

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

91590

L^o -NİTRO-L-ARGİNİN-METİL ESTER (L-NAME) İLE KRONİK
NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİM İNHİBİSYONU YAPILAN
SIÇANLARDA KALP İSKEMİ-REPERFÜZYON ARİTMİLERİ VE
ENDOJEN ANTIOKSİDAN ENZİMLERİN ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ

Uzmanlık Tezi
Dr. Ersin FADİLLİOĞLU

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. M. Hanifi EMRE

MALATYA 2000

Bu tez çalışması İnönü Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 99/21
nolu proje olarak desteklenmiştir.

TEŐEKKÜR

Fizyoloji Anabilim Dalı ailesine katıldığım günden itibaren hiçbir yardımı esirgemeyen ve bana her zaman yanımda olduğunu hissettiren kıymetli hocam *Doç. Dr. M. Hanifi Emre*'ye, çalışmalarımı destekleyen *Doç. Dr. Ercüment Ölmez*, *Yrd. Doç. Dr. Mustafa Birincioğlu*, *Dr. Hasan Erdoğan*, *Dr. Hüseyin Özyurt*, *Dr. Mustafa Ağkadir*, *Dr. Halil Düzova* ile Farmakoloji ve Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına, tez çalışmalarım sırasında bana manevi destekte bulunan annem, eşim, oğlum ve ayrıca tezin yazılmasında katkısı olan kardeşim *Emre Fadilloğlu* ve kuzenim *Yusuf Yaslan*'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. Kalp Fizyolojisi ve Kalpte Yer Alan İyon Kanalları.....	3
2.1.1. Kalp Fizyolojisi.....	3
2.1.2. Kalpte Yer Alan İyon Kanalları ve Taşıyıcılar.....	4
2.1.2.1. Plazma Membranında Yer Alan İyon Kanalları ve Taşıyıcılar.....	4
2.1.2.1.1. Na ⁺ Kanalı.....	4
2.1.2.1.2. Ca ⁺² Kanalları.....	5
2.1.2.1.3. K ⁺ Kanalı.....	6
2.1.2.1.3.1. Hızlı Aktivasyon İle K ⁺ Atan Kanallar.....	6
2.1.2.1.3.2. Geciken Aktivasyonlu K ⁺ Akımları.....	7
2.1.2.1.3.3. İçeri Yönlendiriciler.....	7
2.1.2.1.3.4. Ligand-Aktivasyonlu K ⁺ Akımları.....	8
2.1.2.1.3.4.1. Asetilkolin ile İndüklenen K ⁺ Akımı (I _{Kach}).....	8
2.1.2.1.3.4.2. ATP ile İnhibe Olan K ⁺ Kanalları.....	8
2.1.2.1.3.4.3. Na ⁺ ile Aktive Olan K ⁺ Kanalı.....	8
2.1.2.1.3.4.4. Yağ Asitleri ve Amfifiller ile Aktive Olan K ⁺ Kanalı.....	9
2.1.2.1.4. Cl ⁻ Kanalları.....	9
2.1.2.1.4.1. Protein Kinaz A ve Protein Kinaz C Bağımlı Cl ⁻ Kanalı.....	10
2.1.2.1.4.2. İntrasellüler Ca ⁺² ile Aktive Olan Cl ⁻ Kanalları.....	10
2.1.2.1.4.3. Ekstrasellüler ATP ile Aktive Olan Cl ⁻ Akımı.....	10
2.1.2.1.4.4. Şişme ile İndüklenen ya da Gerilme ile Aktive Olan Cl ⁻ Kanalı.....	11
2.1.2.1.5. Non-Selektif Katyon Kanalları ve Hiperpolarizasyon Kanalı.....	11
2.1.2.1.5.1. İntrasellüler Ca ⁺² ile Aktive Olan Katyon Kanalı.....	11
2.1.2.1.5.2. Ekstrasellüler ATP ile Aktive Olan Katyon Kanalı.....	12
2.1.2.1.5.3. Gerilmeye Hassas Katyon Kanalı.....	12
2.1.2.1.5.4. Non-Selektif Katyon Kanallarından Amfifiller ile Aktive Olanlar.....	12
2.1.2.1.5.5. Non-Selektif Katyon Kanallarından Oksidatif Stres ile Aktive Olanlar.....	12
2.1.2.1.5.6. Non-Selektif Temel Katyon Kanalları.....	12
2.1.2.1.5.7. Sürekli İçe yönelen Akım.....	13
2.1.2.1.5.8. Pacemaker Akım.....	13

2.1.2.1.6. Elektrojenik Değiştiriciler.....	13
2.1.2.1.6.1. Na ⁺ /Ca ⁺² Değiştiricisi.....	13
2.1.2.1.6.2. Na ⁺ /K ⁺ Pompası.....	13
2.1.2.2. İntrasellüler Organellerde İyon Kanalları.....	14
2.1.2.2.1. SR Kanalları.....	14
2.1.2.2.1.1. Ca ⁺² Salan Kanal (ya da Ryanodine Reseptörü).....	14
2.1.2.2.1.2. İnositol 1,4,5-trifosfat (IP ₃) Reseptörü.....	15
2.1.2.2.1.3. SR'da K ⁺ , Cl ⁻ ve H ⁺ Kanalları.....	15
2.1.2.2.1.3.1. H ⁺ Kanalı.....	16
2.1.2.2.1.3.2. K ⁺ Kanalı.....	16
2.1.2.2.1.3.3. Cl ⁻ Kanalı.....	16
2.1.2.2.2. Mitokondriyal Kanallar.....	16
2.1.2.2.2.1. Dış Mitokondriyal Membran.....	16
2.1.2.2.2.2. İç Mitokondriyal Membran.....	17
2.1.2.2.2.2.1. Mitokondrial Geçirgen Geçiş Poru.....	17
2.1.2.2.2.2.2. ATP Bağımlı K ⁺ Kanalı.....	17
2.1.2.2.2.2.3 107-pS Anyon Kanal ya da mCS Kanal.....	18
2.1.2.2.2.2.4. Alkalin Aktive Olan Kanallar.....	18
2.1.2.2.3 GAP Junction Kanalları.....	18
2.1.2.2.3.1. GAP Junctionların Oluşum ve Yapısal İncelenmesi.....	19
2.1.2.2.3.1.1. Kimyasal ve Voltaj Kapı Açılma.....	19
2.1.2.2.3.1.1.1. Protonlar ve Kalsiyum İyonları ile Kimyasal Kapı Açılma.....	19
2.1.2.2.3.1.1.2. Voltaj ile Kapı Açılma.....	20
2.2. Kalp İşkemi ve Reperfüzyonu.....	20
2.2.1. Kalp İşkemi-Reperfüzyonunda Biyokimyasal Değişiklikler.....	20
2.2.2. İşkemi-Reperfüzyon Hasarında Endojen Oksidan ve Antioksidanların Rolu.....	22
2.2.3. İşkemi-Reperfüzyonda Katekolaminler.....	25
2.2.4. İşkemi-Reperfüzyonda Ekstrasellüler ATP, Adenosin ve Asetilkolin (Ach).....	25
2.2.5. İşkemi-Reperfüzyonda Gerilme ve Hacim Değişiklikleri.....	26
2.2.6. İşkemi-Reperfüzyonda İyon Değişiklikleri.....	26
2.2.6.1. İşkemi ile [K ⁺] _o Artar.....	26

2.2.6.1.1. Ekstrasellüler K^+ Birikimi.....	26
2.2.6.1.2. $[K^+]_d$ Artışının Kanallar ve Taşıyıcılar Üzerine Etkisi.....	27
2.2.6.1.3. $[K^+]_d$ Elektrofizyolojik Karakterler Üzerine Etkisi.....	27
2.2.6.2. İntrasellüler ve Ekstrasellüler Asidoz.....	28
2.2.6.3. İntrasellüler $[Na^+]$ Birikimi.....	28
2.2.6.4. İntrasellüler $[Ca^{+2}]$ Dağılımında Değişiklikler.....	29
2.2.6.5. İntrasellüler $[Mg^{+2}]$ Değişiklikler.....	29
2.2.7. İskemi Reperfüzyonda Elektriksel Değişiklikler ve Aritmiler.....	30
2.2.7.1. Sellüler ve Multisellüler Seviyelerde Elektrofizyolojik Değişiklikler.....	30
2.2.7.2. İskemi-Reperfüzyonda Gözlemlenen Aritmiler.....	30
2.2.7.2.1. Aritmilerin Temel Mekanizmaları.....	30
2.2.7.2.1.1. SA Otomatisitesi.....	30
2.2.7.2.1.2. SA Dışında Otomatisite.....	31
2.2.7.2.1.3. Tetikleyici Aktivite.....	31
2.2.7.2.1.3.1. Erken Ard Depolarizasyon (EAD).....	31
2.2.7.2.1.3.2. Gecikmeli Ard Depolarizasyon (EAD).....	31
2.2.7.2.1.4. Reentry.....	32
2.2.7.2.2. İskemi ve Reperfüzyonda Görülen Aritmiler ve Spesifik Aritmilerin Mekanizmaları.....	33
2.3. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz Enzimi.....	36
2.3.1. Nitrik Oksidin Özellikleri.....	36
2.3.2. Nitrik Oksit Sentaz Enzimi (NOS).....	37
2.3.3. NOS İnhibitörleri.....	38
3. Materyal ve Metod.....	40
3.1. Deney Grupları.....	40
3.2. Cerrahi Uygulama.....	41
3.3. Aritmilerin Değerlendirilmesi.....	42
3.4. Biyokimyasal Analizler.....	46
3.4.1. Dokuların Çıkarılması ve Hazırlanması.....	46
3.4.2. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini.....	46
3.4.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini.....	47
3.4.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini.....	47
3.4.5. Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi Tayini.....	48

3.4.6. Nitrik Oksit (NO) Miktarının Tayini.....	48
3.4.7. Malondialdehit (MDA) Miktarı Tayini.....	49
3.5. Biyoistatistiksel Metodlar.....	49
4. Bulgular.....	50
4.1. L-NAME ile NOS İnhibisyonunun İskemi-Reperfüzyon Aritmilerini Etkileri.....	50
4.2. L-NAME Uygulanmasının Ortalama Arteriyel Kan Basıncı ve Kalp Hızı Üzerine Olan Etkileri.....	53
4.3. Biyokimyasal Sonuçlar.....	62
5. Tartışma ve Sonuçlar.....	71
6. Özet	82
7. Referanslar.....	85



Resimlerin, Tabloların ve Şekillerin Listesi

Resim 1. Bu kayıta reperfüzyondan hemen sonra başlayan ventrikül taşikardisi (VT) ve takiben başlayan ventrikül fibrilasyonu (VF) görülmektedir. Ayrıca ventriküler ektopik atımlar (VEB), VT ve VF esnasındaki kan basıncı ve kalp hızı değişiklikleri gözlenmektedir.

Resim 2. Bu kayıta atriyoventiküler blok (AV BLOK), takiben ventriküler ektopik atımlar (VEB) ve ventrikül taşikardisi (VT) izlenmektedir.

Resim 3. Bu kayıta oklüzyonun başlarında R dalgalarının büyümeye başlaması ve oklüzyonun başlarında gözlenen VEB'lerin kan basıncı, EKG ve kalp hızı kayıtlarını nasıl etkilediği gözlenmektedir.

Tablo 1. Nitrik oksit sentaz enzim inhibitörleri ve izoenzimlere etki şiddetleri.

Tablo 2. İskemi/reperfüzyon sonrası ortalama VEB sayıları, VT süreleri, VF süreleri ve VT+VF süreleri.

Tablo 3. İskemi/reperfüzyon sonrası VEB, VT, reversibl VF ve irreversibl VF insidansları.

Tablo 4. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda endojen antioksidan enzim aktiviteleri, malondialdehit ve nitrik oksit düzeyleri.

Şekil 1. İskemi ve reperfüzyon sonrası erkek ve dişi sıçanlarda ortalama VEB sayıları.

Şekil 2. İskemi ve reperfüzyon sonrası erkek ve dişi sıçanlarda ortalama VT süreleri.

Şekil 3. Reperfüzyon periyodunda erkek ve dişi sıçanlarda ortalama VF ve VT+VF süreleri.

Şekil 4. İskemi ve reperfüzyonda erkek ve dişi sıçanlarda reversibl ve irreversibl VF insidansları (%).

Şekil 5. Erkek sıçanların deney süresinde kayıt edilen ortalama arteriyel kan basınçları ve ortalama kalp hızları.

Şekil 6. Dişi sıçanlarda deney sırasında ortalama kan basınçları ve ortalama kalp hızları.

Şekil 7. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda katalaz enzim aktiviteleri.

Şekil 8. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda glutatyon peroksidaz aktiviteleri.

Şekil 9. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda süperoksit dizmutaz aktiviteleri.

Şekil 10. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda ksantin oksidaz aktiviteleri.

Şekil 11, İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda malondialdehit düzeyleri.

Şekil 12. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda nitrik oksit düzeyleri.

KISALTMALAR

Ach : Asetilkolin

AV : Atriyoventriküler Düğüm

CAT : Katalaz

EAD : Erken Ard Depolarizasyon

GAD : Gecikmeli Ard Depolarizasyon

GSH-Px : Glutasyon Peroksidaz

I/R : İskemi-Reperfüzyon

L-NAME : N^o-nitro-L-arginin metil ester

NO : Nitrik Oksit

NOS : Nitrik Oksit Sentaz

SA : Sinoatriyal Düğüm

SOD : Süperoksit Dismutaz

MDA : Malondialdehit

VEB : Ventriküler Ektopik Atım

VT : Ventriküler Taşikardi

VF : Ventriküler Fibrilasyon

XO : Ksantin Oksidaz

1. Giriş Ve Amaç

Son yıllarda artan bir hızla kalp hastalıkları gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin önemli sorunlarından biri olmuştur. Kardiyovasküler hastalıklar özellikle sedanter yaşam ile birlikte artış göstermiştir (1). Özellikle koroner kalp hastalıklarının teşhis ve tedavisinde kullanılmaya başlanan yeni tekniklerden sonra koroner arter hastalıkları ilgi çekici konulardan biri haline gelmiştir.

Kalp bir çok değişik koşullar altında iskemiye maruz kalarak kanlanması bozulmakta ve böylece miyokardiyal dokunun oksijenasyonun engellenmesi ile kasılma yeteneği azalmaktadır. İskemi, ateroskleroz veya tromboembolilerin sonucunda olabildiği gibi, koroner bypass veya transplantasyon gibi cerrahi işlemler sırasında da oluşabilmektedir. İskeminin devam etmesi, miyokardın metabolizmasını devam ettirecek substratı bulamamasına ve sonuçta miyokardiyal infarktüs ya da ölümcül aritmilere yol açabilir (2, 3, 4). İskeminin ve buna bağlı aritmilerin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Miyokardiyal iskeminin tam ve doğru tedavisinin yapılabilmesi patofizyolojik mekanizmaların yeterince bilinmesine bağlıdır.

Miyokardiyal iskemi sonunda tekrar miyokardiyal dokunun oksijenlenmesi yani reperfüzyonu ile iskemide karşılaştığı hasarlardan daha fazlası ile miyokardiyal doku karşı karşıya kalır (4, 5). Reperfüzyon sonucunda ilk olarak karşımıza aritmiler ve bunların ölümcül sonuçları çıkabilir. Aritmilerin patogenezinde rol alan mekanizmaların öğrenilmesi ve mekanizmaya yönelik tedavilerin uygulanması oluşan bu komplikasyonların ölümcül olmasının engellenmesini sağlayacaktır. Reperfüzyon ile hızla oksijenle karşılaşan dokuda paradoksik olarak bazı değişiklikler olur (5). Bu değişiklikler ile açığa çıkan serbest oksijen radikallerini ortamdaki uzaklaştırmaya çalışan endojen antioksidan sistemler oluşan hasarı engellemeye çalışırlar (6, 7).

İskemi-reperfüzyon (I/R) sonrası ortaya çıkan aritmiler ölümcül sonuçlara yol açabilir (5, 6 , 7). Aritmilerin farklı cinsiyetlerde farklı oluşum ve etki mekanizmalarının olması olasıdır. Nitrik oksidin (NO) bu mekanizmalar içinde aldığı yer farklı cinsiyetler için açık değildir. Ayrıca I/R aritmilerinde NO'in rolü ile ilgili farklı çalışmalar vardır (8, 9).

Bu çalışmada erkek ve dişi sıçanlarda L^o-nitro-L-arginin metil esterinin (L-NAME) kronik uygulanması ile nitrik oksit sentaz enziminin inhibisyonunun iskemi-reperfüzyon aritmilerine ve iskemi-reperfüzyon sonrası kalp dokusu endojen antioksidan enzimler ile lipit peroksidasyonuna etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.



2. Genel Bilgiler

2.1. Kalp Fizyolojisi Ve Kalpte Yer Alan İyon Kanalları

2.1.1. Kalp Fizyolojisi

Hayati öneme sahip olan kalp, göğüs boşluğunda yer alan, kendine has kalp kası hücreleri ile ileti üreten ve taşıyan hücrelerden oluşan bir organdır (10 ,11).

Kanlanması Aorta'dan çıkan ana koroner arter ve daha sonra bunun dalları olan sol ve sağ koroner arterlerle sağlanır. Sol koroner arter sol ventrikülün ön ve yan bölümünü beslerken sağ koroner arter sağ ventrikülün büyük bir bölümünü ve insanların % 80-90'ında sol ventrikülün arka bölümünü besler. Venöz dönüşün %75'i koroner sinüs ile sağlanırken aanteriyor kardiyak venler ve thebesian venlerde bu işleve yardımcı olurlar (10, 11).

Kalbin kasılmasını sağlayan uyarılar sağ atriyumun süperior lateral duvarında, süperior vena kavanın ağzının hemen altında ve hafifçe lateralinde yer alan sinoatriyal düğümden başlayan aksiyon potansiyellerle olur. Sinoatriyal düğümden (SA) çıkan uyarılar atriyoventriküler düğüme (AV) gelir ve Purkinje lifleriyle ventriküle yayılır (10, 11). Kalp kası hücreleri arasında yer alan bağlantılar yoluyla kalp kasının sinsitium ile kasılması sağlanır (12).

Kalpte uyarı, ileti ve düzenli kasılmanın sağlanması hücre membranında ve hücre içi organellerde yer alan iyon kanalları, pompalar ile hücreler arası gap junctionlarla olur. Bu kanallar aksiyon potansiyel sırasında açılıp kapanarak hücre içi iyon konsantrasyonunun uygun hale gelmesini sağlar (10, 11, 12, 13, 14).

2.1.2. Kalpte Yer Alan İyon Kanalları Ve Taşıyıcılar

2.1.2.1 Plazma Membranında Yer Alan İyon Kanalları Ve Taşıyıcıları

2.1.2.1.1. Na⁺ Kanalı

Hemen hemen bütün uyarılabilen hücrelerde aksiyon potansiyelinin oluşması Na⁺ akımının olmasına bağlıdır. Kalpte kanalın yoğunluğu SA' da ve AV' de az, Purkinje hücrelerde yüksektir. Na⁺ kanalı voltajla çalışır ve aktivasyon-inaktivasyon gösterir. Kardiyak hücreler depolarize olduğunda içe yönelen akım hızlı bir şekilde artar ve sonra yavaşlayarak azalır. Artış sigmodial ya da üsteldir. Depolarizasyon ile kısa bir pik yapar (13, 14).

Akım ve kararlı durum iki voltaj bağımlı olayla, yani birbirinden bağımsız aktivasyon ve inaktivasyonla açıklanmıştır. Kanalın açılması ve kapanması yüklü kapıların hareketine bağlıdır. Kalp hücresinde böyle bir kapı akımı aktivasyon olayı için ölçülmüştür, ancak inaktivasyon olayında ölçülmemiştir (15). Ancak aktivasyon kapı akımı inaktivasyon sırasında küçülür. Kapı açılma yükünün sabit hale gelmesi iki olay arasında bazı birlikteliklerin (coupling) olduğunu düşündürmektedir. Hücre tipine göre aktivasyon ile inaktivasyon arasındaki birliktelik değişkenlik gösterir ve kardiyak hücrelerde bu birliktelik yavaştır: Açılma her zaman depolarizasyonda hızlı bir aktivasyonla olur ve inaktivasyon yavaş ve değişkendir (14).

Moleküler olarak kanalın bir α -subünitesi (260 kDa) ve 2 β -subünitesi (36 ve 33 kDa) vardır. α -subünitesi kanal aktivitesi için yeterlidir ve tetramerik bir yapıda dört kere tekrar eden altı transmembran segmentten oluşur. Eksternal yüzeyde yer alan sialik asit negatif yönde aktivasyon ve inaktivasyon yönünü değiştirir. Hücre iskeleti ile olan ilişkiyi voltaj bağımlı aktivasyon ve inaktivasyon düzenler; F-aktinin bozulması ve mikrotübüllerin stabilizasyonu tüm hücrenin kaydı sırasında oluşan negatif yönde geçişi

arttırır (16). İki β -subünite ise düzenleyici bir rol oynar, inaktivasyonu arttırır ve lokal anestetiklerin bloğunu azaltır (17).

2.1.2.1.2. Ca^{+2} Kanalları

Kalp hücrelerinin plazma membranında Ca^{+2} 'a geçirgen değişik kanallar gösterilmiştir: Bunlardan ikisi voltaj ile aktive olan L- ve T- tipi kanallar ve birde temel kanallardır (18). Kalbin değişik bölgelerinde L- ve T tipi kanallar farklı yoğunlukta bulunurlar. Purkinje ve sinoatriyal bölgede yüksek T- tipi/L- tipi oranı varken, atriyal ve ventriküler hücrelerde bu oran daha azdır (14).

Temel Ca^{+2} kanalları serbest oksijen radikallerine maruz kaldıklarında aktiviteleri artar (19). Bu kanallar sıçan trabekülünde açıklanan Ca^{+2} 'dan bağımsız olarak Na^{+} girişinden de sorumlu olabilir.

L- tipi Ca^{+2} kanallar SA ve AV da aksiyon potansiyelin *upstroke* undan sorumludur. Bu kanallar diğer kardiak hücrelerde aksiyon potansiyelin plato ve nihai *spike-dome* görünümünün belirlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Eksitasyon ve kontraksiyon arasındaki ardışık hassas dengeden de sorumludur; sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımını uyarır ve intrasellüler Ca^{+2} yükünü kontrol eder. Bu yolla intrasellüler ve mitokondriyal Ca^{+2} hassas bazı regülatör enzimlerin aktivitelerini belirleyebilir.

Sağlam bir hücre iskeleti varlığı lokal kalsiyum konsantrasyonunu ($[Ca^{+2}]$) belirlemede önemlidir. Sağlam hücre iskeleti kanalları birbirinden ayrı tutar ve lokal $[Ca^{+2}]$ artışını sınırlar. İskemide bu hücre iskeleti yapısı bozulabilir.

Kardiyak Ca^{+2} kanalının moleküler yapısı 4 subüniteden oluşur: 2 α -subünitesi, α_1 ve α_2 ; bir β -subünitesi ve bir δ -subünitesi (bir γ -subünitesi iskelet kasında gösterilmiştir). α -subünitesi kanal aktivitesi için yeterlidir. α -subünitesinin fonksiyonu belirgin olarak β -subünitesi tarafından düzenlenir (14).

T- tipi kanal: L- tipi Ca^{+2} akımı için gerekli olan eşik değerden daha negatif bir potansiyelde kısa süreli bir Ca^{+2} akımında aktive olur (20). Bu kanalın akımı en iyi SA, atriyal, Purkinje ve nodal hücrelerde gösterilmiştir. İnsan atriyum ve ventrikülünde bu akım bulunmamıştır (21, 22). Kanalın uyarı oluşturmada bir rolünün olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca kanal steroidenez, hücre çoğalması ve kardiyak gelişimle de ilgili olabilir (14).

2.1.2.1.3. K^{+} Kanalı

Tüm kardiyak K^{+} kanalları aktive oldukları zaman akımı dışarı taşırlar, aksiyon potansiyel süresince membranı depolarize ederler ya da hiperpolarizasyon seviyesinde membranı stabilize ederler, çünkü K^{+} denge potansiyeli negatiftir. Bir çok K^{+} akımı tipi mevcuttur, bunlar; voltaj-aktif olan akımlar, ligand-aktif akımlar ve temel akımlardır. Fizyolojik koşullarda voltaj-aktif olan K^{+} akımları ligand-aktif akımlardan asetilkolin ile indüklenen K^{+} akımı (I_{Kach}) ve temel akım (I_{K1}) normal aksiyon potansiyelin oluşumunda önemli bir rol oynar. İskemik durumlarda ligand-aktif akımlardan özellikle ATP ile inhibe olan K^{+} akımının (I_{KATP}) ve yağ asitleri ve amfifiller ile olan akım (I_{KAA}) başlangıçta görev alır, ancak bazı “fizyolojik” akımlar inhibe olur. Voltaj-aktif olan K^{+} akımlar, depolarizasyonda aktivasyon-inaktivasyon gösterir; bu iki olayın hızları hızlıdan ultra yavaşta kadar değişebilir. Ligandlar, reseptörlere bağlanabilir sonra bir G proteini yoluyla kanal aktive olabilir, ya da kanalın intrasellüler kısmı ile direkt olarak ilişki kurabilir (13, 14).

2.1.2.1.3.1. Hızlı Aktivasyon İle K^{+} Dışarı Atan Kanallar

Voltaj-aktif olan akımlardır. Depolarizasyonda farklı K^{+} akımları hızla aktive olur. İnaktivasyon hızlarına göre ayrılırlar: Hızlı olan akım için I_{to} yavaşta ultra yavaşta olan akım için I_{Kur} ve var olmayan akım için I_{Kss} kısaltmaları kullanılır (ayrıca temel akımdır ve fazla bilgi yoktur) (14).

I_{to} , geçici bir dışa K^+ akımıdır. Hızlı aktive ve inaktive olur. Aksiyon potansiyelde 1. fazdan ya da ilk hızlı repolarizasyondan kısmen sorumludur. Cinsten cinse ve kalbin değişik kısımlarda yoğunluğu değişir. Atriyum ve purkinje liflerinde daha fazla bulunurken ventrikülde endokardialde liflerde ise epikardiallerden daha fazladır. Doğumdan sonra kalpte I_{to} yoğunluğu artar (23, 24). Depolarizasyonda akım aktive olur. Bu aktivasyon süresi ve kararlılığı cinsten cinse ve deney koşullarına göre değişir.

I_{Kur} , kalbin hızlı aktive olan ve inaktive olmayan ya da çok yavaş inaktive olan K^+ akımıdır (14).

2.1.2.1.3.2. Geciken Aktivasyonlu K^+ Akımları

Voltaj-aktivasyonlu akımlardır. İki K^+ akımı gösterilmiştir: aktivasyon ve inaktivasyon gösteren hızlı geciken K^+ akımı (I_{Kr}), ve sadece aktivasyon gösteren yavaş aktive olan K^+ akımı (I_{Ks}) (14). Her ikisi de insan atriyum ve ventrikülü, kobay ventrikül ve atriyumu, köpek ventrikül ve atriyumu, tavşan atriyum ve ventrikülü, fare neonatal ventrikülü ve sıçan ventrikülünde vardır(25, 26, 27, 28, 29, 30, 31). Kedi ventrikülünde ve tavşan SA' de sadece I_{Kr} gösterilmiştir (32, 33). Akımların yoğunluğu miyokardiyal duvar tabakalarında farklılık gösterir (14).

2.1.2.1.3.3. İçeri Yönlendiriciler

İçeri yönlendirici akım (I_{K1}) kalp hücrelerinde istirahat potansiyelini sağlayan akımdır. Ayrıca bir aksiyon potansiyel süresince hızlı final repolarizasyonunda önemli bir rol oynar. I_{K1} yoğunluğu Purkinje ve ventriküler sistemde çok fazla, atriyumda azdır. SA I_{K1} akımı yoktur. Neonatal dönemden yetişkin döneme geçişte akım artışı doyurucu bir seviyededir (14, 34). Ayrıca kalp kasında ilk karakterize edilen K^+ akımıdır (14).

2.1.2.1.3.4. Ligand-Aktivasyonlu K⁺ Akımları

2.1.2.1.3.4.1. Asetilkolin İle İndüklenen K⁺ Akımı (*I_{kach}*)

SA da kalp hızının yavaşlaması özel bir K⁺ kanalının aktivasyonu ile olur. Bu kanal *I_{KAch}* dir. Memelilerde, atriyal hücrelerde, AV hücrelerinde ve Purkinje hücrelerde akım gösterilmiştir (14). Bütün memelilerin ventrikül hücrelerinde kanal yoktur, ancak sıçan, köpek ve insanda gösterilmiştir (35, 36, 37). *I_{kach}* nin aktivasyonu M₂ muskarinik reseptöre asetilkolinin (Ach) bağlanması ile olur. Reseptör bir guanine nükleotid bağlayan protein ya da G proteini yoluyla K⁺ kanalıyla direk eşlenir. Kanal K⁺ için çok seçicidir. İletkenlik ekstrasellüler K⁺ konsantrasyonuna çok hassastır. Akım hiperpolarizasyonda aktive olur ve depolarizasyonda kısmen deaktive olur(14).

2.1.2.1.3.4.2. ATP ile İnhibe Olan K⁺ Kanalları

K-ATP kanalı ilk olarak kalp hücrelerinde gösterildi ve daha sonra bir çok hücre tipinde mevcut olduğu bulundu (38). Kalpte iskemi sırasında koruyucu bir rol üstlendiği görülmüştür. Kanalin aktivasyonu ayrıca ön koşullanmadan ya da ikinci bir atakta korumadan sorumlu olduğu gözlenmiştir. Sitoplazmada ATP konsantrasyonunda kritik bir azalma, yüksek geçirgenliğe sahip K⁺ kanalını aktive eder. Anyonik ATP, Mg-ATP kadar kardiyak kanalı inhibe edebilir. ATP' ın hassasiyeti serbest Mg⁺² varlığında artar. Kanalin fonksiyonel yeterliliği hücre iskeletinin sağlam olmasına bağlıdır. Yüksek hücre dışı K⁺ konsantrasyonu ([K⁺]_d) varlığında kanalın akım yönü içe doğrudur. Ancak normal fizyolojik [K⁺]_d da akım ya hiç yönelim belirtmez ya da 0 mV kadar dışa yönelim gösterir. Dışa olan akım metabolik inhibisyonda, hipoksida ve potasyum kanal açıcılarının varlığında karakteristiktir (14).

2.1.2.1.3.4.3. Na⁺ İle Aktive Olan K⁺ Kanalı

Ligand-aktivasyonlu kanallara dahildir. Aktivasyon hücre içi Na⁺ ([Na⁺]_i) ile sağlanır. İlk önce kalp hücrelerinde gösterilmiştir. Fizyolojik koşullarda, akım dışa

doğrudur ve aksiyon potansiyel sırasında kanalın büyük akımlar taşıdığı önceden belirtilmiştir. Kanalın K^+ seçiciliği yüksektir (14).

2.1.2.1.3.4.4. Yağ Asitleri Ve Amfifiller İle Aktive Olan K^+ Kanalı

Araşinodik asit, doymamış yağ asitleri ve fosfolipitler neonatal sıçan atriyal hücrelerinde, yetişkin sıçan atriyal ve ventrikül hücrelerinde K^+ seçici kanalları aktive eder (39). Membranın her iki tarafından da yağ asitleri ile karşılaşma aktivasyon yapar ancak sitozolik kısımdan uygulandığında daha etkilidir. Kanal depolarizasyon seviyesinde yüksek aktivite ile hafif bir voltaj bağımlılığı gösterir. Araşidonik asit direk olarak kanalı aktive eder, ancak metabolitleri ile aynı etkiyi yapmaz. Araşidonik asit ile aktive olan kanal dışa yönelimli akım sağlar. Yağ asitleri ile aktive olan kanalın açılması patlama tarzında meydana gelir. İskemide yağ asitleri ve amfifiller ile aktive olan K^+ kanalının aktive olmasından sonra (K-ATP kanalı ile), diğer fizyolojik kanallar işlevini yitirir (14).

2.1.2.1.4. Cl^- Kanalları

Kardiyak hücrelerde 4 farklı tip Cl^- kanalı tanımlanmıştır: (1) Protein kinaza (PKA) bağımlı fosforilasyonla aktive olan kanal, (2) hücre içi Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) ile aktive olan kanal, (3) hücre dışı ATP konsantrasyonu ($[ATP]_o$) ile aktive olan kanal ve (4) gerilme veya şişme ile aktive olan kanal.

Cl^- akımlarının fizyolojik rolü kesin bir biçimde açıklanamamıştır, bunun nedeni aktive olan akımın ancak fizyopatolojik durumlarda görülmesidir: PKA ya bağlı Cl^- akımında katekolamin deşarjı, gerilme ve şişme ile aktive olan Cl^- akımında osmotik basıncın yol açtığı hücre şişmesi, ATP ile aktive olan Cl^- akımında hücre dışı ATP salınımının olması bunların her biri patolojik koşullarda olan olaylardır. Hatta Ca^{+2} ile aktive olan Cl^- akımı dahi fizyolojik bir olay olarak her hücrede görülmemektedir (insan atriyal hücrelerinde yoktur) (14, 40). PKA bağımlı akım ventrikül hücrelerinde görülürken, şişme ile aktive olanlar atriyal hücrelerinde görülür (14).

2.1.2.1.4.1. Protein Kinaz A Ve Protein Kinaz C Bağımlı Cl⁻ Kanalı

Daha çok ventrikülde yer alır. Kobay, tavşan, kedi ventrikülünde ve insan atriyumunda gösterilmiştir (41, 42). PKA bağımlı kanal tipik olarak β reseptör stimülasyonundan sonra aktive olur. β -reseptörleri ve histamin reseptörleri ile PKA pozitif olarak çiftlenirler. Nitrik oksit (NO) sentaz yolu bununla ilişkili değildir (43). cAMP ile aktivasyon, eş zamanlı tirozin kinaz inhibisyonu ve daha önce Ach'ne maruz kalınması durumunda olur. Fosforilasyon ile kanal istirahat durumundan aktif duruma geçer ve kinetik davranışı düzenlenir (44, 45).

2.1.2.1.4.2. İntrasellüler Ca⁺² İle Aktive Olan Cl⁻ Kanalları

Geçici ve intrasellüler Ca⁺² bağımlı olup dışa doğru akımı olan ve Cl⁻ taşıyan kanal tavşan miyositlerinde gösterilmiştir. Akım tavşan Purkinje hücrelerinde, tavşan atriyumunda, köpek ventrikül ve atriyal hücrelerinde vardır. İnsan atriyumunda bulunamamıştır(14, 30, 40). Kardiyak aksiyon potansiyel sırasında L-tipi Ca⁺² kanalı ile Ca⁺² un emilmesini takiben sarkoplazmik retikulumdan (SR) salınan Ca⁺² ile Cl⁻ akımı aktive olur. Ca⁺² un fazla yüklenmesinde, intrasellüler Ca⁺² geçişinde zamanın daha kısa olmasına rağmen Cl⁻ akımı uzar ve daha yavaş kinetik gösterir. Negatif potansiyelde akımın aktive olabileceğini not etmek önemlidir ve böylece geciken ard depolarizasyonda (GAD) ve aritmilerin gelişiminde bir rol oynayabilir (46, 47).

2.1.2.1.4.3. Ekstrasellüler ATP İle Aktive Olan Cl⁻ Akımı

Purinerjik bir Cl⁻ aktivasyonu kobay kalbinin atriyal hücrelerinde, fare ve sıçan ventrikül hücrelerinde gösterilmiştir (48, 49). Aktivasyon ATP, adenozin S¹-O-(3-thiotrifosfat), nonhidrolize ATP analogları, ADP ve AMP ile olur. Adenozin kanalı kobayda aktive ederken, fare ve sıçanta aktive etmez (14).

2.1.2.1.4.4. Şişme İle İndüklenen Ya Da Gerilme İle Aktive Olan Cl⁻ Kanalı

Hacim ile aktive olan Cl⁻ kanalı tavşan, kobay, köpek ve insan atriyal hücrelerinde mevcuttur (50, 51). Aktivasyon hücrelerin hipotonik solüsyonlara maruz kalması ya da pipetle uygulanan basınçla olur (51). Ayrıca hücre iskeletinde olan değişiklikler de gerilmeye eşlik edebilir. Aktivasyon hemen olmaz, dakikalar sürer (50). Altta yatan olayın tirozin kinaz ile bir fosforilasyon olayı olduğu, bu enzimin inhibisyonu ile olayın engellenmesinden meydana geldiği öne sürülmektedir. Hücre gerilmesinin tirozin fosforilasyonunun aktivasyonuna yol açabildiği bilinmektedir. İzotonik koşullar altında kanal aktivasyonu çok az olmaktadır (14, 52).

2.1.2.1.5. Non-Selektif Katyon Kanalları Ve Hiper-Polarizasyon Kanalı

Kalpde, Cl⁻ kanallarında aktive eden [Ca⁺²]_i artışı, [ATP]_o artışı ve gerilme bir kısım non-selektif katyon kanallarını da (NSC) aktive eder. Diğerleri de oksijen radikalleri, amfifileri, depolarizasyon (sürekli içeri yönelik akım ya da I_{st}) ve hiperpolarizasyon (I_f akım) ile aktive olur. NSC akımının mekanizması açıklanmamıştır; kendiliğinden aktive olur. Birbirlerinden geçirgenlik açısından farklılık gösterirler.

Hem I_{st} (sadece sinüste gösterilmiştir) hem I_f (nodal, Purkinje ve atriyal ventriküler hücrelerde) fizyolojik ve patolojik durumlarda uyarı üreten bir rol oynarlar. Diğer NSC akımları sadece patolojik durumlarda aktive olurlar ([Ca⁺²]_i, [ATP]_o artışları, gerilme, radikaller ve amfifiller ile) (14).

2.1.2.1.5.1. İntrasellüler Ca⁺² İle Aktive Olan Katyon Kanalı:

İki tipe ayrılabilir: Birinci tipin aktivasyonu, hücrenin Na⁺ dan bağımsız ortamda, yüksek [Ca⁺²]_o ile düşük [K⁺]_o da, intrasellüler Ca⁺² enjeksiyonunu takiben, kafein uygulanmasında, mikromolar Ca⁺² konsantrasyonu içeren solüsyonlar ile hücre dializinde ve intrasellüler serbest oksijen radikallerine maruz kalındığında olur (53). İkinci tip Ca⁺²

ile aktive olan katyon kanalı diğlerinden farklı bir aktivasyon gösterir. Aktivasyonu için hem depolarizasyona hem de $[Ca^{+2}]_i$ artışına gerek vardır (14).

2.1.2.1.5.2. Ekstrasellüler ATP İle Aktive Olan Katyon Kanalı

Geçici, hızla hassasiyetini kaybeden içe yönelik akım $[ATP]_o$ ile aktive olur. Kurbağa atriyal miyositlerinde, tavşan SA ve atriyal hücrelerinde, kobay atriyal, ventriküler hücrelerde ve sıçan ventrikül miyositlerinde gösterilmiştir (54, 55, 56). Kanal $[Ca^{+2}]_i$ a hassas değildir (56).

2.1.2.1.5.3. Gerilmeye Hassas Katyon Kanalı

Gerilme ya da şişme ile aktive olan NSC akımları sıçan atriyal hücrelerinde, neonatal sıçan hücrelerinde, kültürde üretilmiş tavuk kalbinde, kobay ventriküler hücrelerde ve köpek ventrikül miyositlerinde gösterilmiştir (14, 57).

2.1.2.1.5.4. Non-Selektif Katyon Kanallarından Amfifiller İle Aktive Olanlar

Kobay ventrikül hücrelerinde, ve tavşan ventrikül hücrelerinde, NSC kanallarından amfifiller ile aktive olanlar vardır (14).

2.1.2.1.5.5. Non-Selektif Katyon Kanallarından Oksidatif Stres İle Aktive Olanlar

Ekstrasellüler radikallere maruz kalan kobay ventrikül miyositlerinde NSC aktivasyonu olur; ve bir $[Ca^{+2}]_i$ artışına ihtiyaç yoktur (53). Benzer bir akım (thimerosal ve diamid gibi) diğ okside ajanlardan ve singlet oksijen ile aktive olur (58).

2.1.2.1.5.6. Non-Selektif Temel Katyon Kanallar

Tavşan atriyal hücrelerde, kobay atriyal ve ventriküler hücrelerde ve insan atriyal hücrelerde tanımlanmıştır (59).

2.1.2.1.5.7. Sürekli İçe Yönelen Akım

Tavşan ve kobay SA hücrelerinde içe yönelik bir akım -80 den -60 mV depolarizasyonda ve daha pozitif seviyelerde aktive olur. Nispeten büyük depolarizasyonlar için inaktivasyon yavaş olur (14).

2.1.2.1.5.8. Pacemaker Akım

Kalp vuruşu normal koşullarda orijini SA dan alır. Düğümün elektriksel aktivitesi diastolik depolarizasyonun varlığı ile karakterizedir. Bu olayda bir çok akım rol alır. Önemli akımlardan biri olan I_f pacemaker akımı, aksiyon potansiyelin repolarizasyon fazında aktive olur ve içe yönelik bir akım yaratır. I_f akımı temel olarak SA, AV ve Purkinje hücrelerde gösterilmiştir; ancak atriyum ve ventrikül hücrelerinde de vardır (60).

2.1.2.1.6. Elektrojenik Değişiriciler

2.1.2.1.6.1. Na^+/Ca^{+2} Değişiricisi

Na^+/Ca^{+2} değişiricisi $[Ca^{+2}]_i$ regülasyonunda önemli rol oynar. Böylece kasılma-gevşeme ve aksiyon potansiyelin zamanının belirlenmesinde önemli görev alır (14).

2.1.2.1.6.2. Na^+/K^+ Pompası

Na^+ hücre dışına ve K^+ hücre içine taşıyan pompa, pasif hareketin zıttı bir çalışma yapar. Enerji harcayan bir pompadır. Her bir ATP molekülü için üç Na^+ ve iki K^+ taşınır.

Pompanın yoğunluğu ventrikülde atriyumdan daha fazladır (61). Ventrikülde subendokardial hücrelerde subepikardial hücrelerden daha fazladır. Pompanın aktivitesinin artışının aksiyon potansiyelin kısalmasında bir rolü vardır (14).

2.1.2.2. İntrasellüler Organellerde İyon Kanalları

2.1.2.2.1. SR Kanalları

SR membranı çok geçirgen bir membrandır ve K^+ ve Cl^- için yüksek bir geçirgenlik kat sayısına sahiptir. K^+ ve Cl^- un membrandan geçişi eşit olarak gözlenmektedir, önemli gradient farkı oluşturacak geçiş ise Ca^{+2} için geçerlidir (14).

2.1.2.2.1.1 Ca^{+2} Salın Kanalı (ya da Ryanodine reseptörü)

Memelilerin kardiyak hücrelerinde, aksiyon potansiyel sırasında salınan Ca^{+2} 'un depolandığı yer SR dir. Bu olayda SR da ki Ca^{+2} 'a geçirgen kanallar önemli bir rol oynar. Ayrıca Ca^{+2} salınımı Na^+/Ca^{+2} değiştirici akımı, NSC akımı ve Cl^- akımını da aktive eder, bu akımların hepsi erken ve gecikmeli ard depolarizasyonların (EAD ve GAD) oluşmasında görev alabilir. Ca^{+2} fazlalığında, kanal indirekt olarak fakat önemli bir tetikleyici aktivite oluşturmada görev alır. Kanal spesifik olarak ryanodine ile bloke olur.

Kardiyak hücrelerde, aksiyon potansiyel sırasında Ca^{+2} un içeri akışını takiben $[Ca^{+2}]_i$; lokal artışı kanalın aktivasyonu için tetikleyici rol oynar. Küçük bir kısım SR Ca^{+2} akışı direkt olarak iskelet kasındaki benzer bir şekilde voltaj ile aktive olabilir. Voltaj-bağımlı mekanizmada cAMP varlığı görülür (14). Bu koşullar altında Na^+ kanalı Ca^{+2} 'a geçirgen olabilir (62).

Kardiyak SR kanallarında primer ve en önemli aktivatör sitoplazmik Ca^{+2} 'dur (63).

L-tipi Ca^{+2} kanallar ile Ca^{+2} içe akımı aktivatör Ca^{+2} için önemli kaynaktır. Kontraksiyon sırasında Ca^{+2} salınımı için uyarı L-tipi Ca^{+2} kanalları ile plazma membranından hücreye giren Ca^{+2} ile sağlanır (14, 63). T-tipi kanallar yolu ile ve ters Na^+/Ca^{+2} değiştiricileri yolu ile giren Ca^{+2} dan dolayı salınım olur, ancak önemi az ve yavaştır (64, 65, 66).

Rejeneratif Ca^{+2} salınımı luminal $[Ca^{+2}]$ için önemlidir. Normal koşullar altında, Ca^{+2} salınımı olmaz; salınımdan aksiyon potansiyel sorumludur (14).

2.1.2.2.1.2. İnositol 1,4,5-trifosfat (IP₃) Reseptörü

IP₃'ın rolü düz kas ve uyarılmayan hücrelerde iyi gösterilmiştir (67). Kalpte IP₃ ün oynadığı role ait bulgular ayrıntılıdır. Kardiak hücrelerden IP₃ salınır, IP₃ reseptörleri mevcuttur ve IP₃ Ca^{+2} salınımına yol açar (68):

(1) İnositol 1,4,5-trifosfat plazma membranında değişik (M₂, M₁, P₂, endotelin) reseptörlerin aktivasyonu ile salınır IP₃ salınımı özellikle erken reperfüzyonda belirgindir, bu etki α -reseptörlerin aktivasyonu yoluyla düzenlenir (69).

(2) İnositol 1,4,5-trifosfat reseptörleri immunolokalizasyon ile interkale disk bölgelerinde lokalizedir. Purkinje liflerinde diğer hücrelere göre fazladır.

(3) İnositol 1,4,5-trifosfat Ca^{+2} salınımına yol açar. Kardiak mikrosomlar IP₃ tarafından module edilen kanal aktivitesi gösterir.

IP₃ reseptörü protein kinaz C (PKC), protein kinaz A (PKA) ve Ca/Kalmodulin (CaM) kinaz II, MgATP ve pH ile düzenlenir. α -reseptör stimülasyonunun proaritmik etkisi kadar pozitif inotropik etkisi de IP₃ üretimiyle ilişkili bulunmuştur (14). Aminoglikosid türü antibiyotikler salınımı bloke eder ve ventriküler aritmileri baskılar (70).

2.1.2.2.1.3. SR' da K⁺, Cl⁻ ve H⁺ Kanalları

SR membranında Ca^{+2} salınım kanalları dışında K⁺, Cl⁻ muhtemelen H⁺ kanalları yüksek akımlı yollar oluşturur. Bu kanalların varlığından dolayı, SR membranı yaklaşık sıfır potansiyelde tutulur. Bu yolla, lümenenden sitoplazmaya doğru Ca^{+2} zorlayan büyük bir gradient sağlanır. K⁺, H⁺ ya da Cl⁻ akışı zıt iyonlar gibi Ca^{+2} 'un Ca^{+2} -ATPaz yolu ile aktif alınması kadar pasif salınımını da sağlar (14).

2.1.2.2.1.3.1. H⁺ Kanalı

Kanaldan H⁺ hareketinin olup olmadığı bilinmemektedir, fakat ölçülen elektriksel değişiklikler bir proton akışını göstermiştir. Ca⁺² salınımı sırasında asidifikasyon ve geri alınımı sırasında alkalizasyon bulunmuştur.

2.1.2.2.1. 3.2. K⁺ Kanalı

0 mV a çıkan bir potansiyelde SR membranında bir K⁺ kanalı mevcuttur. Kanalın kinetiği çok yavaştır (14).

2.1.2.2.1.3.3. Cl⁻ Kanalı

Kardiyak SR de, 0 mV da bir Cl⁻ kanalı açık durur. Voltaj bağımlılığı azdır ya da hiç yoktur. Tek kanalın kapı açılıp kapanması 2 açık zaman ve 2 kapalı zamanla karakterizedir (71).

2.1.2.2.2. Mitokondriyal Kanallar

Mitokondride oksidasyon ile ATP ye substrat olarak enerji akışı olur. Mitokondriyal iç membranın geçirgen olmadığı kabul edilir ve sadece elektronötral taşıyıcılar ve uniporterler ile regüle edilen bir geçirgenlik gösterir, çünkü anahtar reaksiyonlardan biri bir proton gradienti oluşturmak için mevcuttur. Diğer taraftan dış mitokondriyal membranın ATP, ADP, asetil CoA ve diğer metabolitlerin hızlı geçişine izin verdiği uzun süredir kabul edilmiştir. Son yıllarda bu bakış açısı değişmiştir (14).

2.1.2.2.2.1. Dış Mitokondriyal Membran

İki farklı kanal bulunmuştur. Biri katyon selektif olan kanaldır ve fonksiyonu açık değildir. Muhtemelen protein taşınmasında rol oynayabilir, çünkü hedef peptidler ile bloke edilir. İkinci tip, anyonlara ve daha spesifik olarak ADP ve ATP ye geçirgen bir voltaj bağımlı kanaldır. İç membranda adenin nükleotid taşıyıcıları ile beraber, sitoplazma ve mitokondriyal matriks arasında ATP ve ADP karşılıklı geçişlerinde önemli bir rol oynar (14).

2.1.2.2.2. İç Membran

Mitoplastlar dış zarları kazınmış mitokondrilerdir. Mitoplastlarda iç membranın geçirgenliğine yönelik *patch-clamp* metodunun uygulanması ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Fizyolojik koşullar altında, iç membranın geçirgenliği azdır. Ancak iskemik koşullarda bu geçirgen bariyerler büyük kanalların açılmasıyla zayıflayabilir ya da ortadan kaybolabilir. Beş farklı kanal gösterilmiştir: (1) Multipl iletken kanal (MCC) ya da büyük katyonlar ve anyonlara geçirgen olan mega-kanal, (2) ATP bağımlı K⁺ kanalı, (3) 107-pS hafif anyon selektif kanal, mCS kanal olarakta bilinir ve iki kanal matriks kısmı alkali durumlarda aktive olur, (4) Katyon-seçici 15-pS kanal, ve (5) Anyon-seçici 45-pS kanal (14).

2.1.2.2.2.1. Mitokondriyal Geçirgen Geçiş Poru

Normal fizyolojik koşullar altında, yüksek [ATP] ve düşük [Ca⁺²] ve negatif mitokondriyal elektriksel potansiyeli temin etmek için gereklidir (72). Kanal mikromolar düzeyde intramitokondriyal [Ca⁺²] ile düşük [ATP] nin varlığında aktive olur. Aktivasyon uzun-zincir açıl CoA, pro-oksidantlar ve dithiol oksidatifler (disulfid redüksiyonu ile geri çevirirler), düşük [ATP] ve yüksek [Ca⁺²] ile birlikte yüksek O₂ derişiminde kolaylaşır; H⁺, Mg⁺² ve siklosporin gibi immün baskılayıcı ilaçlar ile inhibisyon olur (14).

2.1.2.2.2.2. ATP-Bağımlı K⁺ Kanalı

ATP bağımlı K⁺ kanalı birçok hücre plazma membranında yer alan kanala benzer (73). Aynı geçirgenlik ve aktivasyon modeline sahiptir. Kritik bir [ATP] konsantrasyonun altında açılır. Ayrıca glibenklamid ile bloke olur ve K⁺ kanal açıcılara hassastır. Açılma PKC-bağımlı fosforilasyon ile sağlanır (74). Kardiyak-plazma membran kanalının tersine, diazoksida hassas ve pankreatik kanallara daha fazla benzemektedir (75). Mitokondrideki rolü açık değildir; aktivasyonu mitokondriyal elektriksel potansiyeli stabilize eder ve mega-kanalın aktivasyonundan kaçındırır. Önkoşullamada ve hacim regülasyonunda rolü

olduğu gösterilmiştir; iskemi sırasında, mitokondriler şişer ve büyük-akım kanallarının açılması maddelerin ve suyun dışa akışını indükleyebilir ve hacmi azaltabilir (74, 75, 76, 77, 78).

2.1.2.2.2.3. 107-pS Anyon Kanal Yada mCS Kanal

107-pS anyon kanal yada mCS kanal anyon seçicidir. Matriksin pozitif potansiyelinde aktive olur, üstel olarak pozitiviteyle artar. pH'ya sensitif değildir, fakat oksidatif ayrışmaya sebep olanlar ile inhibe olur (14).

2.1.2.2.2.4. Alkalın-Aktive Olan Kanallar

Bir mitoplast preperasyonunun matriks kısmı çok alkalın bir çözeltiye maruz bırakıldığı zaman, iki kanalın aktivitesi gözlemlenebilir: 15 pS için iletkenlik gösteren bir katyon seçici kanal ve 45 pS için iletkenlik gösteren bir anyon seçici kanal. Burada kanalların görevleri bilinmemektedir (14).

2.1.2.2.3. Gap Junction Kanalları

Gap junctionlar kardiyak dokuda sinsitial iletiden sorumludur. Yüksek iletkenlik ve geçirgenlikleri aksiyon potansiyelin hızlı iletisine ve hücreden hücreye 1,2 kDa kadar olan (K^+ , Na^+ , Ca^{+2} , cAMP, cGMP, IP_3) moleküller ve metabolitlerin hızlı akışına izin verir. Köpek kalbinde, her ventrikül hücresi diğer on bir hücreye gap junctionlar yoluyla bağlıdır. Normal bir aksiyon potansiyelin iletisinin bir çift hücrede gerçekleşmesi için yaklaşık 35 gap kanal yeterli gözükmektedir (12, 14). Daha fazla olduğunda bu daha iyi olur. Gap junctionları normal kalite dağılımın non-uniform yada anizotropiktir (79). Gap kanalların neredeyse tamamı interkale disk bölgelerinde bulunur. Büyük interkale diskler hücre sonlarında, küçükler ise uzunlamasına yer alırlar. Az miktarda gap junctionlar SA-atriyum birleşme yeri ve Purkinje-kas birleşme yerinde yer alırlar. Bu gözlemler iletinin neden transfer olduğu yada SA ile atriyum arasında, Purkinje sistem ile ventrikül kas

arasında iletinin neden kritik olarak azaldığını açıklar. Kültürde, junctionların sayısı azdır, ve aksiyon potansiyelin iletisi daha yavaştır (14).

2.1.2.2. 3. 1. Gap Junctionların Oluşum Ve Yapısal İncelenmesi

Gap junctionlar iki hücrenin fiziksel temasının oluşturduğu güç ile indüklenebilir (12, 80). Hücreden hücreye kanal oluşturan plazma membranında olan haberciler hızla birlikteliği oluşturabilirler. Değişik biofiziksel teknikler ile yapılan analizler kanalların oluşturduğu gap junctionların iki hemikanaldan yada conneksondan meydana geldiğini göstermiştir (12, 81). Her hemikanal altı polipeptid subüniteden yada conneksinden oluşur. Kalpte, üç tip connexin bildirilmiştir: Cx 40, Cx 43 ve Cx 45 (12, 82). Farklı dağılımlar gösterirler ve fonksiyonel karakteristikleri farklıdır. İnsan kalp hücrelerinde en fazla connexin 43 bulunur. Connexin 40 atriya, nodal doku ve Purkinje sisteminde ayrıcalıklı olarak bulunur (12, 83).

Gap junctionların oluşumunda, hemikanallar her biri diğeri için ligandlar olarak davranır. Bu aktivasyonun önemi, connexin molekülünün ekstrasellüler kısmında 6 sistein varlığındadır. Kanalin açılma ve kapanması sisteinlerin disulfid haline değişiminde fonksiyon görür (12, 14).

Gap junction açılma ve kapanması iki önemli mekanizma olan kimyasal ve voltaj kapı açılma mekanizmaları ile olur.

2.1.2.2. 3. 1.1. Kimyasal Ve Voltaj Kapı Açılma

2.1.2.2. 3. 1.1.1. Protonlar Ve Kalsiyum İyonları İle Kimyasal Kapı Açılma

Yavaş bir olaydır. Protonlar gap kanalları kapatır. Mekanizma bir top-reseptör inaktivasyonuna göre çalışır; protonlar reseptör kısmının pozitif yükünü artırır ve COOH terminal kısmının negatif yüklü topunun bağlanmasına ve kanalın ağzınının kapanmasına izin verir. Zincirin COOH terminalindeki bir delasyon pH sensitivitesinde belirgin bir azalmaya yol açar. Muhtemelen Cx 43 gap aralığının reseptör kısmı gibi çalışan M2 ve M3

arasındaki sitoplazmik halkada histidin rezidüleri mevcut olabilir ve protonlar ile titre edilebilir (81). Bu halkada kritik pozisyonlarda pozitif yüklerin varlığı kanalın kapanmasına yol açar.

[Ca⁺²] artışı da ayrıca toplanan aralık iletkenliğini azaltır. [Ca⁺²] de büyük artışlar iskemi süresinde olur ve birlikteliği indükleyebilir (14).

2.1.2.2. 3. 1.1.2. Voltaj İle Kapı Açılma

Hızlı bir olaydır. Kardiyak hücrelerde gap junction kanalları transjunctional voltaja duyarlıdır. Voltaj gradienti uygulandığında, ani akım-voltaj ilişkisi doğrusaldır. Zamanla, kanallar kapanır ve ilişki S tipi olur. Böyle bir olay iskemi süresince ayrışmayı artırır. İskemide kanalların sayısında azalma görülebilir (14).

2.2. Kalp İskemi Ve Reperfüzyonu

2.2.1. Kalp İskemi-Reperfüzyonunda Biyokimyasal Değişiklikler

Miyokardiyal iskemi, birbirine bağımlı veya birbirinden bağımsız bir çok fizyolojik ve patolojik sürecin sonucu olarak ortaya çıkabilir. İskemi, ateroskleroz veya tromboembolilerin bir sonucu olarak ortaya çıkabildiği gibi, perkütanöz transluminal koroner anjioplasti (PTCA), koroner arter bypass veya transplantasyon gibi cerrahi işlemler sırasında da oluşabilir. İskeminin sebebi ne olursa olsun sonuçları daima aynıdır: miyokardiyal yeterli oksijen ve metabolizmayı devam ettirmeye yetecek miktarda substrat ulaşamaz.

İskeminin ilk dakikalarında glikolitik yol büyük ölçüde stimüle olur, fakat daha sonra aşama aşama, doku asidozunun gelişmesi, NADH, sitrat ve laktat birikmesi sonucu glikolitik yol inhibe olur (84, 85). Oksidatif fosforilasyon için gerekli oksijen yeterince sağlanamadığı için, glikoliz sonucu oluşan piruvat krebs döngüsüne gireceği yerde laktata dönüşür. Bunun sebebi, glikolizin yürütmesi için gliseraldehit-3-fosfatın gliseraldehit-fosfat dehidrogenaz enzimi ile 1,3-difosfogliserata çevrilmesi basamağında mutlaka

gerekli olan NAD'nin ancak piruvat→laktat dönüşümünden elde edilebilmesidir. Anaerobik yolla üretilen ATP, dokunun ihtiyacını karşılayacak miktarda değildir. İskeminin devam etmesi ile birlikte doku ATP düzeyi düşer ve yeni durum hücreyi hasara uğratacak bir seri olayın başlamasına yol açar. Bunların en önemlisi, hücrenin membran iyon dengesini koruma yeteneğini kaybetmesidir. Çünkü hücre içinde üretilen enerjinin %70 gibi bir oranı membran transport sistemlerinde, iyon kanallarında ve membran için gerekli yapı maddelerinin endoplazmik retikulum ve golgi cisminde sentezinde kullanılmaktadır. Bunun sonunda sodyum iskemik hücrenin içine girer, daha sonra reperfüzyon olursa bu sodyumun kalsiyum ile yer değiştirdiğine inanılır. Reperfüzyon ile hızla Ca^{+2} hücre içine girer. $Na^{+}-Ca^{+2}$ değişimi, reperfüze edilmiş alandaki hücreye Ca^{+2} girişini açıklayan mekanizmalardan sadece birisidir. Kalsiyumun hücre içinde artışı; çıkışın azalmasına değil girişin artmasına bağlıdır (86). Hücrede serbest kalsiyumdaki artış, hücrenin iyon dengesinde bozulmaya yol açar. Kalsiyum kolayca mitokondriye alınır. Mitokondri kalsiyum ile aşırı yüklenince ATP üretemez ve sonunda parçalanır (87). Kalsiyum varlığında hücrenin proteaz ve fosfolipazlarının çoğu aktive olur; reperfüzyondan sonra hücrenin daha ileri hasarlanmasının sebebi bu litik enzimlerin aktivasyonudur. Fosfolipazların aktivasyonu hücre membranında hasar oluşturur: Serbest yağ asitlerinin ve lizofosfolipitlerin salınmasına yol açar. Bu bileşikler tek başına toksik değildirler, araşidonik asit metabolizmasını başlatabilirler (88). Sonuçta reperfüzyon ile birlikte radikal türevleri ve diğer sitotoksik ürünlerin üretilmesi söz konusu olabilir (89). Proteazların aktivasyonu hücre iskeletinin sindirimine ve enzim sistemlerinde değişikliklere yol açar. Sonuçta reperfüzyon üzerine bunlar serbest radikal türlerini oluşturur (90).

İskemide meydana gelen olaylara aslında reperfüzyonda hasarı başlatacak ve hızlandıracak bir hazırlık aşaması olarak bakılabilir. McCord, iskemi aşamasındaki olayları, reperfüzyon aşamasındaki hasarın öncüsü olarak tariflemektedir (91).

2.2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Endojen Oksidan Ve Antioksidanların Rolü

Miyokardiyal reperfüzyon esnasında serbest radikallerin rolü konusundaki ilk araştırmalar esas olarak indirekt metotlara dayanmaktadır. Serbest radikallerin miyokard reperfüzyon hasarındaki rolünü anlamadan önce miyokard reperfüzyonunda hangi serbest radikal türleri ile bu hasar olmaktadır, bunu anlamak önemlidir. Şimdilerde yaygın olarak serbest radikallerin reperfüzyon esnasında üretildiğine inanılsa da serbest radikallerin gerçek kaynağı tartışmalıdır.

Reperfüzyon esnasında meydana gelen bir çok olaylardan birisi de fosfolipazların kalsiyum-bağımlı aktivasyonudur (90). Bu enzimlerin aktivitesi ile araşidonik asit başta olmak üzere membran yağ asitleri açığa çıkar (90). Siklooksijenaz ve lipooksijenazlarla araşidonik asidin metabolize edilmesi sonucu hidroksil radikalının ve ara ürün olarak da peroksi bileşiklerinin üretildiği gözlenmiştir. Bunların ikisi de reperfüzyon üzerine doku hasarını hızlandırır (89). Araşidonik asit enzimatik oksidasyon ile de metabolize edilebilir (90). Spesifik lipooksijenazlarla yapılan bu metabolik yıkım ile mono- ve dihidroperoksi yağ asitleri üretilir (92). Hidroperoksi yağ asitleri olarak adlandırılan bu yapılar iki ayrı mekanizma ile doku hasarı yapabilir:

(1) Bütün hidroperoksi asitler, peroksitler gibi hareket ederler: geçiş metal iyon kompleksleri ile reaksiyona girerek hidroperoksi radikalleri veya hidroksil radikallerini oluştururlar. Her ikisi de yeniden oksijenlenme esnasında daha ileri doku hasarını başlatma yeteneğine sahiptir (93).

(2) Diğer bir çok araşidonik asit metabolitleri gibi hidroperoksi yağ asitleri ikinci haberciler olarak görev yapabilirler ve hem inflamatuvar hem de immün cevapları modüle edebilirler. Her iki durum da reperfüzyon aracılı hasarda önemli bir rol oynayabilir (94).

İskemik miyokard dokusunun tekrar reperfüzyonundan sonra inflamatuvar sürecin bir sonucu olarak aktive olmuş nötrofiller reperfüze dokuya invaze olurlar (95). Nötrofillerin ve diğer fagositik hücrelerin bakterisidal etkisi, bu hücrelerin süperoksit üretimine dayanmaktadır. Lökotrienler, kemotaktik peptitler ve mekanik bozulmaların hepsi nötrofiller ve makrofajları aktive etmeye yardımcı olurlar. Aktive olmuş nötrofiller membran bağımlı bir NADPH oksidaz tarafından süperoksit üretir. Respiratuvar patlama esnasında bu hücreler tarafından %70-90 arasında değişen oranlarda oksijen tüketimi, süperoksit üretiminde kullanılır (96). Nötrofiller tarafından üretilen hidrojenperoksitin hepsi süperoksitin dismutasyonu ile gerçekleştirilir. Çalışmalar, aktive olmuş nötrofillerin hidroksil radikali üretebileceğini göstermiştir. Bu radikalın Fenton benzeri bir reaksiyon ile üretildiğine inanılmaktadır (97). Hipoklorat (HOCl) da nötrofiller tarafından bu esnada üretilir. Bu ajan ve yerine göre oluşan diğer ajanlar (hipoyodat, hipobromat), nötrofillerin bakterisidal aktivitelerini yükselterek biyolojik önemli moleküllerin çoğunu okside etmelerini sağlar. Hipoklorik asit, miyeloperoksidaz enziminin katalizi ile hidrojen peroksitten klor iyonları varlığında oluşur. Bu reaksiyon, miyeloperoksidaz içeren lizozomal veziküllerin füzyonundan sonra nötrofillerin fagositik vakuolünde gerçekleşir. Reperfüzyondan sonra meydana gelen serbest radikal üretimine aktive olmuş nötrofillerin katkıda bulunup bulunmaması, nötrofillerin iskemik dokuya ne kadar hızlı birikme gösterdiğine bağlıdır. Ronson bir köpek modelinde infarkte miyokardium sahasında 24 saat içinde nötrofillerin 17 kat artış gösterdiğini bulmuştur (98). 5 saatlik süre, dokuda irreversibl hasarın görülmesi için yeterli bir süredir. Nötrofiller yüksek konsantrasyonda serbest radikal üretebilmekle beraber asıl önemli olan nokta bunların iskemi-

reperfüzyona maruz kalmış dokuya ulaşma zamanlarıdır. Nötrofiller daima infarkte miyokard dokusu ile birlikte düşünülmüş olmasına rağmen, buradaki rolünün sebep mi sonuç mu olduğu henüz net değildir. Nötrofillerin reperfüzyon-bağımlı serbest radikal üretimine katkıda bulunup bulunmadığını ölçmek oldukça zordur. Yapılan bazı çalışmalarda, nötrofil olmayan *in vitro* ortamlarda da reperfüzyon bağımlı aritmilerin ortaya çıkması, aktive olmuş nötrofillerin, reperfüzyon-bağımlı miyokard hasarında ki rollerini sorgulanır hale getirmiştir (99).

İskemi süresinde ve özellikle reperfüzyonda oksidatif stres, fazla radikal üretiminden, koruyucu enzimlerin (SOD, CAT ve Glutasyon peroksidaz) ve süpürücülerin eksikliğinden dolayı ortaya çıkar. Radikaller proteinlere (sülfidril oksidasyonu) saldırır, lipid peroksidasyonuna yol açar, sonuçta sızdırma akımı (I_{NSC}) artar, K^+ akımlarının çoğu bloke olur, SR'da Ca^{+2} salınan kanallar ve özellikle mitokondriyal mega-kanallar aktive olur. Elektrofizyolojik olarak, aksiyon potansiyelinin *upstroke*'u ve ileti hızı azalır ve plato uzar. İkinci aşamada, hücre repolarize olabilir, tekrar çok kısa aksiyon potansiyel gösterir (I_{KATP} aktivasyonu). Sonuç aşamasında, hücre uyarılamamaya doğru gider ve kontraktür oluşumu gözlenir (14).

İskemi sırasında amfifiller (Lizofosfoliseridler) ve yağ asitleri (araşidonik asit dahil) ve metabolitleri plazma membranında, gap junctionta, ve SR ve mitokondri gibi intrasellüler membranlarda birikir. Amfifiller ve yağ asitleri direkt olarak kanal proteinleri ile kanal proteinlerinin çevresinde yer alan fosfolipitler ile etkileşebilir ya da membran akışkanlığını değiştirebilir. Amfifiller istirahat potansiyelinde (hızlı Na^+ akımı ve I_{NSC}) içe akımı artırır, K^+ kanallarınca (I_{KI} ve I_{ATP}) olan dışa akımı aynı anda azaltabilir. Na^+/Ca^{+2} değiştiricisi ve $Na^{+2}-K^+$ pompası gibi taşıyıcıları inhibe eder. Buna ters olarak, FA I_{KACH} , I_{Kur} ve I_{KAA} gibi dışa akımları aktive eder ve Na^+/Ca^{+2} değiştiricisini aktive eder. Aynı

anda aktive olan içe ve dışa akımlar K^+ kaybını ve Ca^{+2} fazlalığını körükler. Hücrelerin birlikteliğinin bozulmasıyla beraber bu sonuçlar aritmilerin oluşmasına yol açar (14).

2.2.3. İskemi- Reperfüzyonda Katekolaminler

Koroner dolaşımın obstrüksiyonu anında sistemik dolaşıma katekolamin salınımı olur, obstrüksiyonun başlamasından on dakika sonra sinir sonlarında reuptake mekanizmasının bloke edilmesi ile lokal bir salınım gerçekleşir. Aynı zamanda, plazma membranında α ve β reseptörlerin sayısı artar. Hem α hem de β reseptörleri kompleks yollarla etkiledikleri kanallarla birliktelik oluştururlar: Bu birliktelikler direkt G proteini ile ya da indirekt olarak bir kısım fosfolipazlarla (α reseptörler) ya da adenilat siklaz (β reseptörler) ile olur. α reseptör uyarımı bazı akımların artışına yol açar ancak K^+ akımını, gap junction iletkenliğini ve Na^+/Ca^{+2} , Na^+/K^+ ve Na^+/H^+ değiştircilerin uyarılmasında azalmaya yol açar. Hücre düzeyinde, dinlenme potansiyeli depolarize ya da hiperpolarize olabilir; bir çok preparatda aksiyon potansiyeli uzar. Gecikmeli ard depolarizasyonlar içe Ca^{+2} sızıntısı arttığı zaman artar; Na^+-K^+ pompasının inhibisyonunun bloke edilmesi ile indüklendiği zaman gecikmeli ard depolarizasyonlar inhibe olabilir. β reseptör aktivasyonu bir çok plazma membran akımlarının (içe ve dışa yönelen akımları), gap junction kanalının, ve SR Ca^{+2} salınım kanalının uyarılmaları ile sonuçlanır. Elektrofizyolojik olarak, β reseptör aktivasyonu pacemaker (uyarı üretici) aktivitesini artırır. Nodal iletinin artışı, aksiyon potansiyelin platosunda yükselme ve kısalma görülmesine yol açar. Aşırı uyarılma Ca^{+2} fazlalaşmasıyla ve aktivitesinin artmasıyla sonuçlanabilir (14).

2.2.4. İskemi-Reperfüzyonda Ekstrasellüler ATP, Adenosin ve Asetilkolin

(Ach)

Metabolik inhibisyon süresince ATP salınımı artar. Ekstrasellüler alanda hızlı metabolizmasından dolayı, fonksiyonel önemi azalmıştır. Reseptör ile efektör arasındaki

esleşme (coupling) ile ilgili bilgi yetersizdir. Adenosine S³-triphosphate I_{NSC} ve I_{Cl} stimule eder, I_{CaT} kolaylaştırır ve bazı K⁺ akımlarını (I_{Kach} , I_{Ks} ve I_{KATP}) aktive eder. Aksiyon potansiyelinin kısılması kadar uzaması da bildirilmiştir. İskemi sırasında kısalma önemli olabilmektedir.

İskemi sırasında vagal reflekslerle birlikte adenosin salınımı da artar. A₁ reseptörleri (adenosin) ve M₂ reseptörleri (ACh) direkt olarak G proteini ile ya da indirekt olarak PLC, NO sentaz ve adenilat siklaz aktivitelerinde olan değişiklikler yoluyla efektörlerle birleşirler. Genelde, etkiler β reseptör uyarısına zıttır. Daha spesifik olarak, I_{Ca} , I_{Cl} , I_f ve gap junction iletisi negatif olarak etkilenir, ancak aktivasyon I_{IAch} ve I_{KATP} ler için görülür. Elektrofizyolojik olarak, adenosin ve ACh hiperpolarizasyona, aksiyon potansiyelinin kısılmasına, diastolik depolarizasyonun yavaşlamasına sebep olurlar (14).

2.2.5. İskemi-Reperfüzyonda Gerilme Ve Hacim Değişiklikleri

Gerilme iki şekilde olur: Tek yönlü değişiklik ile olan gerilimden dolayı ya da osmotik değişikliklerin yol açtığı çok yönlü değişikliklerden dolayı meydana gelen hacim artışı ile olandır. Gerilme enzimlerin aktivasyonuna ve gerilmeye hassas kanalların uyarılarak açılmasının yol açar. Dışa K⁺ akımları kadar içe akımlar da (I_{NSC} , I_{Cl} , I_{CaL}) artar. Negatif membran potansiyelinde, içe doğru akımlar depolarizasyona yol açar; ekstrasistoller için eşik değer azalır. Daha pozitif seviyelerde, dışa akım mevcuttur; aksiyon potansiyelinin platosu genelde dağılımlı bir artış ile kısılır. Bu değişiklikler aritmilere yol açar (14).

2.2.6. İskemi-Reperfüzyonda İyon Değişiklikleri

2.2.6.1. İskemi İle $[K^+]_d$ Artar

2.2.6.1.1. Ekstrasellüler K⁺ Birikimi

Aerobik koşullar altında, $[K^+]_i$ yüksek ve $[K^+]_d$ düşüktür. K⁺ un pasif dışarı akımı, K⁺ un Na⁺-K⁺ pompasıyla aktif olarak içeri alınması ile dengelenir. İskemi sırasında, bu

dinamik denge bozulur ve eksternal K^+ birikimi olur. İskemi süresince K^+ kaybı üç fazda olur. Koroner arterin oklüzyonundan sonra 20 saniye içinde ekstrasellüler alanda hızlı bir K^+ birikimi olur, 3-10 dakika sonra bir platoya ulaşır ve 15-30 dakika arasında bunu üçüncü yavaş artışın başlaması takip eder (100).

Reperfüzyonda, $[K^+]_d$ tamamen düzelir ve bu düzelme ilk artış fazında ya da platoda hızlı olur. $[K^+]_o$ geçici olarak kontrol seviyesinin altına da düşebilir. Eğer reperfüzyon 30 dakika iskemiden sonra başlarsa düzelme olmaz ve $[K^+]_d$ yüksek kalır. Bu koşullar altında, kasın dinlenme gerilimi artabilir ve genelde hiperkontraktüre kayabilir. Aynı zamanda, intrasellüler enzimler açığa çıkar, bu olay membranın geçirgenliğinde irreversibl bir artış olduğunun bulgusudur (14).

İskemik koşullar Na^+-K^+ pompa aktivitesini muhtemelen inhibe eder: Yapılan çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin pompa aktivitesini azalttığı bulunmuştur (101). İskemi şartlarında pompanın çalışması için gerekli enerji yetersizdir.

2.2.6.1.2. $[K^+]_D$ Artışının Kanallar Ve Taşıyıcılar Üzerine Etkisi

Akut iskemi sırasında depolarizasyonun boyutu bir parsiyel ya da komple hızlı Na^+ kanalı, T-tip Ca^{+2} kanalı, I_{to} ve I_{kur} inaktivasyonu için sorumludur. Bu akımların inaktivasyonunun düzelmesi yavaştır ve sonuç, aksiyon potansiyelin iletisinin yavaşlamasıdır.

2.2.6.1.3. $[K^+]_d$ Elektrofizyolojik Karakterler Üzerine Etkisi

Multisellüler seviyede, $[K^+]_d$ artışı ile olan değişiklikler hücrenin depolarize olmasına ve aksiyon potansiyelin amplitüdünün azalması, hızı ve süresinin artmasına yol açacaktır. Depolarizasyona zıt olan Na^+ iletkenliğinin inaktivasyonu aksiyon potansiyel amplitüdünde azalma ve hızında artıştan ve uyarılabilirlikte azalmadan sorumludur. Ancak geçici olarak uyarılabilme artabilir, bunun nedeni eşik değere yakın bir dinlenme potansiyeline ulaşmasıdır. Depolarizasyon seviyesinde, inaktivasyondan düzelme

yavaştır; artan $[K^+]_d$ varlığında postrepolarizasyon refraktör dönemlerde uzama vardır. Özellikle relatif refraktör dönemde iletkenlik hızı azalmış ve yavaşlamıştır. Aksiyon potansiyelin kısalma sebebi temelde artan I_{KI} ve I_{Kr} iletkenliklerine daha az olarak azalan Na^+ iletkenliğinin eklenmesidir. Uyarılabilirlikte, refraktör dönemlerde ve iletkenlikte olan değişiklikler kısalan aksiyon potansiyel ile birlikte *reentry* (yeniden giren) aritmilerin oluşmasında rol alırlar (14).

2.2.6.2. İntrasellüler Ve Ekstrasellüler Asidoz

Aerobik koşullar altında, protonların sürekli üretimi CO_2 artışı, Na^+/H^+ değiştiriciler ve $Na^+-HCO_3^-$ kotransporterler ile kompanse edilir. İskemi sırasında, pH_i ve pH_d da bir pH ünitesi ya da daha fazla bir düşüş olur. Düşüş proton üretiminin artmasından ve protonun ortamdaki uzaklaştırılmasının azalmasından dolayıdır. Plazma membran kanallarından KATP ve KAA hariç bir çoğunu, gap-junction kanalları, SR Ca^{+2} salan kanal, Na^+/Ca^{+2} değiştiricisi, bazıları ekstrasellüler, bazıları intrasellüler asidozdan dolayı inhibe olurlar. Sonuçta aksiyon potansiyelin iletisi yavaşlar, uyarılabilirlik azalır ve aksiyon potansiyel uzar. Reperfüzyon VEB'lerinin oluşmasını asidozun etkisiyle de olur. Tüm asidoz değişiklikleri proaritmiktir ve bu bulgu asidozda neden ventriküler fibrilasyonu eşik değerinin azaldığını açıklayabilir (14).

2.2.6.3. İntrasellüler $[Na^+]$ Birikimi

İskemi süresince, $[Na^+]_i$ 10 mM'dan 20 mM'a 20-30 dakika sonra ulaşır. Na^+/K^+ pompasının radikaller ile inhibe olmasından $[Na^+]_i$ birikimi artar. Reperfüzyonda, bu etkiler hiperpolarizasyon ile sonuçlanır ve düşük $[K^+]_d$ ile birleşen kısa aksiyon potansiyelleri vardır. Böylece aritmilerin oluşması için uygun koşul sağlanmış olur.

Kanallar ve taşıyıcılarda olan değişiklikler (KATP ve temel K^+ kanalları hariç), membranın hiperpolarize olmasına yol açar, ancak etkiler reperfüzyonda daha belirgin hale gelir (14).

2.2.6.4. İntrasellüler $[Ca^{+2}]$ Dağılımında Değişiklikler

Ca^{+2} akımının Ca^{+2} ile indüklenen inaktivasyonun artışı, geçici Ca^{+2} ile aktive olan Cl^- akımının artışı ve geciken iki K^+ akımı aksiyon potansiyelin kısalmasına yol açacaktır.

$[Ca^{+2}]$ sitoplazmada, SR ve mitokondride farklıdır. İskeminin ilk dakikalarında sistolik $[Ca^{+2}]$ geçici olarak artabilmesine karşın, diastolik $[Ca^{+2}]$ ancak 10-20 dak. gecikme sonunda artar. İskeminin başlangıcında mitokondride $[Ca^{+2}]$ sitozolden fazla ise mitokondriden bir başlangıç salınımı olabilir ve sitozolik seviyede $[Ca^{+2}]$ değişiklikler bunu takip eder. Sitozolik $[Ca^{+2}]$ artışın sebebi yetersiz ekstrasellüler alana Ca^{+2} un Na^+/Ca^{+2} değiştiricisi ile atımı SR un yetersiz geri alımı ve içeriye artan akış ile bağlanma noktalarından protonların ayrılmalarıdır. Sitozolik $[Ca^{+2}]$ da artış bir kısım kanal, taşıyıcı ve enzimleri (I_{NSC} , I_{Cl} ve I_{NaCa}) aktive eder ve diğerlerini düzenler (I_{CaL} , I_{CaT} , I_{Ks} , I_{Kr} , I_f , $I_{Na,K}$ ve gap junction kanalları). Sonuçta ventriküler ekstra atımlar (VEB) ve aritmiler ortaya çıkar. Eğer reperfüzyon olursa, Ca^{+2} un ekstrasellüler alana ve SR içine uzaklaştırılması yetersizdir. O_2 temini sağlanıp, mitokondriyal potansiyel düzeltilse, Ca^{+2} un mitokondri tarafından masif absorpsiyonu olabilir ve mitokondriyal mega-kanalların aktive olması ile sonuçlanır böylece irreversible uyarılar oluşur (14).

2.2.6.5. İntrasellüler $[Mg^{+2}]$ Değişiklikler

Sitoplazma ve mitokondride serbest $[Mg^{+2}]$ tespit edilmiştir. İskemi sırasında serbest konsantrasyonda artış olur. Bunun sebebi Mg^{+2} a bağlı ATP nin hidrolizi sonucu kısmen Mg^{+2} -ATPaz dan ayrılarak ve Na^+/Mg^{+2} değiştiricisinden ayrılarak olur. Mg^{+2} fosforilasyon ile kanal ve taşıyıcıları etkiler veya kanalların girişini kapatır (Na^{+2} ve Ca^{+2} kanallar) veya K^+ kanallarında içeri düzeltme yapar. Mg^{+2} multisellüler seviyede bir stabilize edici olarak düşünülebilir (14).

2.2.7. İskemi Reperfüzyonda Elektriksel Değişiklikler Ve Aritmiler

2.2.7.1. Sellüler Ve Multisellüler Seviyelerde Elektrofizyolojik Değişiklikler

Koroner dolaşımın kesilmesi dinlenme membran potansiyelinin depolarizasyonuna ve aksiyon potansiyel süresinin kışalmasına yol açar, ancak efektif refraktör döneminde uzamaya neden olur. Uyarılabilirlik geçici olarak artabilir ancak 2-3 dakika sonra azalır. Değişiklikler tek formda izlenir. Elektrokardiografik seviyede, TQ ve ST segmentleri yer değiştirir ve T dalgaları ters döner. Artan $[K^+]_d$ ve içeri akım varlığı depolarizasyonun sebepleri olabilir. Aksiyon potansiyelin kışalmasının sebebi K^+ ve Cl^- kanallarından dışarı akımın artmasıdır. Sınır kesiminde, kışalma bir hasar akımının oluşması ile indüklenir. Etkin refraktör periyodunun uzaması Na^+ kanallarının inaktivasyonunun düzelmesinin yavaş olmasına bağlıdır. Azalma ile devam eden artmış uyarılabilirlik depolarizasyon boyutu ile ilişkilidir. Uyarılabilirliğin kısmen düzelmesi katekolamin salınımı ile açıklanmıştır, ancak gap junction iletkenliğinde bir düşüşte iletimin güvenlik faktöründe bir artıştan sorumlu olabilir. İletimin bozulması Na^+ iletkenliğinde bir düşüşe ve sonra longitudinal resistansta bir artışa bağlıdır. Reperfüzyonda $[K^+]_d$ azlığına rağmen aksiyon potansiyelin kışalması Na^+ pompa akımında aşırı bir uyarılma ile açıklanır. Aksiyon potansiyel süreleri artan bir dağılım gösterir ve Ca^{+2} fazlalığı daha belirgin hale gelebilir (14).

2.2.7.2. İskemi-Reperfüzyonda Gözlemlenen Aritmiler

2.2.7.2.1. Aritmilerin Temel Mekanizmaları

2.2.7.2.1.1. SA Otomatisitesi :

SA pacemaker aktivite bozulabilir ve depolarizasyon hızında anormal kışalma ya da uzama ile sonuçlanabilir. İskemide, kalp hızında olan değişiklikler genellikle aritmilerin başlamasında öncüdür. Bu değişiklikler çoğunlukla nörojenik (parasempatik

ve sempatik sinir sistemi) ya da hormonal uyarılara bağlıdır, fakat metabolik inhibisyondan dolayı iyonik akımların direkt modülasyonu da muhtemel sebeptir (14).

2.2.7.2.1.2. SA Dışında Otomatisite

AV, Purkinje, atriyal ve ventriküler hücrelerde otomatik aktivite erken iskemik aritmilerin başlaması ve devamında önemli bir rol oynayabilir. Bir ektopik odağın tüm kalbi uyarmasına gerek olmadığı bilmesi önemlidir. Çoğalma otomatik odağın büyüklüğüne (hücre sayısı ve büyüklüğü) ve komşu hücreler ile eşleşmesine bağlıdır (102). Diğer hücreleri yönlendirme birliktelik iletimlerinin belirli bir sırayla olması muhtemeldir; bu sıra $[K^+]_d$ değişikliği ile yönünü değiştirir.

2.2.7.2.1.3. Tetikleyici Aktivite

Otomatisitenin tersine, tetikleyici aktivite mutlaka gerekli bir eksternal uyarı ile karakterizedir. İki tip tetikleyici aktiviteden bahsedilebilir: Erken ard depolarizasyon (EAD) ve gecikmeli ard depolarizasyon (GAD) (14).

2.2.7.2.1.3.1. Erken Ard depolarizasyon (EAD)

Aksiyon potansiyeli plato ve 3. fazında genelde düz ve regülerdir. Plato ya da final repolarizasyon sırasında erken ard depolarizasyonlar ikincil depolarizasyonlardır (103). İki iyonik mekanizma önemlidir: SR dan Ca^{+2} ikincil bir salınımıyla devam eden L-tipi Ca^{+2} kanal iletkenliğinde gerçek bir rejeneratif artış ya da Na^+/Ca^{+2} değiştirici akımın hızlı bir geçici aktivasyonudur (14).

2.2.7.2.1.3.2. Gecikmeli Ard depolarizasyon (GAD)

Gecikmeli ard depolarizasyon önce gelen bir aksiyon potansiyel ile tetiklenmiş geçici depolarizasyonlardır. Altta yatan karışık bir akımdır ve geçici içe yönelik akım olarak adlandırılır. Na^+ iletkenliğinde bir rejeneratif artış için gerekli eşik düzeye ulaşacak büyüklükte depolarizasyon olduğu zaman, bir ekstrasistol meydana gelir. Uyarı kendi

kendine artan olabilir, sonuçta başarılı aksiyon potansiyeller meydana gelir. Kalsiyum fazlalığı GAD nun oluşumunu destekler.

GAD oluşması repolarizasyondaki membran potansiyelinin seviyesine bağlıdır. GAD ve geçici içe yönelik akımın amplitüdü yaklaşık -60mV da en büyük ve daha pozitif yada negatif seviyelerde daha küçüktür (14).

2.2.7.2.1.4. Reentry

Reentry 'de uyarı yolda ilerler ve yok olmak yerine normal bir uyarı gibi eski uyardığı hücreleri tekrar uyarır (104). Yol mikroskopik ya da makroskopik olarak sabit olabilir (düzenli *reentry*) ya da büyüklük ve lokalizasyonu değişken olabilir (random *reentry*). Yol bir anatomik substrat ile (aurikular ve ventriküler doku arasında, damarların girişinde, Purkinje sistemin bifurkasyon noktasında ve ventriküler duvarın kesişme noktalarında anormal birleşmeler) ya da tamamen fonksiyonel karakterleri ile (daire sel *reentry*, anizotropik *reentry*, spiral dalga *reentry*) belirlenebilir. İki özel durumdan bahsedilebilir:

(1)Yolda belirli bir yerde uyarı üretmek için tek yönlü bir bloğun varlığı ve

(2)Kalan yolda yavaş iletkenli ve kısa refraktör periyodlu bir kombinasyonun varlığı.

Uyarıların dönüşü ve yolculuğun devamı için tek yönlü iletiye ihtiyaç vardır. Böyle bir tek yönlü bloğun farklı yollarının oluşumu literatürde tartışılmıştır. Her aksiyon potansiyeli bir ekstra uyarının indüklenebildiği tek yönlü ileti sırasında kritik bir zaman (ve voltaj) penceresini takip eder. Bu zayıf periyotta uyarılma anterograd yönde iletinin bloke edilmesi ile sonuçlanır, çünkü hücreler halen refraktör dönemdedir, ancak Na^+ iletiminde düzelme retrograd yönde iletiye izin vermeye yetecek kadardır. Aksiyon potansiyel süresinde yayılma tek yönlü ileti oluşması gibi artar (14). Yayılma normalde

transmural yöndedir fakat ayrıca apeks, septum ve serbest duvar arasında ve sağ, sol ventriküller arasında da mevcuttur (105).

Normal koşullarda dahi ileti tek şekilli olmaktan uzaktır. Transvers yönden değil de longitudinal yönde daha hızlıdır; doku anizotropiktir (107). Anizotropinin varlığı tek şekilli bir efektif refraktör periyotta (ERP) dahi *reentry* nin oluşmasından sorumludur.

İskemide, koşullar *reentry* oluşması için uygundur. Erken saniyelerde $[K^+]_d$ artışı ve buna karşı olan depolarizasyon Na^+ kanallarının inaktivasyonuna ve aksiyon potansiyelin upstroke sırasında meydana gelen akımda bir azalmaya yol açar. Membranın resistansı $[K^+]_d$ artışı takiben azalır ve uyarıcı akımın etkinliğini azaltır. İleti hızı düşer. Aksiyon potansiyelinin kısalmasına rağmen, efektif refraktör periyod postrepolarizasyon refraktörün varlığından dolayı daha da uzar. 15 dakikadan sonra diastolik $[Ca^{+2}]$; hızla arttığında, gap junction iletkenliğindeki düşüş belirgin olur. Hücreler eşleşemez, ve *reentry* oluşumu daha olasıdır.

2.2.7.2.2. İskemi Ve Reperfüzyonda Görülen Aritmiler Ve Spesifik Aritmilerin Mekanizmaları

10 dakikadan az iskemik periyodu takiben yapılan reperfüzyonda ortaya çıkan aritmiler ventriküler taşikardi (VT) ve olası ventriküler fibrilasyondur (VF). İskemi ve reperfüzyonu takiben ektopik bir odaktan çıkan ventriküler ektopik atımlar da (VEB) görülebilir. Reperfüzyon süresinde ortaya çıkan VF ler süre ve iskemi sayısına göre değişkenlik gösterir (108).

2-10 dakika iskemilerde daha çoğunlukla taşikardi tipinde aritmiler görülürken; VF ler daha az sıklıkla görülür. Çalışmalar bu aritmilerin *reentry* özelliklerini göstermiştir, iskemik alan da anormal uyarının uzun bir yol ya da bloke olan akım bölgesi etrafında iki dalganın yolculuğu şeklinde olabilir. Aritmilerden önceki dönemde, aktivasyon özellikle subepikardial alanda az, subendokardiumda nispeten daha fazladır.

İki başarılı QRS kompleksi arasında diastolü bağlayan ya da devam ettiren küçük elektriksel aktiviteler sıktır (109). Mekanizma subepikardial alanda yavaş ileti ve mikro reentrylerdir. Taşikardi genelde T dalgâ değişikliği ve derin negatif T dalgalarından sonra gelir. Epikardial gecikme ve VF koroner obstriksiyonun bir trombus ile oluşturulduğu ve α -reseptör uyarısı belirgin olduğu zaman daha sıktır (110). Yayılma normal bir fizyolojik faktördür ancak bir infark ve hipertrofide aksiyon potansiyel sınırında süresi ve efektif refraktör periyottaki büyük fark ile özellikle daha belirgin olur (111). β reseptör uyarısı aksiyon potansiyel ve refraktör periyod üzerinde normal ve iskemik dokularda zıt etkiye sahiptir, efektif refraktör periyodun kısalması normal ancak uzaması hasta hücrelerde görülür.

Reperfüzyon süresinde, hemen ya da erken aritmiler reperfüzyondan sonra birkaç saniye içinde görülür. Reperfüzyon zonunda otomatik bir stimulus ile başlar ve sonradan VT ya da VF in multipl dalga tipi bir *reentry* ile değişir. *Reentry* nin oluşmasında yer alan faktörler (14):

(1) Çok kısa aksiyon potansiyel ve refraktör periyod ile

(2) Yavaş iletkenliktir. İletkenlik normalden yavaş kalır, bunun sebebi gap iletisinde negatif etkisi olan artmış $[Ca^{+2}]_i$ ile birlikte büyük hiperpolarizasyondur. Tek yönlü ileti $[K^+]_d$ da, aksiyon potansiyel süresinde ve efektif refraktör periyotta belirgin heterojenlik ile belirgin hale gelir (108).

Reperfüzyon zonunda ekstra uyarılar meydana gelir. Başından sonuna aynı seviyede olmayan VT vakalarının %75 reperfüzyon zonu sınırında subendokardiumda meydana gelirler. Bir kısım gözlemler erken ard' depolarizasyon ya da geç ard depolarizasyonun muhtemelen görülebildiğini göstermiştir. Kedi kalbinde, reperfüzyonda EAD' ler ölçülmüş, ve reperfüzyon aritmilerinin %62' isinde olduğu görülmüştür (112). İzole hücreler, belli bir süre anoksi yada metabolik inhibisyondan sonra olan

reoksijenazasyonları EAD ve GAD ile ve eğer $[Ca^{+2}]_i$ tamponlanmaz ise spontan aksiyon potansiyellerin devamı ile ilişkilidir. Gecikmeli ard depolarizasyon kobay papillar kaslarında 60 dakikalık substratsız hipoksiden sonra reoksijenazasyon da ortaya çıkar. Oksijen radikaller aritminin oluşmasında önemli bir rol oynayabilir ve radikal süpürücüler antiaritmik olarak davranabilirler, ama bu gerçeğe zıt sonuçlarda elde edilebilir. Etkiler cinslere bağlıdır, radikal süpürücülerin koruyucu etkisi köpeklerde gözlemlenmemiştir (113). Ca^{+2} fazlalığının belirgin olması irregüler aktivite görülen sıçanların tek hücrelerinde gözlemlenir, ve kobay papiller kaslarında aritmik aktivite ryanodine uygulanması ile durur. Benzer şekilde, sempatik stimülasyonun aritmogenik etkisine vurgu yapılabilir, özellikle α_1 reseptör aktivasyonu ile PLC aktivasyonu yoluyla Ca^{+2} fazlalığını artırdığı kabul edilir (14). Sıçanda reperfüzyonda α_1 -stimülasyonuna ya da thrombus açılmasına ikincil reperfüzyonda intrasellüler IP_3 konsantrasyonu artar ve aritmiler görülür (114). IP_3 salınımını bloke eden aminoglikozitler ile aritmilerin inhibisyonu görülmüştür (70).

Eğer oklizon periyodu 10-20 dakikadan uzun olursa, geciken reperfüzyon aritmileri irregüler ritmin ikinci periyodu olarak ortaya çıkar. Ekstra sistoller ve taşikardiler muhtemelen Purkinje liflerinde olan iskemik zonda ortaya çıkarlar. Altta yatan mekanizma kısmen depolarize olan hücrelerde anormal otomatizedir. Reperfüzyonda, $[K^+]_d$ hızla yıkılır ve ekstra Ca^{+2} un sitoplazmadan SR'a absorpsiyonu olur. Bu koşullarda, SR'dan osilatör Ca^{+2} salınımı da olur. Multisellüler preparasyonlar ve tek hücrelerde gecikmeli ard depolarizasyon reoksijenazasyonda gözlemlenmiştir. Osilatör potansiyeller, izole edilen kobay kalplerinin Purkinje liflerinde ölçülmüştür. Erken ard depolarizasyonlar muhtemelen α -reseptör stimilasyonu ile düzenlenir (115). İskemik koşullarda α -reseptör yoğunluğu artar. Sağlam kalan Purkinje liflerinin mekanik

olarak uzamaları, gerilmeye ve böylece indüklenen ekstra sistollerde gözlenen depolarizasyonlar aritmilere sebep olabilir (116, 117, 118, 119).

2.3. Nitrik Oksit Ve Nitrik Oksit Sentaz Enzimi

2.3.1. Nitrik Oksidin Özellikleri

Nitrik oksit (NO) lipitte eriyebilen bir moleküldür. Nitrik oksit sentaz enzimleri (NOS) ile sentezlenir. Yarı ömrü çok kısadır (4 saniye). Süperoksitle hızla reaksiyona girer. Hemoglobinin ve diğer hem proteinlerin NO'ye sıkıca bağlanarak onu inhibe ederler. Süperoksitin SOD tarafından hızla metabolize edilmesi ve hemoglobinin uzaklaştırılması NO'nun yarı ömrünü uzatır. S-nitrozotiyol bileşiklerinin oluşması labil NO'yi stabilize edebilir ve biyolojik yarı ömrünü uzatabilir. Proteinlerdeki (örneğin albümin) sülfidril grupları indirgenmiş tiyol açısından çok zengin bir kaynaktır ve fizyolojik şartlarda s-nitroso proteinler oluşur. NO hücreler içinde metallerle bağlanır (Fe, Cu, Co, Mn, vb.). Bu metaller sitokrom oksidazların aktivitesi için gereklidir (120).

NO üç ayrı redoks formunda bulunabilir:

1. Nitrozonyum (NO^+)
2. Nitrik oksit (NO^\bullet)
3. Nitroksil anyonu (NO^-)

Nitrik oksidin ilişkide olduğu moleküller ise şunlardır (121):

1. Nitrojen dioksit (NO_2)
2. Peroksinitrit (ONOO^-)
3. Süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet -}$)
4. Nitrit (NO_2^-)
5. Nitrat (NO_3^-)
6. Nitrozotiyoller (RSNO)

2.3.2. Nitrik Oksit Sentaz Enzimi (NOS)

NOS'un 3 izoformu tariflenmiş ve bunların insanlardaki cDNA'ları izole edilmiştir (120, 122).

İzoenzim I: konstitutif izoformu (cNOS): nöronlarda ve epitel hücrelerinde bulunur ve Ca^{+2} -kalmodulin bağımlıdır.

İzoenzim II: İndüklenebilen izoformu (iNOS): Makrofajlarda ve glial hücrelerde bulunur.

İzoenzim III: Endotelial izoformu (eNOS): Endotel hücrelerinde bulunur.

Bunlar, sırasıyla 12, 17 ve 7 numaralı kromozomlar üzerinde bulunan birbirinden ayrı 3 gen tarafından sentezlenir. İnsandan izole edilen izoformların amino asit sırası ve tipi %59 benzerlik göstermektedir. Türler arasında ise aynı izoformun benzerliği % 90 civarındadır (I ve III. izoformlardaki benzerlik % 90'dan daha fazla II. izoformlarda ise benzerlik % 80'den fazladır.).

Bütün izoformlar substrat olarak L-arginin ve moleküler oksijeni, kofaktör olarak ise NADPH, tetrahidrobiopterin, FAD ve FMN kullanır. Bütün izoformlar kalmodüline bağlanır ve Hem içerir (120, 122).

cNOS, Ca^{+2} -kalmodülin bağımlıdır. Kalmodüline normalde zayıf olarak bağlanır ama sitozolik Ca^{+2} yükseldiğinde bağlanma sıkı hale gelir ve böylece NO üretilir. İtrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunu 100 nM'dan 500 nM'a çıkması NO sentez hızını < % 5'ten > % 95'e çıkarabilir (123).

Purifiye nNOS, NO sentezinin yanı sıra eğer substrat konsantrasyonu düşük ise süperoksit (O_2^-) de üretebilir (124). Arginin seviyesinin regüle edilmesi, O_2^-/NO aracılı hücrel hasarın önlenmesinde yeni tedavisel yaklaşımlar açısından önemli olabilir.

iNOS kalsiyuma duyarlı değildir. Endotoksinler, sitotoksinler, interferon γ ve lipopolisakkaritlerle stimule edilir. iNOS kalmodüline sıkıca bağlanır, bu sebeple Ca^{+2} 'a

diğerleri kadar ihtiyaç duymaz. Hedef hücrelerde demir ihtiva eden enzimleri inhibe ederek ve DNA fragmentasyonuna sebep olarak iNOS sitotoksik etki gösterebilir. Otoimmün hastalıklarda ve septik şokta iNOS indüksiyonu görülür.

eNOS endotel hücrelerinde bulunur. Konstitütif olarak eksprese edilir. Ekspresyonu hızlandırılabilir. Aktivitesi Ca^{+2} -kalmodülün ile regüle edilir. endotelden kaynaklanan NO kan damarlarının dilatasyonuna sebep olur ve ayrıca trombosit ve lökosit adezyonunu inhibe eder. Ayrıca damar düz kasının proliferasyonunu inhibe eder (120, 122, 123, 124).

2.3.3. NOS İnhibitörleri

L-arginin'den NO'nun üretilmesi, N^0 -hidroksi-L-arginin sentezinden sonra sık kullanılan bir yol olmuştur (125). Bu L-arginin/NO yolu L-argininin birkaç analogu ile inhibe edilebilir. Bunlardan ilk sentez edilen ve uygulamaya konulan N^0 -monometil-L-arginindir (126). NO'nun biyolojik bir mediatör olduğunun keşfinden önce N^0 -monometil-L-arginin'in mürin makrofajlarında L-arginin-bağımlı sitotoksiteyi önlediği bulunmuştur (127). Daha sonra bu bileşiğin damarlarda ve diğer yerlerde NO sentezinin kompetitif bir inhibitörü olduğu tespit edildi. Böylece NO'nun biyolojik aktivitesi hakkında değerli bulgular elde edilebildi.

Birçok L-arginin analogunun hem konstitütif tip, hem de indüklenebilen tip NOS'un kompetitif inhibitörü (bazı durumlarda irreversible) olduğu bilinmektedir. L-arginin'in guanidinium kısmı ile benzerlik gösteren ve aminoasit olmayan bir çok diğer bileşik de enzimi inhibe edebilir. NOS'un bazı inhibitörleri Tablo 1.'de görülmektedir.

NOS inhibitörü	Kısaltması	İnhibitör şiddeti
N ^ω -monometil-L-arginin	L-NMMA	nNOS=eNOS>iNOS
N ^ω -nitro-L-arginin	L-NA	nNOS=eNOS>>iNOS
N ^ω -amino-L-arginin	L-NAA	nNOS=iNOS>eNOS
N ^ω -nitro-L-arginin metil ester	L-NAME	
7-nitroindazol	7-NI	nNOS=eNOS=iNOS
N ^δ -iminoetil-L-ornitin	L-NIO	iNOS>eNOS=nNOS
Aminoguanidin		iNOS>eNOS=nNOS

Tablo 1. Nitrik oksit sentaz enzim inhibitörleri ve izoenzimlere etki şiddetleri.

İlginç olarak, NOS'un bir inhibitörü olan asimetrik dimetil-L-arginin (N^G-N^G-dimetil-L-arginin, L-ADMA) ve N^ω-monometil-L-arginin insan plazması ve idrarında bulunmaktadır (128). Plazmada bu bileşiklerin artması bazı hastalıkların patofizyolojisine katkıda bulunabilir.

eNOS ve iNOS'un inhibe edilerek NO üretiminin engellenmesinin cazip karşılandığı septik şok veya belirli kronik inflamatuvar hastalıklar gibi bazı klinik durumlar vardır (örneğin, serebral iskemi veya epilepside nNOS tarafından NO'nun üretilmesi nörotoksisiteye yol açabilir). Günümüze kadar iNOS'un selektif olarak inhibisyonu için oldukça fazla efor sarfedilmesine ve bazı inhibitör maddelerin farklı izoformları farklı oranlarda inhibe ettiğinin bulunmasına rağmen geliştirilen ilaçlar hem indüklenebilen hem de konstitütif izoformları etkilemektedir (129).

4. Materyal Ve Metod

4.1. DeneY Grupları

DeneYlerde 51 erkek (200-260 g) ve 56 dişi (180-240 g) Wistar albino sıçan kullanıldı. Denekler İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar standart şartlar altında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, havalandırılmalı, sabit ısılı odalarda özel kafeslerde bakıldı. Beslenmeleri için standart sıçan pellet yem kullanıldı.

Sıçanlar 180 g üzerinde ağırlığa ulaştıklarında gruplar oluşturulmak üzere rasgele ayrıldı. Her cinsiyet için dörder grup olmak üzere sekiz grup oluşturuldu. Gruplar her cinste şu şekilde oluşturuldu:

Erkek I. Grup (n:20); içme sularına herhangi bir ajan katılmadan 15 gün süreyle çeşme suyu verildi. 15 gün sonunda kalpe iskemi / reperfüzyon (I/R) uygulandı.

Erkek II. grup (n:15); 15 gün süreyle içme sularında 100 mg/L L-NAME çeşme suyunda verilerek, sonunda kalpte I/R uygulandı.

Erkek III. grup (n:16); 15 gün süreyle içme sularında 500 mg/L L-NAME çeşme suyunda verilerek, sonunda kalpte I/R uygulandı.

Erkek IV. Grup (n:7); 15 gün süreyle sadece çeşme suyu verildikten ve herhangi bir ajan verilmeden kalplerine I/R yapmadan, sadece cerrahi girişim yapılan bir *sham opere* grup (enzim deneylerinde kullanıldı).

Dişi I. Grup (n:19); içme sularına herhangi bir ajan katılmadan 15 gün süreyle çeşme suyu verildi. 15 gün sonunda kalpe iskemi / reperfüzyon (I/R) uygulandı.

Dişi II. grup (n:20); 15 gün süreyle içme sularında 100 mg/L L-NAME çeşme suyunda verilerek, sonunda kalpte I/R uygulandı.

Dişi III. grup (n:17); 15 gün süreyle içme sularında 500 mg/L L-NAME çeşme suyunda verilerek, sonunda kalpte I/R uygulandı.

Dişi IV. Grup (n:7); 15 gün süreyle sadece çeşme suyu verildikten ve herhangi bir ajan verilmeden kalplerine I/R yapmadan, sadece cerrahi girişim yapılan bir *sham opere* grup (enzim deneylerinde kullanıldı).

L-NAME SİGMA dan temin edildi. Sıçanların günlük içtikleri sular kayıt edildi ve sıçanların suları günlük olarak değiştirildi. Günlük alınan L-NAME miktarı kayıt edildi.

4.2. Cerrahi Uygulama

Sıçanlar 1.2-1.4 g/kg ürethanın (SİGMA) intra peritoneal uygulanması ile anesteziye edildi. Trakea kanüle edilerek operasyon süresince yapay solunumun sağlandı. Kan basıncının ölçümü amacıyla sağ karotid artere basınç transdüserine (Harvard, 50-8952) bağlı bir kanül yerleştirildi. Yerleştirilen EKG elektrodları ve basınç transdüseri yardımıyla EKG, kan basıncı ve kalp hızı Harvard osilografa kayıt edildi.

Göğsün sol tarafına 1-2 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldı. Cilt altı dokuları geçilerek göğüs kaslarına ulaşıldı. Göğüs kasları ayrıldıktan sonra sternumun 2 mm solunda dördüncü inter kosta kesilerek sol torakotomi yapıldı. Toraks açılınca oluşan negatif basıncı engellemek, normal CO₂, O₂ parsiyel basınçları ile pH'nın temini ve solunumun devamlılığını sağlamak için denek Harvard Animal Rodent ventilasyon cihazına bağlandı. Yaklaşık 1.5 mL/100 g'lık hacim ve 60 atım/dakikalık bir hızda oda havası ventilatör ile verilerek pozitif basınçlı solunum temin edildi.

Kalp perikardın yavaşça sıyrılması ile serbestleştirildi. Göğsün sağ tarafına hafifçe basılarak kalbin dışarı çıkması sağlandı. Sol ana koroner arterin altından 6/0 10 mm'lik ipek ile myokard dokusunda hafifçe içine alacak şekilde hızlıca geçildi. Kalp göğüs içerisine yerleştirildikten sonra stabilizasyon için 20 dakika beklendi. "Lambeth Conventions" ile belirlenen kriterlere göre bu işlemlere bağlı herhangi bir aritmi

görülmesi ya da ortalama kan basıncının oklüzyon öncesi 70 mmHg'nin altına düşmesi halinde denek çalışma dışı bırakıldı (130).

Sol ana koronerin altından geçilmiş olan ipek sütün iplikleri 1 mm çapında ve 1 cm boyunda plastik bir tüp içinden geçirildi. Beklenen 20 dakikalık stabilizasyon sonunda bu iplik plastik tüp vasıtasıyla bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak sol ana koroner arterin oklüzyonu sağlandı. Oklüzyon süresi olan 7 dakikanın sonunda klemp açılarak ip gevşetildi ve böylece reperfüzyon (yeniden kanlanma) sağlandı. Reperfüzyon süresi 7 dakika olarak uygulandı. Bu sürelerin sonunda deneye son verildi. Hayvan karotid arterden kanatılarak sakrifiye edildi.

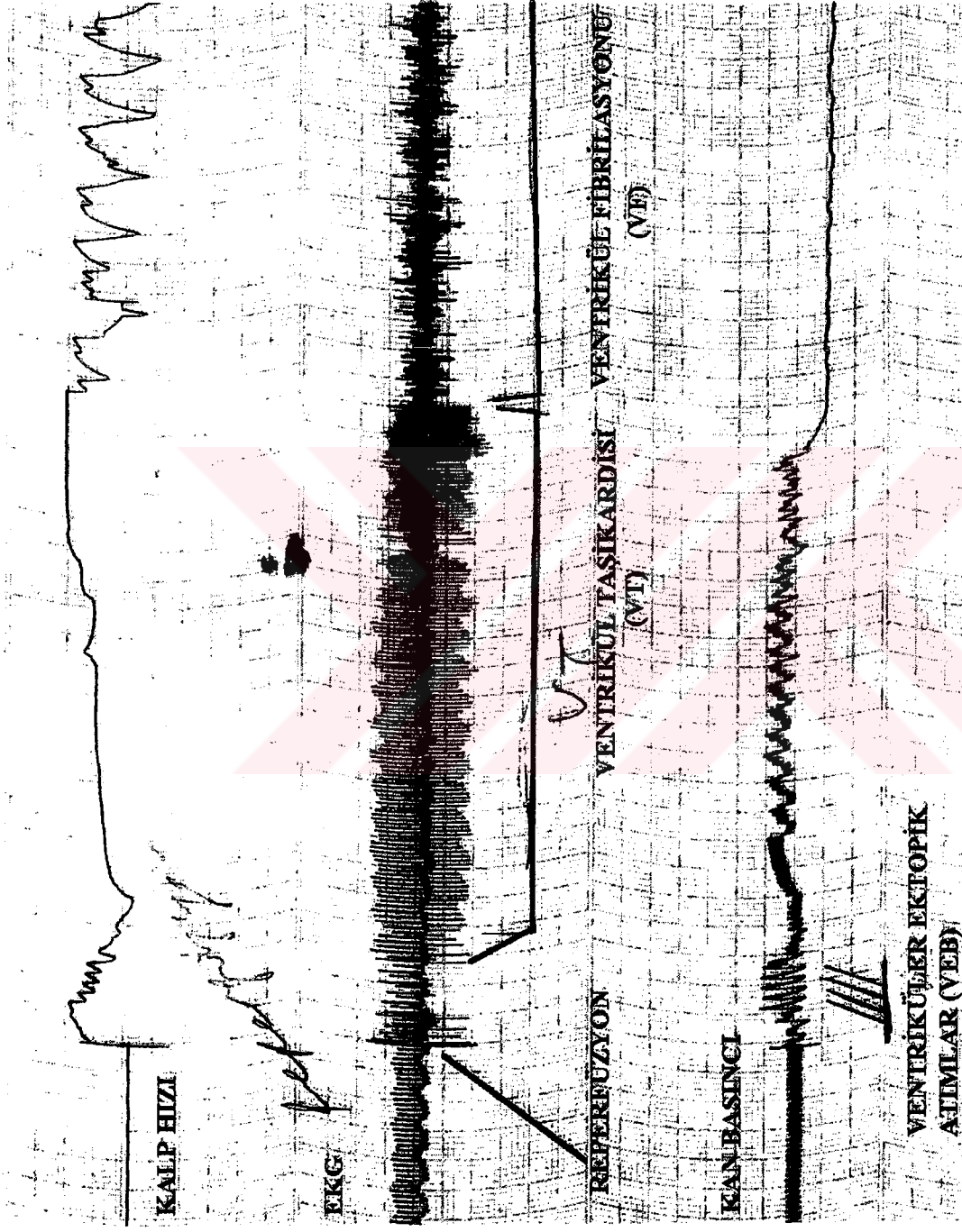
4.3. Aritmilerin Değerlendirilmesi

İskemi/reperfüzyon aritmilerinin oluşumu ve değerlendirilmesinde Birincioğlu ve ark. uyguladıkları sol ana koroner arterin 7 dakika oklüzyon ve 7 dakika reperfüzyon protokolü izlendi (131).

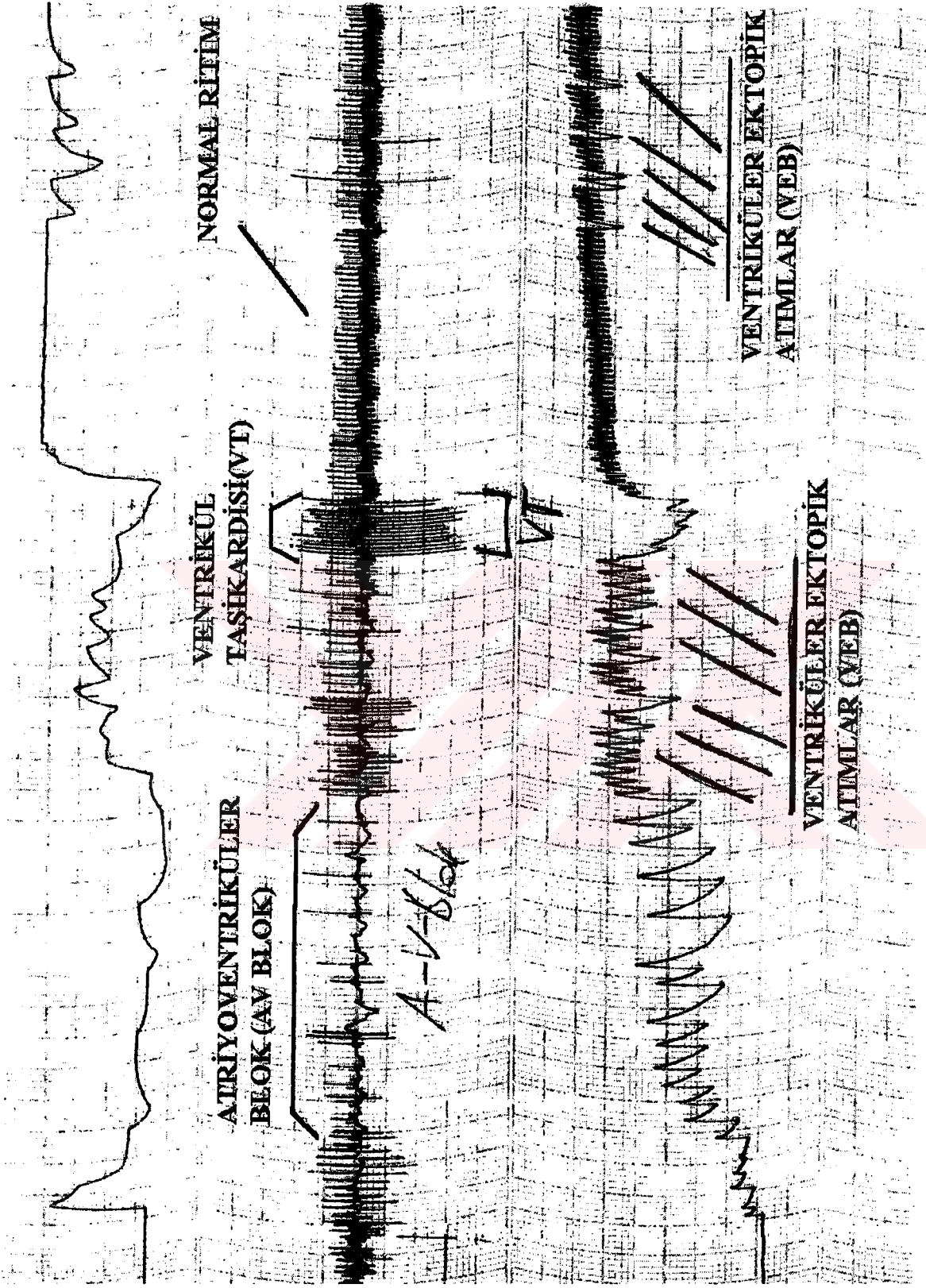
Cerrahi işlemlerin başlamasından, hazırlık dönemi ve iskemi-reperfüzyon dönemlerinde EKG, kan basıncı ve kalp hızı kayıt edildi (Resim 1 ve 2).

Ventrikül ektopik aktivite, "Lambeth Conventions" da önerilen tanı kriterlerine göre değerlendirildi (130) (Resim 1, 2 ve 3). Yapılan kayıtlardan ventriküler ektopik atım (VEB; ventricular ectopic beats) sayıları, ventriküler taşikârdi (VT) ve ventriküler fibrilasyon (VF) süreleri ve insidansları "Lambeth Conventions" a göre değerlendirildi (Resim1, 2 ve 3).

Ortalama arteryel kan basınçları (OAKB) her bir denek için hesaplandı. OAKB hesabı sistolik arteryel basınç değerinin % 40'ı ve diastolik arteryel basınç değerinin % 60'ı toplanarak yapıldı. OAKB si oklüzyon öncesi 70 mmHg'nin altında olan deneyler çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca her bir denegın kalp hızlarıda değerlendirildi.



Resim 1. Bu kayıttta reperfüzyondan hemen sonra başlayan ventrikül taşikardisi (VT) ve takiben başlayan ventrikül fibrilasyonu (VF) görülmektedir. Ayrıca ventriküler ektojik atımlar (VEB), VT ve VF esnasındaki kan basıncı ve kalp hızı değişiklikleri gözlenmektedir.



Resim 2. Bu kayıta atriyoventriküler blok (AV BLOK), takiben ventriküler ektopik atımlar (VEB) ve ventrikül taşikardisi (VT) izlenmektedir.

3.4.Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Dokuların Çıkarılması Ve Hazırlanması:

Kontrol, L-NAME verilen iskemi/reperfüzyon ve sham opere gruplarında yapılan işlemlerden sonra sıçanlar koroner arterden kanatılarak sakrifiye edildikten sonra kalp dokuları çıkarıldı, salin ile yıkanarak enzim çalışmaları için ayrıldı. Çıkarılan kalp dokuları analiz gününe kadar -85°C de saklandı. Analiz gününde, dokular bekletilmeden tartıldı ve $+4^{\circ}\text{C}$ de soğutulan soğuk deiyonize su ile yıkandı. Makas ile küçük parçalara ayrılarak homojenize etmek üzere cam tüplere konuldu. Tüpün içine doku ağırlığının 3 katı $+4^{\circ}\text{C}$ de soğutulan soğuk deionize su ilave edildi. Dokular bir buz kabının içinde 16000 rpm'de 2 dakika homojenize edildi (IKA ultra-Tumax Type 25 Basic, Staufen, Germany). Daha sonra homojenatın bir kısmı 5000xg'de 30 dak. santrifüje edilerek artıklar uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatanın bir kısmı 1/1 oranında etanol/kloroform (5/3, v/v) karışımı ile muamele edilerek ekstraksiyona tabi tutuldu. Daha sonra etanol fazı alınarak analizlerin bir kısmı için kullanıldı.

XO aktivitesi, NO ve MDA seviyeleri homojenatta; CAT ve GSH-Px aktiviteleri süpernatanda; SOD aktivitesi etanol/kloroform ekstraktında ölçüldü. Protein tayini ise bütün aşamalarda Lowry yöntemi ile yapıldı (132).

3.4.2. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi Aebi'nin metoduna göre yapıldı (133). Deneyin prensibi hidrojen peroksitin parçalanma hız sabitinin (s^{-1} , k) tayinine dayanmaktadır. Hidrojen peroksit, ultraviyole spektrum analizinde, dalga boyunun azalması ile artan bir absorbans verir. Maksimum absorbans verdiği dalga boyu 240 nm'dir. Deney ortamında, H_2O_2 'in parçalanması 240 nm'de ($E_{240} = 40 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) katalaz enziminin aktivitesindeki, azalmanın saptanmasına dayandırıldı. Absorbanstaki dakikalık düşme hızı enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

$k/\text{sec} = (2.3 \log OD_1 / OD_2) / 30\text{sn}$. Aktiviteler k/mg protein olarak ifade edildi.

3.4.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini:

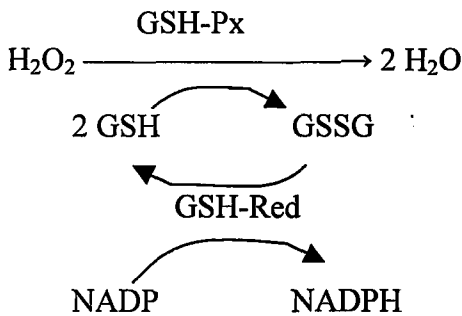
Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edildi (134, 135). Bu metotta SOD aktivitesi, ksantin / ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süper oksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formasyon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbands verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

$$\% \text{ inhibisyon} = (\text{Abs}_{\text{körv}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{körv}} \times 100$$

Bir SOD aktivitesi NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.4.4. Glutatiyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini:

Glutatiyon peroksidaz (GSH-Px, EC 1.6.4.2) aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre ölçüldü (136). Metodun temeli, ortamda bulunan NADPH'in enzim aktivitesi ile ortamdaki uzaklaştırılması sonucu 340 nm'de absorbandsın azalmasına dayanmaktadır. Deney ortamında redükte glutatiyon, NaN_3 (sodyum azit), glutatiyon redüktaz, NADPH ve en son ilave edilmek üzere substrat H_2O_2 vardır.



Enzim tarafından ortamdan uzaklaştırılan H_2O_2 başına $NADPH \rightarrow NADP$ döngüsü gerçekleşmektedir. Dolayısı ile bire bir etkileşim söz konusudur. O halde enzim aktivitesi ile birim zamanda yaklaşık ADP oluşum absorbans azalması doğru orantılıdır. GSH-Px aktivitesi U/mg protein olarak verilmiştir.

3.4.5. Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi Tayini

Ksantin oksidaz (XO, EC 1.1.3.22) aktivitesi Prajda ve Weber'in metoduna göre (137), ksantin ürik asit oluşumu esnasında 293 nm'de absorbans artışının spektrofotometrik olarak ölçümü prensibi ile tayin edilmiştir. Doku homojenatı (50 μ L), fosfat tamponu (pH 7,5 ve 50 mM) ve ksantin (her tüpte 0,067 mmol final konsantrasyonu olmak üzere) içeren 2,85 mL'lik deney ortamında 37°C'de 30 dak. inkübe edildi. Reaksiyon 0,1 mL %100'lük TCA çözeltisi eklenmesi ile durduruldu ve 5000 xg'de 15 dak. santrifüje edildi. Elde edilen berrak kısmın absorbansı köre karşı ölçüldü. 1 ünite XO, 37°C'de pH 7,5'ta 1 dakikada oluşan μ mol ürik asit olarak tarif edildi ve U/g protein olarak hesaplandı.

3.4.6. Nitrik Oksit (NO) Miktarının Tayini

Doku nitrit ve nitratı, NO'in stabil oksidatif metabolitlerinin (NO_2^- ve NO_3^-) konsantrasyonu kalp dokusunda ölçülerek NO üretimi tahmin edildi. Nitrit ölçümü Griess reaksiyonu (138) ile yapıldı. Metodun temeli; ortamdaki nitritin N-naftilendiamin ve sulfanilamid ile birleşerek 540 nm'de maksimum absorbans veren bir kromofor oluşturması esasına dayanır. Örnekler önce Somogyi metodu ile deproteinize edildi (139). Daha sonra berrak süpernatanda yeni hazırlanmış solüsyonlar ile nitrit tayin edildi. Nitrat tayini ise, dolaylı yoldan, yani mevcut nitratın nitrite çevrilmesi üzerine yapıldı. Deproteinize edilmiş örnekler, glisin tamponu (pH 9,7) içinde, bakır ile kaplanmış kadmiyum granülleriyle muamele edilerek nitrat \rightarrow nitrit dönüşümü gerçekleştirildi. Aynı metolla nitrit miktarı belirlendi. Bu durumda total nitrit miktarı belirlenmiş oldu. Son

elde edilen değerden ilk nitrit değeri çıkarılınca nitrat miktarı belirlendi. Standart grafiği, sodyumnitritin değişik molar konsantrasyonlarından (10^{-8} - 10^{-3} mol/L) hazırlanan bir seri standart ile oluşturuldu. Örneklerin nitrit değeri bu grafikten elde edilen eşitlik ile hesaplandı. Sonuçlar nmol/g prot olarak ifade edildi.

3.4.7. Malondialdehit (MDA) Miktarı Tayini:

Malondialdehit (MDA) tayini Wasowicz ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (140). Metodun prensibi, MDA'nın thiobarbitrik asit ile 95°C 'de reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli kromofonun tespitine dayanmaktadır. n-butanol fazında ekstrakte edilerek oluşan rengin şiddeti, bir spektrofluorometre ile (eksitasyon 525 nm ve emisyon 547 nm) lld. 1,1,3,3 tetrametoksi propan ile hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki standartlar ve bunlardan çizilen standart grafiği ile sonuçlar değerlendirildi. Sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ protein olarak ifade edildi.

3.5. Biyoistatistiksel Metodlar

İstatistikler Windows 95-98 uyumlu SPSS[®] 7.5 ve DOS uyumlu EpiInfo version 6 ile yapıldı. Grupların dağılımları non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Test ile değerlendirildi. Her cinsiyetin kendi içinde karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren gruplarda one-way ANOVA testi ve Post Hoc testlerden LSD uygulandı. Normal dağılım göstermeyen gruplara non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi uygulanıp, gruplar arası anlamlılık gösterenlerde ayrıca Mann-Whitney U testi uygulandı. Cinsiyetler arası anlamlılık araştırma konusu olan parametrelerde normal dağılım gösteren gruplar için student T-testi ve normal dağılım gstermeyenlerde ise Mann-Whitney U testi ile saptandı. İnsidansların karşılaştırılmasında χ^2 testi uygulandı. Gruplar içi korrelasyon analizi için Pearson Korrelasyon testi kullanıldı. Değerler ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ ve kritik $p < 0.017$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4. Bulgular

4.1. L-NAME ile NOS İnhibisyonunun İskemi-Reperfüzyon Aritmilerine Etkileri

Sol koroner arterin oklüzyon ve daha sonra reperfüzyonundan sonra hayvanlarda ventriküler ektopik atım (VEB), ventriküler taşikardi (VT) ve ventriküler fibrilasyon (VF) şeklinde aritmiler gözlemlendi. Sonuçlar Tablo 2 ve 3 ile Şekil 1, 2, 3 ve 4'de gösterilmiştir.

İskemi periyodunda tüm hayvanlarda VEB gözlemlendi. Erkek sıçanların kontrol grubunda 7 dakikalık iskemi periyodunda görülen VEB sayısı $43,65 \pm 19,50$ olurken, 100 mg/L L-NAME verilen grupta $34,93 \pm 16,99$ ve 500 mg/L L-NAME verilen grupta $62,60 \pm 26,92$ oldu. Dişi sıçanların kontrol grubunda 7 dakikalık iskemi döneminde görülen ortalama VEB sayısı $14,06 \pm 4,37$ olurken, 100 mg/L L-NAME verilen grupta $36,58 \pm 12,28$ ve 500 mg/L L-NAME verilen grupta $21,94 \pm 6,65$ oldu. Bu değerleri her cinsiyeti kendi içinde karşılaştırdığımızda istatistiksel açıdan anlamlı bir fark ile karşılaşılması (P>0,05). İskemi sırasında olan ortalama VEB sayılarını iki cinsiyet arasında karşılaştırıldığında yine anlamlı bir fark bulunmadı (P>0,05) (Tablo 2 , Şekil 1).

İskemi sırasında gözlemlenen VT süre ve insidansları arasında hem cinsiyetler içi hem cinsiyetler arasında istatistiksel açıdan farklılıklar saptanmadı (P>0,05). Erkek kontrol grubunda iskemi dönemindeki VT insidansı %25, 100 mg/L L-NAME verilen grupta %13,3, 500 mg/L L-NAME verilen grupta %18,8 olurken, dişi kontrol grubunda %10,5 , 100 mg/L L-NAME verilen grupta %10 ve 500 mg/L L-NAME verilen grupta %5,9 oldu (Tablo 2 ve 3, Şekil 2).

İskemi döneminde hiçbir grupta irreversibl VF görülmedi. Reversibl VF erkek kontrol grubundaki deneklerden birinde, 500 mg/L L-NAME verilen grupta iki tane dişi gruplardan 100 mg/L ve 500 mg/L L-NAME alanlarda birer tane gözlemlenirken, erkek

100 mg/L L-NAME alan ve dişi kontrol kontrol gruplarında gözlemlenmedi (Tablo 3, Şekil 4)

Reperfüzyon periyodunda tüm gruplarda yer alan hayvanlarda VEB gözlemlendi. Erkek sıçanların kontrol grubunda reperfüzyon periyodunda periyodunda ortalama VEB sayısı $154,50 \pm 41,20$ olurken, 100 mg/L L-NAME verilen grupta $607,03 \pm 108,40$, 500 mg/L L-NAME verilen grupta $669,83 \pm 147,65$ oldu. Dişi gruplardan kontrol grubunda reperfüzyon periyodunda görülen ortalama VEB sayısı $515,76 \pm 87,27$ olurken, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda sırasıyla $419,39 \pm 89,12$ ve $346,06 \pm 96,54$ olarak bulundu. Erkek sıçanların oluşturduğu L-NAME grupları ortalama VEB sayısı açısından kontrolden istatistiksel olarak farklılık saptandı ($P < 0,05$) (Tablo2, Şekil 1). Dişi gruplarda ise kontrole göre ortalama VEB sayılarında azalma olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P > 0,05$). Cinsiyetler arası istatistiksel karşılaştırma yapıldığında sadece iki kontrol grubu arasında ortalama VEB sayısı açısından erkeklerde dişilere göre daha az ortalama VEB sayısı bulundu ($P < 0,05$). Cinsiyetler arasında L-NAME gruplarında ortalama VEB sayıları açısından farklılık saptanmadı ($P > 0,05$).

Reperfüzyon periyodunda görülen VT insidansları erkek kontrol, 100 mg/L ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda sırasıyla %75, %73,3 ve %68,8 olarak bulundu. Dişilerde ise kontrol, 100 mg/L ve 500 mg/L L-NAME gruplarında sırasıyla VT insidansı %73,3, %75 ve %76,5 olarak bulundu. Cinsiyetler içi ve arası karşılaştırma yapıldığında istatistiksel açıdan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($P > 0,05$). (Tablo 3) Reperfüzyon sırasında görülen ortalama VT süreleri erkek kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME gruplarında sırasıyla $19,39 \pm 4,56$, $62,90 \pm 10,00$ ve $68,32 \pm 14,33$ saniye olarak hesaplanırken, dişi kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda ise sırasıyla $54,11 \pm 7,72$, $48,44 \pm 9,15$ ve $40,23 \pm 10,34$ saniye olarak bulundu. Her iki erkek L-NAME gruplarında kontrole göre ortalama VT süreleri istatistiksel olarak artmış olarak

hesaplandı ($P < 0,05$). Diğer taraftan dişi gruplar arasında ortalama VT süreleri istatistiksel açıdan farklı değildi ($P > 0,05$). Erkek ve dişi gruplar karşılaştırıldığında iki kontrol grubu arasında ortalama VT süreleri açısından istatistiksel olarak farklı bulunurken ($P < 0,05$), L-NAME grupları arasında fark bulunamadı ($P > 0,05$) (Tablo 2, Şekil 2)

Reperfüzyonda görülen VF insidansları değerlendirildiğinde, erkek sıçanların kontrol grubunda %45,100 mg/L L-NAME grubunda %46,7 500 mg/L L-NAME grubunda %43,8 olurken, dişi sıçanların kontrol grubunda %26,32 , 100 mg/L L-NAME grubunda %30 ve 500 mg/L L-NAME grubunda %17,7 olarak bulundu. İnsidansların karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan bir fark bulunamadı ($P > 0,05$) (Tablo 3, Şekil 4). Reperfüzyondaki ortalama VF süreleri değerlendirildiğinde, erkek sıçanların kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME gruplarında sırasıyla ortalamalar $45,44 \pm 11,40$, $57,29 \pm 15,47$ ve $47,57 \pm 13,44$ olurken, dişi sıçan kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME gruplarında sırasıyla $80,30 \pm 7,87$, $55,92 \pm 13,17$ ve $53,50 \pm 23,58$ olarak bulundu. Dişi L-NAME gruplarında kontrole göre bir azalma görülmesine rağmen cinsiyet içi ve arası istatistiksel karşılaştırmada bir fark bulunamadı ($P > 0,05$) (Tablo 2, Şekil 3).

Reperfüzyonda görülen ortalama VT+VF süreleri değerlendirildiğinde erkek kontrol grubunda $70,06 \pm 12,12$,100mg/L L-NAME ve 500 mg/L L-NAME gruplarında sırasıyla $99,42 \pm 10,94$ ve $114,83 \pm 32,42$ olarak bulundu. Erkek L-NAME gruplarında istatistiksel olarak ortalama VT+VF süreleri artmış bulunurken ($P < 0,05$), diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan fark bulunamadı ($P > 0,05$). Ortalama VT+VF süreleri cinsiyetler arası karşılaştırıldığında sadece kontrol grupları arasında fark saptandı ($P < 0,05$) (Tablo 2, Şekil 3).

Erkek kontrol grubunda irreversibl VF gözlenmezken, 100 mg/L L-NAME verilen grupta 15 hayvandan 3 ünde (%20) ve 500 mg/L L-NAME verilende 16 hayvandan 4'ünde (%25) irreversibl, dişi kontrol grubunda ise 19 hayvandan 2'sinde (%10,5),

100mg/L L-NAME verilen grupta 20 hayvandan 2'sinde (%10) ve 500 mg/L L-NAME verilen grupta 17 hayvandan 1'inde (%5,9) irreversibl VF gözlemlendi. İrreversibl VF insidansı yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($P>0,05$) (Tablo 3, Şekil 4).

4.2. L-NAME Uygulanmasının Ortalama Arteriyel Kan Basıncı ve Kalp Hızı Üzerine Olan Etkileri

L-NAME uygulanmasının ve yapılan cerrahi işlemlerin OAKB ve kalp hızı üzerine olan etkileri toplu olarak Şekil 5 ve 6'da gösterilmiştir.

OAKB 0. dakikada L-NAME verilen hem erkek hem de dişi gruplarda kontrollerine göre istatistiksel açıdan artmış olarak bulundu ($P<0,05$ ve kritik $P<0,017$). 1.ve 5. dakikalarda OAKB nda L-NAME verilen Hem erkek hem dişi gruplarda kontrole göre artmış olarak bulundu (kritik $P<0,017$) (Şekil 5 ve 6).

Erkek kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda sırasıyla iskemiden hemen önce 10. dakikada OAKB $73,45 \pm 3,15$, $113,33 \pm 18,03$ ve $116,31 \pm 10,85$ mmHg olurken, dişi kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda sırasıyla $72,16 \pm 3,53$, $102,95 \pm 20,44$ ve $105,35 \pm 17,70$ mmHg oldu. 10. dakika OAKB'ü L-NAME verilen erkek ve dişi gruplarda kontrollerine göre artmış olarak bulundu ($P< 0,05$). Dişi ve erkek gruplar karşılaştırıldığında kontroller arası ve 100 mg/L L-NAME verilen gruplar arası fark bulunmaz iken ($P>0,05$) 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda OAKB erkeklerde dişilere göre istatistiksel olarak artmış olarak bulundu ($P<0,05$) (Şekil 5 ve 6).

11. ve 17. Dakikalarda hem erkek hem de dişi gruplarda OAKB azalma L-NAME verilen gruplara göre kontrol gruplarında daha fazla olmuştur ($P<0,05$) (Şekil 5 ve 6).

18. dakikada OAKB açısından erkek kontrol ile 500 mg/L L-NAME verilen erkek grup arasında ve dişi kontrol ile 100 mg/L L-NAME verilen dişi grup arasında istatistiksel fark bulunurken ($P<0,05$), diğer gruplar arasında fark saptanmadı ($P>0,05$) (Şekil 5 ve 6).

Reperfüzyonun sonunda OAKB açısından 24. Dakikada erkek kontrol ile 100 mg/L L-NAME erkek grubu arasında ve dişi kontrol ile 100 mg/L L-NAME dişi grubu arasında istatistiksel açıdan fark görülürken ($P<0,05$), diğer gruplar arasında fark görülmedi ($P>0,05$) (Şekil 5 ve 6).

Ortalama kalp hızları karşılaştırıldığında, 0. dakikada gruplar arasında hem erkek hem dişilerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($P>0,05$) (Şekil 5 ve 6).

1 ve 5. dakikalarda da ortalama kalp hızları açısından istatistiksel olarak gruplar arasında hem erkek hem dişilerde anlamlı fark yoktu ($P>0,05$).

Oklüzyon öncesi 10. dakikada ortalama kalp hızı erkek kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda sırasıyla $327,8 \pm 10,2$, $327,9 \pm 12,2$ ve $339,2 \pm 11,3$ atım/dakika olurken, dişi kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda ise sırasıyla $305,6 \pm 9,7$, $314,1 \pm 9,3$ ve $310,2 \pm 8,2$ atım/dak oldu. Hem erkek hem dişi gruplar arasında istatistiksel fark bulunamadı ($P>0,05$) (Şekil 5 ve 6).

11. dakikada ortalama kalp hızları erkek kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda sırasıyla $343,5 \pm 8,2$, $342,0 \pm 12,5$ ve $352,7 \pm 10,3$ atım/dak olurken, dişi kontrol grubunda, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda sırasıyla $318,2 \pm 9,7$, $327,6 \pm 9,2$ ve $323,4 \pm 8,3$ atım/dak oldu. Hem erkek hem dişilerde gruplar arasında 11.dakikadaki ortalama kalp hızları açısından istatistiksel fark yoktu ($P>0,05$) (Şekil 5 ve 6).

17., 18. ve 24. dakikalarda ortalama kalp hızı açısından hem erkek hem dişi gruplar arasında istatistiksel fark yoktu ($P>0,05$).

Cinsiyetler ortalama kalp hızı açısından karşılaştırıldığında 18. dakikada ortalama kalp hızları erkek ve dişi kontrol grupları arasında istatistiksel farklılık gösterirken ($P<0,05$), 18. ve 24. dakikalarda ortalama kalp hızları erkek ve dişi 100 mg/L L-NAME verilen gruplar arasında ($P<0,05$) ve 0., 1., 5., 10., 11. ve 24. dakikalarda erkek ve dişi

500 mg/L L-NAME verilen gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($P<0,05$)
(Şekil 5 ve 6).



Gruplar	Ortalama VEB Sayıları		Ortalama VT Süreleri (Saniye)		Ortalama VF Süreleri (Saniye)		Ortalama VT+VF Süreleri (Saniye)		
	İskemide	Reperfüzyonda	İskemide	Reperfüzyonda	İskemide	Reperfüzyonda	İskemide	Reperfüzyonda	
Erkek	Kontrol	47,65±19,50	154,50± 41,20	10,80±5,78	19,39± 4,56	0	45,44±11,40	0	70,06±12,12
	100 mg/L L-NAME	34,93± 6,76	607,03±108,40 ^a	4,50±0,50	62,90±10,00 ^a	0	57,29±15,47	0	131,63±16,99 ^a
	500 mg/L L-NAME	62,60±26,92	669,83±147,65 ^a	21,50±8,43	68,32±14,33 ^a	0	47,57±13,44	0	133,14±18,84 ^a
Dişi	Kontrol	14,06± 4,37	515,76± 87,27 ^b	2,50±0,50	54,11± 7,72 ^b	0	80,30± 7,87	0	122,50± 7,19 ^b
	100 mg/L L-NAME	36,58±12,28	419,39± 89,12	5,75±3,75	48,44± 9,15	0	55,92±13,17	0	99,42±10,94
	500 mg/L L-NAME	21,94± 6,65	346,06± 96,54	9,00±0,00	40,23±10,34	0	53,50±23,58	0	114,83±32,42

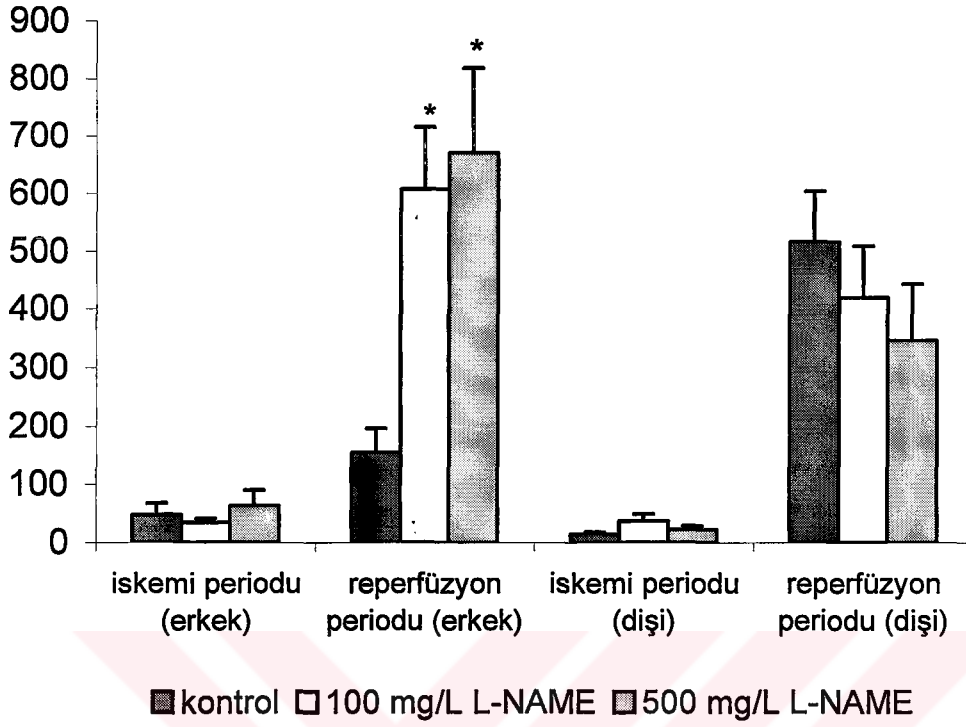
a kontrole göre anlamlı (p<0.05)

b cinsiyetler arası anlamlı (p<0.05)

Tablo 2. İskemi/reperfüzyon sonrası ortalama VEB sayıları, VT süreleri, VF süreleri ve VT+VF süreleri.

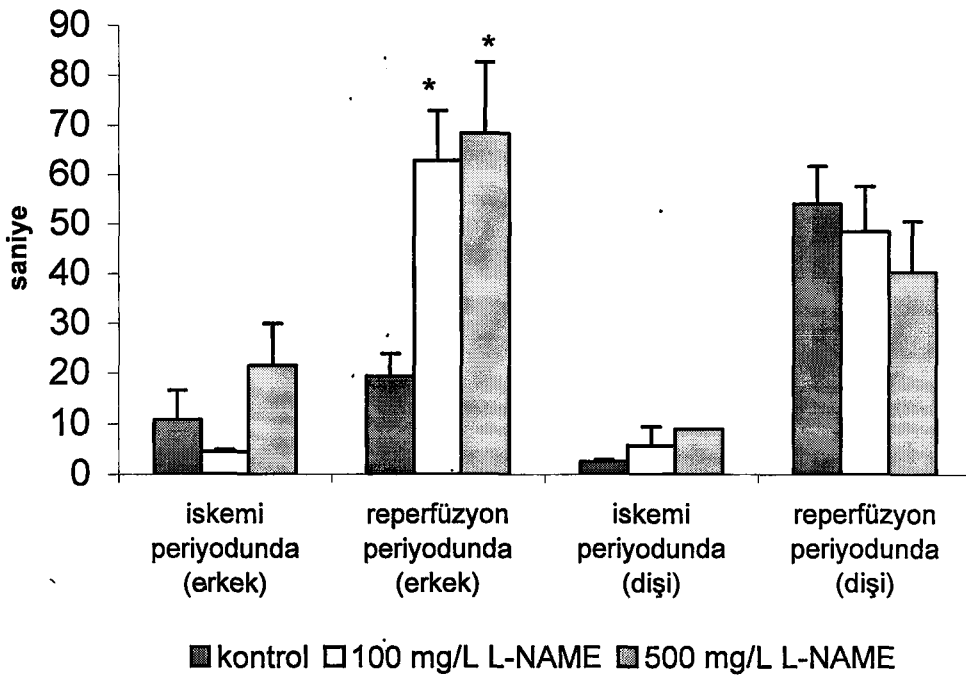
Gruplar	VT insidansı oran (%)		Reversibl VF insidansı oran (%)		İrreversibl VF insidansı oran (%)		Toplam VF insidansı oran (%)	
	İskemide	Reperfüzyonda	İskemide	Reperfüzyonda	İskemide	Reperfüzyonda	İskemide	Reperfüzyonda
Erkek	Kontrol	5/20 (%25)	15/20 (%75)	1/20 (%5)	9/20 (%45)	0	0	9/20 (%45)
	100 mg/L L-NAME	2/15 (%13.3)	11/15 (%73.3)	0	7/15 (%46.7)	0	3/15 (%20)	10/15 (%66.8)
	500 mg/L L-NAME	3/16 (%18.7)	11/16 (%68.8)	2/16 (%12.5)	7/16 (%43.8)	0	4/16 (%25)	11/16 (%68.8)
Dişi	Kontrol	2/19 (%10.5)	14/19 (%73.7)	0	5/19 (%26.3)	0	2/19 (%10.5)	7/19 (%36.8)
	100 mg/L L-NAME	2/20 (%10)	15/20 (%75)	1/20 (%5)	6/20 (%30)	0	2/20 (%10)	8/20 (%40)
	500 mg/L L-NAME	1/17 (%5.9)	13/17 (%76.5)	1/17 (%5.9)	3/17 (%17.7)	0	1/17 (%5.9)	4/17 (%23.5)

Tablo 3. İskemi/reperfüzyon sonrası VEB, VT, reversibl VF ve irreversibl VF insidansları.



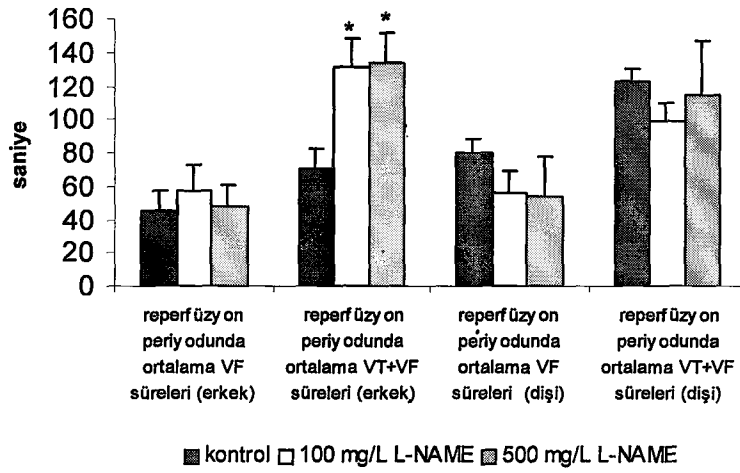
* p<0.05

Şekil 1. İskemi ve reperfüzyon sonrası erkek ve dişi sıçanlarda ortalama VEB sayıları



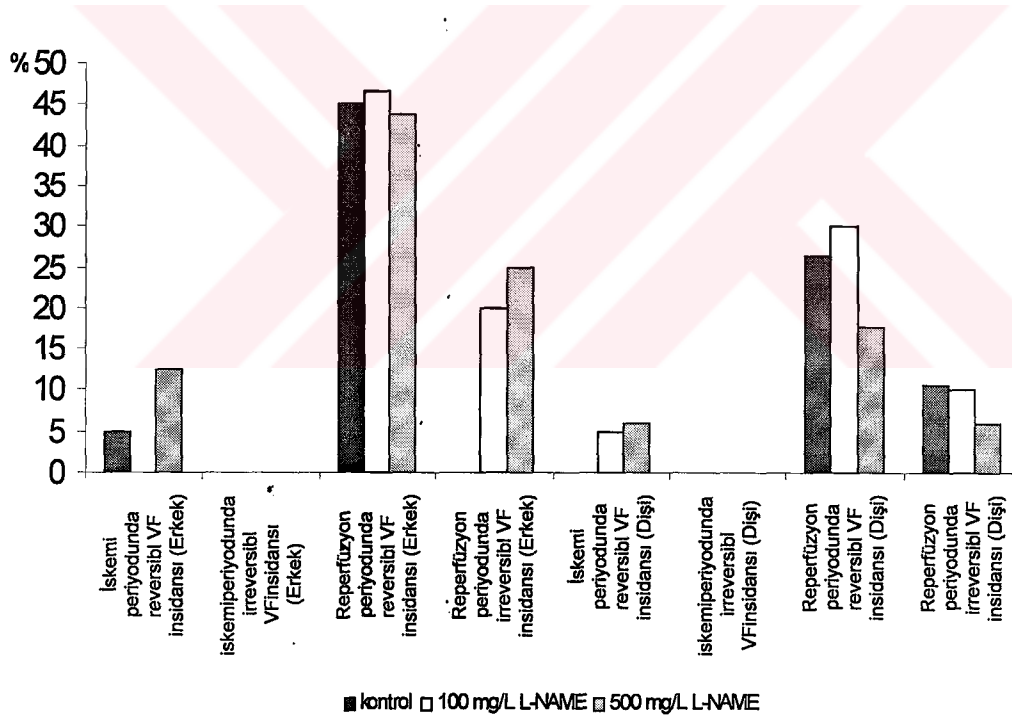
*p<0,05

Şekil 2. İskemi ve reperfüzyon sonrası erkek ve dişi sıçanlarda ortalama VT süreleri

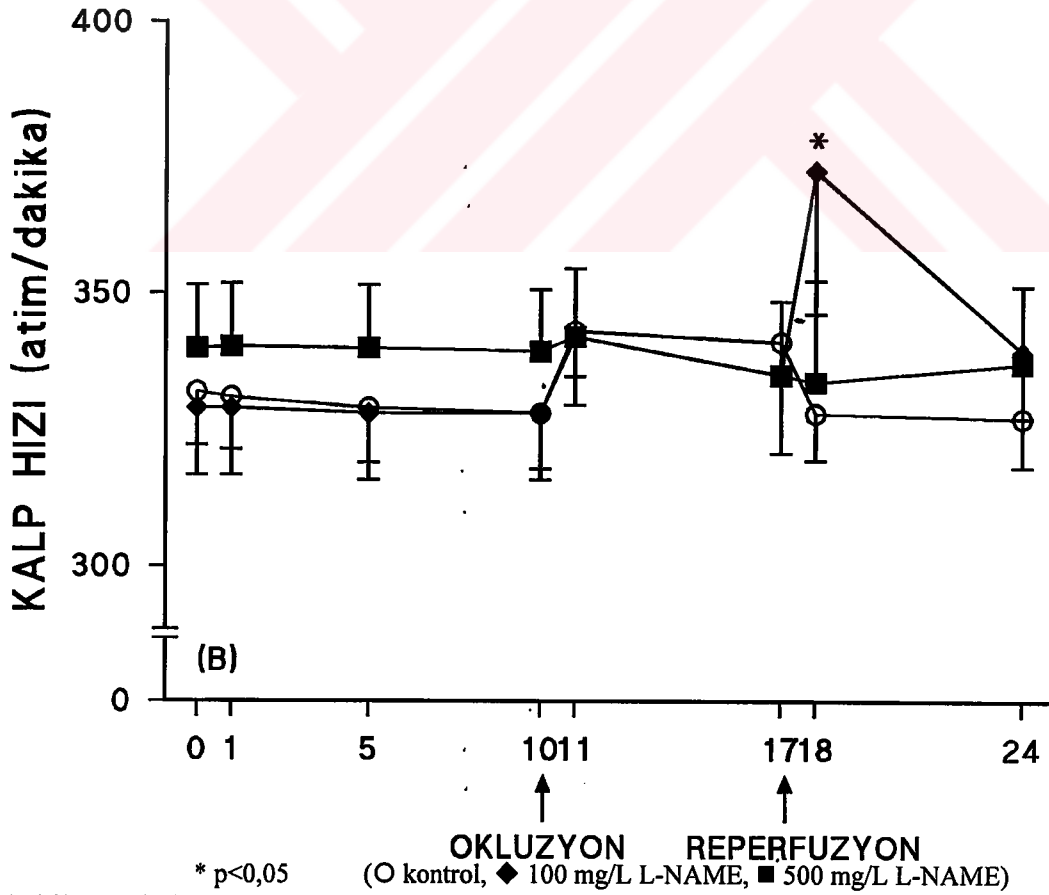
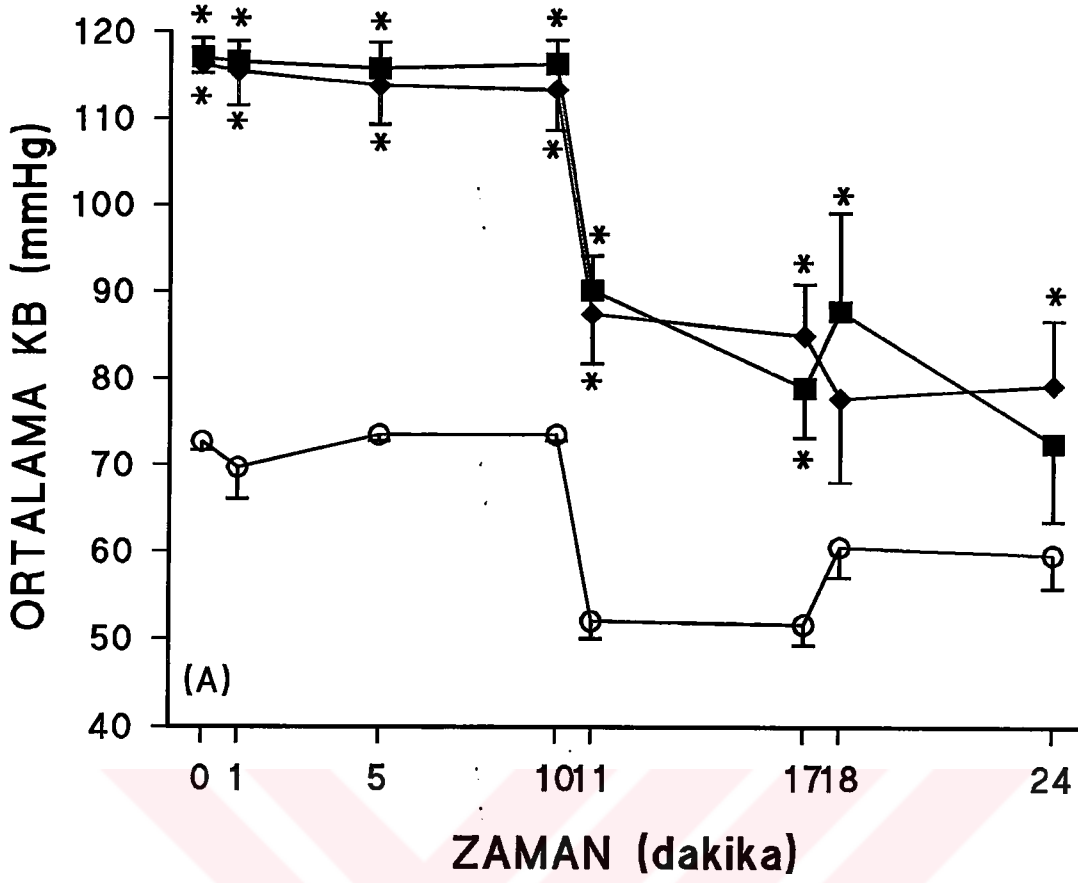


*p<0,05

Şekil 3. Reperfüzyon periyodunda erkek ve dişi sıçanlarda ortalama VF ve VT+VF süreleri.



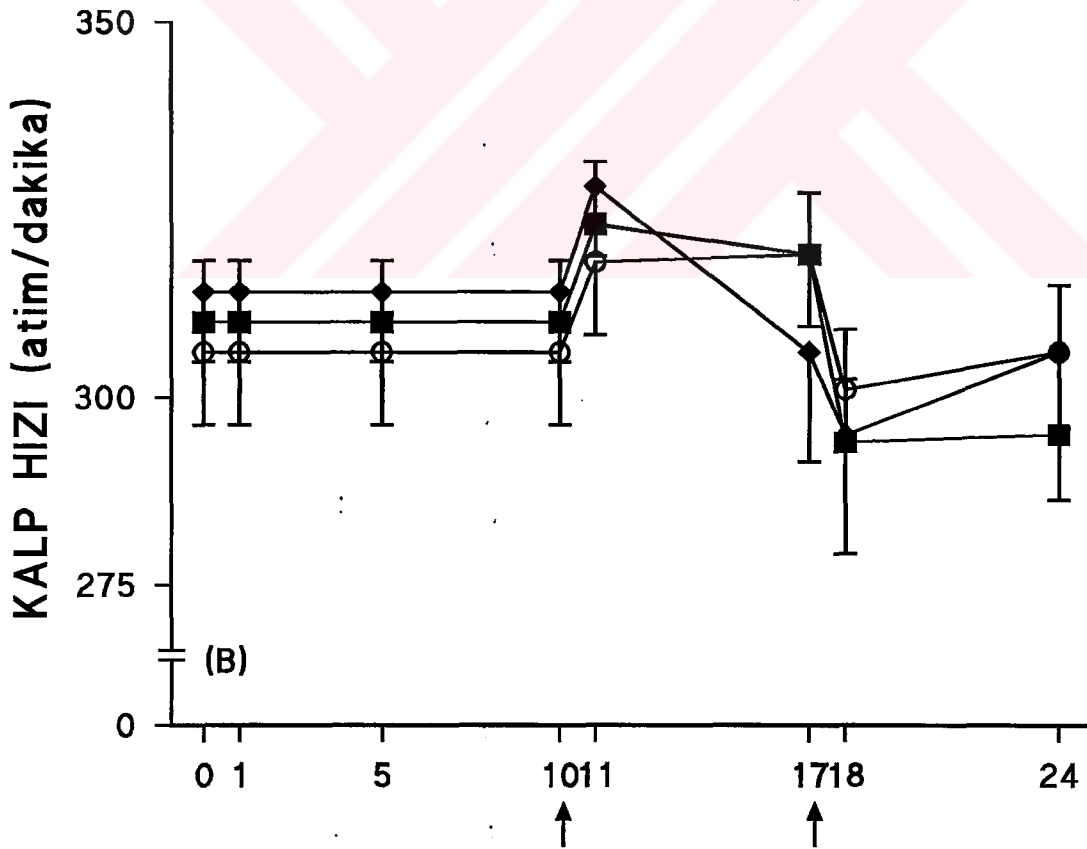
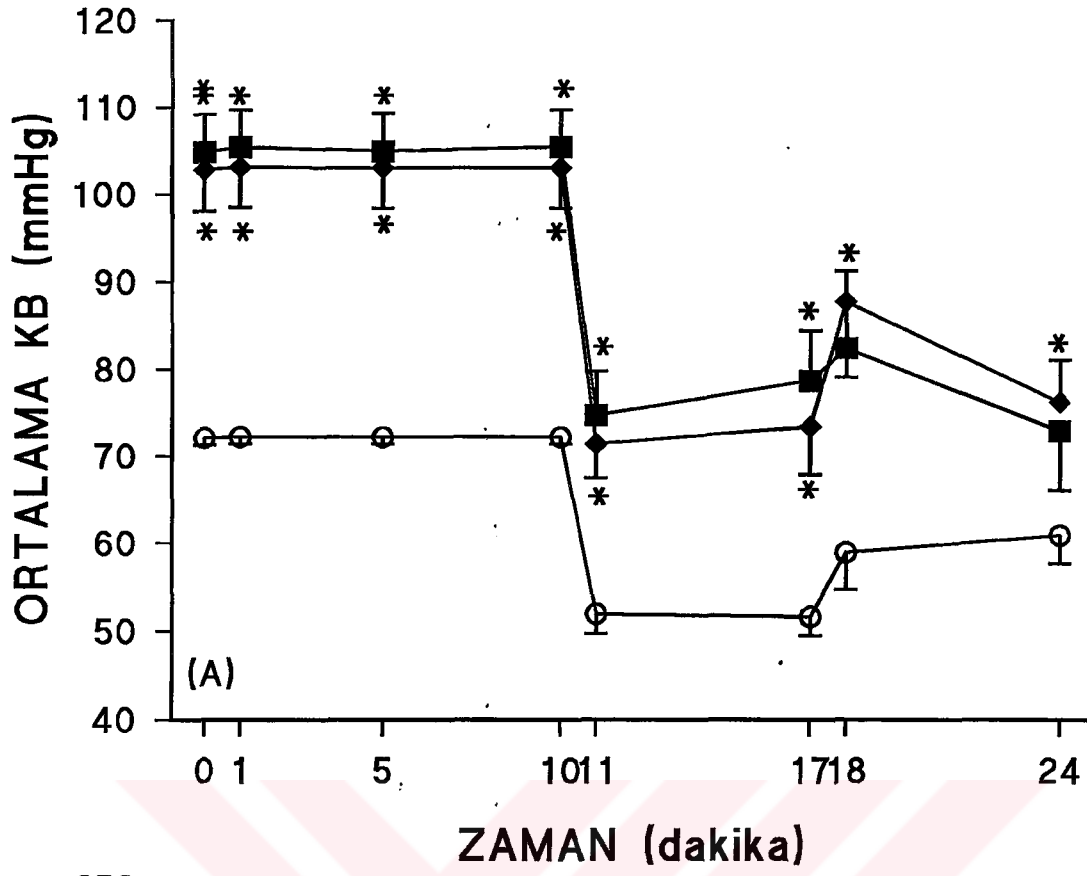
Şekil 4. İskemi ve reperfüzyonda erkek ve dişi sıçanlarda reversibl ve irreversibl VF insidansları (%).



* p<0,05

(O kontrol, ◆ 100 mg/L L-NAME, ■ 500 mg/L L-NAME)

Şekil 5. Erkek sıçanların deney süresinde kayıt edilen ortalama arteryel kan basınçları ve ortalama kalp hızları.



OKLÜZYON REPERFÜZYON

* P<0,05 (O kontrol, ◆ 100 mg/L L-NAME, ■ 500 mg/L L-NAME)

Şekil 6. Dişi sıçanlarda deney sırasında ortalama kan basınçları ve ortalama

kalp hızları.

4.3.Biyokimyasal Sonuçlar

Erkek ve dişi sıçan gruplarının ortalama CAT, GSH-Px, SOD ve XO enzim aktiviteleri ile MDA ve NO seviyeleri Tablo 4'te verilmiştir.

Erkek sıçanların kontrol grubunda CAT aktivitesi $11,07 \pm 0,99$ k/gr protein, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarda sırasıyla $10,54 \pm 0,58$ ve $15,11 \pm 1,75$ k/gr protein olurken sham opere grubunda $13,31 \pm 0,74$ k/gr protein olarak tespit edildi. Dişi sıçanlarda ise kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen ve sham opere gruplarda sırasıyla CAT aktivitesi $11,62 \pm 0,88$, $10,28 \pm 1,14$, $9,96 \pm 1,18$ ve $3,36 \pm 0,34$ k/gr protein olarak bulundu (Tablo 4, Şekil 7). CAT aktivitesi istatistiksel analizlere göre erkek sıçanların kontrol grubu ile 500 mg/L L-NAME verilen arasında ve 100 mg/L L-NAME verilen ile 500 mg/L L-NAME verilen arasında anlamlı fark bulunurken ($p < 0,05$), diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p < 0,05$). Dişi gruplar arasında CAT aktivitesinin istatistiksel olarak analizi yapıldığında sham opere grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunurken ($p < 0,05$), diğer gruplar arasında fark tespit edilemedi ($p > 0,05$). Farklı cinsiyetler karşılaştırıldığında 500 mg/L L-NAME alan erkek ve dişi gruplar ile sham opere erkek ve dişi gruplar arasında CAT aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark hesaplanırken ($p < 0,05$), diğer gruplar arasında fark bulunamadı ($p > 0,05$).

GSH-Px aktiviteleri erkek sıçanların kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen ve sham opere gruplarında sırasıyla $6722,66 \pm 519,28$, $7131,55 \pm 350,44$, $6932,40 \pm 1240,61$ ve $8662,89 \pm 630,24$ U/gr protein olurken, dişi sıçanların kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen ve sham opere gruplarında ise sırasıyla $6915,43 \pm 524,40$, $8365,13 \pm 401,78$, $7956,44 \pm 481,35$, $25964,07 \pm 14450,99$ U/gr protein olarak ölçüldü (Tablo 4, Şekil 8). İstatistiksel analizler GSH-Px aktivitesinin dişi sıçanlarda sham opere grubunda diğerlerine göre artmış olduğunu gösterirken ($p < 0,05$), diğer gruplar arasında

anlamli fark bulunamadı ($p>0,05$). Erkek sıçanlar arasında ise istatistiksel olarak GSH-Px aktivitesinin farklılık göstermediği bulundu ($p>0,05$). GSH -Px aktivitesi açısından cinsiyetler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 100 mg/L L-NAME verilen gruplar arasında anlamlı fark bulunurken ($p<0,05$) diğer gruplar arasında fark tespit edilemedi ($p>0,05$).

SOD aktiviteleri erkek sıçanların kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen ve sham opere gruplarında sırasıyla $0,790 \pm 0,130$, $1,327 \pm 0,276$, $1,110 \pm 0,234$ ve $0,554 \pm 0,103$ u/mg protein ölçülürken, dişi sıçanların kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplarında ise sırasıyla $0,634 \pm 0,104$, $0,681 \pm 0,149$, $0,592 \pm 0,126$ ve $0,557 \pm 0,111$ u/mg protein olarak ölçüldü (Tablo 4, Şekil 9). İstatistiksel olarak, SOD aktiviteleri hem erkek hem de dişi gruplar arasında anlamlı farklılıklar göstermedi ($p>0,05$). Cinsiyetler SOD aktiviteleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 100 mg/L L-NAME verilen erkek ve dişi gruplar arasında ve 500 mg/L L-NAME verilen erkek ve dişi gruplar arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).

XO aktiviteleri erkek sıçanların kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen ve sham opere gruplarda sırasıyla $0,262 \pm 0,055$, $0,340 \pm 0,009$, $0,423 \pm 0,091$ ve $0,725 \pm 0,081$ U/mg protein olarak tespit edilirken, dişi sıçanların kontrol, 100 mg/L L-NAME verilen, 500 mg/L L-NAME verilen ve sham opere gruplarda sırasıyla $0,540 \pm 0,121$, $0,302 \pm 0,037$, $0,304 \pm 0,057$ ve $0,277 \pm 0,036$ U/mg protein olarak tespit edildi (Tablo 4, Şekil 10). İstatistiksel olarak erkek sıçanların oluşturduğu gruplar XO aktiviteleri açısından karşılaştırıldığında sham opere grubu ile diğer gruplar arasında fark bulunurken ($p<0,05$), diğer gruplar arasında fark bulunamadı ($p>0,05$). Dişi sıçanların oluşturduğu gruplar XO aktivitesi açısından karşılaştırıldığında kontrol ile 100 mg/L L-NAME verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilirken ($p<0,05$), diğer gruplar arasında fark bulunamadı ($p>0,05$). Erkek ve dişi gruplar XO aktivitesi açısından

İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol erkek ve dişi gruplar arasında ve sham opere erkek ve dişi gruplar arasında anlamlı fark tespit edilirken ($p < 0,05$), diğer gruplar arasında fark bulunamadı ($p > 0,05$).

MDA düzeyleri erkek sıçanların oluşturduğu kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen ve sham opere gruplarda sırasıyla $15,47 \pm 1,46$, $24,52 \pm 2,64$, $14,57 \pm 1,77$ ve $44,48 \pm 8,85$ nmol/gr protein olarak ölçülürken, dişi sıçanların oluşturduğu kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen ve sham opere gruplarda sırasıyla $56,81 \pm 7,80$, $39,00 \pm 4,77$, $19,85 \pm 2,41$ ve $35,31 \pm 8,55$ nmol/gr protein olarak ölçüldü (Tablo 4, Şekil 11). İstatistiksel olarak MDA düzeyleri erkek sıçanların oluşturduğu gruplarda karşılaştırıldığında sham opere grup diğer gruplara göre farklılık gösterirken ($p < 0,05$) , 100 mg/L L-NAME verilen grup ile kontrol ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplar arasında farklılık tespit edildi ($p < 0,05$). Erkek sıçanların oluşturduğu kontrol grubu ile 500 mg/L L-NAME verilen arasında MDA düzeyi açısından fark bulunamadı ($p > 0,05$). Dişi sıçanlar MDA düzeyleri açısından istatistiksel analize tabi tutulduğunda kontrol ile 100 mg/L L-NAME verilen grup ve 500 mg/L L-NAME verilen grup arasında, 100 mg/L L-NAME verilen grup ile 500 mg/L L-NAME verilen grup arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Dişi sıçanlarda sham opere grup ile diğer gruplar arasında MDA düzeyi açısından fark bulunamadı ($p > 0,05$). Erkek ve dişi gruplar karşılaştırıldığında MDA düzeyleri kontrol erkek ve dişi gruplar arasında ve 100 mg/L L-NAME verilen erkek ve dişi gruplar arasında istatistiksel olarak farklı bulundu ($p < 0,05$). Diğer gruplarda ise bu fark tespit edilemedi ($p > 0,05$).

NO düzeyleri erkek sıçanların oluşturduğu kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen ve sham opere gruplarda sırasıyla $428,57 \pm 75,07$, $286,74 \pm 39,16$, $285,63 \pm 39,89$ ve $55,16 \pm 14,91$ nmol/gr protein ölçülürken, dişi sıçanların oluşturduğu kontrol, 100 ve 500 mg/L L-NAME verilen ve shame opere gruplarda sırasıyla $90,09 \pm 14,60$,

135,65 ± 14,96 , 143,43 ± 25,26 ve 34,88 ± 3,18 nmol/gr protein olarak ölçüldü (Tablo 4, Şekil 12). NO düzeyleri erkek sıçan gruplarında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında sham opere grup diğer gruplardan farklı olarak bulunurken ($p < 0,05$), diğer gruplar arasında bir fark bulunamadı ($p > 0,05$). Dişi sıçanlarda NO düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise kontrol grubu ile 500 mg/L L-NAME verilen arasında, sham opere grup ile 100 mg/L L-NAME verilen ve 500 mg/L L-NAME verilen gruplar arasında fark bulundu ($p < 0,05$). Diğer dişi sıçan grupları arasında NO düzeyleri açısından bir fark bulunamadı ($p > 0,05$). Erkek dişi sıçanlar NO düzeyleri açısından karşılaştırıldığında 100 mg/L L-NAME verilen, 500 mg/L L-NAME verilen erkek ile dişi gruplar arasında, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p < 0,05$), sham opere gruplar arasında fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Gruplar korelasyon analizleri yapıldığında erkek kontrol grubunda CAT aktivitesi ile SOD ve XO aktivitesi, MDA ve NO seviyeleri arasında pozitif korelasyon bulunurken ($p < 0,05$), MDA düzeyi ile XO aktivitesi arasında da pozitif korelasyon bulundu ($p < 0,05$). 100 mg/L L-NAME verilen erkek gruba yapılan korelasyon analizleri sonucunda GSH-Px aktivitesi ile SOD aktivitesi ve MDA düzeyi arasında pozitif korelasyon tespit edildi ($p < 0,05$). 500 mg/L L-NAME verilen erkek grubun korelasyon analizleri sonucuna göre GSH-Px aktivitesi ile XO aktivitesi arasında pozitif, CAT aktivitesi ile NO seviyesi arasında negatif korelasyon bulundu ($p < 0,05$). Sham opere erkek grubun da korelasyon analizi SOD ile GSH-Px aktiviteleri arasında pozitif korelasyon olduğunu gösterdi ($p < 0,05$). Dişi grupların korelasyon analizleri kontrol grubunda CAT aktivitesi ile NO seviyesi arasında pozitif, GSH-Px aktivitesi ile MDA seviyesi arasında negatif bir korelasyonun olduğunu gösterdi ($p < 0,05$). Dişi 100 mg/L L-NAME verilen grubun korelasyon analizinde GSH-Px ile SOD aktivitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu bulundu ($p < 0,05$). Dişi 500 mg/L L-NAME verilen grupta yapılan korelasyon analizleri

CAT aktivitesi ile SOD aktivitesi ve NO seviyesi arasında pozitif, XO aktivitesi arasında negatif bir ilişkinin olduğu ($p<0,05$). GSH-Px aktivitesi ile MDA seviyesi arasında da pozitif bir ilişkinin olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Dişı sham opere grubun korelasyon analizi GSH-Px aktivitesi ile MDA seviyesi arasında pozitif ve CAT ile SOD aktiviteleri arasında negatif korelasyon olduğunu gösterdi ($p<0,05$).



Gruplar	Katalaz (k/g protein)	Glutiyon peroksidad (U/gr protein)	Süperoksit dismutaz (U/mg protein)	Ksantin oksidaz (U/mg protein)	Malondialdehit (nmol/gr protein)	Nitrik oksit (mmol/gr protein)
Erkek	Kontrol (n=20)	6722,66± 519,28	0,790±0,130	0,262±0,055 ^{de}	15,47±1,46 ^{bde}	428,57±75,07 ^{de}
	100 mg/L L-NAME (n=15)	7131,55± 350,44 ^e	1,327±0,276 ^e	0,340±0,009 ^d	24,52±2,64 ^{acde}	286,74±39,16 ^{de}
	500 mg/L L-NAME (n=16)	6932,40± 1240,61	1,110±0,234 ^e	0,423±0,091 ^d	14,57±1,77 ^{bd}	285,63±39,89 ^{de}
Dişi	Sham opere (n=7)	8662,89± 630,24	0,554±0,103	0,725±0,081 ^{abce}	44,48±8,85 ^{abc}	55,16±14,91 ^{abc}
	Kontrol (n=19)	6915,43± 524,40 ^d	0,634±0,104	0,540±0,121 ^{bc}	56,81±7,80 ^{bce}	90,09±14,60 ^{ce}
	100 mg/L L-NAME (n=20)	8365,13± 401,78 ^{de}	0,681±0,149 ^e	0,302±0,037 ^a	39,00±4,77 ^{ce}	135,65±14,96 ^{de}
Dişi	500 mg/L L-NAME (n=17)	7956,44± 481,35 ^d	0,592±0,126 ^e	0,304±0,057	19,85±2,41 ^{ab}	143,43±25,26 ^{ade}
	Sham opere (n=7)	25964,07±14450,99 ^{abc}	0,557±0,111	0,277±0,036 ^e	35,31±8,55	34,88± 3,18 ^{bc}

^a erkek veya dişi kontrole göre anlamlı farklı (p<0,05)

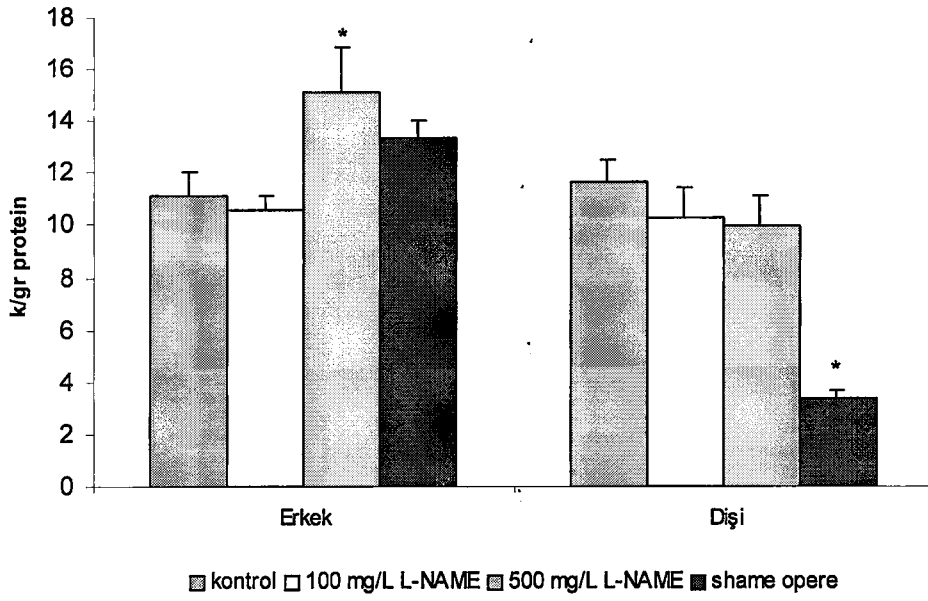
^b erkek veya dişi 100 mg/L L-NAME verilen gruba göre anlamlı farklı (p<0,05)

^c erkek veya dişi 500 mg/L L-NAME verilen gruba göre anlamlı farklı (p<0,05)

^d erkek veya dişi sham opere gruba göre anlamlı farklı (p<0,05)

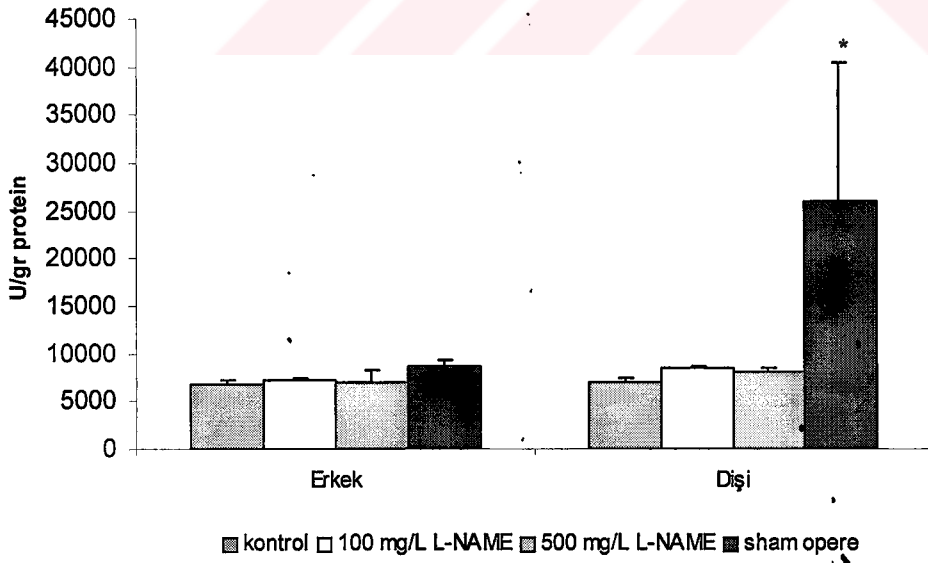
^e erkek ve dişi gruplar arası anlamlı farklı (p<0,05)

Tablo 4. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda endojen antioksidan enzim aktiviteleri, malondialdehit ve nitrik oksit düzeyleri.



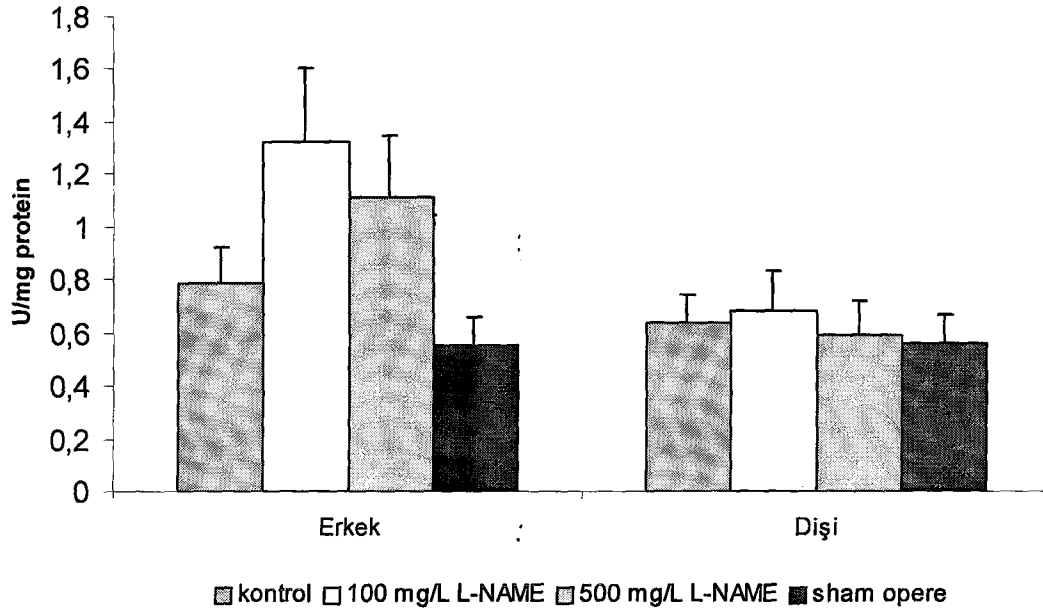
*p<0,05

Şekil 7. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda katalaz enzim aktiviteleri.



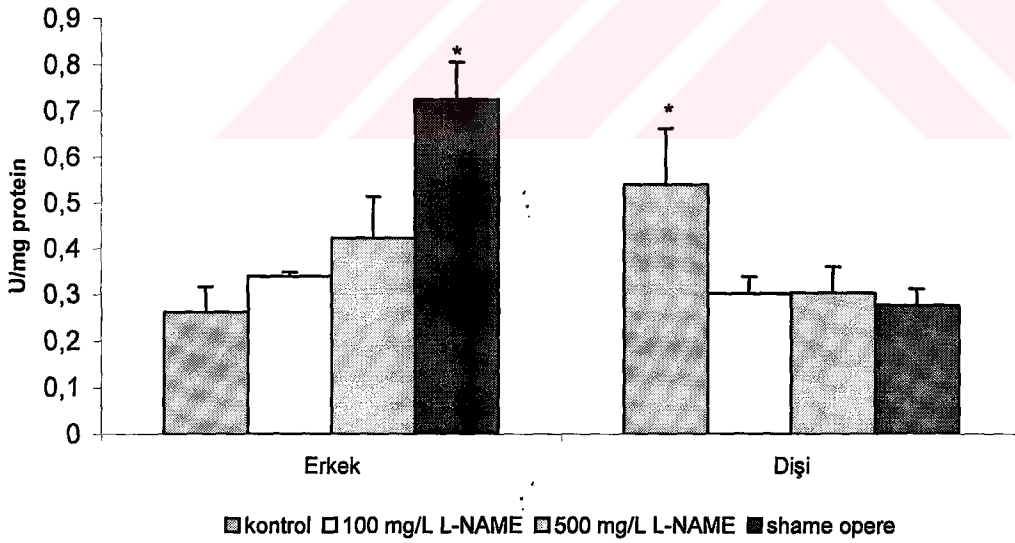
*p<0,05

Şekil 8. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda glutatyon peroksidaz aktiviteleri.



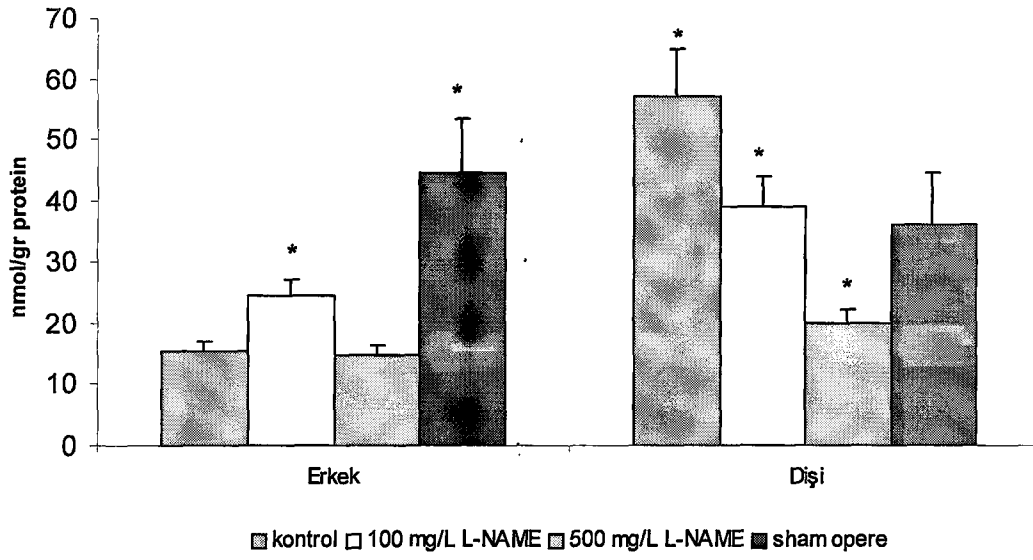
*p<0,05

Şekil 9. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda süperoksit dismutaz aktiviteleri.



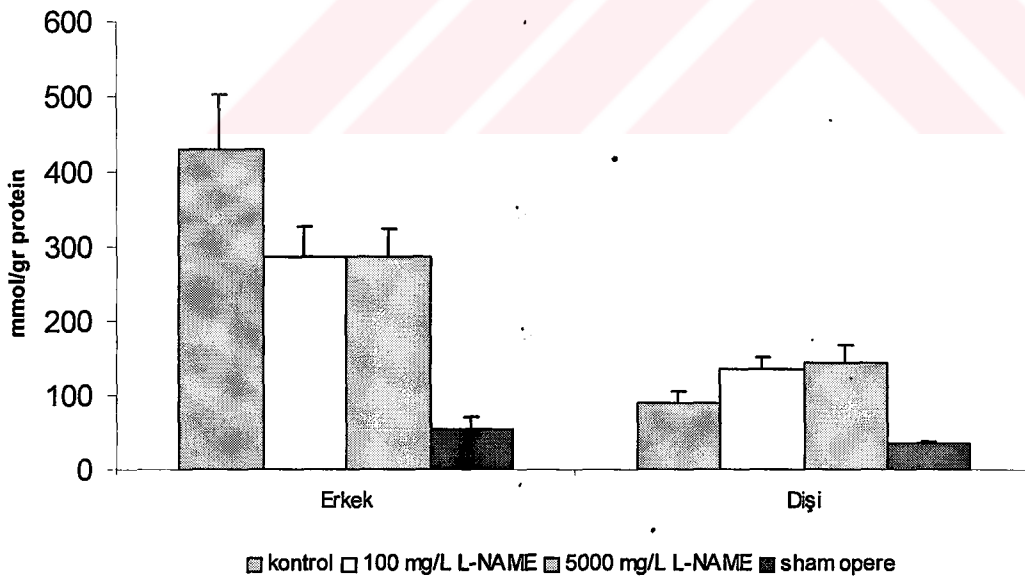
*p<0,05

Şekil 10. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda ksantin oksidaz aktiviteleri.



*p<0,05

Şekil 11, İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda malondialdehit düzeyleri.



*p<0,05

Şekil 12. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp dokusunda nitrik oksit düzeyleri.

5. Tartışma Ve Sonuçlar

İskemik dokunun reperfüzyonu normal fonksiyonun tekrar sağlanması için gereklidir, ancak bu olay bir dizi doku hasarını da beraberinde getirir (141). I/R sonrası endotel disfonksiyonu miyokardiyal hasarının artmasına yol açabilir. Endotel hücrelerde üretilen bir çok kimyasal mediatör ve bunların arasında NO vasküler homeostasisi sağlamaya çalışırlar (142). NO kalpte tüm hücrelerde üretilebilir ve kardiyak fonksiyonlara önemli etkileri olduğu bulunmuştur. NO, nitrik oksit sentazın (NOS) katalizlediği reaksiyonla L-arginin'den NO ve L-citrullin olarak üretilir (9, 141, 143). Bilinen üç NOS izoformları kalpte gösterilmiştir: konstitüf NOS (cNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilen NOS (iNOS). nNOS ve eNOS çoğunlukla kalsiyum/kalmodülin bağımlı iken, iNOS intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonundan bağımsızdır ve tipik olarak mikrobial ya da immünolojik uyarılar ile stimüle olur (9, 123, 126). Fizyolojik koşullar altında kalpte, NO koroner vazodilatör tonu sağlar, platelet agregasyonunu inhibe eder ve nötrofiller ile plateletlerin vasküler endotele adezyonlarını inhibe eder (9). NO vasküler tonu kontrol etmesi, geçirgenliği etkilemesi ve platelet agregasyonunu engellemesinin yanında, I/R hasarında koroner kan akımının artışı, Ca^{+2} artışının engellenmesi ve nötrofil aktivasyonunun inhibisyonunda da yer alır (9, 142, 144). Ayrıca NO, kalp hücreleri üzerine negatif inotropik ve kronotropik etkilere de sahiptir (9).

Miyokardiyal infartüs, şok ve transplantasyon sonrası olan kalpte I/R hasarda NO'nu rolü tartışmalıdır. Bir çok araştırmacı NO donörlerinin uygulanmasının I/R hasarını engellediğini bildirmişlerdir. Farmakolojik olarak NOS' un inhibisyonu ile ortamdan NO'nun uzaklaştırılmasının kalpte I/R hasarını artırdığını göstermiştir. Bu bulgunun tersine, farmakolojik NOS inhibisyonunun kalpte I/R hasarında koruyucu etkisi olduğunu bir çok farklı çalışmada göstermiştir. Langerdorff sisteminde yapılan I/R düzeneğinde N-

iminoetil-L-ornitin ile NOS inhibe edilmiş ve NO' nun I/R da koruyucu etkisi gösterilmiştir (9). I/R hasarı sırasında kardiyak fonksiyonların modülasyonunda NO mekanizmaları bir çok çalışmada gösterilmiştir. NO, inositol-1,4,5-trifosfatı (IP₃) inhibe eder ve kalsiyum artışını engeller. Bunun yanında NO protein kinaz C translokasyonunu düzenler ve nötrofillerden kaynaklanan hasarı inhibe eder. Bu yollarla NO kalpte koruyucu bir mekanizma sağlar (9). Mitokondrial fonksiyonun bozulması ve O₂⁻ üretiminin artması reperfüzyon ile ilgili olaylardandır. Mitokondrial solunum zincirinin aktivitesinin postiskemik reperfüzyon sırasında belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalarda artan O₂⁻ üretiminin mitokondrial disfonksiyona yol açtığı bildirilmiştir. Solunumun inhibisyonu NOS aktivitesinin L-NNA ile blokajı ile baskılanmıştır (141). Buna karşılık NO, ayrıca süperoksit (O₂⁻) ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturur (8, 9) ve bu peroksinitrit sitotoksiktir (9). Bu çalışmada ise L-NAME in kronik uygulanmasının erkek sıçanlarda aritmilerin artırdığı gözlemlendi ve ortalama VEB sayıları ile ortalama VT süreleri erkek sıçanlarda L-NAME uygulanan gruplarda kontrole göre artmış olarak bulundu. Sonuçta erkek sıçanlarda NOS inhibisyonunun kronik olarak yapılması I/R aritmelerini artırıcı etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Erkek sıçanlarda kronik L-NAME uygulanması ile reperfüzyonda ortalama VEB sayılarında ve ortalama VT sürelerinde artış oldu. Myokardiumda artan cGMP konsantrasyonu VF ve VEB' lere yatkınlığı azalttığı gösterilmiştir (144). NO mekanizmasında yer alan cGMP artışı ile bu bulgumuzun açıklaması yapılabilir. Ancak sitozolik Ca⁺² konsantrasyonunun artışı kardiyak hücre membranının osilatör ard potansiyelini provoke edebilir. Bu ard potansiyeller ekstrasistolleri tetikleyebilir. I/R da miyokardiyal cGMP de artış sarkolemmadan L-tipi kanallar ile Ca⁺² içeri akımını inhibe edebilir ve Ca⁺² fazlalığını azaltabilir. Böylece cGMP ard potansiyeli önleyebilir ve Ca⁺²

artışından olan aritmiler engellenebilir (144). Bulgularımıza göre dişi sıçanlarda istatistiksel olarak anlamı olmasa da reperfüzyonda ortalama VEB sayılarında azalma gözlemlendi.

NO in farklı cinsiyetlerde etkisinin farklı olabileceğine yönelik çalışmalar mevcuttur. Estrojen ile yapılan çalışmalar ile kardiyovasküler sistemde gözlemlenen farklılıklar açıklanmaya çalışılmıştır. Estrojen yerine koyma tedavisi postmenoposal kadınlarda kardiyovasküler hastalıkları azaltır. Böyle bir tedavi atherosklerotik plakların gelişimini inhibe edebilir ve koroner arterlerde atheroskleroz sonucu meydana gelen geçici miyokardiyal iskeminin oluşumunu azaltabilir. Estrojen NO üretimini artırır ve I/R sırasında salınan endojen NO miyokardiyal hasarın azalmasıyla sonuçlanabilir (144) Önceki çalışmalar I/R hasarında estrojen uygulanmasıyla sağlanacak NO üretimi I/R hasarını azaltabileceğini göstermiştir (144). İzole sıçan kalbinde yapılan deneylerde eksojen peroksinitritin düşük konsantrasyonlarda I/R aritmelerini azaltmadığını göstermiştir (8). 17 β -estradiol uygulanan köpeklerde miyokardiyal infarkt alanının ve I/R aritmelerinin insidansında azalmaya yol açtığı gösterilmiş ve bu kardio protektif etkiler L-NAME ile NOS inhibisyonu bunu engellemiştir (144). I/R hasarında farklı cinsiyetlerde farklı sonuçlar elde edilmiştir. I/R aritmelerinde bu farklılık bizim çalışmamızda da gözlemlendi. Erkek sıçanlarda aritmelerde artış izlenirken, bu artış dişi sıçanlarda izlenmedi. Reperfüzyon süresinde ortaya çıkan VF ler süre ve iskemi sayısına göre değişkenlik gösterir (108). Bu literatür bilgisi bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre karşılaştığımız aritmelerin sayı ve süresi ile ilgili VF süre ve sayısının erken I/R aritmeleri arasında değerlendirilmesi gerektiği görüşünü benimsetmektedir.

Hipoksik sıçan kalbinin reoksijenasyonu antioksidan enzimlerde geçici bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. Ventriküler aritmiler reperfüzyonu takiben saniyeler içinde ortaya çıkar. Serbest oksijen radikal süpürücülerin sıçan kalbinde bölgesel iskemi sonrası

reperfüzyon aritmilerinin insidansını azalttığı bildirilmiştir. Aynı şekilde serbest radikallerin reperfüzyon aritmelerini artırdığı gösterilmiştir. Singlet oksijen üretimi de normoksik sıçan kalbinde aritmilere yol açabilir (47).

İskemik şartlarda harekete geçen bazı proteolitik süreçlerle ksantin dehidrogenaz (XD) enziminin protein kısmının bir parçasını kayıp ederek XO haline dönüşür (5, 145). Her iki enzimde aynı reaksiyonu katalizlemekle beraber XD kataliz sonucu O_2^- üretmez, ama XO üretir. Bu proteolitik parçalanmadan sonra oksijen kaynağı yeterli olmadığı için iskemik ortamda O_2^- üretimi azdır. Ancak reperfüzyon ile birlikte aşırı ATP harcanması sonucu biriken pürin nükleotidlerinin XO enzimiyle ürik aside çevrilmesi aşamasında patlama tarzında aşırı bir O_2^- üretimi olur. Bu olay reperfüzyonun neden ilgili organda iskemik şartlardan daha çok hasar oluşturabildiğinin bir delili olabilir (145). Diğer taraftan allopürinol gibi XO inhibitörleri köpek kalbinde iskemi ya da reperfüzyon aritmilerinin sıklığını azaltmadığı gibi, domuz kalbinde süperoksit dismutazın intrakoronar uygulanması da reperfüzyon aritmilerini engellememiştir (47). Bu çalışmada sadece 100 mg/L L-NAME verilen erkek grup kontrole göre azalan XO aktivitesi gözlemlendi ($p < 0,05$) ve diğer gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p > 0,05$). Bu bulgulara göre kalpte I/R hasarında XO dışında mekanizmaların daha belirgin olarak etkilendiğini söyleyebiliriz. Ancak erkek ve dişi sıçanlar karşılaştırıldığında kontrol ve sham opere gruplarda anlamlı fark görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuç farklı cinsiyetlerde XO aktivitesinin farklılık gösterebileceğini düşündürülebilir. Erkek sıçanlarda XO aktivitesinin kontrol grubunda MDA düzeyi ile, 500 mg/L L-NAME verilen grupta GSH-Px aktivitesi ile pozitif korelasyon gösterirken, dişi gruplarda sadece CAT aktivitesi ile negatif korelasyon gösterdiği bulundu. Sonuçta erkek sıçanlarda XO aktivitesinin antioksidan sistemlerle belirli miktarda pozitif ilişki içinde olurken, dişi sıçanlarda bu ilişki gözlemlenmedi.

Reperfüzyon aritmilerinin genellikle sellüler hasarın, elektriksel düzenlemelerin ve *reentry* nin oluşturduğu heterojenisiteyle olduğu gösterilmiştir (47). İskemide, koşullar *reentry* oluşması için uygundur. $[K^+]_o$ artışı ilk saniyelerde ve buna karşı olarak depolarizasyon Na^+ kanallarının inaktivasyonuna ve aksiyon potansiyelin upstroke sırasında meydana gelen akımında bir azalmaya yol açar. $[K^+]_o$ artışı takiben membranın resistansı azalır ve bu da uyarıcı akımın etkinliğini azaltır. Sonuçta ileti hızı düşer. Kısalan aksiyon potansiyele rağmen, efektif refraktör period postrepolarizasyon refraktörün varlığından dolayı daha da uzar. Uzun süren iskemide yani 15 dakikadan sonra diastolik $[Ca^{+2}]$ hızla arttığına, gap aralık iletkenliğindeki düşüş belirgin olur. Hücreler eşleşemez, ve *reentry* görülmesi beklenen bir bulgu olur (14). İskeminin 2-10 dakika sürdüğü durumlarda daha çoğunlukla taşikardi tipinde aritmiler görülürken; VF ler daha azdır. Görülen bu aritmilerin *reentry* özelliği gösterilmiştir (14). Son çalışmalar intrasellüler kalsiyumun ve gecikmeli ard potansiyelin reperfüzyon aritmilerinde bir rolü olduğunu önermektedir. Coetzee ve ark. yaptığı çalışmada da reperfüzyon aritmilerinde intrasellüler kalsiyumun rolü, belirgin kalsiyum konsantrasyon değişiklikleri ile gösterilmiştir (47).

Reperfüzyon süresinde görülen elektrofizyolojik değişikliklerin gerçekte serbest radikal üretimi ile ilgili olmadığı ileri sürülmüştür. İntrasellüler ventriküler elektriksel aktiviteler reperfüzyonda hızlı ve sakin bir düzelmeye gider. Ferrier ve ark. bir iskemi modelinde ventriküler kasın hızla reperfüzyon süresinde düzeldiğini, hatta Purkinje liflerin depolarizasyonlarından önce bir hiperpolarizasyon olduğunu göstermiştir. Coetzee ve ark. repolarizasyon periyodunda bildirilen aksiyon potansiyel değişikliklerin aksine membran depolarizasyonunun ve aksiyon potansiyelin kısaldığını bulmuşlar. Sonuçta serbest radikal hasarı ile erken reperfüzyon sırasında olan hasarın ilişkili olmama ihtimali üzerinde durmuşlardır (47).

Serbest radikal süpürücüleri reperfüzyon süresince hidroksil iyonu ile indüklenen elektrofizyolojik değişiklikleri geciktirmiştir. Reperfüzyon uygulanan sıçan kalbinde reperfüzyonu takiben 20 saniye içinde serbest oksijen radikalleri oluşurken, 10 dakika içinde lipid peroksidasyonun oluşmadığı gösterilmiştir. Serbest radikallerin açığa çıkmasından ancak çok uzun süre sonra membran hasarı ortaya çıkar (47). Çalışmamızda sham opere gruba göre diğer erkek sıçanlarda görülen MDA düzeyindeki azlık bunun ile açıklanabilir. Bizim çalışmamızda iskemi periyodu 7 dakika ve takibinde reperfüzyon periyodu 7 dakika olarak uygulanmıştır. Bu süre içinde lipid peroksidasyonun olmaması beklenen bir sonuçtur. Serbest radikallerin yavaş etkilediğine yönelik diğer bulgular ise hipoksantin ve XO uygulamasından ancak 10 dakika sonra sadece ultrastrüktürel miyokardiyal değişikliklerin olmasıdır. Köpek myokardiyumunda, koroner arterin 15 dakika oklüzyonunda serbest oksijen radikallerinin oluştuğu, ancak iskeminin 45 dakikasına kadar lipid peroksidasyonun görülmediği bildirilmiştir (47). Ayrıca süperoksit yapımı izole sıçan kalbinde koroner akımda kısmi erken artışa (2-3 dak), 10 dakika sonra sadece kontraktıl performansda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (47).

Serbest radikaller kullanıldığında depolarizasyon ve aksiyon potansiyel süresinde değişiklikler 10-90 dakika arasında açığa çıktığı bildirilmiştir. Benzer sonuçlar izole kardiyak myositlerinde yüksek H_2O_2 konsantrasyonunda membran potansiyelinin depolarize olduğu ve aksiyon potansiyelinin kısaldığı bir geç hiperpolarizasyon ve kontraktür gelişmesi ile birlikte bildirilmiştir. Pallandi ve ark. purin içeren XO uygulanmasında 3-5 dakika sonra depolarizasyon elde ederken, Coetzee ve ark. $O_2^{\cdot-}$ uyguladıklarında daha az elektrofizyolojik etki elde etmişlerdir (47). Hem reoksijenasyon otomatitesinin hem de reperfüzyon aritmelerinin, ekstrasellüler kalsiyuma olan hassasiyeti reperfüzyon aritmelerinin sarkolemmadan gelen Ca^{+2} içeri akımı ile düzenlendiğini düşündürmüştür. Reperfüzyon aritmeleri reperfüzyon öncesi

artan kalsiyum konsantrasyonu ile artmıştır. Kalsiyum kanal antagonistlerinin kalsiyum konsantrasyonunun düşürmede yetersiz kalması, kalsiyumun hücreye voltaj-bağımlı kanallar dışında girebileceğini düşündürmüştür. Gecikmeli ard potansiyeller muhtemelen geçici içe yönelik akım ile (I_{ij}) sağlanan elektrofizyolojik bozukluklara intrasellüler $[Ca^{+2}]$ osilasyonlarına bağlı olarak aritmojenik etki gösterebilirler. En azından bir kısım reperfüzyon aritmilerinde gecikmeli ard potansiyellerin rolü olduğu öne sürülmüştür (47).

Coetzee ve ark. iskemi sonrası reperfüzyonda geciken ard potansiyelleri gözlemlemişler ve izole sıçan kalbinde kafein ve ryanodine uygulayarak reperfüzyon aritmelerini engellemişlerdir (47).

I/R hasrında radikal süpürücülerin etkisi tartışmalıdır, ancak kalsiyumun reperfüzyon aritmelerinin oluşumundaki rolü kısmen açıklanmıştır. Kalsiyum bağımlı gecikmeli ard depolarizasyonun reperfüzyon aritmelerindeki gösterilen rolü serbest radikallerin etkili olmadığını göstermez. Serbest radikal süpürücülerin I/R sonrası olan infarkt alanını azalttığı bir çok çalışmada gösterilmiştir (47). Reperfüzyonda serbest oksijen radikallerinde artış ve kalsiyum artışı olur. Radikal süpürücülerin reperfüzyonun indüklediği VF insidansını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca hipokalseminin reperfüzyonun indüklediği VF u regüler ritime çevirmede başarılı olduğu, ancak süpürücülerin bunda başarısız olduğu bildirilmiştir. Osada ve ark. yaptığı deneylerde radikal süpürücülerin VF insidansını azaltması, serbest oksijen radikallerinin reperfüzyon aritmelerinin oluşumunda önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Ancak radikal süpürücüler reperfüzyon VF' larını sinüs ritmine çevirememiştir. Serbest oksijen radikalleri aritmi oluşumunda bir tetikleyici olabilirler (146). Oksijen radikaller aritminin oluşmasında önemli bir rol oynayabilir ve radikal süpürücüler antiaritmik olarak davranabilirler, ancak farklı sonuçlarda elde edilmiştir (14). Etkiler cinslere bağlıdır, örneğin radikal süpürücülerin bu koruyucu etkisi köpeklerde gözlemlenmemiştir (113).

Kardiyomyositlerde anormal Ca^{+2} homeostasisine bağı olarak artan intrasellüler Ca^{+2} I/R hasarında rol alan mekanizmalardan biri olarak öne sürülmüştür. Yağ asitleri I_{KAch} , I_{Kur} ve I_{KAA} gibi dışa akımları aktive ederken, aynı zamanda Na^+/Ca^{+2} değıştiricisini aktive eder. Sonuçta aynı anda aktive olan içe ve dışa akımlar K^+ kaybını ve Ca^{+2} fazlalığını körükler. Hücrelerin birlikteliklerinin bozulmasıyla beraber bu sonuçlar aritmilerin oluşmasına yol açar (14). I/R hasarında diğere bir mekanizmada iskemik myokardiyuma aniden oksijen sağlanmasına bağı oksijen radikal yapımı olarak gösterilmiştir (147). I/R sonrası oksidatif stres, fazla radikal üretiminden, koruyucu enzimler olan SOD, CAT ve GSH-Px ve ayrıca süpürücülerin eksikliğinden dolayı ortaya çıkar. Radikaller sülfidril oksidasyonu ile proteinlere saldırır, lipid peroksidasyonuna yol açar, sonuçta sızdırma akımı (I_{NSC}) artar, K^+ akımlarının çoğı bloke olur, SR Ca^{+2} salan kanallar ve özellikle mitokondrial mega-kanallar aktive olur. Sonuçta elektrofizyolojik olarak, aksiyon potansiyelin *upstroke*'u ve ileti hızı azalır ve plato uzar. Daha sonra ikinci aşamada, hücre repolarize olabilir, tekrar çok kısa aksiyon potansiyel gösterir ve I_{KATP} aktivasyonu görülür. Sonuç aşamasında, hücre uyarılamamaya doğru gider ve kontraktür oluşumu gözlenir (14). Bu gözlemler ancak iskeminin ileri aşamalarında karşımıza çıkar. Erken aritmilerin oluşumunun bu açıklanan bilgilere dayanması zordur.

Ayrıca iskemi sırasında vagal reflekslerle birlikte adenosin salınımı da artar. Adenosin A_1 reseptörler ve asetilkolin bağımlı M_2 reseptörler direk olarak G proteini ile ya da indirek olarak PLC, NO sentaz ve adenilat siklaz aktivitelerinde olan değışikler yoluyla efektörlerle birleşirler. Görülen bu etkiler genelde, β reseptör uyarısına zıttır. Daha spesifik olarak, aktivasyon I_{IAch} ve I_{KATP} ler için görülürken, I_{Ca} , I_{Cl} , I_f ve gap junction iletisi negatif olarak etkilenir. Sonuç olarak, adenosin ve Ach hiperpolarizasyona, aksiyon potansiyelinin kısılmasına, diastolik depolarizasyonun yavaşlamasına elektrofizyolojik açıdan sebep olurlar (14). Mitokondride yer alan ATP bağımlı potasyum

kanalının aktivasyonu özellikle önkoşullamada görüldüğü bildirilmiştir. İskemi sırasında mitokondriler şişer ve büyük akım kanallarının açılması maddelerin dışa akışını indükleyebilir ve böylece hacim azalır (75).

Kalsiyumun sitozolde artmasının sebebi yetersiz ekstrasellüler alana Ca^{+2} un Na^{+}/Ca^{+2} değiştiricisi ile atımı, SR un yetersiz geri alımı ve içeriye artan akış ile bağlanma noktalarından protonların ayırmalarıdır. Bu artış bir kısım kanal, taşıyıcı ve enzimleri (I_{NSC} , I_{Cl} ve I_{NaCa}) aktive eder ve diğerlerini düzenler (I_{CaL} , I_{CaT} , I_{Ks} , I_{Kr} , I_f , $I_{Na,K}$ ve gap aralık kanalları). Sonuçta ventriküler ekstra atımlar (VEB) ve aritmiler ortaya çıkar. Reperfüzyon ile, Ca^{+2} un ekstrasellüler alana ve SR içine uzaklaştırılması yetersiz olur. SR' un intrasellüler Ca^{+2} regülasyonunda ve kardiyak kontraksiyon-relaksasyon olayında merkezi bir rol oynadığı açık bir şekilde gösterilmiştir (14). I/R maruz kalan kalpte SR disfonksiyonu da görüldüğü artık bilinmektedir, ancak mekanizması açık değildir. Endojen Ca^{+2} /kalmodilin bağımlı protein kinaz ve eksojen cAMP bağımlı protein kinaz SR fonksiyonunu regüle etmede rol alırlar. Netticadan ve ark. I/R sonrası kardiyak fonksiyonda azalma ve azalmış SR Ca^{+2} alımını kalpte göstermişlerdir, ayrıca endojen Ca^{+2} /kalmodilin bağımlı protein kinazın ve eksojen cAMP bağımlı protein kinazın fosforilasyonu da I/R sonrası SR da gösterilmiştir. Bu fosforilasyonları Netticadan ve ark. SOD+CAT uygulaması ile engellemişlerdir (147). Bu bulgular serbest radikallerin SR Ca^{+2} etkileşmesinde I/R hasarında görev alabileceğini düşündürülebilir. Ancak, başka bir çalışmada Ca^{+2} içeri akımını düzenleyen reoksijenasyonun CAT ile birlikte SOD uygulanmasının hasarı azaltmadığı ve böylece Ca^{+2} kontrollü gecikmeli ard depolarizasyonları ve aritmileri etkilemediği öne sürülmüştür (47). Sonuçlarımız SOD ve GSH-Px aktivitelerini erkek sıçan gruplarında değişmemiş olarak gösterdi. Ancak CAT aktivitesi ile MDA düzeyi, NO düzeyi ve SOD aktivitesi arasında erkek kontrol grubunda pozitif korelasyon izlenirken, dişi kontrol grubunda CAT aktivitesi ile NO düzeyi

arasında pozitif korelasyon izlendi. Bu pozitif korelasyon CAT aktivitesi ile NO düzeyi ve SOD aktivitesi arasında dişi sıçanlarda 500 mg/L L-NAME verilen grupta gözlemlendi. Erkek sıçan kontrol grubunda ayrıca GSH-Px ile SOD arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi. Bu pozitif korelasyon erkek sıçanların 100 mg/L L-NAME verilen grupta da gözlemlendi. Ayrıca MDA düzeyi ile GSH-Px aktivitesi arasında da pozitif korelasyon sıçanların 100 mg/L L-NAME verilen grupta izlendi.

Değişik *in vivo* modellerde kronik NOS inhibisyonu yapmak için N^o-nitro-l-arginin metil ester (L-NAME) kullanılmaktadır (148). Khalil ve ark. sıçanların içme sularına 50 mg/L L-NAME uygulayarak NOS inhibisyonunu kronik olarak sağlamışlardır ve bizim çalışmamızda bu dozların üzerinde bir uygulama ile inhibisyon temin edilmiştir. L-NAME kronik olarak uygulandığı zaman deney gruplarında kan basınçlarında belirgin bir artış diğer çalışmalarda da gözlemlenen belirgin bir sonuç olmuştur (148, 149). Bu çalışmada hem erkek hem de dişi L-NAME verilen gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak ortalama arteryel kan basınçlarında artış gözlemlendi ($p<0,05$). Bu bulgumuz literatürdeki bilgilerle uyumluluk göstermektedir. Deneysel hipertansiyon modelleri arasında sayılan L-NAME uygulanmasının bizim çalışmamızda da hem erkek hem dişi gruplarda bunu sağladığı gözlemlendi. Doggrel ve Brown sıçanlarda hipertansiyon modellerini tartıştıkları makalelerinde sıçanlarda sistemik hipertansiyon modelleri arasında NOS inhibisyonunu sıralamış ve L-NAME' in kronik uygulanması ile uygun hipertansiyon modelinin oluşturulabileceğini bildirmişlerdir (149). Çalışmamızda kalp dokusu NO düzeyleri erkek sıçanlarda I/R yapılan gruplarda sham popere gruba göre artmış olarak bulundu ve NOS inhibisyonu yapılan gruplarda kontrole göre NO düzeylerini istatistiksel olarak anlamsız olmasına rağmen azalmış olarak bulduk. Değişik organlarda I/R sonrası NO düzeylerinin belirgin olarak arttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (150).

L-NAME uygulanan tüm gruplarda I/R öncesi ortalama arteriyel kan basınçları hem erkek hem de dişilerde kontrole göre artmış olarak bulundu. Bu çalışmada, dişi sıçanların I/R aritmilerine daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca L-NAME verilerek NOS inhibisyonu ile NO oluşumunun engellenmesi erkek sıçanlarda aritmilerin artmasına neden olurken, dişi sıçanlarda böyle bir etki gözlenmemiştir. Bu sonuç NO I/R aritmilerinde ki etkisinin cinsiyete bağılı olarak değışebileceğini göstermektedir. Cinsiyete bağılı hormonal etkilerin I/R mekanizmasında ki rolü ile ilgili daha ileri çalışmalara gerek vardır.

NOS inhibisyonunun hipertansif etkisinin diğer deneysel hipertansiyon modelleriyle I/R hasarında karşılaştırılmasına yönelik çalışmalar yapılabilir. Böylece hipertansiyonlu hastalarda karşılaşırlan miyokardial iskemi ve reperfüzyon da daha etkili tedaviler planlanabilir.

6. Özet

Miyokardiyal iskemiye takiben gerçekleşen reperfüzyona bağlı olarak ciddi aritmilerin çıktığı bilinmektedir. Nitrik oksidin de iskemi-reperfüzyon hasarında rol oynadığını bildiren çalışmalar vardır. Değişik *in vivo* modellerde kronik nitrik oksit sentaz inhibisyonu yapmak için L-NAME kullanılmaktadır. Bu çalışmada nitrik oksit sentaz enziminin kronik inhibisyonunun, erkek ve dişi sıçanlarda iskemi-reperfüzyon aritmilerine ve antioksidan enzimlere olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla erkek ve dişi sıçanlar dörder gruba ayrıldı. L-NAME çeşme suyu içerisinde 15 gün süreyle, bir gruba 100 mg/l, diğer gruba 500 mg/l olacak şekilde verildi. Kontrol gruplarına ise yalnızca çeşme suyu verildi. Her iki cinsiyet için birer sham opere grubu biyokimyasal sonuçların karşılaştırılması için oluşturuldu. Deney esnasında, sol ana koroner artere, 7 dakika oklüzyon, 7 dakika reperfüzyon uygulanarak, ortaya çıkan aritmiler değerlendirildi. Sham opere gruplara I/R yapılmadan sadece cerrahi işlem yapıldı. İskemi öncesi kan basıncı ortalamalarında L-NAME verilen gruplarda, hem erkek, hem dişilerde, kontrole göre anlamlı artış tespit edildi. Yalnızca çeşme suyu verilen gruplarda, dişi sıçanlardaki VEB sayıları, VT ve VF süreleri, erkek sıçanlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Kronik L-NAME uygulanması erkek sıçanlardaki VEB sayıları, VT ve VT+VF sürelerinde artışa neden olurken, dişi sıçanlarda oluşan aritmilerde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Erkek I/R yapılan gruplarda sham opere gruba göre artmış NO düzeyi tesbit edildi. Dişi I/R yapılan gruplarda sham opere gruba göre CAT aktivitelerinde artış, GSH-Px aktivitelerinde azalma gözlemlendi. MDA düzeylerinde I/R uygulanan gruplarda beklenen artış izlenmedi. Enzim çalışmaları da elektrofizyolojik sonuçlar gibi kalpte I/R hasarında erkek ve dişilerde farklı mekanizmaların yer alabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, nitrik oksidin iskemi-reperfüzyon

aritmilerindeki rolünün cinsiyete göre değişebileceğini ve erkek sıçanlarda koruyucu rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Abstract

Serious arrhythmias has been known to occur on reperfusion after myocardial ischemia. Some studies showed that nitric oxide (NO) had a role on ischaemia-reperfusion injury. N^o-nitro-L-arginine metyl ester (L-NAME) has been used to inhibit nitric oxide synthase (NOS) chronically in different in vivo models. The aim of this study was to investigate the effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on ischemia-reperfusion arrhythmias and antioxidant enzymes in male and female rats. Male and female rats were divided into four groups. L-NAME was given as 100 mg/L or 500 mg/L in tap water for 15 days. Only tap water was given in control group. Shame opere groups were designed to compare biochemical results for both male and female rats. To produce arrhythmia, the left main coronary artery was occluded for 7 min, followed by 7 min of reperfusion. Surgical procedurs were applied to shame opere groups without I/R procedures. Mean blood pressure values before ischemia were higher in L-NAME groups than control groups in both male and female rats. For control groups, VEB numbers, VT and VF durations were higher in female rats than male rats. Chronic L-NAME administration increased the VEB numbers, VT and VT+VF durations in male rats but had no effect on arrhythmias in female rats. There was an increased NO levels in I/R performed male groups than shame opere one. CAT activities of I/R performed female rats were rised than shame opere ones and GSH-Px activities were decreased in I/R performed female groups than in shame group. MDA levels were not increased unexpectedly in I/R groups of both sexes. As electrophysiological studies, the enzyme results showed that I/R injury in heart could have different mechanism in male and female groups. These results suggest that the role of nitric oxide on ischaemia-reperfusion

arrhythmias may be different according to sex and nitric oxide may have a protective effect on these arrhythmias in male rats.



7. Referanslar

1. Wilson JD, Braunwald E, İsselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK. Harrison's Principles of Internal Medicine. 12. Edition. McGraw-Hill, USA, 1991; Volume 1: 841-842.
2. Ostadal B, Ostadalova I, and Dhalla NS. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiological Reviews* 1999; 79: 635-659.
3. Dougherty C, Barucha J, Schofield PR, Jacobson KA, and Liang BT. Cardiac myocytes rendered ischemia resistant by expressing the human adenosine A1 or A3 receptor. *FASEB J* 1998; 12: 1785-1792.
4. Ferrari R, Pepi P, Ferrari F, Nesta F, Benigno M, and Visioli O. Metabolic derangement in ischemic heart disease and its therapeutic control. *Am J Cardiol* 1998; 82: 2K-13K.
5. Manning A, Bernier M, Crome R, Little S, and Hearse D. Reperfusion- induced arrhythmias: a study of the role of xanthine oxidase-derived free radicals in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20: 35-45.
6. Konya L, Kekesi V, Juhasz-Nagy S, and Feher J. The effect of superoxide dismutase in the myocardium during reperfusion in the dog. *Free Radical Biology & Medicine* 1992; 13: 527-532.
7. Mouhieddine S, Tresallet N, Boucher F, and Leiris J. Ultrastructural basis of the free-radical scavenging effect of indapamide in experimental myocardial ischemia and reperfusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1993; 22: 47-52.
8. Altuğ S, Demiryurek AT, Cakıcı I, Kanzık I. The beneficial effects of norexynitrite on ischaemia-reperfusion arrhythmias in rat isolated hearts. *European*

9. Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL, Billiar TR. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation* 2000; 101: 2742-2748.
10. Guyton AC, Hall EJ. *Tıbbi Fizyoloji (Türkçe Çeviri Editörü Çavuşoğlu H) 9. Edisyon, Yüce Yayınları ve Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 1996; 107-127.*
11. Ganong WF. *Review of Medical Physiology 19. Edition, Appleton & Lange, USA, 1999; 522-549.*
12. Peters NS New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemia and hypertrophied human hearts. *Clinical Science* 1996; 90: 447-452.
13. Roden DM, George AL The cardiac ion channels: Relevance to management of arrhythmias. *Annu Rev Med* 1996; 47: 135-148.
14. Carmeliet E Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiological Reviews* 1999; 79: 917-1017.
15. Hadley RW, and Lederer WJ Intramembrane charge movement in guinea-pig and rat ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 1989; 415: 601-624.
16. Maltsev VA, and Undrovinas AI Cytoskeleton modulates coupling between availability and activation of cardiac sodium channel. *Am J Physiol* 1997; 273 (Heart Circ. Physiol.42): H1832-H1840.
17. Makielski JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, and Kyle JW Coexpression of $\beta 1$ with cardiac sodium channel α subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Mol. Pharmacol* 1996; 49:30-39.
18. McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, and Pelzer DJ Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 1994; 74: 365-507.

19. Wang SY, Clague JR, and Langer GA Increase in calcium leak channel activity by metabolic inhibition or hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes and its inhibition by polycation. *J. Mol. Cell. Cardiol* 1995; 27:211-222.
20. Nilius B, Hess P, Lansman JB, and Tsien RW A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985; 316: 443-446.
21. Li GR, and Nattel S Properties of human atrial I_{Ca} at physiological temperatures and relevance to action potential. *Am. J. Physiol (Heart Circ. Physiol.41)* 1997; 272:H227-H235.
22. Cordeiro JM, Howlett SE, and Ferrier GR Simulated ischaemia and reperfusion in isolated guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1794-1802.
23. Jeck CD, and Boyden PA Age-related appearance of outward currents may contribute to developmental differences in ventricular repolarization. *Circ Res* 1992; 71:1390-1403.
24. Mansourati J, and Le Grand B Transient outward current in young and adult diseased human atria. *Am J Physiol (Heart Circ. Physiol.34)* 1993; 265:H1466-H1470.
25. Wang Z, Fermini B, and Nattel S Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1540-1546.
26. Beuckelmann DJ, Nabauer M, and Erdmann E Alterations of K^+ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993; 73:379-385.
27. Konarzewska H, Peeters GA, and Sanguinetti MC Repolarizing K^+ currents in nonfailing human hearts. Similarities between right septal subendocardial and left subepicardial ventricular myocytes. *Circulation* 1995; 92: 1179-1187.
28. Veldkamp MW, Van Ginneken J, Opthof T, and Bouman LN Delayed rectifier channels in human ventricular myocytes. *Circulation* 1995; 92, 3497-3504.

29. Liu DW, and Antzelevitch C Characteristics of the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I_{Ks} contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ Res* 1995; 76: 351-365.
30. Yue L, Feng J, Li GR and Nattel S. Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1996; 270: H2157-H2168.
31. Muraki K, Imaizumi Y, Watanabe M, Habuchi Y and Giles WR. Delayed rectifier K^+ current in rabbit atrial myocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1995; 269:H524-H532.
32. Salata JJ, Jurkiewicz NK, Jow B, Folander K, Guinasso PJ, Raynor B, Swanson R and Fermini B. I_K of rabbit ventricle is composed of two currents: evidence for I_{KS} . *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1996; 271: H2477-H2489.
33. Follmer CH, Lodge NJ, Cullinan CA and Colatsky TJ. Modulation of the delayed rectifier, I_K , by cadmium in cat ventricular myocytes. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1992; 262: C75-C83.
34. Wahler GM, Dollinger SJ, Smith JM and Fleml KL. Time course of postnatal changes in rat heart action potential and in transient outward current is different. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1994; 267: H1157-H1166.
35. McMorn SO, Harrison SM, Zang WJ, Yu XJ and Boyett MR. A direct negative inotropic effect of acetylcholine on rat ventricular myocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1993; 265: H1393-H1400.
36. Xie LH, Takano M, and Noma A. Development of inwardly rectifying K^+ channel family in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1997; 272: H1741-H1750.

37. Koumi S and Wasserstrom JA. Acetylcholine-sensitive muscarinic K⁺ channels in mammalian ventricular myocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1994; 266: H1812-H1821.
38. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; 305: 147-148.
39. Kim D and Duff RA. Regulation of K⁺ channels in cardiac myocytes by free fatty acids. *Circ Res* 1990; 67: 1040-1046.
40. Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B and Nattel S. Comparative mechanisms of 4-aminopyridine-resistant *I_{to}* in human and rabbit atrial myocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1995; 269: H463-H472.
41. Zhang K, Barrington PL, Martin RL and Teneick RE. Protein kinase-dependent Cl⁻ currents in feline ventricular myocytes. *Circ Res* 1994; 75: 133-143.
42. Warth JD, Collier ML, Hart P, Geary Y, Gelband CH, Chapman T, Horowitz B and Hume JR. CFTR chloride channels in human and simian heart. *Cardiovasc Res* 1996; 31:615-624.
43. Zakharov SI, Pieramici S, Kumar GK, Prabhakar NR and Harvey RD. Nitric oxide synthase activity in guinea pig ventricular myocytes is not involved in muscarinic inhibition of cAMP-regulated ion channels. *Circ Res* 1996; 78: 925-935.
44. Ehara T, Iyadomi I and Hirahara K. Regulation of cyclic AMP-dependent Cl⁻ channel in heart. *Jpn J Physiol* 1994; 44: 173-176.
45. Hwang TC, Nagel G, Nairn AC and Gadsby DC. Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1994; 91: 4698-4702.
46. Zygmunt AC. Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1994; 267: H1984-H1995.

47. Coetzee WA, Owen P, Dennis SC, Saman S and Opie LH. Reperfusion damage: free radicals mediate delayed membrane changes rather than early ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 156-164.
48. Levesque PC and Hume JR. ATP₀ but not cAMP_i activates a chloride conductance in mouse ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 336-343.
49. Matsuura H and Ehara T. Activation of chloride current by purinergic stimulation in guinea pig heart cells. *Circ Res* 1992; 70: 851-855.
50. Sorota S. Swelling-induced chloride-sensitive current in canine arterial cells revealed by whole-cell patch-clamp method. *Circ Res* 1992; 70: 679-687.
51. Tseng GN. Cell swelling increases membrane conductance of canine cardiac cells: evidence for a volume-sensitive Cl⁻ channel. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1992; 262:C1056-C1068.
52. Duan D and Nattel S. Properties of single outwardly rectifying Cl⁻ channels in heart. *Circ Res* 1994; 75: 789-795.
53. Jabr RI and Cole WC. Oxygen-derived free radical stress activates nonselective cation current in guinea pig ventricular myocytes. Role of sulfhydryl groups. *Circ Res* 1995; 76: 812-824.
54. Hirano YS, Abe S, Sawanobori T and Hiraoka M. External ATP-induced changes in [Ca²⁺]_i and membrane currents in mammalian arterial myocytes. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1991; 260: C673-C680.
55. Parker KE and Scarpa A. An ATP-activated nonselective cation channel in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1995; 269: H789-H797.
56. Zheng JS, Christie A, Levy MN and Scarpa A. Modulation by extracellular ATP of two distinct currents in rat myocytes. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1993; 264: C1411-C1417.

57. Clemo HF, Stambler BS and Baumgarten CM. Persistent activation of a swelling-activated cation current in ventricular myocytes from dogs with tachycardia-induced congestive heart failure. *Circ Res* 1998; 83: 147-157.
58. Matsuura H and Shattock MJ. Effects of oxidant stress on steady-state background currents in isolated ventricular myocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1991; 261: H1358-H1365.
59. Crumb WJ, Pigott JD and Clarke CW. Comparison of I_{to} in young and adult human atrial myocytes: evidence for developmental changes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1995; 268: H1335-H1342.
60. DiFrancesco D. The pacemaker current (I_f) plays an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 307-308.
61. Wang J, Schwinger RH, Frank K, Müller-ehmsen J, Martin Vasallo P, Pressley TA, Xiang A, Erdmann E and McDonough AA. Regional expression of sodium pump subunits isoforms and Na^+ - Ca^{2+} exchanger in the human heart. *J Clin Invest.* 1996; 98: 1650-1658.
62. Santana LF, Gomez AM and Lederer WJ. Ca^{2+} flux through promiscuous cardiac Na^+ channels: slip-mode conductance. *Science* 1998; 279: 1027-1033.
63. Cannell MB, Cheng H and Lederer WJ. The control of calcium release in heart muscle. *Science* 1995; 268: 1045-1049.
64. Leblanc N and Hume JR. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science* 1990; 248: 372-376.
65. Tsuchiya K, Hrie M, Watanuki M, Albrecht CA, Obayashi K, Fujiwara H and Sasayama S. Functional compartmentalization of ATP is involved in angiotensin II-mediated closure of cardiac ATP-sensitive K^+ channels. *Circulation* 1997; 96: 3129-3135.

66. Sipido KR, Maes M and Van De Werf F. Low efficiency of Ca^{2+} entry through the Na^+ - Ca^{2+} exchanger as trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca^{2+} current and reverse-mode Na^+ - Ca^{2+} exchange. *Circ res* 1997; 81: 1034-1044.
67. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361: 315-325.
68. Marks AR. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1997; 272: H597-H605.
69. Steinberg SF and Alter A. Enhanced receptor-dependent inositol phosphate accumulation in hypoxic myocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1993; 265: H691-H699.
70. Du XJ, Anderson KE, Jacobsen A, Woodcock EA and Dart AM. Suppression of ventricular arrhythmias during ischemia-reperfusion by agents inhibiting $\text{Ins}(1,4,5) \text{P}_3$ release. *Circulation* 1995; 91: 2712-2716.
71. Kawano S, Nakamura F, Tanaka T and Hiraoka M. Cardiac sarcoplasmic reticulum chloride channels regulated by protein kinase A. *Circ Res* 1992; 71: 585-589.
72. Simbula G, Glascott PA, Akita S, Hoek JB and Farber JL. Two mechanisms by which ATP depletion potentiates induction of the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1997; 273: C479-C488.
73. Inoue L, Nagase H, Kishi K and Higuti T. ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991; 352: 244-247.
74. Sato T, O'Rourke B and Marbán E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent K^+ channels by protein kinase C. *Circ Res* 1998; 83: 110-114.
75. Garlid KD, Paucek P, Yarov Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA and Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its

interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection *Circ Res* 1997; 81: 1072-1082.

76. Liu Y, Gao WD, O'Rourke and Marban E. Synergistic modulation of ATP-sensitive K^+ currents by protein kinase C and adenosine. Implications for ischemic preconditioning. *Circ Res* 1996; 78: 443-454.

77. Gross GJ, Mei DA, Sleph PG and Grover GJ. Adenosine A1 receptor blockade does not abolish the cardioprotective effects of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener bimakalim. 1997; 280: 533-540.

78. Akao M, Otani H, Horie M, Takano M, Kuniyasu A, Nakayama H, Kouchi I, Sasayama S and Murakami T. Myocardial ischemia induces differential regulation of K_{ATP} channel gene expression in rat hearts. *J Clin Invest* 1997; 100: 3053-3059.

79. Peters NS and Wit AL. Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis. *Circulation* 1998; 97: 1746-1754.

80. Veenstra RD and Dehaan RL. Cardiac gap junction channel activity in embryonic chick ventricle cells. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1988; 254: H170-H180.

81. Spray DC and Burt JM. Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1990; 258: C195-C205.

82. Darrow BJ, Laing JG, Lampe PD, Saffitz JE and Beyer EC. Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1995; 76: 381-387.

83. Kwong KF, Schuessler RB, Green KG, Laing JG, Beyer EC, Boineau JP and Saffitz JE. Differential expression of gap junction proteins in the canine sinus node. *Circ Res* 1998; 82: 604-612.

84. Neely JR, Rovetto MJ, Whitmer JI and Morgan HE. Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working heart. *Am J Physiol* 1973; 225: 651-658.

85. Neely JR, Whitmer JI and Rovetto MJ. Effects of coronary blood flow on glycolytic flux and intra cellular pH in isolated rat hearts. *Circ res* 1975; 37: 733-741.
86. Bourdillon PD and Poole-Wilson PA. The effects of verapamil, wuiscence and cardioplegia on calcium exchange and mechanical function in ischaemic rabbit myocardium. *Circ res* 1982; 50: 360-368.
87. Parr DR, Wimhurst JM and Harris EF. Calcium-induced damage of rat heart mitochondria. *Cardiovasc Res* 1975; 9: 366-372.
88. Murphy E, Aitcon JF, Horres CR and Lieberman M. Calcium elevation in cultured heart cells; its role in cell injury. *Am J Physiol* 1983; 245: C316-C321.
89. Konotos HA, Wei EP, Povlishock JJ, Dietrich WD, Magiera CJ and Ellis EF. Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin G₂. *Science* 1980; 209: 1242-1245.
90. Bersohn MM, Philipson KD and Yi FJ. Sodium calcium exchange and sarcolemmal enzymes in ischaemic rabbit hearts *Am J Physiol* 1982; 242: C288-C295.
91. McCord JM. Oxygen derived free radicals in post ischaemic injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163.
92. Hammond B, Kontos HA and Hess ML. Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischaemia and reperfusion injury and in cerebral vascular damage. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63:173-187.
93. Post JA, Leunissen-Bijrett J, Ruigrok TC and Verkleij AJ. Ultra-structure changes of sarcolemma and mitochondria in the isolated rabbit heart during ischaemia and reperfusion. *Biochem Biophys Acta* 1987; 845:119-123.
94. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, et al. Role of oxygen free radicals in ischaemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:215S-222S.

95. Mullane KM, Read N, Salmon JA and Mancada S. Role of leukocytes in acute myocardial damage in anaesthetised dogs: relation ship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228:510522.
96. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 1984; 73: 599-601.
97. Rosen H, Rakita R, Waltersdorh AM and Klebanoff S. Myeloperoxidase-mediated damage to the succinate oxidase system of *Escherichia Coli*. *J Biol Chem* 1987; 262:15004-15010.
98. Ronson JL, Hook Kunkel BG, Abrams GR and Schork MA. Reduction of the extent of ischaemic injury by neutrophyl depletion in the dog. *Circulation* 1983; 62:1016-1023.
99. Manning AS. Reperfusion-induced arrhythmias: do free radicals play a critical role? *Free Rad Biol Med* 1988; 4:305-316.
100. Wilde AA and Aksnes G. Myocardial potassium loss and cell depolarisation in ischaemia and hypoxia. *Cardiovasc Res* 1995; 29:1-15.
101. Shattock MJ and Matsuura H. Measurement of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump current in isolated rabbit ventricular myocytes using the whole-cell coltage-clamp technique. Inhibition of the pump by oxidant stress. *Circ Res* 1993; 72:91-101.
102. Wagner MB, Golod D, Wilders R, Verheijck EE, Joyner RW, Kumar R, Jongsma HJ, Van Ginneken AC and Goolsby WN. Modulation of propagation from an ectopic focus by electrical load and by extracellular potassium. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1997; 272:H1759-H1769.
103. Hiraoka M, Sunami A, Fan Z and Sawanobori T. Multiple ionic mechanisms of early afterdepolarizations in isolated ventricular myocytes from guinea-pig hearts. *Ann NY Acad Sci* 1992; 644:33-47.

104. Wit AL and Janse MJ. Experimental models of ventricular tachycardia and fibrillation caused by ischemia and infarction. *Circulation* 1992; 85:Suppl I: I-32-I-42.
105. Gomez AM, Benitah JP, Henzel D, Vinet A, Lorente P and Delgado C. Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1997; 272:H1078-H1086.
106. Volders PGA, Sipido KR, Carmeliet E, Spatjens RLHMG, Wellens HJJ and Vos MA. Repolarizing K^+ currents I_{to1} and I_{Ks} are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation* 1999; 99, 206-210.
107. Spach MS and Heidlage JF. The stochastic nature of cardiac propagation at a microscopic level. Electrical description of myocardial architecture and its application to conduction. *Circ Res* 1995; 76:366-380.
108. Coronel R, Wilms Schopman FJ, Opthof T, Cinca J, Fiolet JW and Janse MJ. Reperfusion arrhythmias in isolated perfused pig hearts. Inhomogeneities in extracellular potassium, ST and TQ potentials, and transmembrane action potentials. *Circ Res* 1992; 71:1131-1142.
109. Smith WT, Fleet WF, Johnson TA, Engle CL and Cascio WE. The I_b phase of ventricular arrhythmias in ischemic in situ porcine heart is related to changes in cell-to-cell electrical coupling. *Circulation* 1995; 92:3051-3060.
110. Coronel R, Wilms Schopman FJ and Janse MJ. Profibrillatory effects of intracoronary thrombus in acute regional ischemia of the in situ porcine heart. *Circulation* 1997; 96:3985-3991.
111. Kimura S, Bassett AL, Furukawa T, Cuevas J and Myerburg RJ. Electrophysiological properties and responses to simulated ischemia in cat ventricular myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ Res* 1990; 66:469-477.

112. Priori SG, Mantica M, Napolitano C and Schwartz PJ. Early afterdepolarizations induced in vivo by reperfusion of ischemic myocardium. A possible mechanism for reperfusion arrhythmias. *Circulation* 1990; 81:1911-1920.
113. Euler DE. Role of oxygen-derived free radicals in canine reperfusion arrhythmias. *Am J Physiol (Heart Circulation Physiol)* 1995; 268:H295-H300.
114. Jacobsen AN, Du XJ, Lambert KU, Dart AM and Woodcock EA. Arrhythmogenic action of thrombin during myocardial reperfusion via release of inositol 1,4,5-triphosphate. *Circulation* 1996; 93:23-26.
115. Anyukhovskiy EP and Rosen MR. Abnormal automatic rhythms in ischemic Purkinje fibers are modulated by a specific α_1 -adrenergic receptor subtype. *Circulation* 1991; 83:2076-2082.
116. Hansen DE, Craig CS and Hondeghem LM. Stretch-induced arrhythmias in the isolated canine ventricle. Evidence for the importance of mechanoelectrical feedback. *Circulation* 1990; 81:1094-1105.
117. Hansen DH, Stacy GP, Taylor LK, Jobe RL, Wang Z, Denton PK and Alexander J. Calcium and sodium-dependent modulation of stretch-induced arrhythmias in isolated canine ventricles. *Am J Physiol (Heart Circulation Physiol)* 1995; 268:H1803-H1813.
118. Stacy GP, Jobe RL, Taylor LK and Hansen DE. Stretch-induced depolarizations as a trigger of arrhythmias in isolated canine left ventricles. *Am J Physiol (Heart Circulation Physiol)* 1992; 263:H613-H621.
119. Wang Z, Taylor LK, Denney WD and Hansen DE. Initiation of ventricular extrasystoles by myocardial stretch in chronically dilated and failing canine left ventricle. *Circulation* 1994; 90:2022-2031.

120. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASE J* 1993; 7:349-360.
121. Moncada S, Higgs A and Furchgott R. XIV. International Union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacological Reviews* 1997; 49(2):137-141.
122. Borjes PN and Borjes C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 1995; 41(6):904-907.
123. Dalkara T and Moskowitz MA. The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* 1994; 4:49-57.
124. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH and Zureick JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6770-6774.
125. Pufahl RA, Nanjappan PG, Woodard RW and Marletta MA. Mechanistic probes of N-hydroxylation of L-arginine by the inducible nitric oxide synthase from murine macrophages. *Biochemistry* 1992; 31:6822-6828.
126. Moncada S and Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-2012.
127. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Granger DL, Drapier JC, Amber IJ and Lancaster JR. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In: *Nitric oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System*. Ed. By Moncada S and Higgs A., Elsevier, Amsterdam, 1990 pp. 189-223
128. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J and Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339:572-575.

129. Griffith OW and Gross SS. Inhibitors of nitric oxide synthases. In: Methods in nitric oxide research, ed. By Feelisch M and Stamler JS, Wiley and Sons Ltd. New York, 1996. pp. 187-220.
130. Walker M.J.A., Curtis M.J., Campbell R.W.F., et al The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischemia, infarction, and reperfusion Cardiovascular Research 1988,22:447-455.
131. Olmez E., Birincioglu M., Aksoy T., Acet A. Effects of captopril on ischemia-reperfusion-induced arrhythmias in an in vivo rat model. Pharmacol Res. 1995; 32; 37-41.
132. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.
133. Aebi H. Catalase in: Bergmeyer HU (ed). Methods of enzymatic analysis. New York and London: Academic Press, Inc. 1974; 1-2:673-677.
134. Sun Y, Oberley LW and Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988; 34(3):497-500.
135. Durak I, Yurtarlan Z, Canbolat O and Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. Clin Chim Acta 1993; 214:103-104.
136. Paglia DE and Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70:158-170.
137. Prajda N and Weber G. Malign transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. FEBS lett 1975; 59:245-249.
138. Cortas NK and Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem 1990; 36:1440-1443.

139. Somogyi M. A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar. 1930; 86: 655-663.
140. Wasowicz W, Neve J and Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. Clin Chem 1993; 39:2522-2526.
141. Xie YW and Wolin MS. Role of nitric oxide and its interaction with superoxide in the suppression of cardiac muscle mitochondrial respiration. Circulation 1996; 94:2580 –2586.
142. Fukuda H, Sawa Y, Kadoba K, Taniguchi K, Shimazaki Y and Matsuda H. Supplement of nitric oxide attenuates neutrophil-mediated reperfusion injury. Circulation 1995; 92:413-416.
143. Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C, Punz A, Mueller M, Afkhampour K, Mittlboeck M, Losert U, Polterauer P, Roth E, Patton S and Malinski T. L-arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia /reperfusion injury in skeletal muscle. Circulation 1997; 96:667-675.
144. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Funaya H and Hori M. Amelioration of ischemia-and reperfusion-induced myocardial injury by 17 β -estradiol. Role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels. Circulation 1997; 96:1953-1963.
145. Xia Y and Zweier JL. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. JBC 1995; 270:18797-18803.
146. Osada M, Sato T, Komori S and Tamura K. The role of oxygen free radicals and extracellular calcium ions in reperfusion- induced arrhythmias. Japanese Circulation Journal 1991; 55:609-616.

147. Netticadan T, Temsah R, Osada M and Dhalla NS. Status of Ca⁺²/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol (Cell physiol)* 1999; 277:C384-C391.
148. Khalil RA, Crews JK, Novak J, Kassab S and Granger JP. Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis pregnant rats. *Hypertension* 1998; 31:1065-1069.
149. Doggrell SA and Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 1998; 39:89-105.
150. Hropot M, Grotsh H, Klaus E et al. Ramipril prevents hypertension, cardiac hypertrophy and renal insufficiency. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1994; 350:646-652.

Jüri Başkanı
UYGUNDUR
Adı Soyadı (İmza)

Jüri Üyesi
UYGUNDUR
Adı Soyadı (İmza)

Jüri Üyesi
UYGUNDUR
Adı Soyadı (İmza)

Jüri Üyesi
UYGUNDUR
Adı Soyadı (İmza)

Jüri Üyesi
UYGUNDUR
Adı Soyadı (İmza)

**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**