalinde kinaz bölgesi vardır. Orta bölgesinde kuramsal olarak kangal gibi kıvrılmış (coiled-coil) bölge ve C-terminal bölgesinde plekstrin homoloji bölgesi bulunur. Aktive olmuş Rho, Rhokinaz'ın kangal gibi kıvrılmış bölgesinin C-terminal parçasıyla etkileşerek kinaz bölgesini aktive eder (65). Trombin, anjiyotensin II (AII), trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve serotonin gibi çeşitli vazoaaktif ajanlar Rho/Rhokinaz sinyal yolağını aktive ederler (66). Rho/Rhokinaz yolağı bozuklukları sıklıkla ölüme neden olan hipertansiyon, vasküler spazm ve arterosklerozun patolojisinde yer almaktadır. Düz kas konstriktör tonusunun kontrolünde Rhokinaz merkezi bir rol üstlenir ancak bu enzim aynı zamanda vasküler tonusun fizyolojik koşullar altında kontrolünde de önemli bir fonksiyon görür. Rhokinaz'ın damar düz kas hücreleri üzerindeki bahsedilen önemli etkilerinin yanında, NO ve NOS regülasyonu üzerinde de önemli etkileri vardır (67). Koroner damar içine uygulanan Fasudil (68) uzun süreli IL-1 $\beta$  verilen domuz modellerinde koroner vazospazmı inhibe etmektedir. Fasudil'in anti-iskemik etkisi, aynı zamanda ET-1 verilerek miyokardiyal iskemi oluşturulan

tavşan modelinde gösterilmiştir (69). Rho/Rhokinaz yolunun inflamasyon ve transendotel lökosit göçü, trombosit aktivasyonu, tromboz gibi süreçlerde etkili olduğu belirtilmektedir (70). Rhokinaz'ın hipertansiyon, koroner arter spazmı, anjina, ateroskleroz, miyokardial iskemi ve reperfüzyon hasarı gibi kardiyovasküler hastalıkların patojenezinde önemli rol oynadığı ve yeni bir terapötik hedef olabileceği önemle vurgulanmıştır (71).

### **3.7. NADPH Oksidaz**

Kalp damar sisteminde, NADPH oksidaz sadece İR hasarı sırasında değil, aynı zamanda fizyolojik şartlar altında oluşan ROS'un önemli bir kısmından sorumlu tutulmaktadır (72). Serbest radikallerin oluşumunda ve İR hasarında önemli bir kaynak olan nötrofillerin plazma zarında oksidan etkili NADPH oksidaz enzimi bulunmaktadır. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile  $O_2^-$  iyonlarına oksitlenmektedir.

NADPH oksidaz'ın NOX1-5 ve DUOX1-2 (NOX6-7 olarak da adlandırılır) olmak üzere yedi izoformu vardır. Tüm izoformların iki hem grupları, bir FAD ve NADPH bağlanma bölgesi vardır. Oksidatif patlamaya aracılık eden nötrofillerde keşfedilen NOX2 ilk açıklanan izoform olmuştur (73).

Kardiyovasküler sistemde, NOX2 yanında NOX1, NOX4 ve NOX5 de eksprese edilmiştir. NOX1 endotel hücreleri, vasküler düz kas hücrelerinde ve adventisyal fibroblastlarda; en bol şekilde bulunan izoform olan NOX4 ise endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücrelerinde bulunur. NOX5 vasküler endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücrelerinde yer almaktadır (74).

Vasküler endotel ve kas hücre membranında bağlı NADH ve NADPH oksidaz enzimi vardır. Bu iki enzim nötrofillerde oksijen radikali üretiminden sorumlu NADPH oksidaz gibi çalışır. Fakat nötrofildekine kıyasla çalışma hızı yavaş ve patlama reaksiyonunu göstermezler (75). NADH ve NADPH oksidaz sıra ile NADH ve NADPH'ı elektron kaynağı olarak kullanırlar. Bu kaynaklardan aldıkları elektronları moleküler oksijene taşıyarak  $O_2^-$  molekülü sentezlerler. Vasküler NADH ve NADPH oksidaz sisteminin önemli bir özelliği AII ve sitokinlerle aktive olmasıdır. AII, damar adventisiasında, düz kas hücresi ve endotelde reaktif oksijen türleri meydana getiren NADPH/ NADH oksidaz'ı uyarır ki bu da endotel disfonksiyonu, hücre büyümesi ve inflamasyona yol açar (76). NADPH oksidaz norepinefrin, AII, TNF de dahil olmak üzere çeşitli uyarılar ile aktive edilir (77,78). NADPH oksidaz aktivitesi ve ekspresyonunun deneysel sol ventrikül hipertrofisi (79) ve MI'da (80) arttığı gözlenmiştir.

### **3.8. Nükleer Faktör KAPPA-B**

Oksidatif strese yanıt olarak aktive olan ve birçok genin ekspresyonunda ve inflamatuvar genlerin üretiminden sorumlu olan redoks-duyarlı transkripsiyon faktörüdür. Oksido-inflamatuvar kaskadın tetiklendiği, yoğun sitokin salıverilmesi ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun arttığı klinik durumlarda patofizyolojide önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur (81).  $NF_{\kappa}B$  sitoplazmik bir inhibitör protein olan I $\kappa$ B tarafından inhibe edilir.  $NF_{\kappa}B$  ve inhibitörü olan I $\kappa$ B'den oluşan kompleks sitoplazma içinde inaktif halde bulunur.  $NF_{\kappa}B$  IL-1, TNF- $\alpha$ , reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri (RNT), hipoksi/anoksi, hiperoksi, sitokinler, protein kinaz C aktivatörleri, "mitogen activated" protein kinaz (MAPK) aktivatörleri, lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel veya viral

ürünler ve UV radyasyon tarafından aktive edilebilir (82). NF<sub>κ</sub>B'nin aktivasyonunda en önemli basamak IκB'ların 700–900 kDa multimerik kompleksler ile fosforilasyonudur; sonuçta IκB kinaz (IKK) kompleksi oluşur. NF<sub>κ</sub>B'nin sitokine bağlı aktivasyonunda IKK'nin rolü yoktur; IKK proinflamatuvar uyarılar tarafından NF<sub>κ</sub>B'nin aktivasyonunda rol alır. Makrofajlar, T hücreleri ve diğer hücreler tarafından üretilen proinflamatuvar sitokinler hedef hücreler üzerindeki etkilerini NF<sub>κ</sub>B'nin aktivasyonu ile gösterirler (83). Lökosit, vasküler endotel ve düz kas hücreleri, kardiyomyositler ve fibroblast gibi hücreler proinflamatuvar sitokinlere NF<sub>κ</sub>B aktivasyonu ile yanıt verirler (84,85). Ek olarak, NF<sub>κ</sub>B aktivasyonu proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonuna da uyarır. NF<sub>κ</sub>B yolağı patolojik süreçlerde rol alır ve hücre ölüm yollarını aktive etmektedir. TNF-α apoptozise neden olur ve bu NF<sub>κ</sub>B aktivasyonu ile sıklıkla paralel seyreder (86). NF<sub>κ</sub>B'nin antiapoptotik faktörlerin indüklenmesi ile sağ kalım faktörü olduğunu düşünülmektedir (87). Farklı deney modelleri ile yapılan çalışmalar NF<sub>κ</sub>B'nin hücreleri ölümden koruduğunu desteklemektedir. NF<sub>κ</sub>B'nin alt ünitelerinden birinin kaybı İR modelinde hücre ölümünü azaltmaktadır (88).

### **3.9. Toll-Like Reseptörler**

Toll-like reseptörler (TLR), birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan, aynı zamanda adaptif immün cevabın da aktive olmasını sağlayan protein grubudur. İlk kez *Drosophila* türünde, embriyonal gelişim basamaklarında rol aldığı bilinen bir reseptör olarak tanımlanan ve daha sonra mutant olan sineklerde fungal infeksiyonlara yatkınlık olduğu fark edilerek, immün sistem cevabında önemli fonksiyonu olduğu düşünülen reseptöre “toll” adı verilmiştir. Ancak 1997 yılında insan homoloğu tariflenmiş ve şaşırtıcı bir şekilde

doğal immün sistemin parçası olduğu görölmüştür. Bugüne kadar TLR ailesinde 13 üye saptanmıştır. Bunlardan TLR-1-9 arası ve TLR-11'in ligandları belirlenmiş; TLR-10, TLR-12 ve TLR-13'ün ligandları ise henüz bilinmemektedir. İlk tanımlanan TLR-1 olmasına rağmen, bu reseptörlerden fonksiyonu ilk belirlenen TLR-4 olmuştur. TLR'ler hem lenfoid hem de non-lenfoid dokuda eksprese olmaktadır. TLR-1 ağırlıklı olarak monosit, nötrofil, B-hücreleri ve natural killer (NK) hücrelerinde, TLR-2'nin monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR-3'ün dendritik hücrelerde, TLR-4'ün endotelial hücreler, monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR-5'in ise monosit ve dendritik hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiştir (89). TLR-4, insanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan çeşididir. TLR-1, -2, -4, -5, -6 ve -10 çoğunlukla hücre yüzeyinde lokalize olup patojenlere spesifik molekülleri tanırlar. TLR-3, -7, -8 ve -9 ise hücre içi organellerde lokalize olurlar (90). Son yapılan çalışmalar, kanama ve İR hasarı gibi bakteriyel olmayan olaylarda da TLR-2 ve TLR-4 aktivasyonunun önemli rol oynadığını göstermektedir (91).

TLR-4'un aşırı ekspresyonu sonucu NF<sub>κ</sub>B aktivasyonu ve sitokin üretimi artar. TLR antagonistleri ile zararlı proinflatuar sitokinlerin etkileri azaltılabilir. TLR-2 ve TLR-4 inhibisyonu, kritik hastalıkta klinikte kullanılmak üzere olası terapötik yaklaşımlar sağlamıştır. İnme, MI ve solid organ transplantasyonunda ortaya çıkan İR hasarının TLR-2 ve TLR-4 üzerinden artabileceği ile ilgili kanıtlar giderek artmaktadır. TLR-4 veya TLR-4 ilişkili yapısal iskelet proteini MyD88 eksikliği olan transgenik farelerde, hemoraji, MI veya böbrek İR hasarını takiben gelişen organ disfonksiyonlarının azaldığı *in vivo* olarak gösterilmiştir (92,93). İR hasarında ksantin oksidaz ile ortaya çıkan

ekstraselüler  $O_2^{\cdot-}$ 'in nötrofilleri aktive ettiği ve indüklenen nötrofil ilişkili proinflamatuvar yanıtın TLR-4 bağımlı mekanizmalarla ortaya çıktığı gösterilmiştir (94).  $O_2^{\cdot-}$  dışındaki diğer oksijen radikalleri de TLR-4 bağımlı mekanizmalar ile inflamatuvar süreçleri düzenler.

### 3.10. Nekroz

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdaki daha farklı hücre ölümü gösterilmiş ve buna, ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelen “apoptozis” adı verilmiştir (95). Hücre ölümü nekroz ve apoptozis olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir. Nekroz hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyarılar sonucu oluşan rastgele gelişen, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz ve istenmeyen bir süreçtir. Nekroz sırasında mitokondriyal ROS üretimi artar, nonapoptotik proteazlar aktive olur, ATP üretimi azalır ve  $Ca^{+2}$  kanalları açılır. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir (96).

Hem nekroz hem de apoptoz, yöntem olarak hücre ölüm şekli olmalarına rağmen bu iki ölüm şeklinin hem histolojik hem de fizyolojik nedenlerinde büyük farklılıklar vardır. Nekrozun karakteristik özelliği ölümün hücre gurubunda ortaya çıkmasıdır ve nekrozun en yaygın nedeni oksijen yetersizliği anlamına gelen hipoksidir (97). Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması inflamasyona sebep olur. Bu olayın karakteristik özelliği makrofaj ve

nötrofillerin nekrotik dokuya göç etmesidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite eder. Bu nedenle inflamasyon nekrozun önemli bir işaretidir.

Kalp hücrelerinde nekroz gelişimi İR döneminde harekete geçen mekanizmaların ortak sonucudur. Bununla birlikte reperfüzyon döneminin ilk dakikalarında gelişen nekrozun başlıca sebebi kalp hücrelerinde gelişen kontraktürdür (98). Reperfüzyon hasarının en önemli iki komponenti, reperfüzyon aritmileri ve miyokardiyal nekrozdur. Hücre nekrozu geliştiğinde, kalp kasının harabiyeti ve buna bağlı kanı yeterince pompalayamaması sonucunda, kalp yetmezliği oluşur. Bu durum da, hastanın prognozunu ve ilerideki yaşam kalitesini belirlemesi açısından hayati önem taşır. İlaçların koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi için yapılan deneysel çalışmalarda, kardiyak enzimlerin salıverilmesi, iskemi-sonrası kalp fonksiyonlarının dönüşü ve hücre kültürlerindeki hücrelerin canlı kalabilme oranları gibi yöntemler de kullanılmakla birlikte; en güvenilir değerlendirme, MI sonrasında, tüm kalpteki doku nekrozu miktarının direkt olarak ölçülmesiyle yapılmaktadır. Nekroz miktarının tayininde en yaygın olarak kullanılan yöntem ise, “tetrazolium ile boyama” yöntemidir (99). Tetrazolium tuzları, dokuda dehidrogenazların ve NADH gibi kofaktörlerin bulunması durumunda, indirgenerek formazan pigmenti oluşumuna neden olurlar. Bu enzimleri ve kofaktörlerini içeren canlı doku lanları trifenil tetrazolium ile pozitif boyanırken bunları içermeyen dokuların ise, canlılıklarını devam ettiremeyecekleri; dolayısıyla ölü ya da ölmek üzere oldukları kabul edilir. Öte yandan, pozitif olarak boyanan dokular da, sağlıklı olmayabilirler ve birkaç saat ya da gün sonra canlılıklarını yitirebilirler. Bu nedenle, nispeten kısa (30-60 dk) bir iskemiye takiben, daha uzun süreli bir reperfüzyon periyodu, sonuçların

güvenilirliği açısından gereklidir. İskemik miyokardium, vücut sıcaklığındaki değişimlere çok duyarlıdır. Vücut sıcaklığındaki her bir derecelik düşüşün, risk zonundaki kalpte %7'lik bir koruma sağladığı bildirilmiştir. Nekroz miktarı tayini ile ilgili çalışmalarda, vücut sıcaklığının yetersiz kontrolü sonuçları etkileyen en önemli faktörlerden birisidir (100). Dokuda canlılığını koruyan alanlar nitro blue tetrazolium ile koyu mavi renkte boyanırken nekrotik bölge soluk sarımsı-kahverengi renkte gözlenir.

### **3.11. Renin Anjiyotensin Sistemi**

Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS) vücut sıvı ve elektrolit dengesi ve arteryel basıncı etkilemek suretiyle kardiyovasküler, renal ve adrenal fonksiyonları kontrol eder. RAS, kardiyovasküler sistemin fizyolojik ve patolojik cevaplarında yer alan çok önemli bir parçadır. Vücutta sistemik (klasik, hormonal) ve lokal (doku) olmak üzere anjiyotensin üreten iki sistem vardır (101).

#### **3.11.1. Sistemik RAS**

Renin, küçük protein yapılı bir enzim olup böbrekteki jukstaglomerüler hücrelerden iskemi, hipotansiyon gibi arteriyel basınç düşmesi, plazma  $Na^+$  konsantrasyonunda azalma, reseptörlere etkili katekolaminlerin artması ve çeşitli ilaçlarla (genel anestezipler, diüretikler vb.) salınımının arttığı kabul edilmektedir. Renin böbrekleri terkederek kan dolaşımına karışır ve burada anjiyotensinojeni anjiyotensin I'e (AI) çevirir ki bu da akciğer damar endotelindeki anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) ile hızlıca AII'ye çevrilir. AII çok güçlü bir vazokonstriktördür, daha çok arteriyollere etki eder ve total periferik direncin artmasına neden olur. AII, kan basıncı kontrolünde böbrekler üzerinde sekonder bir role daha sahiptir. Vazokonstriktör etkisiyle böbreklere gelen kan akımını

azaltarak tuz ve su reabsorbsiyonununu artırır. Ayrıca adrenal bezden aldosteron salınımını stimüle eder ve proksimal tubuluslardan  $\text{Na}^+$  reabsorbsiyonununu artırır. Aldosteron böbrek tubuluslarından  $\text{Na}^+$  reabsorbsiyonunun artırarak ekstrasellüler sıvıda  $\text{Na}^+$ 'un artmasına neden olur. Bu da su retansiyonuna, hücre dışı sıvı hacminde artışa ve kan basıncında artışa neden olur (102).

### **3.11.2. Lokal RAS**

Dolaşımdaki rolüne ek olarak, AII kalp, beyin, böbrek ve arterlerden doku seviyesinde de salgılanır, otokrin ve parakrin etkileri ortaya çıkar. Fizyolojik şartlar altında doku AII vasküler yapı ve fonksiyonların korunmasını sağlar. Lokal AII endotelysel fonksiyon üzerine direkt etki gösterir. Damar tonusu, koagülasyon, hücre büyümesi ve ölümü ile lökosit migrasyonundan sorumludur. Endoteldeki artmış AII seviyeleri oksidatif strese neden olur ki buna bağlı olarak salgılanan bazı mediyatörler endotelysel disfonksiyona, hücre büyümesine, inflamasyon ve tromboza neden olur. AII ayrıca vasküler remodelizasyonunda otokrin büyüme faktörlerini artırarak görev alır. AII matriks metalloproteinaz (MMP) enzim üretimini stimüle ederek aterosklerotik plak stabilitesini etkiler (102). Miyositlerde hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  düzeylerinde artışa yol açarak, pozitif inotropik etkinin yanısıra diyastolik fonksiyonları bozar ve koroner vazokonstriksiyona neden olur. Bu etkileriyle miyokardiyal reperfüzyon döneminde gelişen hasara katkıda bulunur (103). Bölgesel damar tonusu ve kan damarlarının regülasyonu, damarlarda ve kalpte hipertrofi oluşumu, hasar ve inflamasyona damar cevabının gösterilmesi, düz kas proliferasyonunun uyarılması, koroner vazokonstriksiyon, miyokard kontraktilesinin artışı, MI ve reperfüzyon sırasında ventriküler aritmilere eğilim oluşturması, RAS'ın farmakolojik inhibitörlerine yanıt vermesi

gibi etkilerden bu sistem sorumlu tutulmaktadır (104). Özellikle kardiyak lokal RAS'ın miyokardiyal hipertrofi, anjiyogenez ve fibrozis üzerine etkileri ve RAS'ın diğer sinyal sistemleriyle ve kaskadlarıyla olan ilişkisi güncel literatürde ilgi çekmektedir (105).

### **3.11.3. AII ve Reseptörleri**

RAS'ın ana mediyatörü AII' dir. AII, sadece dolaşımda bulunan bir hormon olmayıp, aynı zamanda beyin, kalp, böbrek ve kan damarları gibi pek çok dokuda da üretilir ve böbrek üstü bezleri, böbrekler, beyin, hipofiz bezi, damar düz kasları ve sempatik sinir sistemi gibi dokularla etkileşir. Böylelikle, AII hem parakrin hem de otokrin hormon görevi yapar.

AII damarsal NADPH oksidazın kuvvetli bir aktivatörüdür ve ROS üretimini artırır. AII aynı zamanda endotel hücrelerindeki ksantin oksidaz'ı uyarır, bu da AII' ye cevap olarak endoteldeki oksidatif stresinin yeni bir mekanizmasını gösterir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma AII'nin, NAD(P)H aktivasyonuna ve RhoA/Rho-kinaz yolağının uyarılmasına sebep olarak damar tonusuna katkıda bulunduğunu göstermiştir (106). Diğer peptid hormonlar gibi AII de hedef hücrelerin plazma membranlarında yerleşik bulunan reseptörler aracılığı ile etki eder. AII'nin AT1, AT2, AT3 ve AT4 olmak üzere tanımlanmış dört tip reseptörü vardır. Temel olarak AT1 ve AT2 reseptörleri üzerinden etkisini gösterir. AT3 ve AT4'ün görevleri kesin olarak bilinmemektedir.

#### **3.11.3.1. AT1 reseptörü**

AII kardiyovasküler, nöronal, renal, endokrin ve hepatik sistem üzerindeki fizyolojik etkilerinin hemen hemen tamamını AT1 reseptörünün stimülasyonu ile gerçekleştirir. AT1 reseptörü; kalp, böbrek, vasküler düz kas hücreleri, beyin,

adrenal bez, plateletler, yağ dokusu ve plasentada yerleşmiştir. Sıçan, fare ve tavşanlarda yapılan çalışmalarda AT1 reseptörünün AT1A ve AT1B olmak üzere alt tipleri tanımlanmıştır. AT1 reseptörlerinin aktivasyonu hücrenin kasılması için gerekli olan fosfolipaz C' yi uyararak, inositoltrifosfat (IP3) oluşumuna ve yavaş  $Ca^{+2}$  kanallarının açılarak endoplazmik retikulumdan  $Ca^{+2}$  salınmasına neden olur. Ayrıca fosfolipaz A2 aktivasyonu ve adenilat siklaz inhibisyonu yaptığı da bilinmektedir. AT1 reseptörlerinin etkilerini; vazokonstriksiyon, renin sekresyonunun baskılanması,  $Na^{+}$  alımının artışı, vazopressin salınımının artırılması, ET seviyesinin artırılması, sempatik aktivasyon, miyositlerde hipertrofi, miyokardiyal kasılmanın artırılması, vasküler ve kardiyak fibrozis, aritmiler, plazminojen aktivatör inhibitör 1'in uyarılması ve  $O_2^{-}$  oluşumu ve apoptozisin tetiklenmesi olarak özetlenmektedir (107). Son zamanlardaki çalışmalarda AII'nin, yerel olarak aktif bir büyüme hormonu olduğu ve AT1 reseptörleri aracılığı ile hücrel hipertrofi, fibrozis patobiyolojisinde rol aldığı bildirilmiştir (105).

### **3.11.3.2. AT2 Reseptörü**

Şu ana kadar yapılmış çalışmalar AII' nin kardiyovasküler sistemde pek çok etkisinin AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiğini göstermekte olup, AT2 reseptörünün katkısı ise çok fazla bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar AT2 reseptörünün, AT1' e antagonistik etkisinin olduğunu göstermektedir. AT2 reseptörü; AT1' e zıt olarak, büyümeyi inhibe edici, antihipertrofik ve proapoptotik özellikler taşımaktadır (108). Miyokardiyumdaki AT2 reseptörünün fonksiyonu çok iyi tanımlanmamış olmakla beraber, yakın zamanlarda yapılan hücre kültürü çalışmaları AT2 reseptör uyarımının, neonatal sıçan

kardiyomiyositlerinde ve fibroblastlarda AT1 reseptör uyarımıyla oluşan büyümei inhibe ettiğini göstermiştir (109). AT2 reseptörlerinin, apoptozis, osmoregulasyon, serebral kan akımının otoregülasyonu, anjiyogenez ve vazokonstriksiyonu inhibe edici birçok özelliği bilinse de aydınlatılamamış yönleri de mevcuttur (110).

Miyokardiyal fonksiyon ve yapının tanımlanmasında bu reseptörlerin oranları farklı patolojik durumlar altında değişmektedir. Miyokardiyal AT2 reseptör yoğunluğu, deneysel MI modelinde infarkt sahası içinde, infarktan bir gün sonra artmış olarak görünür ve yedi gün sonra hem infarkte hem de non-infarkte alanlarda AT2 reseptör yapımı artar (111). Yine deneysel hipertrofik sıçan kalbinde AT2 reseptör yoğunluğu AT1' e göre artmış olarak bulunmuştur (112). Ayrıca yetmezliği olan insan kalbinde de AT2/AT1 oranı artmış olarak tespit edilmiştir (113). AT2 reseptörü programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozisi artırmaktadır. AII' nin kaspaz kaskadını aktive ederek apoptozis üzerine olan uyarıcı etkisinin AT2 reseptör blokajı ile ortadan kalkmasının gösterilmesi de bu reseptörün apoptozisteki rolünü kanıtlamıştır (114).

Önceki çalışmalar erişkin sıçan kalbinde % 50 oranında AT1, % 50 oranında da AT2 reseptörü tespit ederlerken, yakın zamanda tek hücre çalışmaları erişkin sıçan kalbinde % 50 oranında AT1 ve % 10 oranında AT2 reseptörü mevcut olduğunu, geri kalanın büyük çoğunluğu ise skar dokusu olduğunu göstermiştir (115). Sıçanlarda ve farelerde yapılan çalışmalar, AT2 reseptör mRNA' sının fetal dönemlerde yüksek iken, doğumdan sonra hızla düştüğünü göstermiştir (108). Her ne kadar erişkin yaşamda AT2 reseptör yoğunluğu düşse de, kardiyak hipertrofi, MI, kardiyomiyopati (KMP), konjestif kalp yetmezliği (KKY) gibi patolojik

durumlarda bu reseptör sayısında belirgin artış olmaktadır (116). Son evre iskemik kalp hastalığı veya dilate KMP'li hastaların ventriküllerinin infarkte alanlarında, interstisyel ve endokardiyal bölgelerinde non-infarkte alanlara oranla istatistiksel olarak anlamlı yoğunlukta AT2 reseptörü bağlama alanlarını gösterilmiştir (117). AT2 reseptör geni silinmiş farelerde yapılan çalışmalar, kontrole göre yüksek kan basıncı göstermiştir. Çalışmanın sonuçları AT2 reseptörünün vazodilatasyon yapıcı etkisi olduğunu ve bu etkisini NO ve bradikinin aracılığı ile yaptığı düşünülmektedir (108). AT1 reseptör aktivasyonu; tirozin kinazın indüklediği protein fosforilasyonu, araşidonik asit metabolit üretimi, reaktif oksidan ürün aktivitelerinde değişme, hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunda artma yaparken, AT2 reseptör aktivasyonu, bradikinin, NO ve PG üretimine yol açar (118).

AT2 reseptörünün sinyal mekanizmaları iyi tanımlanmış değildir. Bazı durumlarda Gi proteinlerle eşleşerek etki gösterirler. Nöronlarda ve muhtemelen diğer dokularda da protein serin/treonin fosfataz aktivasyonu yaparak geç tip  $K^{+}$  kanal aktivasyonuna yol açarlar. İkinci bir sinyal mekanizması fosfotirozin fosfataz aktivasyonu yapmasıdır. Bu olay, normal dokuların kontrolsüz çoğalmasını hızlı bir şekilde önleyerek büyümeye zıt etki gösterir. sGMP oluşumunu takiben, NO salınımı da hücre içi diğer önemli bir AT2 reseptör etkisidir. Özellikle vasküler yapı ve böbrek dokusunda etkisi görülür. Ayrıca T-tipi  $Ca^{+2}$  kanallarını da kapattığı gösterilmiştir. Ayrıca bu reseptör aktivasyonunun protein tirozin fosfatazın inhibisyonu veya aktivasyonu ile ilişkili olduğu, guanilat siklaz inhibisyonu yaptığı ve hücre membranındaki  $K^{+}$  kanallarının kapanmasına yol açtığı da belirtilmiştir (119).

Spontan hipertansif sıçanlarda PD123319 ile kronik tedavinin AT1 reseptör mRNA'sında artışa yol açarken; aortik AT2 reseptör mRNA'sını, düz kas hücrelerinin media tabakasındaki hipertrofiyi ve aortik kollajen içeriğini azaltmıştır (120). Bazı çalışmalarda da AII'nin yol açtığı hipertansiyonu, AT1 reseptör antagonistleri ortadan kaldırırken, AT2 blokajı etkisiz kalmıştır. AT2 reseptör aktivasyonunun AII' nin proinflamatuvar etkilerinden bazılarını aracılık ettiği de bildirilmiştir (118). İnsan kalbinde *ex vivo* yapılan çalışmalar kardiyovasküler sistemin fizyopatolojik şekillenmesinde AT2 reseptör protein yapımının, AT1 reseptör proteinleri azaldığında dahi devam ettiğini göstermiştir. Yetmezlikli insan kalbinde de fibroblastlarda AT2 reseptör gen yapımı ve proteinlerinde artış görülmesi, AT2 reseptörünün fibrozisi artırdığı ve ventriküler şekillenmede rolünü desteklemektedir (121).

AT1 reseptörünün sıçan kardiyomiyositlerinde oluşturduğu hipertrofinin AT2 reseptör inhibisyonu ile ortadan kalkması, bu reseptörün kardiyak hipertrofi üzerine tonik inhibitör etkisinin olduğunu göstermektedir (109). Yapılan pek çok çalışmada AT1 reseptörü blokajı ile ortaya çıkan faydalı etkilerin AT2 reseptör antagonistlerince ortadan kalkması; hipertansiyon ve kardiyovasküler sistem hastalarının tedavi stratejilerinde AT2 reseptörleri hakkında ileri çalışmalara ve tanımlamalara ihtiyaç doğurmuştur.

### **3.12. Novokinin**

Novokinin, AT2 reseptör agonisti güçlü bir hipotansif peptiddir. Novokinin'in AT2 reseptör affinitesi ovokinin'den sadece 3,4 kat fazla olmasına rağmen; novokinin'in hipotansif etkinliği ovokinin'den 100 kat daha güçlüdür. Bu, ovokinin'in hipotansif etkinliğinin AT2 bağımsız mekanizmalar aracılığıyla olduğunu

düşündürmektedir. Novokinin, spontan hipertansif ratlara (SHR) 0.1 mg/kg dozda oral yolla verildikten sonra sistolik kan basıncını anlamlı olarak düşürdüğü ve bu hipotansif etkinin, bir AT2 antagonist olan PD123319 ile bloke edildiği gösterilmiştir (122). SHR' dan izole edilen endoteli sağlam mezenterik arterlerde doz bağımlı olarak gevşemeye sebep olduğu, endoteli sıyrılmış mezenterik arterlerde ise gevşeme oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar novokinin aktivitesinin endotelyum-deriveli gevşeme faktörü aracılı olduğunu göstermektedir. Novokinin'in gevşetici etkisinin AT2 reseptör antagonisti PD123319 (100µM) ile anlamlı olarak bloke olması damar gevşetici etkisinin AT2 reseptör aracılı olduğunu düşündürmektedir (123) NOS inhibitörü olan L-NAME' in, kronik AT1 reseptör antagonisti uygulanan SHR' dan izole edilen mezenterik arterlerde AII' nin ortaya çıkardığı gevşemeyi köreltmesi AT2 reseptörlerinin indüklediği vazorelaksasyonda NO' in rolü olduğunu düşündürmüştür (122) Bununla birlikte, 100µM L-NAME'in Novokinin'in oluşturduğu gevşemeyi anlamlı olmamakla birlikte azaltması; COX inhibitörü İndometazin'in (0,3 µM) gevşemeyi anlamlı düzeyde bloke etmesi NO' in değil PG'lerin novokinin indüklü gevşemede etkili olduğunu göstermektedir (123). Vazorelaksasyonu indükleyen PG türleri olan PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> ve PGD<sub>2</sub> ile yapılan çalışmada bu PG reseptör türlerini bloke eden antagonistler kullanılmış ve novokinin'in gevşetici etkisinin sadece PGI<sub>2</sub> reseptörlerinin (IP reseptör) blokajı ile baskılandığı diğer PG antagonistlerinin novokinin aktivitesini baskılamadığı belirlenmiştir. Güçlü vazodilatör etkisi ile PGI<sub>2</sub>, COX yolağının en önemli ürünüdür. Bu sonuçlar novokinin'in damar gevşetici etkisinin asıl olarak IP reseptör ve PGI<sub>2</sub> aracılı olduğunu düşündürmektedir (123).

### 3.13. Çalışmanın Amacı

Yeni bir hipotansif peptid olan AT2 agonisti Novokin'in, miyokardiyal İR'daki etkisini gösteren herhangi bir çalışma bizim bilgilerimize göre mevcut değildir. Bu çalışmada miyokardiyal İR oluşturulan sıçanlarda AT2 agonisti Novokin'in,

- Oksidatif stres ile ilişkili kardiyak hasarda etkili rhokinaz
- Reaktif oksijen üretiminde etkili bir enzim olan ve özellikle de AII ile aktive - olan NADPH oksidaz,
- Endojen NOS inhibitörü olan ve oksidatif stres ile artan ADMA,
- eNOS aktivitesinden sorumlu CAV-1 ve HSP90,
- Pro-inflamatuar etkili ve miyokardiyumun hasara duyarlılığını artıran TLR-4,
- Oksidatif strese yanıt olarak aktive olan ve inflamatuvar genlerin üretiminden sorumlu NF<sub>κ</sub>B düzeylerine ve
- Nekroz alanına

etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Deney Hayvanları

Deneylerde Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde üretilen Sprague Dawley cinsi, 200-250 gr ağırlığında 28 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlara 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık siklusta, havalandırılmalı, sabit ısılı ( $21\pm 1$  C°) odalarda ve özel kafeslerde standartlara uygun olarak bakıldı. Beslenmeleri 8mm'lik standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile *ad libidum* olarak sağlandı.

### 4.2. Deney Planı ve İlaç Uygulamaları

Çalışma kontrol, iskemi-reperfüzyon, novokinin ve iskemi-reperfüzyon+novokinin olmak üzere 4 grup üzerinden planlandı.

**Kontrol grubu (K, n=7):** Her hayvana genel anestezi altında juguler vene yerleştirilen kanül yardımı ile infüzyon pompası kullanılarak %0,9 izotonik NaCl 2ml/dk olarak uygulandı.

**Novokinin grubu (N, n=7):** Sıçanlara genel anestezi altında juguler vene yerleştirilen kanül yardımı ile infüzyon pompası kullanılarak 0,05 mg/kg dozda Novokinin 2ml/dk olarak uygulandı.

**İskemi-reperfüzyon grubu (IR, n=7):** Sıçanlara genel anestezi altında juguler vene yerleştirilen kanül yardımı ile infüzyon pompası kullanılarak iskeminin 30 dakika öncesinde başlamak üzere ve iskemi-reperfüzyon sırasında devam edecek şekilde %0,9 izotonik NaCl 2ml/dk olarak uygulandı. Anestezi altındaki her hayvana miyokardiyal İR yapıldı.

**İskemi-reperfüzyon+Novokinin grubu (IRN, n=7):** Sıçanlara genel anestezi altında juguler vene yerleştirilen kanül yardımı ile infüzyon pompası

kullanılarak iskeminin 30 dakika öncesinde başlamak üzere ve iskemi-reperfüzyon sırasında devam edecek şekilde 0,05 mg/kg dozda Novokinin 2ml/dk olarak uygulandı..

#### **4.3. Cerrahi uygulama: İskemi-reperfüzyon**

Sıçanlar Sodyum Pentobarbital (50mg/kg, i.p.) ile genel anesteziye alındı. Yapay solunum için trakea kanülasyonu yapıldı ve sıçanlar solunum pompasına bağlandı. Karotid artere yerleştirilen bir kanülden, transdüser ve bir kaydedici yardımı ile kan basıncı, kalp hızı ve EKG yazdırıldı. İlaç uygulamaları için Juguler ven kanüle edilerek kanülün diğer ucu infüzyon pompasına bağlandı. Göğsün sol tarafına 1-1.5 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldıktan sonra cilt altı dokuları ve göğüs kasları geçildi, sternumun hemen solunda dördüncü kosta kesilerek sol torakotomi yapıldı. Toraks açıldığı anda içerideki negatif basıncın ortadan kalkması nedeniyle, solunumun devamı ve pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> ve pH değerlerini korumak amacı ile ventilasyon cihazı (Harvard Animal Rodent Ventilator) ile 1.5 ml/100gr'lık hacim ve 60 atım/dakika'lık hızla oda havası verilerek pozitif basınçlı solunum uygulanmaya başlandı. Perikardiyumun sıyrılmasını takiben göğsün sağ tarafına hafifçe basılarak kalp dışarı alındı ve 10 mm'lik yuvarlak uçlu iğne ile 6/0 ipek iplik sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızla geçildi. Daha sonra kalp yeniden göğüs içine yerleştirilerek stabilizasyon için 20 dakika beklendi. Stabilizasyon dönemi başlangıcında infüzyon pompası kullanılarak gruplara ilaç uygulamasına başlandı ve iskemi süresince de ilaç uygulamasına devam edildi. Konulmuş olan ipliğin uçları 1mm çap ve 1cm boyda ufak bir plastik tüp içinden geçirilerek ve 20 dakikalık stabilizasyon periyodu sonunda damarın altından geçirilmiş olan ip

plastik tüp ve bir klemp yardımı ile sıkıştırılarak damarın oklüzyonu sağlandı. 30 dakikalık iskemi sonunda klemp açılarak tüp içinden geçen iplik gevşetildi ve böylece yeniden kanlanma yani reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon süresi 120 dakika olarak uygulandı. Deneye son verilmeden önce heparin uygulandı ve kalpler hızlıca çıkarıldı.

#### **4.4. Hemodinamik Parametrelerin Değerlendirilmesi**

Deneylerde sistolik (SKB) ve diyastolik (DKB) kan basıncı karotid artere yerleştirilen bir kanülden, transdüser ve bir kaydedici yardımı ile direkt yöntemle ölçüldü. Ayrıca SKB'nin %40' ı, DKB'nin %60' ı toplanarak ortalama kan basıncı (OKB) hesaplandı. Sıçanların kan basıncı değerlendirmelerinde kanülün takılması ile ilaç uygulamasına kadar geçen süredeki bazal, ilaç uygulaması sırasındaki, iskem başlangıcı ve sonundaki, reperfüzyon başlangıcı ve sonundaki kan basıncı verileri kullanıldı. Ayrıca cerrahi uygulamalar süresince kalp hızı ve EKG bulguları kaydedildi.

#### **4.5. Nekroz Alanının Ölçülmesi**

Her deneyin sonunda hızlıca çıkarılan kalpler serum fizyolojik ile yıkanarak 12 saat dondurucuda bekletilmek üzere alüminyum folyoya sarıldı. Dondurulmuş kalpler 2 mm kalınlığında dilimlendi ve %1' lik trifenil tetrazolyum klorid (TTC) içeren tamponda (pH=7,4) 37 C° de 15-20 dakika süreyle inkübe edildi. TTC, dokuda NADH, dehidrojenazlar ve diaforazlar bulunduğunda formazan pigmentlerini indirger. Canlı dokular, bu enzimler ve kofaktörleri içerdikleri için koyu kırmızı renkte boyanırken, infarkt alanları bu enzimler ve kofaktörleri içermedikleri için boyanmazlar. Boyamadan sonra kalp dilimleri birbirinden 2mm uzaklığı olan iki cam levhanın arasına konuldu. Canlı doku ve nekrotik doku ayırt

edilerek şeffaf bir asetat üzerine çizildi ve scanner ile taranan görüntüler bilgisayara aktarılarak ImageJ görüntü analiz programı ile ölçüldü.

#### **4.6. Genetik analizler**

Deneyler sonunda hızlıca çıkarılıp serum fizyolojik ile yıkanan kalplerden 2 mm kalınlığında alınan dokular RNA later solüsyonu içeren 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. +4°C'de 1 gece bekletildikten sonra RNA izolasyonu yapılmaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

##### **4.6.1. RNA İzolasyonu**

1. Yaklaşık olarak 50-100 mg olan dokular RNA later solüsyonu içerisinden çıkartılarak kurutma kağıdı arasına alınıp hafifçe bastırılarak RNA later solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml Trizol reaktifi içeren 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı ve steril çelik bilyeler kullanılarak homojenizasyon cihazında homojenize edildi.

2. Homojenize edilmiş örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Santrifüjde 12000x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım yeni tüpe transfer edildi.

3. Üzerine 0.2 ml kloroform ilave edilerek vortekslendi ve 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Örnekler, 15 dakika ve +4°C'de 12000xg'de santrifüj edildi.

5. Üst faz, yeni bir tüpe transfer edildi ve üzerine 0.5 ml izopropil alkol eklendi. Örnekler, 10 dakika 15-30°C'de inkübe edildi ve +4°C'de 10 dakika 12000xg'de santrifüj edildi.

6. Süpernatant kısım tamamen uzaklaştırıldı. RNA pelleti, ilk olarak 1 ml %75'lik etanol ile yıkandı. +4°C'de 5 dakika için 7500xg'de santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi tekrarlandı ve kalan tüm etanol uzaklaştırıldı.

7. RNA pelleti 5-10 dakika havada kurutma işlemine tabi tutuldu.

8. DNase/RNase içermeyen su ile sulandırıldı ve cDNA elde edilinceye kadar -80°C'de saklandı.

#### **4.6.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması**

İzolasyonu yapılan RNA'ların miktarı Qubit cihazı (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanılarak ölçüldü. K, IR, IRN ve N ve olmak üzere oluşturulan 4 grup için Qubit ile ölçülen değerlere göre eşitleme yapılarak 4 RNA havuzu oluşturuldu.

#### **4.6.3. cDNA Sentezi**

RNA örneklerinden cDNA sentezi High Capacity cDNA sentez kiti kullanılarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde gerçekleştirildi.

#### **4.6.4. Real Time-PCR**

Elde edilen cDNA'lar, GAPDH (Housekeeping gen) HSP90, NF $\kappa$ B ve CAV-1 gen ekspresyonlarını araştırmak için Tag Man Ekspresyon Assay'leri (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanılarak, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazında çalışıldı. 4 gruptaki ilgili 3 genin ekspresyonları  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerleri kullanılarak karşılaştırıldı.

#### **4.7. ELISA**

Doku ADMA, TLR-4, Rhokinaz ve NADPH oksidaz düzeylerine ELISA yöntemi ile bakıldı. Sıçanlardan elde edilen doku örneklerinde ADMA, TLR-4, Rhokinaz ve NADPH oksidaz ELISA kitleri ile ticari firmaca (Eastbiopharma, Cat No: CK-E90206- Ref: E20121120049- Lot: 20121120; Sunred, Cat No:

201110081- Ref: D2E201110081- Lot:201303; Eastbiopharma, Cat No: CK-E90094; Cusabio, Cat No:CSBEL015959RA-Lot No:24069902, sırası ile) belirlenen protokol uyarınca ölçüm yapıldı.

#### **4.8. İstatistiksel analiz**

Elde edilen veriler ortalama±standart hata (SH) olarak belirtildi. Verielerin istatistiksel anlamlılık düzeylerini belirlemek için bilgisayar programlı paket programı kullanıldı. İstatistiksel farkların değerlendirilmesinde Kruskal Wallis sonrasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Elde edilen sonuçların yorumlanmasında  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 5. BULGULAR

### 5.1. Novokinin uygulamasının kan basıncı üzerine etkileri

Bazal OKB değerleri sırasıyla K grubunda  $107 \pm 4$  mmHg,  $107 \pm 5$  mmHg, IR grubunda  $105 \pm 1$  mmHg, IRN grubunda  $106 \pm 4$  mmHg olarak hesaplandı. Gruplar arasında bazal OKB, SKB ve DKB değerleri bakımından fark yoktu. Novokinin uygulaması sonrası N grubunun SKB değeri IRN grubuna göre anlamlı olarak düşüktü. İR uygulanan grupta iskemi ve reperfüzyonun başlangıcı ve sonunda SKB değerleri IRN grubundan anlamlı olarak düşük bulundu. İskemi başlangıcında DKB ve OKB, iskemi sonu ve reperfüzyon başlangıcında ise OKB değerleri IR grubuna göre anlamlı düşük bulundu (Tablo 1).

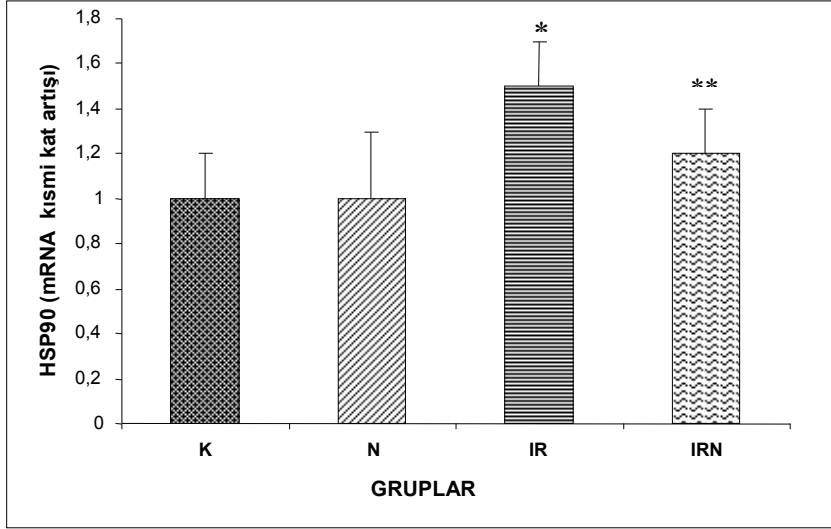
**Tablo 1.** Novokinin uygulamasının kan basıncı üzerine etkileri

GRUPLAR	KB	BAZAL	NS	İB	İS	RB	RS
K	SKB	$143 \pm 5$					
	DKB	$84 \pm 4$					
	OKB	$107 \pm 4$					
N	SKB	$141 \pm 4$	$135 \pm 5$				
	DKB	$83 \pm 4$	$79 \pm 4$				
	OKB	$107 \pm 5$	$96 \pm 2$				
IR	SKB	$145 \pm 4$		$133 \pm 5$	$130 \pm 3$	$147 \pm 6$	$149 \pm 3$
	DKB	$82 \pm 4$		$77 \pm 3$	$75 \pm 4$	$84 \pm 4$	$85 \pm 6$
	OKB	$105 \pm 1$		$99 \pm 3$	$98 \pm 4$	$110 \pm 4$	$108 \pm 5$
IRN	SKB	$145 \pm 6$	$134 \pm 6$	$122 \pm 4^a$	$119 \pm 5^a$	$134 \pm 4^a$	$143 \pm 4^a$
	DKB	$79 \pm 5$	$74 \pm 4$	$72 \pm 3^a$	$72 \pm 3$	$77 \pm 6$	$81 \pm 2$
	OKB	$106 \pm 4$	$98 \pm 4$	$93 \pm 3^a$	$91 \pm 3^a$	$99 \pm 4^a$	$106 \pm 1$

a:IR grubuna göre anlamlı farklılık, ( $p < 0,05$ ). NS: novokinin uygulaması sonrası, İB: iskemi başlangıcı, İS: iskemi sonu, RB: reperfüzyon başlangıcı, RS: reperfüzyon sonu

### 5.2. Novokinin uygulamasının HSP90 düzeyine etkileri

HSP90 düzeyleri sırasıyla kontrol grubunda  $1\pm 0.2$ , N grubunda  $1\pm 0.3$ , IR grubunda  $1.5\pm 0.2$ , IRN grubunda  $1.2\pm 0.2$ , olarak belirlendi. K ve N gruplarına göre IR grubunda anlamlı artan HSP90 düzeyleri Novokinin uygulaması ile anlamlı olarak azaldı (Şekil 3).

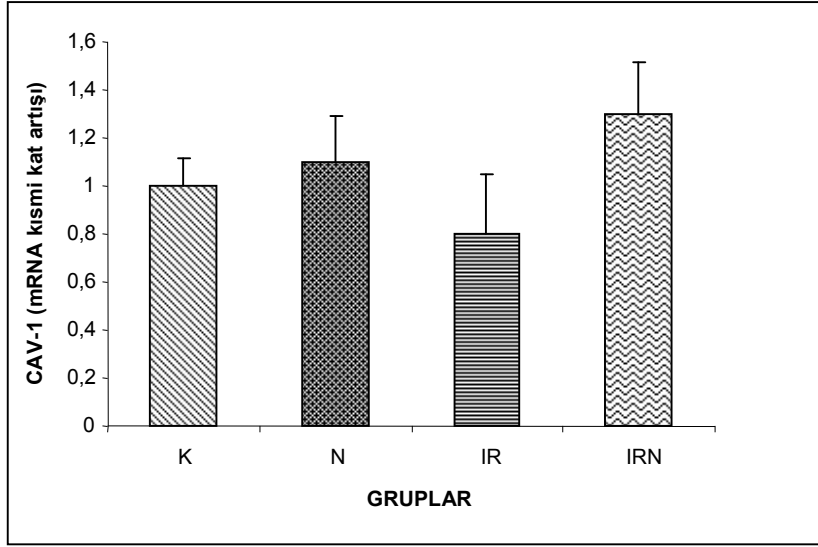


Şekil 3. Novokinin uygulamasının HSP90 düzeylerine etkileri.

\*: K ve N gruplarına göre anlamlı farklılık, \*\*: IR grubuna göre anlamlı farklılık, ( $p < 0,05$ ).

### 5.3. Novokinin uygulamasının CAV-1 düzeyine etkileri

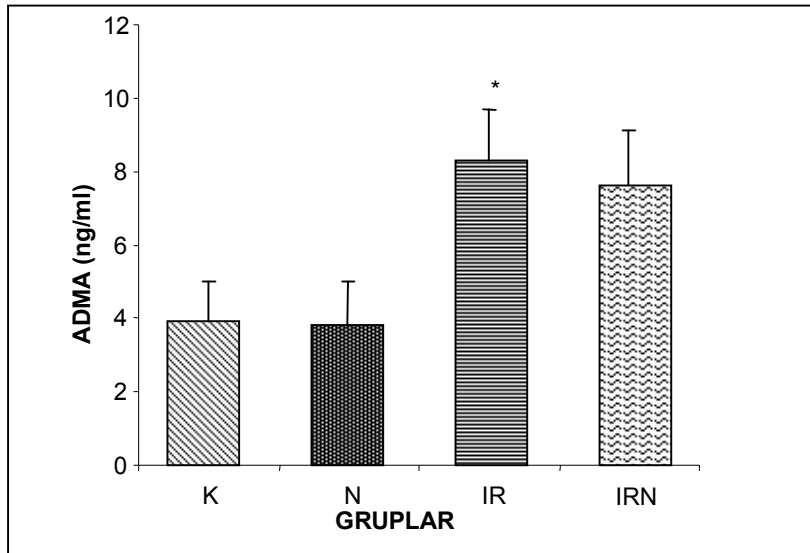
CAV-1 düzeyleri K grubunda  $1.1\pm 0.12$ , N grubunda  $1\pm 0.19$ , IR grubunda  $0,8\pm 0.2$ , IRN grubunda  $1.3\pm 0.25$  olarak belirlendi. IR grubunda azalan CAV-1 düzeyi Novokinin uygulaması ile anlamlı olmamakla birlikte arttı (Şekil 4).



Şekil 4. Novokinin uygulamasının CAV-1 düzeylerine etkileri

### 5.5. Novokinin uygulamasının ADMA düzeyine etkileri

ADMA düzeyleri sırasıyla K grubunda  $3.9 \pm 1.1$ , N grubunda  $3.7 \pm 1.2$ , IR grubunda  $8.3 \pm 1.7$ , IRN grubunda  $7.6 \pm 1.5$  olarak belirlendi. K grubuna göre IR grubunda anlamlı olarak artan ADMA düzeyi Novokinin uygulaması ile azaldı ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 5).

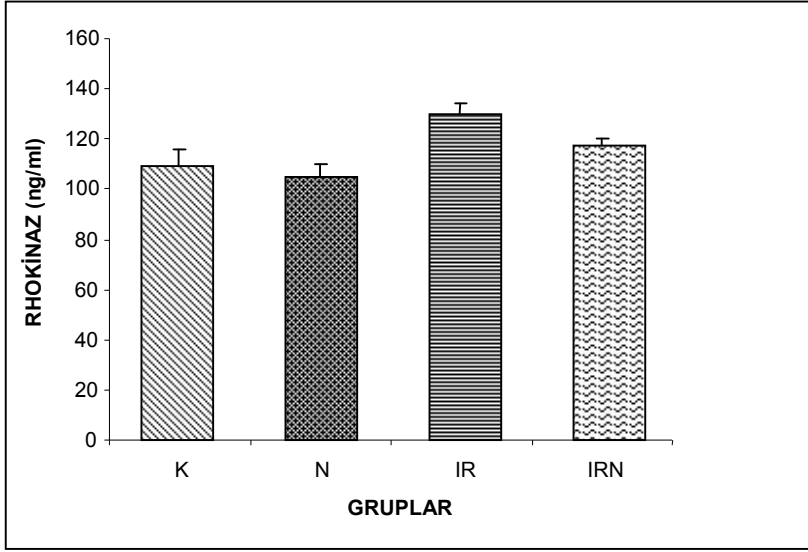


Şekil 5. Novokinin uygulamasının ADMA düzeylerine etkileri.

\*: K ve N gruplarına göre anlamlı farklılık, ( $p < 0,05$ ).

### 5.6. Novokinin uygulamasının Rhokinaz düzeyine etkileri

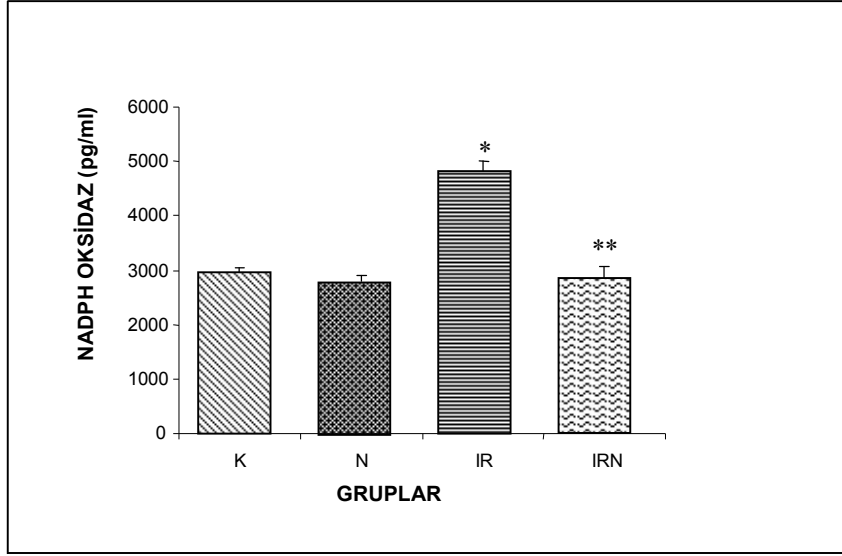
Rhokinaz düzeyleri sırasıyla K grubunda  $109\pm 11$ , N grubunda  $105\pm 10$ , IR grubunda  $130\pm 14$ , IRN grubunda  $117\pm 16$  olarak belirlendi. K ve N gruplarına göre IR grubunda artan Rhokinaz düzeyi Novokinin uygulaması ile anlamlı olmamakla birlikte azaldı (Şekil 6).



Şekil 6. Novokinin uygulamasının Rhokinaz düzeylerine etkileri

### 5.7. Novokinin uygulamasının NADPH Oksidaz düzeyine etkileri

NADPH Oksidaz düzeyleri sırasıyla K grubunda  $2948\pm 100$ , N grubunda  $2870\pm 102$ , IR grubunda  $4821\pm 180$ , IRN grubunda  $2858\pm 200$  olarak belirlendi. K grubuna göre anlamlı artan NADPH oksidaz düzeyi Novokinin uygulaması ile anlamlı azaldı (Şekil 7).

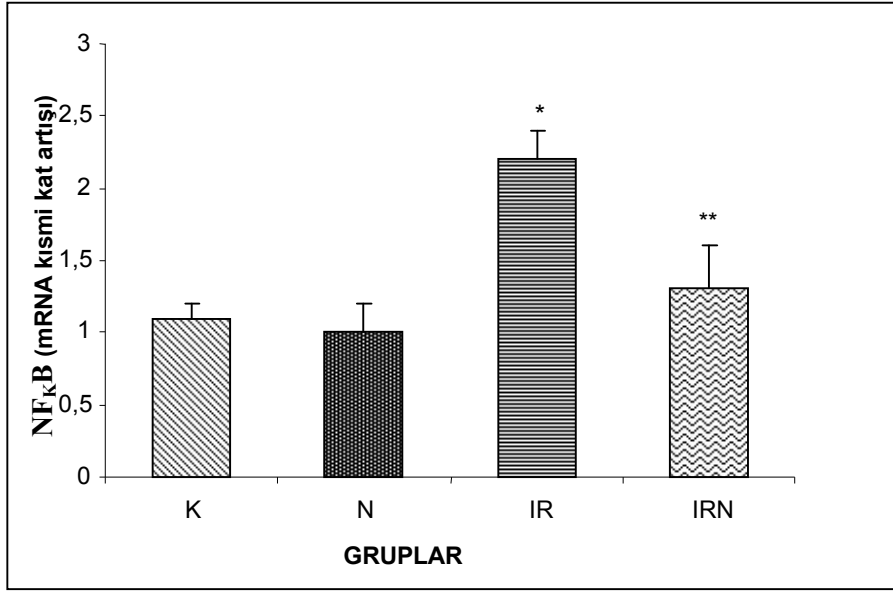


**Şekil 7.** Novokinin uygulamasının NADPH Oksidaz düzeylerine etkileri.

\*: K göre anlamlı farklılık, \*\*: IR grubuna Novokinin uygulaması ile oluşan anlamlı farklılık, (p<0,05).

### **5.8. Novokinin uygulamasının NF<sub>κ</sub>B düzeyine etkileri**

NF<sub>κ</sub>B değerleri K grubunda 1.1±0.3, N grubunda 1±0.2, IR grubunda 2.2±0.3, IRN grubunda 1.25±0.21 olarak belirlendi. K ve N gruplarına göre IR grubunda anlamlı olarak artan NF<sub>κ</sub>B düzeyleri Novokinin uygulaması ile anlamlı olarak azaldı (Şekil 8).

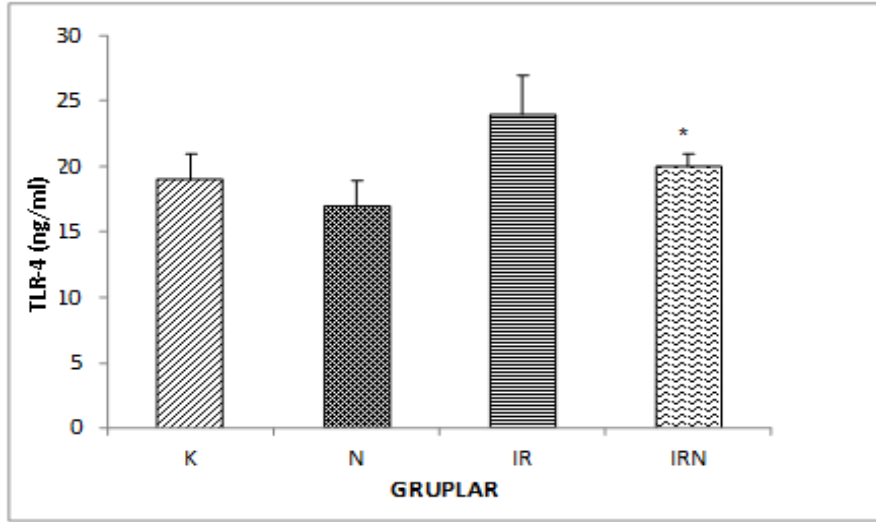


**Şekil 8.** Novokinin uygulamasının NF $\kappa$ B düzeylerine etkileri.

\*: K ve N gruplarına göre anlamlı farklılık, \*\*: IR grubuna göre anlamlı farklılık, (p<0,05).

### 5.9. Novokinin uygulamasının TLR-4 reseptör düzeyine etkileri

TLR-4 reseptör düzeyleri sırasıyla kontrol grubunda 19±2, N grubunda 18±2, IR grubunda 24±3, IRN grubunda 20±1 olarak belirlendi. IR grubunda K grubuna göre artan TLR-4 düzeyi Novokinin uygulaması ile anlamlı olarak azaldı (Şekil 9).

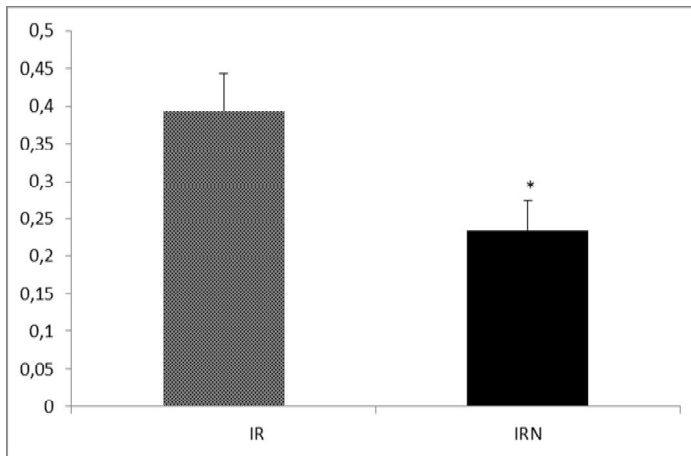


**Şekil 9.** Novokinin uygulamasının TLR-4 reseptör düzeyine etkileri.

\*: IR grubuna göre anlamlı farklılık, ( $p < 0,05$ ).

### 5.10. Novokinin İskemi-reperfüzyona bağlı nekroz alanına etkileri

İR'a bağlı olarak oluşan nekroz oranları sırası ile IR grubunda  $0,3939 \pm 0,05$ , IRN grubunda  $0,2339 \pm 0,04$  olarak belirlendi. Novokinin uygulaması IR grubuna göre infarkt alanını anlamlı olarak azalttı (Şekil 10).



**Şekil 10.** Novokinin uygulamasının nekroz alanı üzerine etkileri.

\*: IR grubuna göre anlamlı farklılık, ( $p < 0,05$ ).

## 6. TARTIŞMA

Çalışmamızda, bazal kan basıncı değerleri bakımından gruplar arasında herhangi bir fark yoktu. Novokinin, başlangıçta, iskemi ve reperfüzyon boyunca OKB, SKB ve DKB değerlerini IR grubuna göre azalttı. Novokinin uygulaması İR'a bağlı artan NFKB, NADPH oksidaz, HSP90, TLR-4 düzeylerini ve infarkt alanını anlamlı olarak azalttı. İR'a bağlı ADMA ve Rhokinaz değerlerindeki artışlar novokinin uygulaması ile azaldı.

Novokinin, iskemi ve reperfüzyon boyunca SKB değerlerini, iskemi başlangıcında DKB değerlerini ve reperfüzyon sonu hariç OKB değerlerini IR grubuna göre anlamlı olarak azalttı. SHR da yapılan bir çalışmada farklı dozlarda oral ve i.v. olmak üzere iki farklı yolla Novokinin verilmesi SKB da anlamlı düşüşler sağlamış, AT2 reseptör antagonisti PD123319 verilmesi ise hipotansif etkiyi bozmuştur. COX inhibitörü indometazin ve PGI2 reseptör antagonisti CAY10441 verildiğinde de yine Novokininin hipotansif etkisi bloke olmuştur (124). SHR' dan izole edilen endoteli sağlam mezenterik arterlerde doz bağımlı olarak gevşemeye sebep olduğu, endoteli sıyrılmış mezenterik arterlerde ise gevşeme oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar Novokinin aktivitesinin endotelyum-deriveli gevşeme faktörü aracılı olduğunu göstermektedir. Novokinin'in gevşetici etkisinin AT2 reseptör antagonisti PD123319 (100µM) ile anlamlı olarak bloke olması damar gevşetici etkisinin AT2 reseptör aracılı olduğunu düşündürmektedir (122). NOS inhibitörü olan L-NAME' in, kronik AT1 reseptör antagonisti uygulanan SHR' dan izole edilen mezenterik arterlerde AII' nin ortaya çıkardığı gevşemeyi azaltması AT2 reseptörlerinin indüklediği vazorelaksasyonda NO' in rolü olduğunu düşündürmüştür (123). Bununla

birlikte, 100 $\mu$ M L-NAME' in Novokinin' in oluşturduğu gevşemeyi anlamlı olmamakla birlikte azaltması; COX inhibitörü indometazin' in (0,3  $\mu$ M) gevşemeyi anlamlı düzeyde bloke etmesi NO ile birlikte PG'lerin Novokinin indüklü gevşemede etkili olduğunu göstermektedir (124). Vazorelaksasyonu indükleyen PG türleri olan PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> ve PGD<sub>2</sub> ile yapılan çalışmada bu PG reseptör türlerine bloke eden antagonistler kullanılmış ve Novokinin' in gevşetici etkisinin sadece PGI<sub>2</sub> reseptörlerinin (IP reseptör) blokajı ile baskılandığı diğer PG antagonistlerinin Novokinin aktivitesini baskılamadığı belirlenmiştir (125). Bu sonuçlar Novokinin' in damar gevşetici etkisinin asıl olarak IP reseptör ve PGI<sub>2</sub> aracılı olduğunu düşündürmektedir (125). Başka bir çalışmada selektif AT<sub>2</sub> reseptör agonisti CGP42112' nin SHR' da kan basıncını düşürdüğü belirlenmiştir (126). Aort damarında yapılan bir çalışmada ise eNOS/cGMP aktivasyonu ve AT<sub>2</sub> ekspresyonuna bağlı olarak AT<sub>2</sub> reseptör aracılı vazorelaksasyonun meydana geldiği rapor edilmiştir (127). Çalışmamızın Novokinin'in hipotansif etkisini gösteren sonuçları literatürler ile benzerlik göstermektedir.

İR'a bağlı olarak artan HSP90 düzeyleri Novokinin uygulaması ile anlamlı olarak azaldı. Koroner arter hastalığına sahip erkek ve bayan hastalarda yapılan bir çalışmada hem erkek hem de bayan hastaların arterlerinde HSP90 düzeylerinin sağlıklı bireylere göre çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir (128). Brown Norway ve Dahl S cinsi sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise eNOS bağımlı HSP90 düzeylerinin Brown Norway cinsi sıçanlarda iskemiden sonra 2 kat arttığı, infarkt alanında %63 oranında bir azalma olduğu ve L-NMA ile NOS blokajı yapıldığında ise infarkt alanının arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, HSP90-eNOS ikilisinin NO sentezini arttırdığı ve bunun da Brown Norway cinsi

sıçanların iskemiye daha dirençli olmasının temelinde yatan mekanizma olduğu düşünülmektedir (129). ROS'un iskemik kalpte stres cevabına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise HSF-1 aktivasyonu ile HSP90 mRNA'nın uyarılarak iskemik-reperfüze kalpte HSP90 düzeyinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (130). HSP90 transfeksiyonu yapılan domuz IR modelinde kalbin HSP90 ekspresyonu gerçekleşen iskemik bölgesinde infarkt alanında %33 azalma olduğu belirlenmiştir (131). Çalışmaların sonuçları HSP90'ın eNOS' u regüle edici olması, endotelial fonksiyon ve NO salınımı için rolünü ve kardiyovasküler hastalıklar açısından önemini ortaya koymaktadır.

İR ile artan CAV-1 düzeyinde Novokinin uygulaması ile herhangi bir değişiklik belirlenmedi. CAV-1 peptidinin miyokardiyal İR'da kalp için koruyucu olduğu ve bu etkisini NO aracılı mekanizma ile gösterdiği ifade edilmiştir (132). CAV-1 eksikliğinin kardiyak disfonksiyonu şiddetlendirdiği ve MI geçiren farelerde hayatta kalma oranını azalttığı tespit edilmiştir (133). CAV-1 knock-out farelerin kalbinde MMP düzeylerinin artmış olduğu ve bunun kardiyak fonksiyonu etkilediği belirtilmektedir (134). İskemi ve reperfüzyonu takiben miyokardiyal CAV-1 içeriğinde azalma olduğu belirtilmektedir (132). CAV-1 knock-out farelerde plazma NO düzeyinin beş kat artması CAV-1'in eNOS regülasyonunda rolü olduğu hipotezini desteklemektedir (135). İskemiden 1 saat önce i.v. olarak verilen CAV-1 peptitleri iskemi sonrası nötrofil infiltrasyonunu ve buna bağlı kardiyak disfonksiyonu azaltmıştır. Yine aynı çalışmada CAV-1 verilen grupta bazal NO salınımının kontrole göre 2.2 kat arttığı belirlenmiştir. CAV-1'in endotelial kökenli NO salınımını artırarak nötrofil infiltrasyonunu ve kardiyak disfonksiyonu azalttığı düşünülmektedir (132). Koroner damar

yataklarındaki O<sub>2</sub>- inhibisyonu ve artmış NO salınımı CAV-1'in İR'daki koruyucu etkisini göstermektedir (132). Endojen CAV-1 ekspresyonunun modülasyonu iskemik renal yetmezlik, MI ve serebral iskemide gösterilmiştir (133). Kaveolinlerin genel olarak eNOS inhibisyonunu önleme, NO salınımını hızlandırma, O<sub>2</sub>- üretimini azaltma, post-iskemik sol ventriküler fonksiyonu iyileştirme ve SOD aktivitesini artırma gibi etkileri ile kardiyak koruma sağladığı düşünülmektedir (134).

Çalışmamızda İR ile artan ADMA düzeyi Novokinin uygulaması ile azaldı ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. ADMA ile oluşan endotel disfonksiyonu mekanizması vasküler NO elde edilebilirliğinin azalması, vasküler O<sub>2</sub><sup>-</sup> seviyelerinin artması ile olmaktadır (136). Çeşitli deneysel hayvan modellerinde ve hastalıklarda artmış ADMA düzeyi, artmış oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu arasında anlamlı ilişkiler saptanmıştır. Orta yaşlı 150 kişiyi içeren bir çalışmada yüksek ADMA düzeylerinin, akut koroner hastalık riskini 3.9 kat arttırdığı gösterilmiştir (137). Klinik ve deneysel çalışmalar endotel disfonksiyonunu, artmış oksijen kökenli serbest radikal üretimiyle ilişkilendirmiştir (57). Vazospastik anjinalı hastaların koroner damarlarında ADMA düzeyleri yüksek, NO düzeyleri ise düşük bulunmuştur (59). ADMA'nın ventriküler kontraksiyonu, kalp hızını azalttığı ve kalp yetmezliğinde ADMA düzeyleri arttığı rapor edilmiştir (60). 30 dakika iskemiye takiben farklı reperfüzyon süreleri uygulanan farelerde miyokardiyal dokuda anlamlı bir ADMA akümüasyonu belirlenmiş ve en yüksek ADMA düzeyi reperfüzyonun 4. saatinde tespit edilmiştir. Oral L-Arjinin uygulanan farelerde reperfüzyonun 4. saatindeki reperfüzyon hasarı %40-50 oranında azalmıştır. ADMA'nın reperfüzyon

hasarındaki etkilerinin eNOS aktivitesini ve fosforilasyonu, adezyon molekülü ekspresyonunu ve lökosit aktivitesini azaltması aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (138).

Rhokinaz düzeylerinde İR'a bağlı olarak görülen artış Novokinin uygulaması ile anlamlı olmamakla birlikte azaldı. Köpeklerde yapılan in vivo bir çalışmada, reperfüzyon öncesi uygulanan Rhokinaz inhibitörü Fasudil endotelial disfonksiyonu önleyerek MI gelişimini baskılamıştır. Fasudil vazodilatör etkisini sadece düz kas kasılmalarını önleyerek değil aynı zamanda eNOS sentezini artırarak göstermiştir (139). İnsan endotel hücrelerinde Rho-kinaz, eNOS'u protein kinaz B/Akt inhibisyonu aracılığı ile negatif yönde düzenlediği belirtilmiştir (140). Bu veriler, sağlıklı bireylerin periferel dolaşımında eNOS düzenlenmesinde Rho-kinaz enzimin önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir. Patolojik olarak önemli AII ve ET-1 gibi uyarıcı faktörler, çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda RhoA-Rhokinaz sinyal yolunu uyarmak suretiyle etkili olabilirler (141). Akut miyokardiyal İR hasarında RhoA ve Rhokinaz'ın rolünün araştırıldığı bir çalışmada 30 dakika iskemiye takiben 24 saat reperfüzyon ve iskemiden 1 saat önce oral Rhokinaz inhibitörü Y-27632 uygulaması ile iskemik miyokartta RhoA ekspresyonunun arttığı ve takibinde Rhokinaz'ın aktive olduğu belirlenmiştir. Y-27632, İR da artan Rhokinaz aktivasyonu anlamlı olarak inhibe etmiş ve infarkt alanı da %41.1 azaltmıştır. Aynı çalışmada post-iskemik kardiyak fonksiyonlar Y-27632 ile artmış ve İR ile artan inflamatuvar maddeler ve apoptozis azalmış olarak tespit edildi. Bu sonuçlar Rhokinaz'ın miyokardiyal İR hasarında odak olabilecek bir role sahip olduğunu düşündürmektedir (142). Hidroksifasudil ile köpekte yapılan bir çalışmada, hidroksifasudil'in İR ile bozulan eNOS ekspresyonu

düzeltiltiği ve miyokardiyal infarkt alanını azaltiltiği rapor edilmiştir. Hidroksifasudil'in in vivo koroner İR hasarındaki kardiyoprotektif etkisinin eNOS ekspresyonunu iyileştirerek NO aracılı olduğunu akla getirmiştir (143). Erken reperfüzyon esnasında Rhokinaz enziminin aktive olduğu ve enzimin inhibisyonu ile ilk olarak infarkt alanının sınırlandırıldığı ve bu etkinin Akt/eNOS bağımlı mekanizmalar aracılığı ile ortaya çıktığı belirtilmektedir. AII'nin uzun süreli infüzyonunun RhoA ve Rhokinaz aktivitesini uyararak koroner arterlerde mediyal kalınlaşmayı ve perivasküler fibrozisi ilerlettiği belirtilmiştir (141). Aşırı RhoA/Rhokinaz aktivitesi NO sentezinde azalmaya ve endotelial disfonksiyona neden olabilir ve RhoA/Rhokinaz inhibitörleri bunu geri çevirmesi RhoA/Rhokinaz yolağı kardiyovasküler tedavide önemli bir terapötik hedef haline gelmiştir (144).

Novokinin uygulaması ile İR'a bağlı olarak artan NADPH oksidaz düzeyi azaldı ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. NADPH oksidaz aktivitesi ve ekspresyonunun deneysel sol ventrikül hipertrofisi (79) ve MI'da (80) arttığı gözlenmiştir. NADPH oksidaz'ın Aposinin ile inhibisyonu miyokardiyal oksidatif stresi ve apoptozisi azaltırken MI sonrası kardiyak fonksiyonları düzeltmiştir (145). NADPH oksidaz'ın endotelial hücrelerde, vasküler düz kas hücrelerde, kardiyomiyositlerde ve fibroblastlarda ROS üretimine neden olduğu gösterilmiştir (146). Artmış NADPH oksidaz ekspresyonunun sıçanlarda akut MI sonrası lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (147). AII NADPH oksidaz enzimini AT1 reseptörü aracılığıyla indükleyebilmekte ve oksidatif stresi artırabilmektedir. RAS ile NADPH oksidaz arasındaki etkileşimin yol açtığı oksidatif stres kardiyovasküler patolojilerde

(ateroskleroz, diyabet, kalp hastalıkları, hipertansiyon) anahtar rol oynayabilmektedir.

NF<sub>κ</sub>B düzeyleri İR'a bağlı olarak artmış ve Novokinin uygulaması ile anlamlı olarak azalmıştır. Farklı deney modelleri ile yapılan çalışmalar NF<sub>κ</sub>B'nin hücreleri ölümden koruduğunu desteklemektedir. NF<sub>κ</sub>B'nin alt ünitelerinden birinin kaybı İR modelinde hücre ölümünü azaltmaktadır (148). NF<sub>κ</sub>B hem sağ kalım hem de ölüm yollarını/moleküllerini indüklemektedir. Lökosit, vasküler endotel ve düz kas hücreleri, kardiyomyositler ve fibroblast gibi hücreler proinflamatuvar sitokinlere NF<sub>κ</sub>B aktivasyonu ile yanıt vermektedir (146). NF<sub>κ</sub>B'nin aktivasyonu, domuz miyokardiyal reperfüzyon hasarı modelinde bir 20S proteozom inhibitörü olan PS-519 'un sistemik olarak verilmesi ile inhibe edilmiştir. 1 saat iskemiye takiben 3 saat reperfüzyonun uygulanan bu modelde; PS-519 ile reperfüzyonun indüklediği NF<sub>κ</sub>B aktivasyonu bloke edilmiş ve bunun sonucu olarakta miyokarttan kreatin kinaz troponin I salınımı azalmış, infarkt alanı önemli ölçüde azalmış, herhangi bir akut toksisite ortaya çıkmamıştır (149). Çalışmanın sonuçları proteozom inhibitörü kullanarak NF<sub>κ</sub>B aktivasyonu baskılandığında reperfüzyon hasarının inhibe edilebileceğini göstermektedir. Çeşitli nedenlere bağlı kalp yetmezliği olan hastaların miyokard dokusunda NF<sub>κ</sub>B aktivasyonunu görülmesi kalp yetmezliği gelişiminde inflamatuvar yolların edimsel olduğunu düşündürmektedir. Arterlerde, NF<sub>κ</sub>B proinflamatuvar, pro-adhezyon ve pro-oksidan gen transkripsiyonu özellikleri ile kardiyovasküler hastalıkları teşvik ettiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda İR ile artan TLR-4 reseptör düzeyi Novokinin uygulaması ile anlamlı olarak azaldı. TLR'lerin özellikle miyokardiyal İR ve ateroskleroz gibi

kardiyovasküler patolojilerde önemli rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır (150). TLR4'un aşırı ekspresyonu sonucu NFκB aktivasyonu ve sitokin üretimi artırır. NFκB knock-out farelerde İR hasarına duyarlılıkta azalma meydana gelmesi TLR4-NFκB aracılı inflamatuvar cevapların hasarda önemli rol oynadığını düşündürmektedir (151). Ayrıca kardiomyositlerde TLR-2, -4 ve -5 aktivasyonu ile oluşan sinyalizasyonun miyokardın kontraktilesini azalttığı ve kalp yetmezliğinde etkili olduğu ifade edilmektedir (152). TLR-4 veya TLR-4 ilişkili yapısal iskelet proteini MyD88 eksikliği olan transgenik farelerde, hemoraji, MI veya böbrek İR hasarını takiben gelişen organ disfonksiyonlarının azaldığı *in vivo* olarak gösterilmiştir (152,153). TLR4'ün miyokard iskemisi ile ortaya çıkan hücre sel sinyallerin aktivasyonunun transdüksiyonu için gerekli olduğu ortaya konmuştur (153). İR hasarında Ksantin oksidaz ile ortaya çıkan hücre dışı O<sub>2</sub>'-in nötrofilleri aktive ettiği ve indüklenen nötrofil ilişkili proinflamatuvar yanıtın TLR-4 bağımlı mekanizmalarla ortaya çıktığı gösterilmiştir (154). TLR-4 aktivasyonunu inhibe eden ve bir lipid A analogu olan E5564'un (eritoran) ile farelerde yapılan miyokardiyal İR modelinde infarkt boyutunu azaltmış ve transkripsiyonu NFκB bağımlı olan proinflamatuvar sitokinlerin üretimini de baskılamıştır (155). Farelerde yapılan bir çalışmada MI'dan 4 gün sonra MI grubunun ventrikül kasında yüksek düzeyde TLR-4 ekspresyonu belirlenmiş ve TLR-4 knock-out farelerde miyokardiyal inflamatuvar hasara karşı koruma şekillendiği rapor edilmiştir (156). Karvedilol ile yapılan bir çalışmada ise infarkt bölgesinde NFκB ve TLR-4 ekspresyonunun inhibisyonuna bağlı olarak inflamasyonunun baskılandığı ve kardiyak koruma sağlandığı ifade edilmektedir

(157). Bu sonuçlar TLR-4'ün miyokardiyal İR da pro-inflamatuar bir rol oynadığını düşündürmektedir.

İR'a bağılı olarak oluşan nekroz Novokinin uygulaması ile anlamlı olarak azaldı. ADE inhibitörü Kaptopril, AT1 ve AT2 reseptör blokörleri Losartan ve PD123319 ile yapılan *in vivo* sıçan miyokardiyal İR modelinde infarkt oluşturmak amacıyla sol koroner artere 30 dakika iskemi ve takiben 120 dakika reperfüzyon uygulanmış, Kaptopril ve Losartan miyokardiyal infarkt alanını sırasıyla % 30.50 ve %37.75 azaltırken PD123319 ile azaltmamıştır. Çalışmanın verileri Kaptopril ve Losartan'ın İR hasarı sonrası kalbi koruyucu aktivite gösterdiğini, ayrıca, losartan ile infarkt boyutundaki küçülmenin AT2 reseptörünün blokajı ile durdurulduğunu göstermektedir. AT2 reseptör aktivasyonunun potansiyel olarak koruyucu olduğunu ve AT1 reseptörlerinin etkilerine karşı görünebileceği düşünülmektedir (158). Yeni üretilen güçlü ve selektif bir ARB olan TAK-491 ile yapılan bir çalışmada ise  $Ca^{+2}$  bağımlı NOS aktivitesinin arttığı ve infarkt alanının sınırlandığı gösterilmiştir (159). AT1 reseptör antagonisti Kandesartan ve peptid yapısında olmayan AT2 reseptör agonisti C21 ile yapılan bir MI çalışmasında ise nekroz alanı bakımından gruplar arasında fark oluşmazken C21 MI sonrası sol ventrikül remodeling'i azaltmamış olarak belirlenmiştir (160).

Sonuç olarak; bu çalışmada Rhokinaz, NADPH oksidaz, ADMA, TLR-4, NFκB, CAV-1 ve HSP90 düzeylerinin İR hasarına katılımları ve AT2 agonisti Novokinin'in oksidatif stres ve inflamasyonla ilgili bu yolaklara ve miyokardiyal nekroz alanı üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir.

Bu sonuçlar, Novokinin'in;

İR'na bağlı nekroz alanını azaltabileceği, İR sırasında kan basıncını azaltmasının ve değer parametreler etkisinde de nekrozdaki koruyuculuğuna katkı sağlayabileceğini

CAV-1 ve HSP90 düzeylerine olan etkileri ile de NO biyoyararlanımını etkileyebileceğini,

Reaktif oksijen üretiminde etkili bir enzim olan ve özellikle de AII ile aktive olan NADPH oksidaz düzeyini azaltması ile endotelde RAS kaynaklı oksidatif stresi önleyerek kardiovasküler hastalıklarda koruyucu rol alabileceğini,

Endojen NOS inhibitörü olan ve oksidatif stres ile artan ADMA düzeyini azaltması, novokinin'in oksidatif stresi azaltıp endotelial disfonksiyonu iyileştirici etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

## 8. KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). The top ten causes of death. Fact sheet No 310/ 2008.
2. Onat A. TEKHARF çalışması 2009. Available at: <http://tekharf.org/> Accessed May 20, 2011.
3. Grace PA, Mathie RT. Ischemia-reperfusion Injury. London, Blackwell Science, 1999.
4. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
5. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
6. Brover RW, Meij S, Serruys PW. A model of asynchronous left ventricular relaxation predicting the bi-experimental pressure decay. *Cardia- vasc Res* 1983; 17:482.
7. Katz A M, Reuter H: Cellular calcium and cardi- ac cell death. *Am J Cardiol* 1979; 44:188.
8. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 2000; 190: 255–266.
9. Xiao CY, Hara A, Yuhki K, et al. Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia–reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation* 2001; 104: 2210-2215.
10. Banda MA, Lefer DJ, Granger DN. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule deficient mice. *Am J Physiol* 1997; 273: 2721-5.
11. Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, et al. Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron Artery Dis* 2001; 12: 349- 356.
12. Kaeffer N, Richard V, Francois A, et al. Preconditioning prevents chronic perfusion- induced coronary endothelial dysfunction in rats. *Am J Physiol* 1996; 271: H842–H849.
13. Piper HM, Meuter K, MD, Schafer C. Cellular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 644-648.

14. Kloner RA, Rude RE, Carlson N, et al. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation* 1980; 62: 945-952.
15. Patel B, Seroudi OM, Bolli R: Pathogenesis of ischemic myocardial injury and methods for myocardial protection. *The science and practice of pediatric cardiology*. Ed, Gerson A, Bricker TS, McNamara DG. Lea & Febiger, Philadelphia/London 1990; 226-279.
16. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999; 138: 69-75.
17. Aral H, Türkmen S. Oksidatif stres ve hastalıklarla ilişkisi. *Folia* 2002; 4: 1-5.
18. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res* 2000; 86: 117-18.
19. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The Am J Off Surgery* 1991; 161: 488-503.
20. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *Faseb J* 1995; 9: 526-533.
21. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 426-32.
22. Hess ML, Krause S, Kontos HA. Mediation of sarcoplasmic reticulum disruption in the ischemic myocardium: proposed mechanism by the interaction of hydrogen ions and oxygen free radicals. *Adv Exp Med Biol* 1983; 161: 377-89.
23. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russel GI. Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995; 3: 348-354.
24. Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 939: 200-215.

25. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm* 1994; 9: 26-35.
26. White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology* 1993; 43: 1656-1665.
27. Rice-Evans CA. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. In: Rice-Evans CA, Burdon RH. *Free radical damage and its control*. England, Elsevier Science Pres 1994; 131-153.
28. Kilgore KS, Lucchesi BR. Reperfusion injury after myocardial infarction: The role of free radicals and the inflammatory response. *Clin Biochem* 1993; 26: 359-370.
29. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: H1269-H1275.
30. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514-2523.
31. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost* 2007; 97: 738-747.
32. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 481-497.
33. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol* 1993; 16: 19-26.
34. Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J* 2003; 79: 195-200.
35. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 2000; 87: 179-83.
36. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 181-90.

37. Hartman M, Decking UK. Blocking Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by cariporide reduces Na<sup>+</sup> overload in ischemia and is cardioprotective. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 1985-95.
38. Hopkins PN, Williams RR. A survey of 246 suggested coronary risk factors. *Atherosclerosis* 1981; 40: 1-52.
39. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. Chapter 1. 3rd ed. London: Mosby 1993; 1-12.
40. Clark JI, Muchowski PJ. Small heat shock proteins and their potential role human disease. *Curr Opin Biol* 2000; 10(1): 52-9.
41. Moseley PL. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann Acad Sci* 1998; 29: 206-131.
42. Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 2006; 125: 443–451.
43. Christians ES, Yan LJ, Benjamin IJ. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners in protection against acute cell injury. *Crit Care Med* 2002; 30: 43–50.
44. Nollen EA, Brunsting JF, Roelofs H, Weber L A, Kampinga HH. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol* 1999; 19 (3): 2069-2079.
45. Arrigo AP. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol Chem* 1998; 379: 19–26.
46. Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999; 248: 30–43.
47. Möbius J, Groos S, Meinhardt A, Seitz J. Differential distribution of the mitochondrial heat-shock protein 60 in rat gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 1997; 287: 343–350.
48. Sun Y, McRae TH. The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J* 2005; 272: 2613–2627.
49. Koyasu S, Nishida E, Miyata Y, Sakai H, Yahara I. HSP100, a 100-kDa heat shock protein, is a Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-regulated actin-binding protein. *J Biol Chem* 1989; 264(25): 15083-7.

50. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 433–442.
51. Isshiki M, Anderson RG. Function of caveolae in  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signal transduction. *Traffic* 2003; 4(11): 717-23.
52. Yu J, Bergaya S, Murata T et al. Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechano transduction and remodeling of blood vessels. *J Clin Invest* 2006; 116, 1284–1291.
53. Young LH, Ikeda Y, Lefer AM. Caveolin-1 peptide exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion via nitric oxide mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(6): 2489-95.
54. Jasmin JF, Rengo G, Lymperopoulos A, et al. Caveolin-1 deficiency exacerbates cardiac dysfunction and reduces survival in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300(4): 1274-81.
55. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 33-40.
56. Wang J, Sim AS, Wang XL, et al. Relations between plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and risk factors for coronary disease. *Atherosclerosis* 2006; 184: 383-388.
57. Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 41-51.
58. Böger R. ADMA: a mediator of endothelial dysfunction and marker of vascular disease. *Vascular Disease*, October 2004.
59. Hori T, Matsubara T, Ishibari T, et al. Significance of asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentrations during coronary circulation in patients with vasospastic angina. *Circ J* 2003; 67: 305-11.
60. Saitoh M, Osanai T, Kamada T, et al. High plasma level of asymmetric dimethyl arginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitric oxide level. *Heart Vessels* 2003; 18: 177-82.
61. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb. Vasc Biol* 2000; 20: 2032-2037

62. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81: 153-208.
63. Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1767-1775.
64. Chitaley K, Webb RC. Microtubule depolymerization facilitates contraction of rat aorta via activation of Rho-kinase. *Vasc Pharmacol* 2002; 38: 157-161.
65. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by the small GTPase Rho and its targets. *Trends Cardiovasc Med* 1998; 8: 162-168.
66. Chitaley K, Webb RC. Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of Rho-kinase signaling. *Hypertension* 2002; 39: 438-442.
67. Chitaley K, Webb RC. Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling. *Hypertension* 2002; 39: 438-42.
68. Katsumata N, Shimokawa H, Seto M, et al. Enhanced myosin light chain phosphorylations as a central mechanism for coronary artery spasm in a swine model with interleukin-1 $\beta$ . *Circulation* 1997; 96: 4357-63.
69. Sato S, Ikegaki I, Asano T, Shimokawa H. Antiischemic properties of fasudil in experimental models of vasospastic angina. *Jpn J Pharmacol* 2001; 87: 34-40.
70. Rolfe BE, Worth NF, World CJ, Campbell JH, Campbell GR. Rho and vascular disease. *Atherosclerosis* 2005; 183: 1-16.
71. Sarı AS, Tunçtan SB. Rho kinaz ve kardiyovasküler hastalıklar. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg* 2010; 3: 1-7.
72. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494-501.
73. Rivera J, Sobey CG, Walduck AK, Drummond GR. Nox isoforms in vascular pathophysiology: insights from transgenic and knockout mouse models. *Redox Rep* 2010; 15: 50-63.

74. Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, et al. Upregulation of the vascular NAD(P)Hoxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin–angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1456–1464.
75. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The Am J Off Surgery* 1991; 161: 488-503.
76. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33(2): 110-8.
77. Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, et al. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ. Res* 2003; 93: 802–805.
78. Li JM, Fan LM, Christie MR, Shah AM. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol. Cell. Biol* 2005; 25: 2320-2330.
79. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 2002; 40: 477-484.
80. Fukui T, Yoshiyama M, Hanatani A, et al. Expression of p22phox and gp91phox, essential components of NADPHoxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2001; 281: 1200-1206.
81. Abraham E. NF-kB activation. *Crit Care Med* 2000; 28(4): 100-104.
82. Li C, Browder W, Kao LR. Early activation of transcription factor NF-kB during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol* 1999; 276: 543-552.
83. Baldwin AS. The NF-kB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-681.
84. Collins T, Read MA, Neish AS, et al. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa-B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995; 9: 899-909.
85. Warner S, Auger KR, Libby P. Recombinant human interleukin-1 induces interleukin-1 production by adult human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1987; 139: 1911-1917.

86. Beg A, Sha WC, Bronson R, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the Rel A component of NF-kappa B. *Nature* 1995; 376: 167-70.
87. Maulik N, Goswami S, Galang N, Das DK. Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF-kB on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation. *FEBS Lett.* 1999; 443: 331-6.
88. Bond M, Fabunmi R, Baker A, Newby A. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines; an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.* 1998; 435: 29-34.
89. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leucocytes: selective expression of TLR-3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164: 5998-6004.
90. Tapping RI, Akashi S, Miyake K, et al. Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2 is a signalling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol* 2000; 165: 5780-7.
91. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, et al. Mouse toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* 2000; 275: 2251-4.
92. Oyama J, Blais C Jr, Liu X, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004; 109: 784-9.
93. Wu H, Chen G, Wyburn KR, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007; 117: 2847-59.
94. Lorne E, Zmijewski JW, Zhao X, et al. Role of extracellular superoxide in neutrophil activation: interactions between xanthine oxidase and TLR4 induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: 985-93.
95. Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus (AAAA-I)* 1998; 1: 1-19.
96. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 37-43.

97. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review* 1993; 14: 133-150.
98. Piper HM, Meuter K, MD, Schafer C. Cellular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg*, 2003; 75: 644-648.
99. Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch* 1981; 393: 287-297.
100. Miki T, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: a practical intervention for acute myocardial infarction? *Basic Res Cardiol* 1998; 93(5): 372-83.
101. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 641.
102. Roland E. Schmieder. Mechanisms for the Clinical Benefits of Angiotensin II Receptor Blockers *Am J Hypertens* 2005; 18: 720-730.
103. Neves LA, Almeida AP, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 801-809.
104. Birincioğlu M. İskemi-reperfüzyon aritmilerine ACE inhibitörleri, Glutation ve indometazinin etkileri. *Uzmanlık Tezi, Malatya*, 1996.
105. Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, et al. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 943-948.
106. Jin L, Ying Z, Hilgers RH, et al. Increased RhoA/Rhokinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 288-295.
107. De Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the Heart On the Intracrine Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 2000; 35: 1183-1188.

108. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Brief Review* 1999; 33: 613-621.
109. Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 1996; 28: 635-640.
110. Inagami T, Senbonmatsu T. Dual effects of angiotensin II type 2 receptor on cardiovascular hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 324-8.
111. Nio Y, Matsuharj H, Muravuwa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest*, 1995; 95: 46-54.
112. Lopez J, Lorell BH, Ingelfinger JR, et al. Distribution and function of cardiac angiotensin AT1-and AT2-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol* 1994; 36: H844-H852.
113. Dzau VJ, Horiuchi M. Differential expression of angiotensin receptor subtypes in the myocardium: a hypothesis. *Eur Heart J* 1996; 17: 978-980.
114. Yamada T, Akishita M, Pollman M, et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin type I receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci* 1998; 63: 289-295.
115. Busche S, Gallinat S, Bohle RM, et al. Expression of AT1 and AT2 receptors in adult ratcardiomyocytes after myocardial infarction: a single-cell RT-PCR study. *Am J Pathol* 2000; 157: 605-611.
116. Unger T. The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens* 1999; 17: 1775-86.
117. Wharton J, Morgan K, Rutherford RA, et al. Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 323-336.
118. Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: 2337-2365.
119. Gasparo MD, Catt KJ, Inagami JW, Wright JW, Unger TH. International union of pharmacology. XXIII. The Angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 415- 472.

120. Otsuka S, Sugano M, Makino N, et al. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 32: 467-472.
121. De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999; 11(1):1-12.
122. Yamada Y, Yamauchi D, Yokoo M, et al. A potent hypotensive peptide, novokin, induces relaxation by AT<sub>2</sub>- and IP-receptor-dependent mechanism in the mesenteric artery from SHR. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72(1): 257-9.
123. Yamada Y, Yamauchi D, Usui H, et al. Activity of novokin, a potent analogue of ovokin(2-7), is mediated by angiotensin AT<sub>2</sub> receptor and prostaglandin IP receptor. *Peptides* 2008; 29(3): 412-8.
124. Yamada Y, Yamauchi D, Usui H, et al. Hypotensive activity of novokin, a potent analogue of ovokin(2-7), is mediated by angiotensin AT<sub>2</sub> receptor and prostaglandin IP receptor. *Peptides* 2008; 29: 412-418.
125. Clark RD, Jahangir A, Severance D. Discovery and SAR development of 2-(phenylamino) imidazolines as prostacyclin receptor antagonists. *Med Chem Lett*. 2004; 14(4): 1053-6.
126. Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT<sub>2</sub> receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT<sub>1</sub> receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension*. 1999; 34(5): 1112-6.
127. Hiyoshi H, Yayama K, Takano M, Okamoto H. Stimulation of cyclic GMP production via AT<sub>2</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the pressure-overloaded aorta after banding. *Hypertension*. 2004; 43(6): 1258-63.
128. Paier A, Agewall S, Kublickiene K. Expression of heat shock proteins and nitrotyrosine in small arteries from patients with coronary heart disease. *Heart Vessels* 2009; 24(4): 260-6.
129. Shi Y, Hutchins W, Ogawa H. Increased resistance to myocardial ischemia in the Brown Norway vs. Dahl S rat: role of nitric oxide synthase and Hsp90. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38(4): 625-35.

130. Nishizawa J, Nakai A, Matsuda K, et al. Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart. *Circulation*. 1999; 99(7): 934-41.
131. Kupatt C, Dessy C, Hinkel R, et al. Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(8): 1435-41.
132. Young LH, Ikeda Y, Lefer AM. Caveolin-1 peptide exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion via nitric oxide mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280(6): 2489-95.
133. Jasmin JF, Rengo G, Lymperopoulos A. Caveolin-1 deficiency exacerbates cardiac dysfunction and reduces survival in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300(4): 1274-81.
134. Chow AK, Daniel EE, Schulz R. Cardiac function is not significantly diminished in hearts isolated from young caveolin-1 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299(4): 1183-9.
135. Minshall RD, Sessa CW, Stan RV. Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L1179–L1183.
136. Richter B, Niessner A, Penka M, et al. Endurance training reduces circulating ADMA and MPO levels in persons at risk of coronary events. *Thromb Haemost* 2005; 94: 1306-11.
137. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358: 2127-8.
138. Stühlinger MC, Conci E, Haubner BJ, et al. Asymmetric dimethyl L-arginine (ADMA) is a critical regulator of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2007 15; 75(2): 417-25.
139. Dong M, Yan BP, Liao JK, et al. Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Discov Today* 2010; 15(15-16): 622-9.
140. Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, et al. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 8467–77.

141. Lan C, Das D, Wloskowitz A, Vollrath B. Endothelin-1 modulates hemoglobin-mediate signaling in cerebrovascular smooth muscle via RhoA/Rh kinase and protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: 165-73.
142. Bao W, Hu E, Tao L, et al. Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61(3): 548-58.
143. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, et al. Beneficial effect of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia/reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(4): 599-607.
144. Zhou Q, Liao JK. Rho kinase: an important mediator of atherosclerosis and vascular disease. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 3108-3115.
145. Qin F, Simeone M, Patel R. Inhibition of NADPH oxidase reduces myocardial oxidative stress and apoptosis and improves cardiac function in heart failure after myocardial infarction. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 43: 271-281.
146. Xiao L, Pimentel DR, Wang J, et al. Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C926-C934.
147. Fukui T, Yoshiyama M, Hanatani A, et al. Expression of p22phox and gp91phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 281:1200-1206.
148. Bond M, Fabunmi R, Baker A, Newby A. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines; an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.* 1998; 435: 29-34.
149. Pye J, Ardeshirpour F, McCain A, et al. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284(3): H919-26.
150. Vallejo JG. Role of toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond).* 2011; 121(1): 1-10.
151. Ha T, Liu L, Kelley J, et al. Toll-like receptors: new players in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15(7): 1875-93.

152. Barsness KA, Arcaroli J, Harken AH, et al. Hemorrhage-induced acute lung injury is TLR-4 dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R592-9.
153. Oyama J, Blais C Jr, Liu X, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004; 109: 784-9.
154. Lorne E, Zmijewski JW, Zhao X, et al. Role of extracellular superoxide in neutrophil activation: interactions between xanthine oxidase and TLR4 induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C985-93.
155. Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2006; 114: I270-4.
156. Timmers L, Sluijter JP, Van Keulen JK, et al. Toll-like receptor 4 mediates mal - adaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 2008; 102: 257-264.
157. Liu CC, Huang Y, Zhang JH, Xu Y, Wu CH. Effect of carvedilol on cardiac dysfunction 4 days after myocardial infarction in rats: role of toll-like receptor 4 and  $\beta$ -arrestin 2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013; 17(15): 2103-10.
158. Parlakpınar H, Ozer MK, Acet A. Effects of captopril and angiotensin II receptor blockers (AT1, AT2) on myocardial ischemia-reperfusion induced infarct size. *Cytokine*. 2011; 56(3): 688-94.
159. Ye Y, Keyes KT, Zhang CF, et al. Additive effect of TAK-491, a new angiotensin receptor blocker, and pioglitazone, in reducing myocardial infarct size. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010; 24(2): 107-20.
160. Jehle AB, Xu Y, Dimaria JM, et al. A nonpeptide angiotensin II type 2 receptor agonist does not attenuate postmyocardial infarction left ventricular remodeling in mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012; 59(4): 363-8.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1979 yılında Trabzon'da doğdum. İlk-orta ve lise eğitimimi Trabzon da tamamladım. Lisans eğitimimi 1996-2001 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi' nde, Yüksek Lisans eğitimimi 2002-2005 yılları arasında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda tamamladım. 2009 yılında aynı Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimime başladım. 2009 yılından itibaren Bitlis Eren Üniversitesi'nde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktayım.

**Esra GÜNDÜZ**