

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR

**İSATININ İZOLE SIÇAN KALBİNDE OLUŞTURULAN
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDAKİ ETKİLERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Zuhal GUKSU

Referans no: 10057962

EDİRNE-2014

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR

**İSATININ İZOLE SIÇAN KALBİNDE OLUŞTURULAN
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDAKİ ETKİLERİ**

(Yüksek Lisans Tezi)


Zuhal GUKSU


Tez No:

EDİRNE-2014

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Zuhale GUKSU tarafından tez başlığı “ **İsatinin izole sıçan kalbinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarındaki etkileri** ” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 20/11/2014 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.


İmza
Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK
JÜRİ BAŞKANI


İmza
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR


İmza
Doç. Dr. GÜLNUR Kızılay ÖZFİDAN

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sırasında benden bilgi, tecrübe, hoşgörü ve sabrını eksik etmeyen tez danışman hocam sayın Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR'a, eğitimim hayatım boyunca bilgilerinden yararlandığım değerli emekli hocamız Prof. Dr. Kadir KAYMAK, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK, Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU ve Yrd. Doç. Dr. Mevlüt YAPRAK'a sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca çalışmamda yardımlarıyla yanımda olan Prof. Dr. Necdet Süt'e, Yrd.Doç.Dr. Ebru Taştekin'e, Dr. Orkide PALABIYIK, Uzman Dr. Aziz KARACA ve Serap TOPÇU'ya teşekkür ederim. Araştırmamın maddi desteğini sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim. Bunun dışında tez çalışmam boyunca benimle birlikte olan oğluma ve benden desteğini esirgemeyen sevgili eşim ve çalışma arkadaşlarıma minnettar olduğumu belirtmek isterim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
İSATİNİN BİYOLOJİK ETKİLERİ	3
ATRİAL NATRİÜRETİK PEPTİTLER VE İSATİN ETKİLEŞİMİ	6
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ MEKANİZMASI	7
PROİNFLAMATUAR MEDATÖRLERİN KARDİYAK İSKEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ	11
İZOLE KALPTE DÜŞÜK AKIMLI İSKEMİ MODELİ	12
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	14
GEREÇ VE YÖNTEMLER	17
BULGULAR	28
TARTIŞMA	34
SONUÇLAR	40
ÖZET	42
SUMMARY	44
KAYNAKLAR	46
RESİMLEMELER LİSTESİ	51
ÖZGEÇMİŞ	53
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ATP	: Adenozin trifosfat
ANP	: Atrial natriüretik peptit
BNP	: Beyin natriüretik peptit
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CNP	: C-tipi natriüretik peptit
COX-2	: Siklooksigenaz-2
Dp/dtmaks	: Maksimum sol ventrikül basınç değişim oranı
Dp/dtmin	: Minimum sol ventrikül basınç değişim oranı
GC	: Guanilat siklaz
IP	: İntraperitoneal
MAO	: Monoamin oksidaz
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NPR-A	: Natriüretik peptit reseptör tipi A
NPR-B	: Natriüretik peptit reseptör tipi B
NPR-C	: Natriüretik peptit reseptör tipi C
SVGB	: Sol ventrikül gelişim basıncı
TTZ	: Trifentil tetrazolium klorid

GİRİŞ ve AMAÇ

İsatin (indoleedione 2,3), memeli dokularında ve vücut sıvılarında bulunan endojen bir indoldür. Bazal dokularda isatin konsantrasyonları organlara göre farklılık göstermektedir (1,2). İsatin başlangıçta endojen monoamin oksidaz (MAO) inhibitör aktivitesinin bir bileşeni olarak tanımlanmıştır ve bağırsakta triptofan katabolizmasındaki indolden üretilebilmektedir. İsatinin oluşum yolları hala iyi deneysel desteği gerektirmektedir (3).

Bundan başka isatin, natriüretik peptid reseptörleri üzerine antagonist etkileri olduğu bilinen bir indol olup atrial natriüretik peptid (ANP) ve beyin natriüretik peptid (BNP)'in etkili olduğu reseptörlere bağlanarak ANP ve BNP'nin tersine guanilat siklazı (GC) inhibe edici rol oynar. Böylece isatin, natriüretik peptitlerin etkilerine bağlı GC yolu üzerinden oluşan siklik guanozin monofosfat (cGMP) salınımını azaltmaktadır (2-4). İsatinin ayrıca apoptoz inhibitörü, antikolvülzan, antiviral, antibakteriyal ve antifungal etkilerde rolü olduğu bildirilmektedir (5).

Son yıllarda ANP'nin immün sistem üzerine düzenleyici etkileri olduğu belirtilmektedir (6). ANP, siklooksigenaz-2 (COX-2), indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve tümör nekroz faktör- α gibi pro-inflamatuvar mediatörleri baskılayıcı etki göstermektedir. Siklooksigenaz enzimleri hücrelerde araşidonik asitten eikosanoidlerin oluşumunda rol oynar.

Siklooksigenaz enzimlerinden biri olan COX-2 hücrelerin çoğunda düşük miktarda bulunurken inflamasyona bağlı olarak hücrelerde hızla eksprese olmaktadır (6,7). İsatinin COX-2 ile ilişkili etkileri ise henüz tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir. COX-2 transkripsiyonunu düzenleyen faktörler arasında nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) yer almaktadır. NF- κ B nin miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarında, iskemik ön koşullama ve

anstable anjina patofizyolojisinde anahtar rolü olduğu belirtilmektedir. NF- κ B miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon sırasında aktive olur. İzole kalplerde bu aktivasyonun iskemi başladıktan hemen sonra olduğu ve reperfüzyon döneminde arttığı belirtilmektedir (8). İsatinin COX-2 üzerinden oluşacak muhtemel etkilerinde NF- κ B düzeyinde değışim oluşabilir.

İskemi reperfüzyon hasarına bağı kardiyak hemodinamik etkilerinin incelendiğı daha önceki çalışmalarda, isatinin doku perfüzyon sıvısına verildiğı görülmektedir. Endojen bir indol olan isatinin intraperitoneal uygulanarak dokulara dağılımı ve etkilerini bu şekilde oluşturması sonrasındaki kardiyak etkiler ise tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle bu çalışmada izole-perfüze sıçan kalbinde intraperitoneal olarak uygulanan isatinin düşük akımlı iskemi ve sonrasındaki reperfüzyon hasarı üzerine olan hemodinamik etkisi ve isatin uygulanmasına bağı cGMP düzeyindeki değışim incelenmiştir. Ayrıca, son yıllarda ortaya çıkan ANP'nin etkileri ile ilgili bulgular ışığında, isatinin miyokardiyal dokuda bir proinflamatuvar mediatör olan COX-2 ve COX-2 transkripsiyonunu düzenleyen faktör olan NF- κ B mRNA düzeylerine etkisi araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

İSATİNİN BİYOLOJİK ETKİLERİ

Endojen bir indol olan isatin kalpte ve ayrıca beyin, akciğer, karaciğer, dalak gibi organlar, üreme sistemi ve vücut sıvılarında bulunmaktadır (4). İsatinin kandaki konsantrasyonu $1\mu\text{M}$ 'ü aşabilmektedir (9). Doku isatin konsantrasyonları organlara göre farklılık göstermektedir (Tablo 1). Ayrıca isatin konsantrasyonlarının cinsiyete bağlı da değişim gösterdiği bildirilmiştir. Beyin dokusunda bazal isatin düzeyleri kadınlarda erkeklerden daha yüksektir. İsatın, merkezi sinir sistemi içinde hipokampus, beyincik ve striatumda bulunmaktadır (3). Periferal organlarda, seminal veziküller ve vas deferanste $47,4-79\ \mu\text{M}$ gibi yüksek konsantrasyonlardadır. Kalp dokusundaki isatinin maksimal konsantrasyonu ise $3\ \mu\text{M}$ 'e yaklaşmaktadır (10). Bu düzey neredeyse beyindeki 3 katı kadardır.

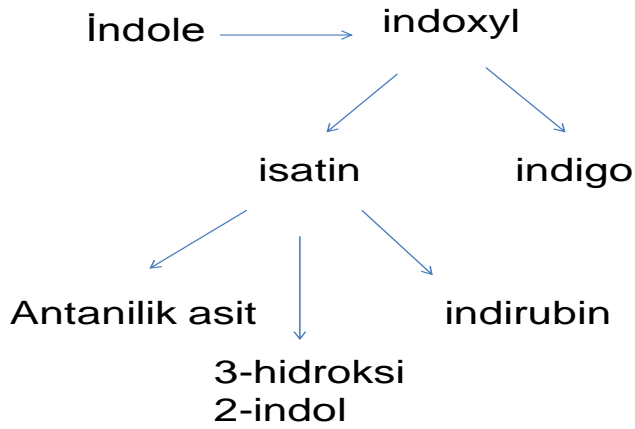
İsatın konsantrasyonları stres durumundan etkilenebilir. Sığıçanda, stres nedeniyle kalpte isatin düzeyi 2-3 kat artmaktadır. İdrarda ise isatin atılımı 2,5-6 kat artmakta ve serum isatin konsantrasyonu ise $2.9 \pm 0.29\ \mu\text{M}$ ' e ulaşabilmektedir (3).

Endojen isatin oluşumu tam olarak bilinmemekte ve iyi deneysel desteği gerektirmektedir. Gillam E.M. ve arkadaşlarının (11) yaptığı çalışmada endojen bir indol olan isatinin metabolik süreçler sonucu nasıl oluştuğu ve hangi katabolik süreçlere girdiği araştırılmıştır. İsatinin katabolizmasında mikrozomal sitokrom P450 enzimlerinin rol oynadığı belirtilmiştir. İsatın bağırsakta, triptofan katabolizması sonucu oluşan indolden üretilmektedir. Barsakta üretilen bu isatin katabolize edilmektedir. Ayrıca sindirim sistemindeki katabolik yollar dışında idrarla da dışarı atılmaktadır. İsatın katabolizması sonucu indirubin, antanilik

asit, 3 hidroksi-2oksoindol oluşmaktadır (Şekil 1). Tüm bu bileşikler idrarda da bulunmaktadır (11).

Tablo 1. Sıçan dokularında isatin konsantrasyonları (3)

Doku	İsatin konsantrasyonları (µM)
Tüm beyin	0.3-0.4
Hipokampus	0.9-1.3
Serebellum	0.8-1.2
Striatum	0.6-1.0
Kalp	0.79-2.62
Karaciğer	0.77-1.45
Böbrek	0.88-1.32
Akciğer	0.14-1.20
Dalak	0.35-0.62
Testis	0.16-0.63
Seminal vezikül	2.37-47.4
Vas deferens	1.58-79



Şekil 1. İsatinin oluşum mekanizması ve katabolizması

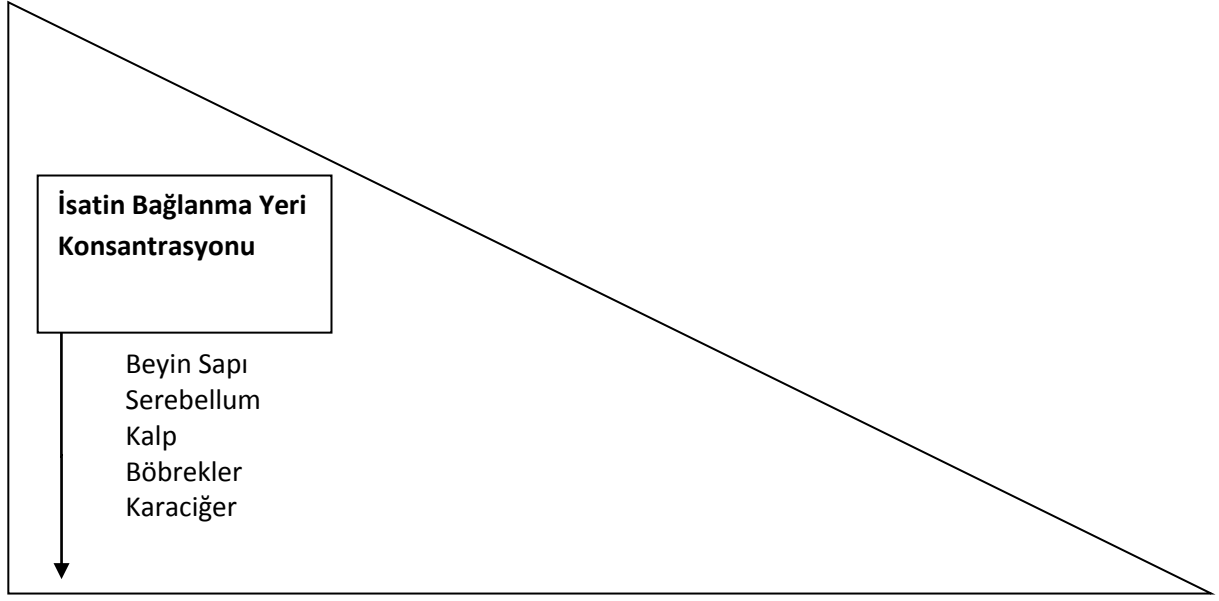
İsatinin beyin ve diğer dokulardaki bağlanma yerlerinin birden fazla olduğu gösterilmiştir. İnsitu isatin görüntülenmesinde sıçan beyнинin farklı bölgelerinde isatin bağlanma yerleri farklılık göstermektedir. Serebellum, hipokampus, korteks ve hipotalamik çekirdekler isatinin en fazla şekilde etkilediği merkezi sinir sistemi bölgeleridir (12).

Sıçanlarda MAO inhibitörü olan pargyline isatinde azalmaya neden olmakta, ama MAO'nun isatin bağlayıcılığını tam olarak kaldıramamaktadır. MAO, isatin bağlayıcılığında önem taşımaktadır (13). Çünkü isatin stres durumunda artan bir indoldür ve MAO inhibisyonu oluşturarak dopamin üzerinden biyolojik etkiler meydana getirmektedir. Bu etkilerin Parkinson hastalığında meydana gelen bradikineziyi önleyici rolü olabileceği deneysel çalışmalarda ortaya konmuş bulunmaktadır (14).

İsatin ayrıca farklı bir bağlanma da göstermektedir. Medvedev ve arkadaşlarının (15) yaptığı çalışmada isatinin natriüretik peptitler üzerine olan antagonist etkisi araştırılmıştır. İsatın, sıçan beyinde ANP ve C-tipi natriüretik peptit (CNP) reseptörlerine bağlanmaktadır. İsatın, natriüretik peptit reseptör tipi-A (NPR-A) reseptörlerine bağlanarak ve guanil siklaz aracılığı ile hücresel düzeyde baskılayıcı etkiler göstermektedir. Ayrıca natriüretik peptit reseptör tipi-C (NPR-C)'ye bağlandığında ise etkisini adenilat siklaz yolu aracılığı ile oluşturduğu bildirilmiştir (1).

Natriüretik peptidler tarafından oluşturulan anksiyeteyi önleyici etkilerde, isatinin ters bir etki yapması da muhtemeldir. İsatın anksiyojenik etkiler oluturabilmekte ve natriüretik peptidlerle bu açıdan yarışabilmektedir. İsatının oluşturacağı anksiyojenik etkilerin natriüretik peptidlerin de bağlandığı NPR-A reseptörlerine bağlanarak meydana geldiği bildirilmektedir (14).

İsatin bağlanma yerleri farklı organlara göre farklılık göstermektedir. Beyinde özellikle isatin bağlanma yerleri hücre membranında yer almaktadır. Membrandaki isatin bağlanma yerleri biyosensör tekniği ile partikül şeklinde gözükmekte ve isatin bağlanma bölgelerinin miktarı değişim göstermektedir. Ancak böbrekteki bağlanma yerinin membran olmadığı belirtilmektedir (16). İsatın bağlanma yerleri beyin sapında en çok, karaciğerde ise beyin bölgeleri, kalp ve böbreklere nazaran daha az miktarda bulunmaktadır (Şekil 2) .



Şekil 2 . İsatin bağlanma yerlerinin miktarı dokulara göre farklılık gösterir

İsatinin bağlandığı biyolojik hedeflerin özellikle isatini bağladığı ve aynı zamanda bu bağlayıcıların isatin konsantrasyonunun inhibisyonunda da rol oynadığı belirtilmektedir. MAO isatin bağlayıcı proteinlerden biridir. Bundan başka da çeşitli sitozolik enzimler isatini bağlayabilir (5). İsatinin hangi proteinlere ne şekilde bağlandığı günümüzde araştırılmaktadır. Bu araştırmalarda optik biyosensör tekniği gibi ileri teknikler kullanılmaktadır (17).

İsatin hücre ve dokularda farklı sinyalizasyon sistemlerini uyararak etki gösterebilmektedir. Bunlardan biri ANP reseptörlerine bağlanma yoluyla, ANP sinyalizasyon sisteminin uyarılmasıdır. ANP sinyalizasyon sistemi isatin için en hassas olan invitro hedefler arasındadır. ANP reseptörlerinden biri olan NPR-A, partikül şeklindedir ve guanilat siklaz yolağı üzerinden etkiler gösterir. İsatin bundan başka nitrik oksit ve MAO B ile de birleşerek de etki gösterir. Nitrik oksit üzerinden oluşan etkiler solübl guanilat siklazın uyarılması şeklindedir. İsatin konsantrasyonlarındaki fizyolojik düzeyde oluşan dalgalanmalar, bu etkilerin değişmesine ve duyarlı bir sistemin oluşmasına yol açabilir (18).

ATRİAL NATRİÜRETİK PEPTİTLER VE İSATİN ETKİLEŞİMİ

Natriüretik peptitler ANP, BNP, CNP, D-tipi natriüretik peptit ve ürodilatinden oluşmaktadır. Bu peptitler ve onların reseptörleri önemli bir düzenleme sistemini temsil eder

(19). Bu sistem sıvı dengesi ve kan basıncının düzenlenmesinde ve bunun yanı sıra emosyonel olarak davranış (kaygı, uyarılma gibi) düzenlenmesi, stres hormonlarının salınımının değişmesi ve otonom sinir sistemi aktivasyonu ile ilişkilidir (20).

Natriüretik peptitler üç tip membran reseptörü ile ilişkilidir. Bu reseptörlerden ilk iki tipi, NPR-A ve natriüretik peptit reseptör tipi B (NPR-B) olup, ligand-bağımlı intrinsik guanil siklaz aktivitesi gösteren transmembran glikoproteinlerdir. ANP ve BNP, NPR-A'ya, CNP ise çoğunlukla NPR-B'ye yüksek afinite göstermektedir. Üçüncü natriüretik peptit reseptör tipi NPR-C' de guanilat siklaz domaini yoktur. Bu reseptör klirens reseptörü olarak bilinmektedir. Bu reseptör ANP, BNP ve CNP'ye bağlanmaktadır (19). ANP ve BNP kalp miyositlerinden salgılanmakta iken yalnızca CNP endotel kökenlidir. CNP ayrıca beyin ve periferik dokuda etki gösteren parakrin bir peptittir (21).

Beyin ve kalpte endojen olarak üretilen isatin memeli dokularında, beyin omirlik sıvısı ve diğer vücut sıvılarda geniş dağılım göstermektedir. Medvedev ve arkadaşlarının (1) yaptıkları çalışmada, isatinin beyindeki ANP reseptörlerine bağlandığı bildirilmiş; sıçan kalp, beyin ve böbrek dokularında ANP ile aktive olmuş guanilat siklazı kompetitif olarak inhibe ettiği belirtilmiştir. Aynı zamanda sıçan ve tavşanda anksiyojenik bir ajan olan pentilentetrazolün beyin isatin düzeylerini artığı bildirilmektedir.

Glover ve arkadaşlarının (22) yaptıkları çalışmada isatinin değişik dozlarda ANP, BNP ve CNP üzerine olan antagonist etkisi araştırılmış ve isatinin bu peptitlerin etkisini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca isatin ANP'nin oluşturduğu hipertermik etkiyi (4) ve ANP'nin öğrenme üzerine olan etkisini baskılamaktadır (22).

Kobaylarda 0.4 µm isatin, serebral membrana ANP'nin bağlanmasını inhibe etmektedir (16). İsatın aynı zamanda sıçan beyinde, ANP ve BNP tarafından uyarılan partikül guanilat siklaz aktivitesini inhibe etmektedir (15). İsatının aşırı sıvı yüklenmesinde cGMP oluşumunu etkilediği ve vücut sıvı dengesinde rol oynadığı bildirilmiştir (23).

İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ MEKANİZMASI

Miyokard iskemisi, miyokardın metabolik gereksinimlerine göre, yetersiz kan akımı ile karakterize bir durumdur. Miyokardın yetersiz oksijenlenmesi sonucunda oluşan iskemi, anaerobik metabolizmada artışa yol açmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarındaki mekanizma; anaerobik metabolizmaya geçişte serbest oksijen radikalleri ve inflamatuvar mediyatörler dahil bir dizi olayı başlatmakta ve doku hasarına neden olmaktadır. Bu duruma "iskemi reperfüzyon hasarı" denmektedir (24). Bu mekanizmadaki primer iskemik hasar toksik

ürünlerin normalden fazla birikmesine bağlı oluşmaktadır. Reperfüzyon sonrasında ise serbest oksijen radikallerinin salınması sonucu doğrudan etkilenen doku hasarı meydana gelmektedir. Aynı zamanda reperfüzyon hasarında hücredeki antioksidan sistemler zayıflamaktadır (24,25).

İskemi oluşum mekanizması sırasında oluşan olaylar aşağıdaki şekilde belirtilebilir.

- Miyokardiyal dokuya oksijen geçişinde azalma sonucunda adenozin trifosfat (ATP) üretiminde azalma ve yağ asit miktarında artış gözlemlenir,
- Kalsiyum düzeyinde artış oluşur,
- Olaylar iskemik nekroz ve enfarktüs oluşumu ile sonuçlanır (26).

İnsanda kalbe giden kan akışının kesilmesinden 20 dakika sonra geri dönüşümsüz bir hasar başlamaktadır (27). Miyokardiyumda koagülasyon nekrozu, nötrofil infiltrasyonu ve ödem enfarktüstün ortalama dört saat sonra saptanmaktadır. Hücre ölümü, hem iskemi sürecinde hem de iskemi sonrasında oluşmaktadır. Kan akımının yeniden başlamasında da hücre ölümü devam etmektedir. İskemi ve reperfüzyon süreçlerinde gelişen hücre hasarı sonucunda aritmi, doku hasarının büyümesi (enfarkt) ve miyokardiyal afallama (stunning) gibi ciddi klinik sonuçlar oluşabilmektedir (28).

Reperfüzyon hasarına duyarlı hücrel yapılar membran lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (29,30). Bu yapılarda meydana gelen değişimler sonucunda miyokardiyal afallama, reperfüzyon aritmileri, miyositlerde nekroz, koroner endotelial ve mikrovasküler disfonksiyon oluşabilmektedir (29).

Miyokardiyal afallama, iskemi reperfüzyon sonucunda geri dönüşümsüz bir hasar olmamasına karşı kalpte meydana gelen uzamış mekanik fonksiyon bozukluğudur. Genellikle global iskemilerden sonra daha fazla gözlenmektedir (31). Reperfüzyon aritmilerinde ise sıklıkla taşikardi ve ventriküler fibrilasyon meydana gelir (29). Miyositlerde oluşan nekrotik dokular iskemi reperfüzyon sürecindeki mekanizmalar sonucunda da ortaya çıkabileceği gibi bu nekrozun en önemli nedeni hücrelerde oluşan kontraktürdür (32).

İskemi sırasında miyokardın enerji dengesi bozulmakta, ATP üretimi durmakta ancak kullanımı devam ettiği için ATP seviyesi düşmektedir. ATP kullanıma bağlı olarak adenozin difosfat ve adenozin monofosfat seviyesi artmaktadır. Hücreler ATP üretebilmek için glikojenden glukoz üretmektedir. Anaerobik koşullarda glikolizin sonucunda son ürün olarak oluşan piruvat, laktat dehidrogenaz enzimi ile birlikte laktata çevrilmektedir. İskeminin devam etmesi, enerji dengesini daha da bozmaktadır. Adenozin difosfat, hidrolize olmakta adenozin ve düşük oranda inozin oluşmaktadır. Adenozin difosfat hidrolizi sırasında büyük

oranda proton üretilmektedir. Hücre pH'nın düşmesi glikolizi inhibe etmektedir. ATP depolarının % 80 ve daha fazlası ağır ve uzun süreli iskemi sonucunda kaybolursa, hücre hacim ve iyon bütünlüğünü sürdürme kabiliyetini kaybedebilmektedir (33,34).

İnsanda yirmi dakikalık bir süre miyokard iskemisi için sınır süre olarak kabul edilir. Bu süreden daha kısa devam eden iskemi sonrası reperfüzyonda doku hasarı olduğuna dair bir bulgu saptanmamıştır. Daha uzun süren iskemilerde ise reperfüzyon hasarının nedenleri değişebilmektedir. Reperfüzyonun dakikalar ile saatler arasındaki değişen zamanlarda nekroz ve apoptozis sonucu hücre ölümünün artması gibi nedenler miyokardiyal doku hasarını artırmaktadır. Kırk dakika süren iskemide subendokardiyal nekroz oluşmaktadır. Üç saat süren iskemide ise nekroz yayılmakta ve iskeminin uzaması durumunda transmural enfarktüs oluşmaktadır. Uzun süreli iskemi sonrası miyokardın reperfüzyonundan sonra veya reperfüzyon sırasında aritmiler, mikrovasküler hasar, miyokardiyal afallama (stunning) ve miyokardiyal hibernasyon oluştuğu saptanmıştır (29,31).

Değişik nedenlere bağlı oluşan iskemi sonucunda serbest radikaller, sitokinler ve nitrik oksit oluşmaktadır. Nitrik oksit iskemi sırasında endotel hücrelerinin hasar görmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır ve lipid peroksidasyonunu uyarmaktadır. Bunun sonucunda ise malondialdehit gibi ürünler açığa çıkmaktadır. Bunların da miyokardiyal hasarda rolü bulunmaktadır (25,34).

Reperfüzyon hasarında hücrede birçok moleküler değişiklik oluşmaktadır. Moleküler oksijen, yüksek oksidasyon potansiyeline sahiptir, buna karşılık organik bileşikler seri bir şekilde moleküler oksijenle okside olamazlar. Oksidatif fosforilasyon ile hücreler enerji üretmektedir. Oksijen miyokardiyal elektron transport sistemi ile suya dönüşmektedir. Mitokondride kompleks IV içindeki sitokrom C oksidazla birlikte oksijen respirasyon sırasında bir dizi elektron kaybeder. Bunun sonucunda süperoksit radikal, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve su oluşmaktadır (33,34).

Süperoksit radikalleri, biyolojik moleküllerin membran yapıları için zararlıdır. Membran yapısını bozar ve okside eder. Bunu lipid peroksidasyonu yardımıyla yapmaktadır. Bu durumda monoaldehit oluşumu ile değerlendirme yapılmaktadır. Bu reaksiyonlar sonucunda ilk olarak lipid peroksit radikalleri ikinci olarak ise hidroksilipid peroksidler oluşmakta ve bu radikaller DNA oksidasyonu ve protein çapraz bağlantıları oluşturmaktadır. Bunun sonucunda ise hücresel disfonksiyon ve hücre nekrozu meydana gelmektedir (35).

İskemik dokunun reperfüzyonu sonuç olarak hasarlı dokuda hızlı bir nötrofil kümelenmesine yol açmaktadır. İzole kalp modellerinde serbest radikal oluşumu

reperfüzyonun başında hızlı bir şekilde oluşur. Nötrofillerin endotele adezyonu ve sonrasında transmigasyonu, canlılığını sürdürebilir dokularda proteolitik enzimleri salarak serbest oksijen radikalleri oluşturmaktadır.

Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarında süperoksit radikal oluşumuna yardımcı olan birçok intrasellüler enzimatik mekanizma vardır. Bunlardan bazıları; ksantin oksidaz, mitokondrial sitokrom oksidaz yolu, siklooksijenaz, lipooksijenaz yolu, katekolaminlerin oksidasyonudur (35-37).

Organizmada yukarıda saydığımız metabolik olaylar sırasında sürekli olarak serbest radikaller oluşur ve endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından etkisizleştirilir. Bu korunma glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimler ile oluşur. Serbest radikaller belirli düzeyin üstüne çıktığında ve antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığında hücrenin bazal yapı taşlarını hasara uğratar. Bu aşamada vücudun diğer doğal savunma sistemi olan tamir işlevi, hasarlı biyomolekülleri ortadan kaldırır. Hasarlı nükleik asitler spesifik enzimler tarafından tamir edilir, okside proteinler proteolitik sistem tarafından ortadan kaldırılır (38,39)

ATP ürünleri ksantin dehidrogenaz enzimiyle üreye çevrilmektedir. Bununla beraber iskemik durumda Ca^{+2} ile aktive edilen ve "kalpein" olarak tanımlanan sitozolik proteaz enzimi ile ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüşmektedir. Ayrıca iskemik dokuda sülfhidril oksidasyonu bu dönüşümü hızlandırır. Bu da iskemik dokuda aşırı hipoksantin ve süperoksit radikal birikimine neden olur.

Uzamış iskemiden sonra reperfüzyonda sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun artması ciddi miyokardiyal hasarla ilişkilidir. Burada Na^{+}/H^{+} pompası önemli bir role sahiptir. İskemi sırasında proton miktarının artması ki bu asidoza yol açar, Na^{+}/H^{+} pompasını inhibe eder. Reperfüzyonla beraber bu inhibisyon ortadan kalkar ve hücre içi sodyum miktarı artar. Bu Na^{+}/Ca^{+} pompasını aktive ederek hücre içi kalsiyum miktarını artırır. Na/H pompa inhibitörleri kullanımının; intrasellüler Na^{+} ve Ca^{+2} artışını durdurarak reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca iske miyle beraber hücre içi asidotik ortam, fizyolojik pH'da proteinlere bağlı olan kalsiyumun da serbest kalmasına neden olarak hücre içi Ca^{+2} arttırır. Sonuç olarak miyokard kontraktıl elemanlarının kalsiyuma karşı duyarlılığı azalır ve bu durum miyosit kontraktılitesinin azalması ile sonuçlanır. İntrasellüler kalsiyum konsantrasyonu kritik bir göstergedir. Çünkü fosfolipaz, proteaz, endonükleaz gibi bazı enzimlerin aktivasyonu ile ilişkili ikincil haberci gibi davranır ki bu durum hücre ölümünde degradasyon yolunu ve inflamatuvar kaskadı başlatır (40,41).

PROİNFLAMATUAR MEDIATÖRLERİN KARDİYAK İSKEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B sitokinlerin, kemokinlerin, immünoresptörlerin ve hücre adezyon moleküllerinin iskemi reperfüzyon hasarı sırasındaki erken gen ekspresyonuna aracılık etmektedir. NF- κ B'nin selektif blokajının ciddi iskemik stres sonrası reperfüzyonun erken fazında belirgin koruma sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (42,43).

İskemi reperfüzyon hasarının mekanizması karmaşık ve zincirleme bir reaksiyondur. Ortaya çıkan doku hasarı esas olarak; serbest oksijen radikalleri, hücre içi Ca⁺² dengesinin bozulması ve inflamatuvar kaskatın aktivasyonu ile oluşur. Ayrıca NF- κ B, TNF- α , IL-6, iNOS gibi inflamatuvar mediatörlerin gen ekspresyon regülasyonundan sorumludur (29).

COX enzimleri hücre içerisinde araşidonik asitten eikosanoidlerin oluşumunda görevli enzimlerdir. Bu enzimlerin iyi bilinen iki tip izoformu mevcuttur. Bunlar COX-1 ve COX-2 dir. COX-1 ve COX-2 enzimleri önce kararsız yapıda prostaglandin-H₂ üretimi yaparlar, daha sonra hücreye özgül olarak prostaglandinlerin yapımını sağlarlar. COX-1, trombaksan A₂ sentezini sağlar. Çoğu vücut hücrelerinde bulunur ve gastrik mukozayı korunmada önemli rolü vardır. COX-2 ise çoğu hücrede normalden düşük seviyede bulunurken, inflamasyon ile pek çok hücrede hızla ekspre olur ve prostasiklin sentezinde görevlidir. Arteriosklerotik plakta da plağın inflamasyonu sırasında COX-2 önemli oranda artar.

Romatoid artrit, osteoartrit veya nonspesifik bir kas iskelet sistemi ağrısında özellikle yaşlı hastalarda COX-2 inhibitörleri sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak gastrik ülser oluşumu nedeniyle COX-2 inhibitörlerinin sık kullanımından kaçınılmaktadır. COX-2 enziminin 1990 yılında bulunmasıyla yukarıda bahsettiğimiz rahatsızlıklar için ilaç yapımına başlanmıştır. ABD de 2000 yılında toplam COX-2 inhibitörü satışı 3 milyar doları bulmuştur ve bu sonuç bu ilacın ne kadar sık kullanıldığını göstermektedir (44).

COX-1 ve COX-2 enzimleri hemostatik dengede önemli işlevlere sahiptirler. COX-1 inhibitörleri TXA₂ sentezini durdurup, PGI₂ sentezini etkilemeden trombosit kümeleşmesini azaltırlar. COX-2 ye özgül inhibitörler ise (refokoksib, celokoksib gibi) PGI₂ sentezini azalttığı için trombojenik bir duruma zemin hazırlarlar (45).

COX-2 inhibitörleri antiinflamatuvarıdır ve plak inflamasyonunun baskılanmasına yardımcı olurlar. İnflamatuvar hücrelerin uyarılmasıyla matriks yıkımı ve fibröz hasar oluşmaktadır. Bu nedenle plak inflamasyonu akut koroner olayların ortaya çıkmasının en

önemli belirleyicisidir. COX-2 inhibitörlerinin antiinflamatuvar özelliği nedeniyle koroner olayların azaltılabileceği düşünülmektedir (7).

Taha M. ve arkadaşlarının (46) yaptıkları çalışmada yüksek dereceli astrositik tümörlerde COX-2 ekspresyonunun normale oranla daha fazla olduğu gözlemlenmiş ve bu fazla orandaki ekspresyon yeni mikrovasküler yapıların oluşumuyla tümörogenesise neden olmuştur. Bu durumda, tedavi için COX-2 inhibisyonunun önemli bir amaç olabileceği düşünülmektedir.

İZOLE KALPTE DÜŞÜK AKIMLI İSKEMİ MODELİ

İlk olarak Oscar Langendorff tarafından tanımlanan izole perfüze kalp preparatı, bugüne değin birçok değişikliğe uğramıştır. Farmakolojik, biyokimyasal ve fizyolojik araştırmalarda bu model yaygın kullanılabilir. İzole perfüze kalp modeli, ilaçların akut etkilerini araştırmak için kullanılmaktadır. Ayrıca belirli bir uygulama yaptırılan hayvanların kalplerindeki değişikliklerin akut etkileri bu model ile ölçülebilmektedir.

İzole kalp çalışmaları, kalp fizyolojisinin temelinde önem taşıyan buluşlar için kullanılmıştır. Bu düzenek ile izole kalbe sıcaklık, oksijen, kalsiyum iyonları ve besin açısından zengin perfüze sağlanır. Langendorff tekniğinin temelinde kardiyak mekanik fonksiyonların koroner dolaşımdaki değişikliklerden etkilenmesi bulunmaktadır (47).

Langendorff Kalp Preparatı Hazırlanması

Kalp, anestezi uygulandıktan ve koagülasyonu önlemek amacıyla heparin uygulandıktan sonra, izole edilerek aort kısmından kanüle edilir. Buradan belirli bir basınçla verilen perfüzyon sıvısı aort kapaklarını kapatır ve sıvı sol ventrikül içine gidemez ancak koroner arterleri perfüze eder. Perfüze sonra koroner sinüsten sağ atriuma boşalır ve daha sonra pulmoner arterden atılır. Langendorff preparatı bu yönüyle perfüze sol atriuma boşaldığı ve koroner perfüzyonun kalbin kendi kasılma gücüyle gerçekleştiği çalışan kalp (working heart) preparatlarından ayrılır.

İzole kalp preparatı hazırlanırken yeterli el becerisiyle, kalbin izolasyonu ve perfüzyonu kısa bir süre içerisinde gerçekleşir. Preparatın hazırlanması sırasında dekapitasyon yapıldıktan sonra hızla sağ sternotomi ile toraks açılmalı ve kalpte herhangi bir mekanik hasar oluşturmadan assenden aorta izole edilip kalp soğuk perfüzyon solüsyonuna konulmalıdır. Kalbin kasılması soğuk solüsyon içinde durur ve bundan sonra kalp perfüzyon için hazır

bekletilen kanüle kolayca takılabilir. İplikler aortu sabitlemek için bağlandıktan sonra perfüzyonu derhal başlanmalıdır.

Perfüzyon sıvısı bir ısı sarmalı aracılığıyla ısıtılmış (37 °C) ve % 95 O₂ ve % 5 CO₂ ile oksijenlendirilmiştir. Perfüzyon başladığı anda kanül içinde hava kabarcığı olmamasına dikkat edilmelidir. Eğer hava kabarcığı varsa kalp hafifçe sıkılarak hava uzaklaştırılmalıdır.

Preperat kayıtlar için gerekli prosedürler yerine getirildikten sonra cidarları ısıtan bir kalp odacığı içine alınmalıdır. Bu şekilde preperatın bulunduğu ortam sıcaklığı daha hassas bir şekilde düzenlenmiş ve kalbin dış cidarları kurumaya karşı korunmuş olur.

Perfüzyon genellikle Modifiye Krebs ya da Tyrode solusyonu gibi solüsyonlarla perfüze edilir. Krebs-Henselit solüsyonu NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, NAHCO₃ ve glukoz içerir. Preperatın iyi çalışması perfüzyon solüsyonunun kalitesinde bağlıdır. Solüsyon kesinlikle hiçbir partikül içermemelidir. Bunun için kalpler çok temiz olmalı, mümkünse deiyonize edilmiş distile su kullanılmalı ve solüsyon için en yüksek saflıkta tuzlar tercih edilmelidir. Çözelti hazırlanması bittikten sonra uygun filtrelerle süzülmesi de yararlı olmaktadır.

İzole kalp preparatında uygulanacak olan perfüzyon sabit basınç veya sabit akım olarak iki ayrı şekilde yapılabilir. Sabit basınçla perfüzyonda koroner akımı, sabit akımla perfüzyonlarda koroner perfüzyon basıncını kaydetmek mümkündür. Eğer yeterli akım ve basınçta perfüzyon yapılırsa preperatın viabilitesi açısından iki methodla da uygun sonuçlar alınır.

Elde edilen parametreler (basınç veya akım) birbirleriyle ters orantılı oldukları için herhangi birinin ölçülmesi diğeri hakkında da bilgi verir. Düşük akımlı iskemi modeli, iskemi öncesi ve reperfüzyonda akımın normalin % 10'una düşürülmesiyle yapılmaktadır. Bazı Langendorff sistemlerinde kullanılan perfüzyat yeniden sirküle edilir (48).

Kullanılmış perfüzyat sıvısı da pek çok biyokimyasal parametrenin ölçülebilmesi için fayda sağlar. En sık ölçülenler arasında laktat dehidrojenaz, kreatin kinaz, troponin T, pH, pO₂, pCO₂ gibi parametreler sayılabilir.

İzole kalp kanüle edildikten sonra sol ventrikül içine sol atriyum yoluyla bir balon yerleştirilir. Balona belli bir basınç uygulanarak önyük oluşturulur. Balon içinde oluşturulan basınç intraventriküler basıncı simüle eder. Yeni cihazlarda ultrasonik sensörlerle ventrikül boyutlarını, segment uzunluklarını ve duvar kalınlıklarını da ölçmek mümkündür.

Yerleştirilen iki elektrotla bipolar elektrogram kaydedilebilir. Langendorff preperatında ritim ve hız değişikliklerinin deneyi etkilemesi istenmiyorsa kalp sağ atriyuma

yerleştirilen elektrotla uyarılabilir. Uygun izolasyon yöntemleri izlenirse uyarı yapılması elektrogram kayıtlarının alınmasına engel değildir.

Langendorf düzeneğindeki izole kalp preparatında sistolik basınç, diastolik basınç, sol ventrikül basınç gelişimi, maksimum sol ventrikül basınç değişimi (dp/dt_{maks}), minimum sol ventrikül basınç değişimi (dp/dt_{min}), kontraksiyon zaman eğrisi altında kalan alan, aort perfüzyon basıncı, kalp hızı, basınç hız çarpanı, sol ventrikül volümü, koroner rezistans, oksijen kullanımı, refrakter periyod ölçülen ve hesaplanan parametrelerdir (49).

GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR), DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren flöresan sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Bilim ve tıp alanındaki çalışmalarda nükleik asit miktarını belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniğin Real-time PCR olduğu ortaya konmuştur. Bu teknik seksenli yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen PCR'ın ileri bir versiyonudur. Klasik PCR ile çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini analiz etmek için çok sayıda döngüsel işlemle, istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte sonrasında da ürün miktarını net olarak belirlemek oldukça güçtür. Çünkü klasik PCR'da başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız olarak bir ürün miktarı ortaya çıkar. Higuchi ve arkadaşları 1992 yılında Real-Time PCR'ı geliştirmişlerdir. Real-Time PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süresi boyunca oluşan ürünün miktarını Real-Time PCR sırasında gözlemlemek mümkün olmuştur. Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi Real-Time PCR'ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinde tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkan reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü flöresan işaretli probalar ile sağlanır (50,51).

Kantitatif “Real-Time PCR” Metodları

Mutlak Kantifikasyon: Hedefin konsantrasyonu mutlak değerler olarak ifade edilir. Mutlak kantifikasyon konsantrasyonları önceden bilinen seri olarak dilüe edilmiş eksternal standartların kullanımıyla oluşturulan standart bir eğri yardımıyla yapılır. Konsantrasyonları bilinmeyen örneklerin konsantrasyonlarının belirlenmesi geçiş noktaları (C_p) değerlerinin

belirlenmesi ile sağlanır. (Cp değeri, PCR içindeki her eğriye ait PCR ürünü miktarını gösterdiği varsayılan bir örneğin PCR amplifikasyonuna başladığı noktayı ifade eder).

Rölatif Kantifikasyon: Hedefin konsantrasyonu hedefin belli bir referansa oranı olarak ifade edilir. İlgilenilen genin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan “housekeeping” genin ifade düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan, izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir. Bu metod ile hedef ve referans genin konsantrasyonlarını belirleyebilmek için her ikisine ait standart eğrilerin kullanımına ihtiyaç duyulur (52).

“Real Time” Polimer Zincir Reaksiyonu için Kullanılan Problar

Tüm Real-Time PCR sistemleri reaksiyondaki PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan belirleyici bir flöresan boyadan alınan boya miktarı arasındaki orantı esasına dayalı olarak çalışır. Belli bir diziyeye bağlı kalmadan tüm çift iplikli DNA molekülüne bağlanan flöresan boyalar ya da belirlenmiş bir PCR ürünü üzerindeki spesifik bir diziyeye bağlanabilen oligonükleotid hibridizasyon problemleri kullanılır.

Dizi spesifik olmayan flöresan boyalar: Bu tip boyalar çift iplikli DNA'nın tamamına bağlanabilme özelliği taşıyan etidyum bromid benzeri boyalardır. Real-Time PCR sistemlerinde kullanılan boya SYBR Green'dir. SYBR Green 1, onun emisyon özelliğini önemli ölçüde arttıran bir solüsyon içerisinde bulunduğunda DNA molekülüne bağlanır. PCR boyunca amplifiye olan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak SYBR Green'in sinyali artacaktır.

Dizi spesifik flöresan problemler: Oldukça yüksek hassasiyete sahip floroforlar ile işaretli dizi spesifik problemlerdir. Reaksiyon içerisinde sadece spesifik hedef mevcut ise flöresan artışı gözlenir.

Basit Prop Format: Tek işaretli problemler, mutasyon ve tek nükleotid polimorfizmlerinin taranmasında kullanılan basitçe dizayn edilmiş hibridizasyon problemlerinin özel bir tipidir.

Flöresan Rezonans Enerji Trasferi (FRET): Flöresan ile işaretli bir molekülün enerjisinin, bir diğer komşu flöresan moleküle aktarılması prensibine dayanır.

Hibridizasyon Prop Format: Bu yöntemde PCR ürününe yan yana hibridize olabilen iki prob kullanılır.

Hidroliz Prop (TaqMan): Bu yöntemde 5' ve 3' ucuna bağlı iki farklı renkte florokrom bulunan prob kullanılır.

Kantitatif Real-Time PCR teknolojisi, gen düzeyinin ölçümünde rutin olarak kullanılan, uygulaması kolay, kesin sonuçlar veren, hassasiyeti iyi olan bir uygulamadır. Farklı dilüsyon oranlarında hazırlanmış standart eğrilerin kullanımı ile örnekler ve deneyler arasında karşılaştırma imkanı sağlayan, internal standartlar yardımı ile başlangıç miktarı farklılığından kaynaklanacak problemlere son veren yüksek verimde sonuçlar elde edilen bir yöntemdir (53).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

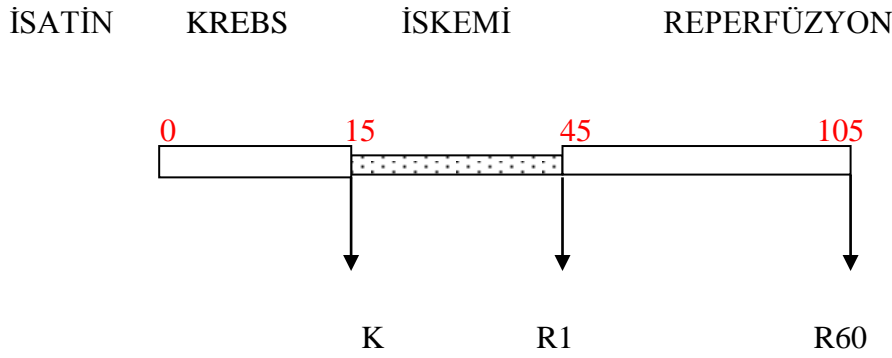
Bu çalışma Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından yapılan değerlendirme sonucunda 2013.03.10 karar ile etik kurul onayından geçmiştir (Ek 1). Ayrıca Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından kapsamında 2013/30 numara ile desteklenmiştir.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji, Biyofizik ve Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

ÇALIŞMA GRUBU

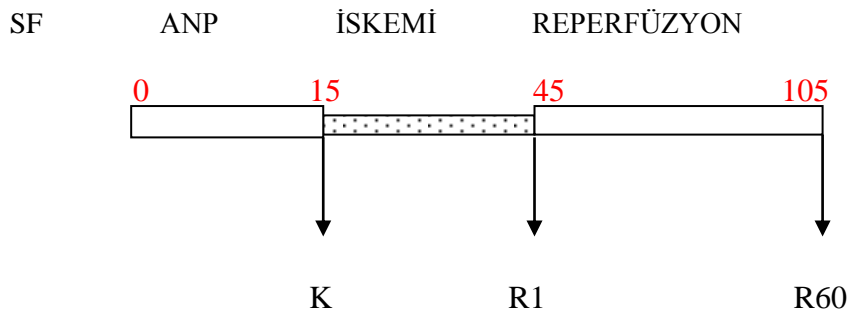
Deney prosedürü için, Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminde standart koşullarda tutulan (23 ± 1 °C oda sıcaklığı, %60 nem oranı, 12 saat aydınlık/karanlık ritim), 250-350 gr ağırlığında 54 adet yetişkin Wistar erkek sıçan kullanıldı. Çalışmada yer alan ilk 4 gruptaki sıçanlar kontrol (K), isatin (İ), ANP, isatin+ANP (İ+ANP) olmak üzere ayrıldı. Son iki grup ise COX-2, NF- κ B mRNA bakılan (C-N), isatin uygulanan COX-2, NF- κ B mRNA bakılan İ+ (C-N) olarak ayrıldı (Tablo 2). İlk 4 grupta izole kalp preparatı oluşturuldu. Bu amaçla anestezi için, tyopental (100 mg/kg) intraperitoneal (IP) uygulandı. Heparin (500 U/kg) IP enjekte edildi. Abdominal kavite enine insizyonla açıldı, göğüs kafesine her iki taraftan lateral insizyon yapıldı ve göğüs kafesi ön kısmı uzaklaştırıldı. Kalp çıkarılarak hızla Krebs-Henseleit bikarbonat tampon solüsyonu içine konuldu. Daha sonra Langendorff aparatına asılan kalplerde ventrikül basınç gelişimi, maksimum ve minimum sol ventrikül basınç değişim oranı ve kalp hızı sürekli olarak kaydedildi.

Grup İ de sıçanlara deneyden 30 dakika önce intraperitoneal isatin uygulandı. Daha sonra kalp asılarak 15 dakika perfüze edildi, 30 dakika iskemi uygulandı ve 60 dakika reperfüzyon yapıldı. Deneyin 15. dakikasında kontrol (K) ölçümü olarak, iskemi sonrası reperfüzyonun 1. (R1) ve 60. (R60) dakikalarında hemodinamik ölçümler ve cGMP değerlendirilmesi için perfüzyon sıvısı örneği alındı (Şekil 4).



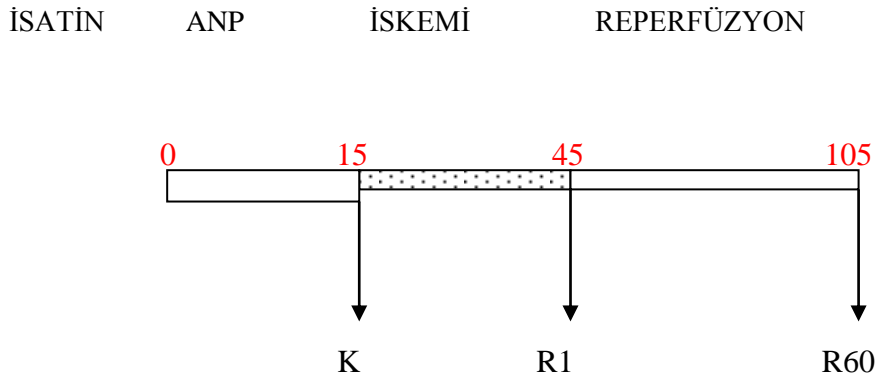
Şekil 4. İsatın grubunun (Grup İ) deney prosedürü

Grup ANP deki sıçanlara deneyden 30 dakika önce intraperitoneal serum fizyolojik uygulandı. Daha sonra kalp asılarak 15 dakika ANP eklenmiş Krebs solüsyonu ile perfüze edildi. Bunu takiben 30 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon yapıldı. Deneyin 15. Dakikasında kontrol (K), iskemi sonrası reperfüzyonun 1. (R1) ve 60. (R60) dakikalarında hemodinamik ölçümler ve cGMP değerlendirilmesi için perfüzyon sıvısı örneği alındı (Şekil 5).



Şekil 5. Atrial natriüretik peptit grubunun (Grup ANP) deney prosedürü

Grup İ+ANP’de yer alan sıçanlara deneyden 30 dakika önce intraperitoneal isatin (50 mg/kg) uygulandı. Daha sonra kalp asılarak 15 dakika ANP eklenmiş Krebs solüsyonu ile perfüze edildi, 30 dakika iskemi uygulandı ve 60 dakika reperfüzyon yapıldı. Deneyin 15. Dakikasında kontrol (K) ölçümü, iskemi sonrası reperfüzyonun 1. (R1) ve 60. (R60) dakikalarında hemodinamik ölçümler ve cGMP değerlendirilmesi için perfüzyon sıvısı örneği alındı (Şekil 6).



Şekil 6. İsatın + Atriyal natriüretik peptid grubunun (Grup İ+ANP) deney prosedürü

Grup C-N’de yer alan COX-2 ve NF- κ B proinflamatuvar mediatörlerinin incelendiği bu gruptaki sıçanlara serum fizyolojik (2.5 ml/kg; IP) uygulandıktan 30 dakika sonra, anestezi için tyopental (100 mg/kg) IP uygulandı. Heparin (500 U/kg) IP enjekte edildi. Abdominal kavite enine insizyonla açıldı, göğüs kafesine her iki taraftan lateral insizyon yapıldı ve göğüs kafesi ön kısmı uzaklaştırıldı. Miyokardiyal dokular alındı ve parafin bloklar oluşturuldu. Buradan elde edilecek kesitlerden RNA izolasyon kiti ve cDNA sentez kiti kullanılarak COX-2 ve NF- κ B gen ifadelerinin ölçümleri Biyofizik laboratuvarında Real-Time PCR yöntemi ile yapıldı. Patoloji laboratuvarında COX-2 ve NF- κ B incelenmesi için kesitler hemotoksilen eozin ile boyanarak histolojik değişiklikler değerlendirildi.

Grup İ+C-N’de yer alan sıçanlarda daha önceki bir çalışmada kullanılan doza benzer şekilde isatin 50 mg/kg (2.5ml/kg serum fizyolojikte sulandırılarak) IP yolla verildi (4) (n:10). İsatın uygulandıktan 30 dakika sonra, anestezi için tyopental (100 mg/kg) IP uygulandı. Heparin (500 U/kg) IP enjekte edildi. Abdominal kavite enine insizyonla açıldı, göğüs kafesine her iki taraftan lateral insizyon yapıldı ve göğüs kafesi ön kısmı uzaklaştırıldı ve miyokardiyal dokular alındı ve parafin bloklar oluşturuldu. Buradan elde edilecek kesitlerden

RNA izolasyon kiti ve cDNA sentez kiti kullanılarak COX-2 ve NF- κ B gen ifadelerinin ölçümleri Biyofizik laboratuvarında RT-PCR yöntemi ile yapıldı.

İSKEMİK ALAN BELİRLENMESİ

Deney bitiminde ilk 4 gruptaki sıçanlarda iskemik alanları belirlemek üzere kalp dokularından kesit alındı. Bu kesitler için trifentil tetrazolium klorid (TTZ) kullanılarak iskemik ve noniskemik alanlar işaretlendi. İskemik alanlar bilgisayarda planimetrik yöntem kullanılarak belirlendi (54).

İskemik kalplerde nekroz miktarının belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemlerden birisi de tetrozolum ile boyama yöntemidir. Kalpler iskemi reperfüzyon sonrasında -80 °C de streç filme sarılarak donduruldu. Kalpler 24 saat sonra dondurucudan çıkarıldı ve 2 mm'lik dilimlere ayrıldı. Kalp dilimleri % 1' lik tetrozolum içeren PH'ı 7,4 olan tamponda, 37°C'de 15-20 dakika inkübe edildi ve inkübasyondan sonra 20 dakika %20 lik formalde bekletildi. Bu işlemde sonra kalp dilimlerindeki renk ayrımı belirginleşti. Nekroz olan dokular soluk sarımsı kahverengi renkte gözlendi. Canlı dokular koyu kırmızı renkteydi. Levhalar yanlardan klempile tutturuldu. Nekrotik alanlar şeffaf bir asetat üzerine çizildi. Asetat üzerindeki çizimler fotokopiyle iki kat büyütülerek taratıldı. Daha sonra bilgisayar destekli planimetrik yöntem ile nekrotik alanlar hesaplandı ((55).

PERFUZAT cGMP DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Kalp dokusunu perfüze ettikten sonra iz kalpten damlayan sıvıdan cGMP ölçümü için örnek alındı. Deney bitiminde serum perfüze cGMP düzeyleri “Rat Cyclic guanosine monophosphate ELISA kit” kullanılarak ELISA yöntemiyle ölçüldü (CK-E30335, China). Sıçan serumunda, kan plazmasında ve birçok biyolojik sıvıda bu kitle cGMP düzeyine bu yöntem ile bakılmaktadır. Ölçümde solüsyon dilüe edilerek kullanıldı. Kit üzerindeki kuyucuklara cGMP antikoru konuldu ve inkübe edildi. Kuluçka ve yıkamadan sonra bağlanmamış enzimler ayrıldı. A ve B substratları eklendi. Sonra solüsyonun rengi asit etkisiyle maviden sarıya değişti. Bu inceleme solüsyonun tonları ile sıçan cGMP konsantrasyonları arasında pozitif korelasyon olmasına dayanmaktadır. Test kitindeki malzemeler aşağıdaki gibidir (Tablo 3).

Tablo 3. Test kitinde bulunan malzemeler

1. Standart solusyon (320 pmol/ml)	0.5ml	7	kromojenik solüsyon A	6ml
2. Standart dilüsyon	3 ml	8	kromojenik solüsyon B	6ml
3. Kaplı ELISA plakaları	12 x 8 kuyu	9	duran solüsyon	6ml
4. Streptavidin-HRP	6 ml	10	Kullanım	1
5. Konsantre yıkama (30X)	20ml	11	Plaka	2
6. Biotinle etiketli anti cgmp antikoları	1 ml	12	hermetik çanta	1

Yıkama Metodu

Manuel yıkama metodu: ELISA plaklarındaki emici kuyucuklara sıvı bırakıldı ve daha sonra en az 0.35 ml seyreltilmiş yıkama konsantrasyonu ile 1-2 dakika nemlendirildi. Bu süreç gerektiğinde tekrarlandı.

Analiz prosedürü aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Standart solüsyon dilüsyonu: (bu kitin orijinal konsantrasyon standartları bulunmaktadır.)

160pmol/ml	standart no:5	120µl orijinal standart + 120 µl standart seyreltici
80 pmol/ml	standart no:4	120µl standart no5 + 120µl standart seyreltici
40 pmol/ml	standart no:3	120µl standart no 4 + 120µl standart seyreltici
20 pmol/ml	standart no:2	120µl standart no 3 + 120µl standart seyreltici
10pmol/ml	standart no:1	120µlstandart no 2 + 120µl standart seyreltici

2. Kuyucuk sayısına göre eklenecek numune belirlenir. Standart solüsyon kuyucuklara göre ayarlandı.

3. Örnek injeksiyonu: a- boş kuyu : örnek yok, biotin veya streptavidin-HRP etiketli anti cgmp antikoru, kromojen solusyon a ve b , duran solusyon

b- standart solusyon kuyusu: 50µl standart ve 50µl streptomisin- HRP

4. Test edilecek örnekler: 40µl örnek ve sonra 10µl cgmp antikoru, 50µl streptavidin-HRP. Sonra plağı örttüğ ve hafifçe çalkaladık. İnkübasyon için 60 dakika 37 °C de bekletildi.

5. Yıkama solusyonunun hazırlanması: solusyonu seyreltmek için distile su kullanıldı.

6. Yıkama: dikkatli bir şekilde örtüyü kaldırıp sıvı boşaltıldı ve yıkama solusyonu her bir kuyucuğa dolduruldu. 30 dakika bekledikten sonra sıvıyı süzdük. Bu işlemi beş kez tekrarlandı ve plaka kurulandı.

7. Renk gelişimi: her bir kuyucuğa ilk önce 50µl kromogen solusyon A ve ardından yine her bir kuyucuğa 50µl kromogen B solusyonu ekledik. Karışması için çalkaladık. İnkunasyon için 10 dakika 37°C renk gelişimi için bekletildi.

8. Dur: stop solusyonu her bir kuyucuğa eklendi ve renk değişimi için beklendi. (maviden sarıya)

9. Analiz: stop solusyonu eklendikten 10 dakika sonra 450 nm dalga boyu altında absorbans ölçüldü.

10. Standartlara ve absorbansa göre , standart eğrinin lineer regresyon denklemi hesaplandı. Daha sonra numunelerin absorbans değerine göre karşılık gelen numune konsantrasyonu hesaplandı.

Reaktifleri Hazırlamak, Örnekler Ve Standartlar

Tüm numuneler ve standartlar ELISA solusyonu ve biotinle etiketli iki antikorla hazırlandı. 60 dakika 37 °C reaksiyonu beklendi. Beş kez plaklar yıkandı. Kromojen solüsyonları eklendi. İnkübasyonu için 10 dakika 37 derecede beklendi. Stop solüsyonu eklendi. 10 dakika sonra absorbansı okundu. Hesaplaması yapıldı.

Hesaplama

Standart konsantrasyonların absis ve absorbans değerlerinin koordinatları hesaplandı. Koordinat kağıdı üzerinde standart bir eğri çizildi. Standart konsantrasyon ve absorbans değerine göre lineer regresyon denklem eğrisinde örnek absorbans değerlerine göre ona karşılık gelen konsantrasyonu hesaplandı. Daha sonra kullanılmak için örnek bir absorbans değeri hesaplandı.

DOKULARIN ALINMASI VE “REAL TIME PCR” İLE COX-2 - NF-κB ÖLÇÜMLERİ

İzole kalp preparatı oluşturmak amacıyla, sıçanlara tyopental (100 mg/kg) interaperitoneal anestezisi uygulandı. intraperitoneal heparin (500 U/kg) enjekte edildi. Abdominal kavite enine insizyonla açıldı, göğüs kafesine her iki taraftan lateral insizyon yapıldı ve göğüs kafesi ön kısmı uzaklaştırıldı. Kalpler çıkarılarak hızla %10'luk formol ile tespit edildi. Sonrasında parafin bloklar hazırlandı. Dokulardan Real-Time PCR ile COX-2 ve NF-κB genlerinin mRNA miktar tayini için parafin bloklardan 10 µm lik 4 er kesit alındı. Bu kesitler ependorf içine konuldu. Parafin içine gömülü dokudan RNA izolasyonu Roche firmasının “High Pure FFPE RNA isolation kiti” kullanılarak elde edildi (Cat. No. 06 650 775 001 Roche, Almanya).

Deparafinizasyon

1. Ependorf içindeki kalp dokularından parafini uzaklaştırmak için herbirinin üzerine 800 µl ksilen eklenerek iyice vortekslendi.
2. Üzerine 400 µl absolute etanol eklendi ve vortekslendi. 2 dk maksimum hızda (16.000 g) santrifüj edildi. Süpernetand dikkatlice atıldı.
3. 1ml absolute etanol eklendi vortekslendi. 2 dk 16.000 g'de santrifüj edildi. Süpernetant dikkatlice atıldı.
4. Pellet içindeki etanol uzaklaşana kadar tüm ependorfler kapakları açık olarak +55°C de 10 dk tutuldu. Peletin kuruması sağlandı. Eğer gerekli olursa kuruması için süre 20 dk veya daha fazla uzatıldı.

RNA izolasyonu

1. Parafinden uzaklaştırılan RNA örnekleri üzerine 100µl RNA Tissue Lysis Buffer (Doku lizis tamponu) , 16µl SDS ve 40µl proteinaz K ilave edildi. Vortekslendi. Kısa bir spin yaptırıldı. İnkübasyon için +85°C de 30 dk 600 rpm de ısı bloğunda tutuldu.
2. Blok sıcaklığı 55°C ye indirildi. Örnekler alındı. 60-65°C ye ulaştığında örnekler tekrar bloğa yerleştirildi. Sıcaklık 55°C ye ulaştığında 80µl Proteinaz K eklendi. Vortekslendi, kısa bir spin yaptırıldı. 55°C de 600 rpm hızda 30 dk bekletildi. Eğer partikül varsa 10 dk daha inkübasyon işlemi uzatıldı.
3. Ependorfların içine 325 µl RNA Binding Buffer (bağlayıcı tampon) ve 325 µl etanol eklendi. Vortekslendi ve lizat özel filtreli tüpe alındı. 6000 g'de 30 sn santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.
4. Yeni toplama tüpüne geçildi ve 2 dk 16.000 g de filtre kurutuldu.
5. 100 µl DNA working solution (çalışma solüsyonu) eklendi. 15 dk oda sıcaklığında inkübasyon için beklendi. (DNA çalışma solüsyonu, Herbir örnek için 10 µl DNase 1 + 90 µl DNase inkübasyon tamponu hazırlanıp karıştırıldı.)
6. 500 µl Wash Buffer I (yıkama solüsyonu) eklendi. 30 sn 6000 g'de santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.
7. 500 µl Wash Buffer II eklendi. 30 sn 6000 g'de santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.
8. 500 µl Wash Buffer II eklendi. 30 sn 6000 g'de santrifüj edildi. Filtreden geçen karışım atıldı.

9. Filtre 2dk 16.000 g'de filtre kuruyuncaya kadar santrifüj edildi. Filtre 1,5 ml'lik ependolfe alındı.

10. 50 µl Elution buffer (elasyon tamponu) eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk beklendi. 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

11. Ependorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80°C de saklandı.

RNA Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen RNA molekülünün konsantrasyonu nanodrop Spektrofotometre cihazı ile 280 nm dalga boyunda (saflaştırılmış RNA'nın oranı) ölçüldü. İzolasyon ve kantite edilen RNA'dan hemen cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Uzun dönemli saklama -80°C ve daha kısa dönem saklama -20 °C'de gerçekleştirilmiştir.

cDNA Sentezi

cDNA sentezi için "Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit" kullanıldı. Aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı ve cDNA sentez işlemi aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi (Tablo 4 ve Tablo 5).

Tablo 4. cDNA sentezi için kullanılan miks içeriği.

Miks	Miktar(µl)
RNA	5µl
dH ₂ O	4,4µl
Random Hexamer	1µl
Anchored-oligo(dT) ₁₈ primer	1µl
Toplam	11,4µl

Real Time- PCR

Real-Time PCR için toplam 25 µl Real Time-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi. Roche firmasına ait LightCycler 480 cihazı kullanıldı .

Tablo 5. Real-Time PCR için miks içeriği.

Miks	Miktar (µl)
LightCycler 480 prob Master (COX-2,NF-κB veya β-Aktin)	10µl
RealTime ready Assay	1µl
H ₂ O (PCR Grade)	4µl
Cdna	5µl
Toplam	20µl

Primer Dizileri

Primerler COX-2, NF-κB ve β-Aktin için Primer-prop karışım halinde “real-time ready single assay” kullanıldı. Dizaynların konfigürasyon numaraları tabloda gösterilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Primerler ve referans gen konfigürasyon numaraları

Gen	REF	Assay ID	Versiyon
COX-2	00583055001	505824	3
NF-κB	05583055001	500911	3
β-Aktin	05583055001	500152	3

Değerlendirme

Sonuçların relatif quantifikasyonu için “LghtCycler 480 Software 1,5” ile hesaplandı. Bu yöntemde önce hasta ve kontrol grubu örneklerinin ortalama Cp (Crossing point) değerleri COX-2, NF-κB ve β-Aktin değerleri ayrı ayrı hesaplandı. Daha sonra COX-2 ve NF-κB ortalama değerlerinden tek tek β-Aktin ortalama değerleri ile oranlandı. β-Aktin gen ekspresyonu internal kontrol olarak kullanılarak relatif olarak belirlendi.

İSTATİSTİK

Bu çalışmada çoklu gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi ile yapıldı. İki Grup arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı. İstatistiksel analiz için SPSS 20.0 paket programı (Lisans No:10240642) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık P < 0,05 olarak belirlendi. Veriler medyan (minimum – maksimum) olarak gösterildi.

BULGULAR

DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER

Bu çalışmada 250±350 gr ağırlığında olan 54 adet sıçan kullanılmıştır. Çalışmada ilk 4 grubun hemodinamik ölçümleri kaydedilmiştir. Çalışma sırasında hemodinamik ölçüm yapılan K, İ, ANP, İ+ANP gruplarında SVGB, kalp hızları, minimum ve maksimum sol ventrikül basınç değişim oranları, kalp asıldıktan 15 dakika sonra (K), iskemi sonrası reperfüzyonun 1.dakikasında (R1) ve reperfüzyonun 60. dakikasında (R60) kaydedilmiştir. Gruplar arası SVGB değerlerinin medyan (minimum ve maksimum değerleri) ve p değerleri aşağıda verilmiştir (Tablo 7). SVGB değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında K_{SVGB} ve $R1_{SVGB}$ değerlerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Gruplar arasında $R60_{SVGB}$ değerlerinde ise anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Grup içi K, R1 ve R60 değerlerinin karşılaştırılmasında kontrol ve isatin gruplarında $R60_{SVGB}$ değeri K_{SVGB} ve $R1_{SVGB}$ değerine göre anlamlı şekilde azalmıştır (Tablo 7).

Tablo 7. Gruplarda sol ventrikül gelişim basıncı (SVGB) ölçümleri

Grup	K	İ	ANP	İ+ANP	P
$K_{SVGB}(\text{mmHg})$	91 (48-143)	66 (5-141)	85 (61-115)	120 (89-168)	0,083
$R1_{SVGB}(\text{mmHg})$	82 (4-124)	39 (8-127)	72 (7-154)	143 (61-151)	0,084
$R60_{SVGB}(\text{mmHg})$	33 (1-125) *#	13(1-49)*,#	61 (2-149)	71(3-135)	0,028
P	0,002	0,006	0,565	0,368	

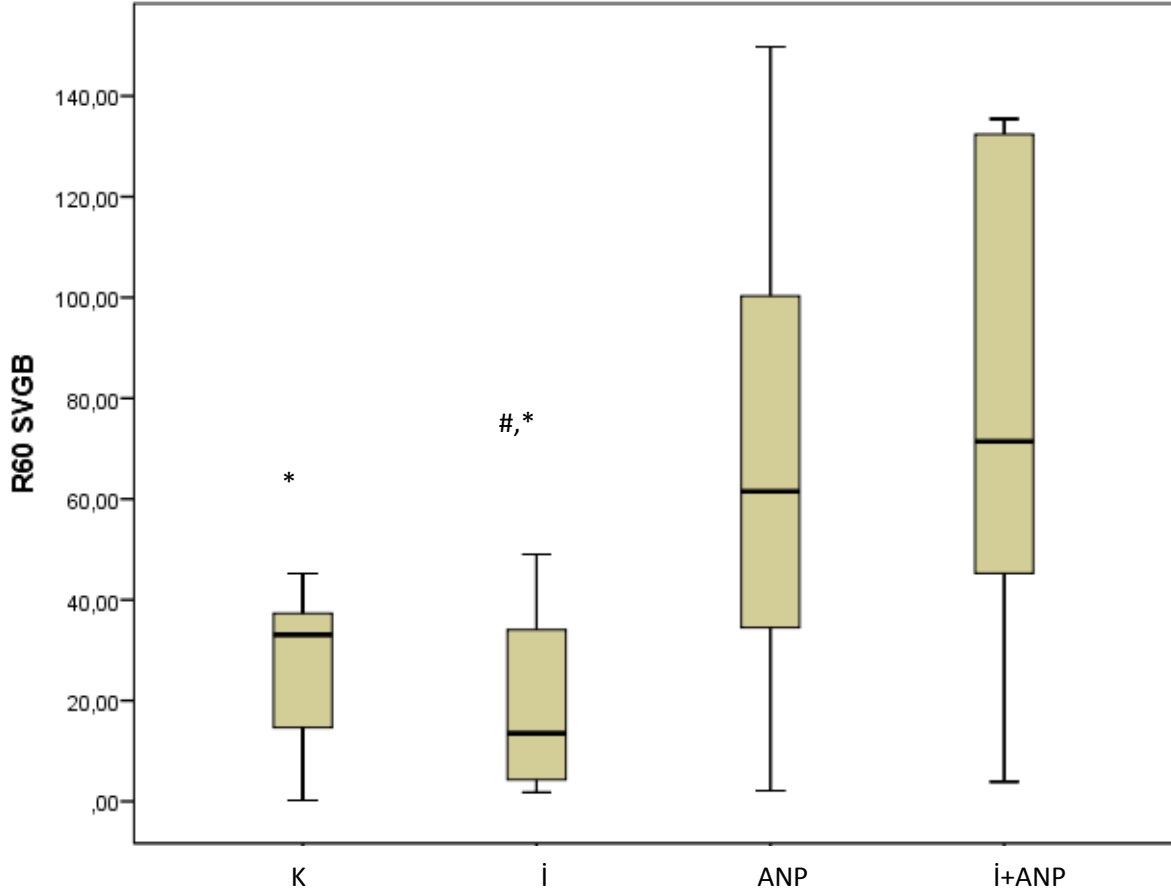
*K'ya göre farklılık # R1'e göre farklılık

Kontrol Grubu (K), İstatin Grubu (İ), Atrial Natriüretik Peptid Grubu (ANP), İstatin + Atrial Natriüretik Peptid Grubu (İ+ANP)

İskemi öncesi ölçülen SVGB değeri(K_{SVGB}), Reperfüzyonun ilk dakikası ölçülen SVGB değeri ($R1_{SVGB}$),

Reperfüzyonun 60. dakikası ölçülen SVGB değeri ($R60_{SVGB}$)

Gruplararası SVGB değerleri karşılaştırıldığında $R60_{SVGB}$ değerlerinde anlamlı farklılık görüldü. $R60_{SVGB}$ değeri kontrol grubunda İ+ANP grubuna, İ gurubunun değerleri ise ANP ve İ+ANP'ye göre farklılık göstermektedir (Şekil 11).



Şekil 11. $R60_{SVGB}$ değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması (medyan (min-maks))

*İ+ANP'ye göre farklılık #ANP'ye göre farklılık

Kontrol Grubu (K), İsatın Grubu (İ), Atrial Natriüretik Peptit Grubu (ANP), isatin + Atrial Natriüretik Peptit Grubu (İ+ANP)

Maksimum sol ventrikül basınç değişim oranlarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Grup içi değerlerin karşılaştırılmasında ise K grubunda ve İ grubunda $R60_{dp/dtmaks}$ değeri $K_{dp/dtmaks}$ ve $R1_{dp/dtmaks}$ değerine göre anlamlı olarak azalmıştır (Tablo 8).

Tablo 8. Grupların maksimum sol ventrikül basınç değişim oranları (dp/dt_{maks})

Grup	K	İ	ANP	İ+ANP	P
K dp/dt _{maks}	1964	1617	2283	3061	0,762
(mmHg/s)	(1340/4140)	(-36/4085)	(637/4025)	(1053/4001)	
R1 dp/dt _{maks}	1890	956	2694	2707	0,056
(mmHg/s)	(-604/3491)	(-602/3026)	(-205/4162)	(2253/3806)	
R60 dp/dt _{maks}	750	264	1745	1932	0,071
(mmHg/s)	(-527/4346) *,#	(-210/1434) *,#	(-584/4900)	(-359/4114)	
P	0,020	0,045	0,368	0,651	

*K'ya göre farklılık # R1'e göre farklılık.

Kontrol Grubu (K), İsatın Grubu (İ), Atrial Natriüretik Peptit Grubu (ANP), isatin + Atrial Natriüretik Peptit Grubu (İ+ANP)

İskemi öncesi ölçülen dp/dt_{maks} değeri(K_{dp/dt_{maks}}), Reperfüzyonun ilk dakikası ölçülen dp/dt_{maks} değeri (R1_{dp/dt_{maks}}), Reperfüzyonun 60. dakikası ölçülen dp/dt_{maks} değeri (R60_{dp/dt_{maks}})

Gruplar arası minimum sol ventrikül basınç değişim oranlarında R60_{dp/dt_{min}} değerinde anlamlı bir farklılık saptanmıştır. K_{dp/dt_{min}} ve R1_{dp/dt_{min}} değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

Kontrol ve isatin gruplarının grup içi minimum sol ventrikül değişim oranı karşılaştırıldığında R6_{dp/dt_{min}} değerinin K_{dp/dt_{min}} ve R1_{dp/dt_{min}} değerlerine göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9. Grupların minimum sol ventrikül basınç değişim oranları

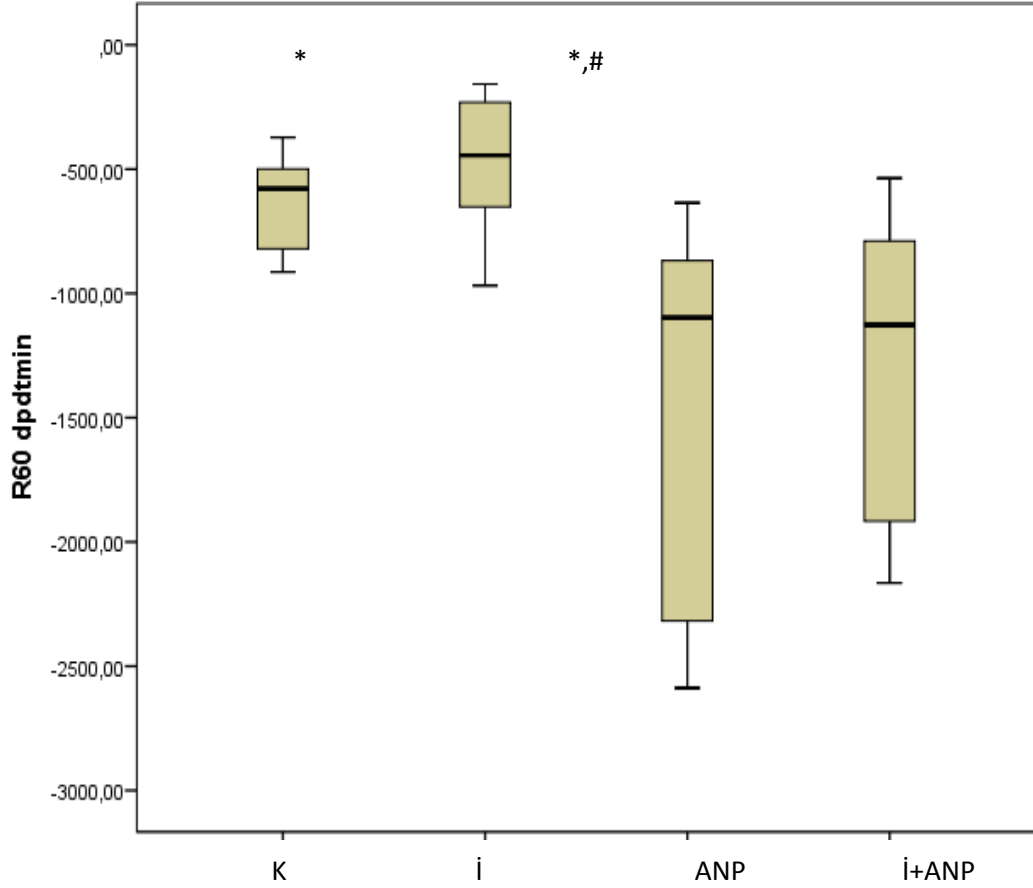
Grup	K	İ	ANP	İ+ANP	P
K dp/dt _{min}	-1377	-911	-1480	-1982	0,624
(mmHg/s)	(-2593/-808)	(-2576/-158)	(-2622/-506)	(-2821/-307)	
R1 dp/dt _{min}	-911	-804	-869	-1032	0,444
(mmHg/s)	(-2576/-158)	(-1421/-245)	(-2157/-607)	(-2508/-326)	
R60 dp/dt _{min}	-578	-444	-1097	-1126	0,002
(mmHg/s)	(-2119/-371)*,#	(-968/-157) *,#	(-2587/-635)	(-2164/-535)	
P	0,001	0,027	0,867	0,565	

*K'e göre farklılık # R1'e göre farklılık

Kontrol Grubu (K), İsatın Grubu (İ), Atrial Natriüretik Peptit Grubu (ANP), isatin + Atrial Natriüretik Peptit Grubu (İ+ANP)

İskemi öncesi ölçülen dp/dt_{min} değeri(K_{dp/dt_{min}}), Reperfüzyonun ilk dakikası ölçülen dp/dt_{min} değeri (R1_{dp/dt_{min}}), Reperfüzyonun 60. dakikası ölçülen dp/dt_{min} değeri (R60_{dp/dt_{min}})

Gruplararası değerler karşılaştırıldığında R60 dp/dtmin değerinde anlamlı bir farklılık saptandı. Kontrol grubuna göre ANP grubunda, isatin grubuna göre ise ANP ve İ+ANP grubunda R60 dp/dtmin değeri anlamlı olarak farklılık göstermektedir (Şekil 12).



Şekil 12. R60 dp/dtmin değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması (medyan (min-maks))

*ANP'ye göre farklılık #İ+ANP'ye göre farklılık

Kontrol Grubu (K), İsatın Grubu (İ), Atrial Natriüretik Peptid Grubu (ANP), isatin + Atrial Natriüretik Peptid Grubu (İ+ANP)

Gruplardaki kalp hızlarında R60_{KH} değerinde anlamlı bir farklılık saptanmıştır. K_{KH} ve R1_{KH} değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur.

Kontrol grubunda grup içi karşılaştırılmasında R1_{KH} değeri K_{KH} ve R60_{KH} değerine göre anlamlı olarak azalmıştır. Diğer gruplarda anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 10).

Tablo 10. Gruplardaki kalp hızları (KH)

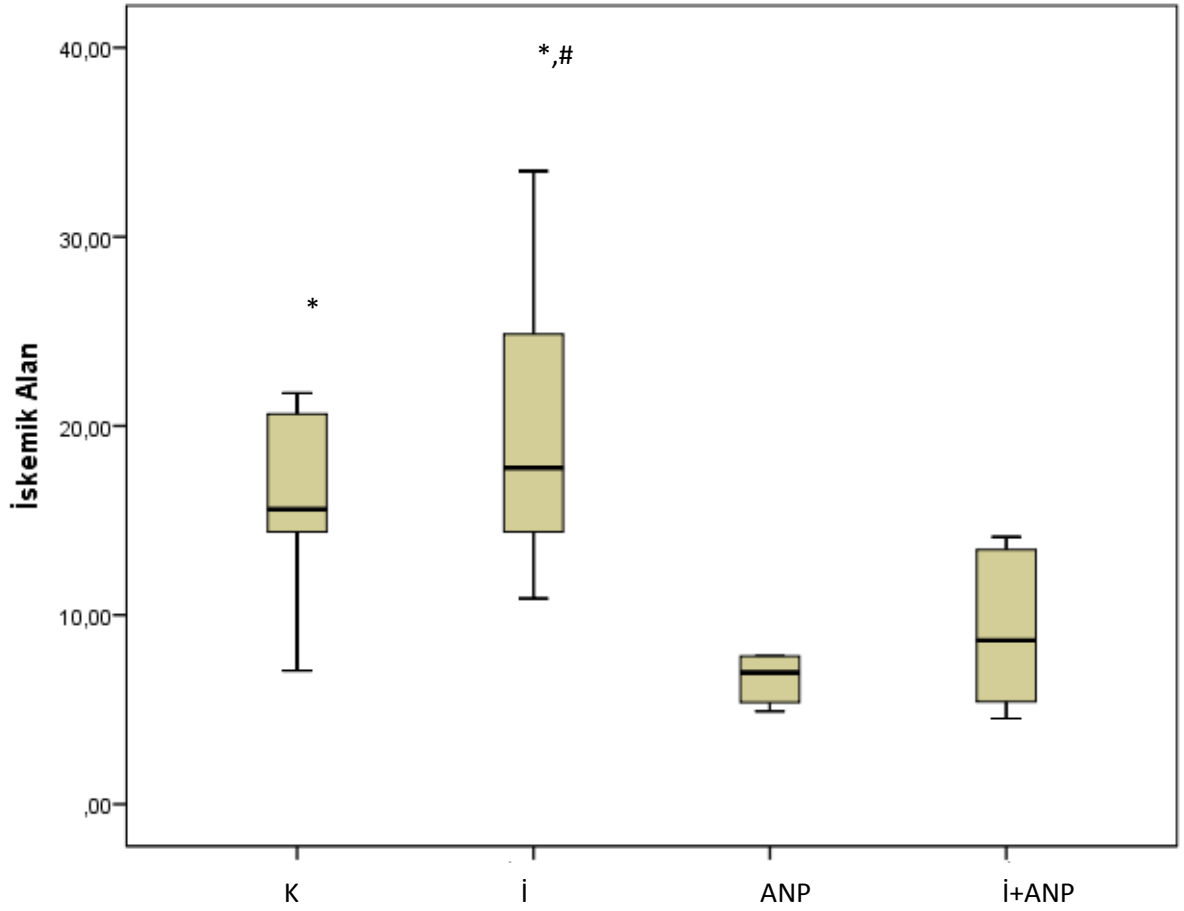
GRUP	K	İ	ANP	İ+ANP	P
K_{KH(atım/dk)}	229(191/277)	224(156/263)	223(105/272)	209(161/241)	0,736
R1_{KH(atım/dk)}	171(78/234)*,#	164(107/272)	205(136/252)	189(151/223)	0,204
R60_{KH(atım/dk)}	239(142/300)	236(95/365)	227(144/277)	267(165/285)	0,005
P	0,001	0,497	0,867	0,368	

KH; Kalp hızı * K'ya göre farklılık # R60'e göre farklılık

Kontrol Grubu (K), İstatin Grubu (İ), Atrial Natriüretik Peptit Grubu (ANP), isatin + Atrial Natriüretik Peptit Grubu (İ+ANP)

İskemi öncesi ölçülen kalp hızı değeri(K_{KH}), Reperfüzyonun ilk dakikası ölçülen kalp hızı değeri (R1_{KH}), Reperfüzyonun 60. dakikası ölçülen kalp hızı değeri (R60_{KH})

Hemodinamik ölçüm yapılan gruplarda iskemik alanların değerlerine bakıldığında gruplar arasında farklılık olduğu görülmüştür. ANP grubunun iskemik alan düzeyinin K grubuna göre anlamlı düzeyde az olduğu saptanmıştır. Ayrıca ANP grubu ve İ+ANP grubundaki iskemik alanlar İ grubundaki iskemik alanlara göre azalma göstermektedir (Şekil 13).



Şekil 13 .Gruplarda iskemik alanlar, medyan (min –maks)

* ANP'ye göre farklılık # İ+ANP'ye göre farklılık

Kontrol Grubu (K), İsatın Grubu (İ), Atrial Natriüretik Peptit Grubu (ANP), isatin + Atrial Natriüretik Peptit Grubu (İ+ANP)

Çalışmada cGMP değerlerine bakıldığında, K_{cGMP} , R_{1-cGMP} , $R_{60-cGMP}$ değerleri açısından tüm gruplarda anlamlı bir farklılık saptanmıştır (Tablo11).

Tablo 11. Grupların cGMP verileri

Grup	K	İ	ANP	İ+ANP	P
K_{cGMP} (pmol/ml)	1,02(0,01/1,59) *	0,91(0,16-/1,26) *,#	1,29(1,15/1,35)	1,15(1,01/1,38)	0,005
R_{1cGMP} (pmol/ml)	1,03(0,01/1,64)	0,91(0,16/1,05) *, #	1,20(1,03/1,53)	1,15(0,98/1,47)	0,008
R_{60cGMP} (pmol/ml)	0,99(0,18/1,61)	0,87(0,15-/1,08) *, #	1,24(1,11/1,31)	1,24(1,06/1,44)	0,002
P	0,882	0,236	0,607	0,368	

*ANP'ye göre farklılık # İ+ANP'ye göre farklılık

Kontrol Grubu (K), İsatın Grubu (İ), Atrial Natriüretik Peptit Grubu (ANP), isatin + Atrial Natriüretik Peptit Grubu (İ+ANP)

İskemi öncesi ölçülen cGMP değeri(K_{cGMP}), Reperfüzyonun ilk dakikası ölçülen cGMP değeri (R_{1cGMP}), Reperfüzyonun 60. dakikası ölçülen cGMP değeri (R_{60cGMP})

Çalışmada C-N ve İ+C-N gruplarında miyokardiyal doku COX-2 mRNA ve NF-κB mRNA düzeylerine RT-PCR ile bakıldı. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo 12).

Tablo 12. Gruplarda mRNA COX-2 ve NF-κB değerleri

Grup	C-N	İ+ C-N	p
COX-2	4,13 (1,03/6,77)	6,46 (1,06/9,99)	0,791
NF-κB	0,83 (0,62/3,01)	1,16 (0,48/1,99)	0,351

Siklooksijenaz 2 (COX-2) , Nükleer faktör kapa B (NF-κB)

COX-2 ve NF-κB grubu (C-N), İsatın + COX-2 ve NF-κB grubu (İ+C-N)

TARTIŞMA

Bu çalışmada izole perfüze sıçan kalbinde isatinin hemodinamik etkisini incelemek amacıyla SVGB, dp/dt_{maks} , dp/dt_{min} ve kalp hızı düzeyleri bakılmıştır. Bu değerler, isatin IP uygulandıktan 30 dakika sonra iskemi öncesinde, reperfüzyonun 1. ve 60.dakikasında kaydedilmiştir. Aynı zamanlarda perfüzattan alınan sıvıdan cGMP düzeylerine ELISA yöntemiyle bakılmıştır. İsatinin inflamasyon üzerine etkisini görmek amacıyla ayrı iki grupta COX-2 ve NF- κ B mRNA düzeylerine RT-PCR yöntemiyle incelenmiştir. Bu incelemeler sonunda elde edilen hemodinamik veriler, isatinin kontrol grubundan farklı bir değişim oluşturmadığını gösterdi. Ancak ANP ve İ+ANP gruplarında iskemi sonrası sol ventrikül kontraktilitesinin diğer gruplardan daha fazla artmış olduğunu gördük. Bu durum ANP'nin kardiyak kontraktiliteyi akut bir etki ile artırmış olduğunu düşündürmektedir.

Sol ventrikül kontraktilitesi ile ilgili SVGB'na ek olarak, kalbin sistolik fonksiyonunun bir göstergesi olan dp/dt_{maks} değerleri incelendiğinde, K ve İ gruplarında reperfüzyon döneminde belirgin bir azalma görülmesine rağmen ANP ve İ+ANP gruplarında azalma saptanmadı. Bu durumda ANP'nin SVGB'deki etkiye benzer şekilde dp/dt_{maks} değerini artırdığı düşünülebilir. Ancak bu artış gruplararası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde farklılık oluşturmamıştır. Bu durumda isatinin, kalbin sistolik fonksiyonunda belirgin bir değişime yol açmadığını düşünmekteyiz. ANP grubunda görülen artışın, İ+ANP grubunda da muhtemelen ANP'nin etkisine bağlı olarak meydana geldiği düşünülebilir.

Kalbin gevşeme fonksiyonunun bir göstergesi olarak dp/dt_{min} değerlerine bakıldığında ise K ve İ gruplarında reperfüzyon döneminde azalma görülmektedir. K ve İ

gruplarında dp/dtmin değerlerinin sifira daha yakın ve daha az negatif değerler olduğu saptandı. Bu durum K ve İ gruplarında daha az düzeyde bir gevşeme olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Ayrıca, ANP ve İ+ANP gruplarının reperfüzyon dönemindeki dp/dtmin değerlerine bakıldığında ise belirgin bir azalma olmadığı saptandı. Bu gruptaki dp/dtmin değerleri iskemi öncesindeki değerlere benzer seviyede değerlerdi. Bu durum ANP'nin gevşeme üzerine belirgin etkisinden kaynaklanmış olabilir.

Stresle birlikte sıçanlarda serum isatin düzeyinde hem kalp hem beyinde artış saptanmıştır ve beyindeki isatin seviyesi kadınlarda erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur. Stres sonrasında kalp ve beyindeki serum isatin seviyelerinde anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (10). ANP'nin atriyumdan sentezlendiği bilinmektedir ancak sol ventrikül disfonksiyonu ve ventriküler hipertrofide, ventriküllerden de sentezlenen ANP düzeyi artış gösterir. Damar içi volüm artışı nedeni atrium duvar geriminin artışı ANP sentezini uyarır. ANP salınımını direkt yoldan uyanan arginin, vazopresin, katekolaminler gibi maddelerin varlığının yanında atriumdaki duvar tonusunun artması sonucunda da ANP sentezinde artış olduğu bildirilmektedir.

ANP çoğunlukla atriyumdaki kardiyomiyositlerde bulunan granüllerde proANP olarak depolanmaktadır. Pro-ANP salgılanma esnasında atriyopeptidaz enzimi tarafından C-terminal ve N-terminal olarak ikiye bölünür. C-terminal-ANP 28 aminoasitten oluşur ve fizyolojik aktif formdur. Natriüretik, diüretik, damar gevşetici etkilere sahip N-terminal-proANP (NT-proANP),yüksek molekül ağırlıktadır ve küçük parçalara ayrılabilirdiği bilinir (56).

Bu çalışmada izole kalp düzeneğinde iskemi öncesinde ANP uygulanan gruplarda kardiyak kontraktilitenin artığı saptanmıştır. Bu artış SVGB, dp/dtmaks ve dp/dtmin değerleri incelenerek belirlenmiştir. Kalbin sistolik ve diyastolik fonksiyonlarını incelemek amacıyla dp/dtmaks ve min değerlerine bakıldığında ANP uygulanan gruplarda reperfüzyon sonrası artış görölmektedir.

Biz çalışmamızda yer alan gruplarda iskemiye bağlı infarkt alanlarını TTZ boyaması ile belirledik. Daha önce Yang ve arkadaşlarının (57) yaptıkları bir çalışmada tavşan kalbinde iskemi reperfüzyon yaparak ANP ve isatin etkisini araştırmışlardır. Reperfüzyondan hemen önce uygulanan ANP'nin infarktüsü azalttığı ve isatin uygulanan gruplarda da bu koruyucu etkinin ortadan kalktığı görölmüştür. Bizim çalışmamızda ise, isatin uygulanmış olan gruplarda sol ventriküldeki iskemik alan düzeyinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olmadığı saptanmıştır. K grubunda iskemik alan düzeyi %15 (7-21) olup İ grubunda bu değer %17 (10-33) olarak belirlenmiştir. ANP grubunda ise iskemik alan

%6 (4-20) ve İ+ANP grubunda %8 (4-14) olarak bulunmuştur. Bu bulgular, İ grubuna göre ANP ve İ+ANP grubunda belirgin bir azalmayı göstermektedir (Şekil 3). Buna göre iskemiden 30 dakika önce IP uygulanan isatin, iskemi alanında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. İsatın kardiyak kontraktilite ve iskemik alana bağlı oluşan infarkt alanını belirgin şekilde değiştiren bir etki oluşturmamaktadır. Ayrıca iskemi öncesi IP isatin uygulaması, ANP'nin kardiyak kontraktilite ve infarkt alanı üzerine etkilerini değiştirmemektedir.

Miyokard infarktüsü, kalp yetmezliği ve arteroskleroz gibi birçok kalp-damar hastalıklarında apoptotik hücre ölümü rol oynamaktadır. Kardiyomiyosit apoptozu ise deneysel olarak iskemi ve iskemi-reperfüzyon yapılarak gözlemlenmiştir. İskemiden sonra miyordiyal geri kazanım reperfüzyonla başlamakta ancak bazen reperfüzyonda da infarktüs alanı genişleyebilmektedir (58). Miyokard infarktüsündeki olaylar sol ventrikül dilatasyonu, kontraktil disfonksiyon, miyosit hipertrofisi ve bunu takiben bir sıra hücre içi olayla devam etmektedir (59).

İsatinin, ANP antagonisti olma dışında bilinen hücre içi etki mekanizması, cGMP gibi ikinci haberci oluşumuna engel olmasıdır (56). Natriüretik peptitler ve nitrikoksit, cGMP sinyal yolağını kullanmaktadır. cGMP'nin kardiyomiyositlerde apoptoz ile ilişkisi bildirilmiştir (60). Ayrıca cGMP'nin hemodinamik çalışmalarda sol ventrikül kan akımı artırdığı gözlemlenmiştir (61). Gerek isatin gerekse ANP'nin hücre içi etkisinde cGMP aracılı mekanizmalar önemli rol oynamaktadır. ANP etkisini cGMP'yi artırarak göstermektedir.

İsatin, biyolojik işlevlerde rolü olan endojen bir bileşiktir. İsatın anksiyojenik, sedatif ve antikonvülzan işlevleri yanı sıra ANP reseptörleri üzerinde etkili bir antagonisttir (62). İsatın ANP ile aktive olan guanilat siklazı baskılamaktadır ve aynı zamanda natriüretik peptitlerin ikinci habercisi olan cGMP üzerinde de baskılayıcı etkisi olduğu bildirilmiştir. İsatın bu özellikleri dışında NPR-A reseptörü ile etkileşime geçmektedir (63). Bizim çalışmamızda izole-perfüze sıçan kalbinde intraperitoneal olarak uygulanan isatinin düşük akımlı iskemi ve sonrasındaki reperfüzyon hasarı üzerine olan hemodinamik etkisi ve isatin uygulanmasına bağlı cGMP düzeyindeki değişim incelenmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre isatin uygulanan gruplarda ve uygulanmayan gruplarda cGMP değerlerinde bir değişim saptanmamıştır. Ancak ANP uygulanan gruplarda cGMP düzeylerinde belirgin bir artış vardır. ANP ile birlikte isatin uygulanması da bu artışı düşürmemiştir. Bu çalışmada hemodinamik ölçümlere bakıldığında kontrol ve isatin gruplarında belirgin farklılık saptanmadı. Bu bulguyu destekler şekilde kontrol ve isatin gruplarında ölçülen cGMP

düzeyleri birbirinden farklı değildi. Bu durumda bulgularımız, isatinin sol ventrikül miyokardiyal dokusunda cGMP üzerinden belirgin bir etki olmadığını göstermektedir.

Bizim çalışmamızda son yıllarda ortaya çıkan ANP'nin etkileri ile ilgili bulgular ışığında, isatinin miyokardiyal dokuda bir proinflamatuvar mediatör olan COX-2 ve COX-2 transkripsiyonun düzenleyen faktör olan NF- κ B mRNA düzeylerine etkisi araştırılmıştır. İsatinin COX-2 düzeyi üzerine etkili olup olmadığını incelemek amacıyla isatin uygulanmış ya da uygulanmamış sıçan kalplerinde COX-2 mRNA düzeylerindeki değişim RT-PCR ile bakılmıştır. Elde edilen bulgular COX-2 düzeyinin isatin uygulamasına bağlı değişim göstermediğini ve bu şekilde isatinin miyokardiyal dokuda inflamatuvar bir etki oluşturmadığını göstermektedir.

Vücutta hücresel açıdan araşidonik asitten eikosanoidlerin oluşumunda görevli olan COX enzimlerinin iyi bilinen iki tip izoformu mevcuttur. Bunlar COX-1 ve COX-2 dir. Bunun dışında son yıllarda COX-3 enzimi de saptanmıştır. COX-1 ve COX-2 enzimleri prostaglandin-H₂ üretiminde rol oynar. Daha sonra, prostaglandin-H₂'den hücreye özgü diğer prostaglandinlerin oluşumu sağlanır. Vücuttaki çoğu hücrelerde bulunan COX-1, trombaksan A₂ sentezinde de önem taşır. Bu şekilde mukozaların korunması gibi işlevlerde rolü vardır. COX-2 ise özellikle inflamatuvar süreçlerde artan bir enzimdir. Bunun dışındaki durumlarda hücreler içinde daha düşük seviyede bulunurken, inflamasyon süreçlerinde hızla artar ve prostasiklin sentezinin artışında görev alır (7). Bu enzimin kardiyovasküler homeostazda kötüleştiren rolü olduğu belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular isatinin COX-2 aracılı bir etki ile kardiyovasküler açıdan hasar oluşturucu yönde bir rol oynamadığı şeklindeydi.

İnflamatuvar mediyatörlerin kalpteki etkisi özellikle iskemi reperfüzyon süreçlerinde önem taşımaktadır. İskemi ve reperfüzyon hasarı TNF- α , IL-6, IL-8, interferon gibi birçok sitokin gen ekspresyonunu uyarmaktadır. Miyokardiyal sitokinler kardiyak hipertrofi, kalp yetmezliği, miyokardiyal disfonksiyonun ilerlemesinde önemli role sahiptir. Bununla birlikte iskemi ve reperfüzyon esnasında miyokardiyumda gen ekspresyonunun moleküler kontrol mekanizması ve düzenlenmesi araştırılmaya devam etmektedir. Son çalışmalar iskemik ön koşullanmanın kalpte COX-2'nin ekspresyonunu ve aktivitesini artırdığını gösterdi. COX-2 aktivitesindeki bu artış hem miyokard enfarktüsünde hem de miyokardiyal afallamada geç faz iskemik ön koşullanmanın etkilerine karşı koruyucu etkiler oluşturarak meydana geldiği bildirilmektedir (45). Biz bu çalışmada isatinin iskemi reperfüzyon hasarında COX-2 üzerinden oluşabilecek muhtemel etkisini incelemeyi amaçlamadık. Ancak bu konuda

yapılacak ileri çalışmalar isatinin iskemiye bağılı inflamatuvar değişikliklerdeki etkisini anlamaya yardımcı olabilir.

Bu alışmada COX-2 enzimine ek olarak, isatin uygulanmış ve uygulanmamış sıçanların kalp dokularında NF-κB dūzeyleri de belirlenmiştir. NF-κB immun, inflamasyon ve strese tepki olarak indüklenen bir transkripsiyon faktörüdür. NF-κB' nin dūzeyleri doku hasarı ve infalamatuvar birçok hastalıklarda artar. Birçok inflamatuvar hastalığın etiyolojisi tam anlaşılmasa da, NF-κB veya onunla ilgili yolaklarla ilişkisi bulunmaktadır (64). Bizim alışmamızda NF-κB grubuna isatin ve serum fizyolojik intraperitoneal uygulanarak miyokardiyal dokular çıkarıldı ve dokuların NF-κB mRNA dūzeylerine bakıldı. NF-κB dūzeyinde gruplarda artış görölmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Browder ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada izole perfüze sıçan kalbinde iskemi sonrasında NF-κB aktivasyonu uyarılmıştır. Bu aktivasyonun iskemi reperfüzyon esnasında erken gen ekspresyonu dūzenlenmesinde bir sinyal mekanizması oluşturabileceği belirtilmiştir (8). Biz bu çalışmada iskemi reperfüzyon olmaksızın COX-2 ve NF-κB yolağını incelenmiş bulunuyoruz. Bulgularımıza göre isatin uygulanmasına bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamasına rağmen COX-2 dūzeylerine bakıldığında isatin grubunda [6,46 (1,06 / 0,99)] elde edilen değerler kontrol grubundan [4,13 (1,03 / 6,77)] daha fazlaydı. Aynı şekilde NF-κB dūzeyi de isatin grubunda [1,16 (0,48 / 1,99)] kontrol grubundan [0,83 (0,62 / 3,01)] daha yüksekti. Bu bulguların isatinin COX-2 ve NF-κB yolağındaki muhtemel inflamatuvar etkisi açısından önem taşıdığını dūřünmekteyiz.

Sonuç olarak bu çalışmada natriüretik peptit reseptörleri üzerine antagonist etkileri olduğu bilinen bir indol olan isatinin izole-perfüze sıçan kalbinde iskemi reperfüzyon hasarına bağlı hemodinamik etkileri incelenmiştir. Bu etkinin oluşum mekanizmasında cGMP'nin rolünün anlaşılması açısından hemodinamik ölçümlerle birlikte cGMP dūzeylerine de bakılmıştır. Ayrıca isatin ve ANP uygulanmasının kalpte iskemik doku alanının dūzeyini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre isatin iskemi öncesinde intraperitoneal olarak uygulandığında kardiyak kontraktliyeti belirgin şekilde değiştirmediği görölmüştür. Ancak perfüzyon sıvısında iskemi öncesinde ANP konsantrasyonunun artışı, isatin uygulanan gruplarda da kardiyak kontraktilitede artış oluşumuna yol açmaktadır. Bu durumda isatin ANP etkisini azaltıcı etki göstermemiştir. Ayrıca, hemodinamik ölçümlerde elde edilen sonuçları destekler şekilde, isatin uygulanan grupta cGMP konsantrasyonu ANP uygulanan gruba göre belirgin azalma gösteriyordu. ANP uygulanan grupta iskemik alanlarda belirgin azalma görölürken ilginçtir ki sadece isatin uygulanan grupta bir farklılık saptanmamıştır. Bu

Çalışma bulguları ayrıca, isatinin inflamatuvar mediyat3r olan COX-2 ve NF-κB d3zeyinde istatiks3l olarak bir anlamlılık saptanmamış olsa da, bir azalma eğilimine yol açtığını d3ř3nd3rm3řt3r.

SONUÇLAR

Bu çalışmada izole-perfüze sıçan kalbinde intraperitoneal olarak uygulanan isatinin düşük akımlı iskemi ve sonrasındaki reperfüzyon üzerine olan hemodinamik etkisi ve isatin uygulanmasına bağlı cGMP düzeyindeki değişim incelenmiştir. Bu amaçla izole perfüze sıçan kalbi oluşturulmasının ardından iskemi öncesinde, reperfüzyonun 1. dakikasında ve 60. dakikasında hemodinamik ölçümler kaydedilmiş bulunmaktadır. Aynı zamanda bu çalışmada kalpten damlayan perfüzattan cGMP için örnek alınmıştır. Sol ventrikül gelişim basınçları, maksimum ve minimum basıç değişim oranları ve kalp hızları kayıt edilmiştir. Ek olarak izole kalplerde iskemik alanlar planimetrik yöntem ile belirlendi. Ayrıca, son yıllarda ortaya çıkan ANP'nin etkileri ile ilgili bulgular ışığında, isatinin miyokardiyal dokuda bir proinflamatuvar mediatör olan COX-2 ve COX-2 transkripsiyonunu düzenleyen faktör olan NF- κ B mRNA düzeylerine etkisini araştırdık.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre

1. Natriüretik peptit reseptörleri üzerine antagonist etkileri olduğu bilinen bir indol olan isatin, iskemi öncesinde intraperitoneal olarak uygulandığında kardiyak kontraktiliteyi kontrole göre belirgin şekilde değiştirmemiştir.
2. Düşük akımlı iskemi öncesinde perfüzyon sıvısında ANP konsantrasyonunun artışı, kardiyak kontraktilitede artış oluşumuna yol açmaktadır.
3. İsatın uygulanması iskemi öncesinde perfüzyon sıvısında ANP konsantrasyonunun artışına bağlı kardiyak kontrktilite artışı etkilememektir. Bu durumda bulgularımız iskemi öncesi maruz kalınan isatinin ANP etkisini azaltıcı etki oluşturmadığını göstermiştir.

4. Bu çalışmada, hemodinamik ölçümlerde elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak isatin uygulanan grupta cGMP konsantrasyonunun ANP uygulanan gruba göre belirgin azalma gösterdiği saptandı.
5. İskemik alanların boyutu incelendiğinde, ANP uygulanan grupta iskemik alanlarda belirgin azalma görülürken, isatin uygulanan grupta kontrol grubuna göre bir farklılık saptanmamıştır.
6. Bu çalışmada isatinin inflamatuvar mediyatör olan COX-2 ve COX-2 transkripsiyonunu düzenleyen faktör olan NF- κ B düzeyini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği görüldü. Ancak çalışmamız istatistiksel anlamlılık saptanmamış olsa da, isatinin COX-2 ve NF- κ B düzeylerinde bir azalma eğilimine yol açtığını düşündürmüştür.

ÖZET

İsatin vücut sıvılarında bulunan, natriüretik peptid antagonisti olduğu bilinen endojen bir indoldür. Bu çalışmada isatinin izole sıçan kalbindeki hemodinamik etkisi ve isatin uygulanmasına bağlı siklik guanozin monofosfat değerlerindeki değişim incelendi. Ayrıca isatinin miyokardiyal dokuda iskemi üzerine siklooksigenaz-2 ve nükleer faktör kapa B düzeylerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada 250-350 gr ağırlığında erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Düşük akımlı iskeminin 30 dakika öncesinde Kontrol grubuna (n=10) serum fizyolojik, isatin grubuna (n=10) isatin (50 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. İzole kalpler Langendorf aparatına yerleştirildi. Bu gruplardaki izole kalplere 15 dakika boyunca Krebb's Henseleit solüsyonu perfüze edildi. Atriyal natriüretik peptit grubunda (n=7) ve isatin + atriyal natriüretik peptit grubunda (n=7) perfüzyon solüsyonuna atriyal natriüretik peptit (0.1 µM/L) eklendi. Tüm gruplarda sol ventrikül gelişim basıncı maksimum ve minimum basınç değişim değerleri çalışma boyunca kaydedildi. Sol ventrikül dokusunda siklooksigenaz-2 mRNA and nükleer faktör kapa B mRNA düzeyleri isatin (n=10) ve serum fizyolojik (n=10) verilmesini takiben 30 dakika sonrasında belirlendi.

İsatin grubunun reperfüzyonun 60. dakikasındaki sol ventrikül gelişim basıncı değerleri (18,9 ± 17,1 mmHg) atriyal natriüretik peptit grubundan (68,9± 55,5 mmHg; p<0.05) ve isatin + atriyal natriüretik peptit grubundan (80,8± 53,2 mmHg; p<0.05) daha düşüktü. İsatin grubunda reperfüzyonun 60. dakikasında isatin ve atriyal natriüretik peptit grubuna göre azalmış minimum basınç değişimi saptandı. Atriyal natriüretik peptit (1,22±0.07 pmol/ml) ve isatin + atriyal natriüretik peptit (1,22±0.11 pmol/ml) gruplarının

perfüzyon solüsyonunda isatin grubundan ($0,67\pm0.39$ pmol/ml) daha yüksek siklik guanozin monofosfat düzeyleri saptandı(sırasıyla, $p<0.01$ and $p<0.01$). İsatın grubunda infakt alanı ($19,7\pm7,1$ %) atriyal natriüretik peptit ($8,8\pm6,0$ %; $p<0.01$) ve isatin + atriyal natriüretik peptit ($9,1\pm4,2$ %; $p<0.01$) grubundan daha fazlaydı. Grupların siklooksigenaz-2 ve nükleer faktör kapa B mRNA değerleri isatin verilmesini takiben kontrol grubuna benzer bulundu.

İzole sıçan kalbinde yüksek doz isatin verilmesi kontrol grubuna benzer kontraktıl etki oluşturmuş bulunmaktadır. Bununla birlikte, atriyal natriüretik peptit sıçan kalbinde reperfüzyonun 60. dakikasında siklik guanozin monofosfat düzeyini artırarak pozitif inotropik ve lusiotropik etkiler oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: İsatın, atrial natriüretic peptit, kalp, iskemi

HEMODYNAMIC EFFECTS OF ISATIN ON ISOLATED PERFUSED HEART

SUMMARY

Isatin is an endogen indole which is found in the body fluids and known as natriuretic peptid reseptor blocker. The hemodynamic effects of isatin were investigated in this study. Additionally, the alterations of cyclic guanosine monophosphate levels depending on isatin in application and the effect of isatin on myocardial infact area and the effects of isatin on the levels of cyclooxygenase-2 and nükleer faktor kappa B were investigated in this study.

Male Wistar rats weighted 250-350 gr were used in this study. Normal saline in control group (n=10) and isatin (50 mg/kg) in isatin group (n=10) were applied intraperitoneally to rats 30 minutes before low flow ischemia. Isolated hearts were placed in a Langendorff apparatus. Krebb's Henseleit solution perfused for 15 minutes to the isolated hearts in each group. Atrial natriuretic peptid (0.1 μ M/L) was added to the perfusion solution in atrial natriuretic peptide group (n=7) and isatin + atrial natriuretic peptide group (n=8). Left ventricular developed pressure, maximum and minimum rate of pressure development (+dp/dt and -dp/dt) were recorded during the experiments. Cyclic guanosine monophosphate levels were measured in perfusion solution before and after 30 minutes and 60-minutes of ischemia in all groups. Cyclooxygenase-2 mRNA and nuclear factor kapa B mRNA levels in left ventricle tissue were also determined 30 minute after administration of isatin (n=10) or normal saline (n=10).

Left ventricular developed pressure was lower in isatin group ($18,9 \pm 17,1$ mmHg) than atrial natriuretic peptide group ($68,9 \pm 55,5$ mmHg; $p < 0.05$) and isatin + atrial natriuretic peptide group ($80,8 \pm 53,2$ mmHg; $p < 0.05$) in reperfusion (60 minutes). Decreased dp/dtmin values were observed 60 minutes after reperfusion in isatin group than atrial natriuretic peptide group, and isatin + atrial natriuretic peptide group. Higher cyclic guanosine monophosphate values were found in reperfusion in atrial natriuretic peptide ($1,22 \pm 0.07$ pmol/ml) and isatin + atrial natriuretic peptide ($1,22 \pm 0.11$ pmol/ml) group than isatin group ($0,67 \pm 0.39$ pmol/ml) in perfusion solution ($p < 0.01$ and $p < 0.01$ respectively). Infarct size was larger in the isatin group ($19,7 \pm 7,1$ %) than atrial natriuretic peptide ($8,8 \pm 6,0$ %; $p < 0.01$) and isatin + atrial natriuretic peptide ($9,1 \pm 4,2$ %; $p < 0.01$) group. Cyclooxygenase-2 and nuclear factor kappa B mRNA values were similar with control group following isatin administrations.

Similar contractil force has been observed with control values following ischemic injury after high dose of isatin administration in isolated rat heart. However, atrial natriuretic peptide may mediate positive inotropic and lusitropic effect on the rat heart in the 60th minute of reperfusion by increasing cyclic guanosine monophosphate levels in isolated perfused rat heart.

Key Words; isatin, atrial natriuretic peptide, heart, ischemia

KAYNAKLAR

1. Medvedev A, Crumeyrolle-Arias M, Cardona A, Sandler M, Glover V. Natriuretic peptide interaction with [3H]isatin binding sites in rat brain. *Brain Res* 2005; 1042(2):119-24.
2. Yıldırım AE, Eşsizoglu A, Mengi M, Yurdakoş E. Endojen bir anksiyolitik olarak atrialnatriüretik peptid. *New Symposium Journal* 2012; 50(1):3-12
3. Medvedev A, Buneeva O, Glover V. Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy. *Biologics* 2007; 1(2):151-62.
4. Pataki I, Adamik A, Telegdy G. Isatin (Indole-2, 3-dione) inhibits natriuretic peptide-induced hyperthermia in rats. *Peptides* 2000; 21(3):373-7.
5. Buneeva OA, Kopylov AT, Tikhonova OV, Zgoda VG, Medvedev AE, Archakov AI. Effect of affinity sorbent on proteomic profiling of isatin-binding proteins of mouse brain. *Biochemistry* 2012; 77(11):1326-38.
6. Clerico A. Natriüretic Peptidas. *The hormones of the hearts* 2006; 3:35.
7. Murat Gençbay. Siklooksijenaz-2, İnhibitörleri Koroner Olay Riskini Artırıyorlar Mı? *Türk Kardiyol Dern Arş* 2004;(32):371-5.
8. Li C, Browder W, Kao RL. Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol* 1999; 276(2 Pt 2):H543-H552.
9. Mawatari K, Segawa M, Masatsuka R, Hanawa Y, Iinuma F, Watanabe M. Fluorimetric determination of isatin in human urine and serum by liquid chromatography postcolumn photoirradiation. *Analyst* 2001; 126(1):33-6.
10. Igosheva N, Matta S, Glover V. Effect of acute stress and gender on isatin in rat tissues and serum. *Physiol Behav* 2004; 80(5):665-8.
11. Gillam EM, Notley LM, Cai H, De Voss JJ, Guengerich FP. Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. *Biochemistry* 2000; 39(45):13817-24.

12. Crumeyrolle-Arias M, Medvedev A, Cardona A, Barritault D, Glover V. In situ imaging of specific binding of [3H]isatin in rat brain. *J Neurochem* 2003; 84(3):618-20.
13. Binda C, Li M, Hubalek F et al. Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(17):9750-5.
14. Igosheva N, Lorz C, O'Conner E, Glover V, Mehmet H. Isatin, an endogenous monoamine oxidase inhibitor, triggers a dose- and time-dependent switch from apoptosis to necrosis in human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 2005; 47(3):216-24.
15. Medvedev AE, Sandler M, Glover V. Interaction of isatin with type-A natriuretic peptide receptor: possible mechanism. *Life Sci* 1998; 62(26):2391-8.
16. Glover V, Medvedev A, Sandler M. Isatin is a potent endogenous antagonist of guanylate cyclase-coupled atrial natriuretic peptide receptors. *Life Sci* 1995; 57(22):2073-9.
17. Ivanov I, Panova NG, Gnedenko OV, Buneeva OA, Medvedev AE, Archakov AI. Study of the tissue and subcellular distribution of isatin-binding proteins with optical biosensor. *Vopr Med Khim* 2002; 48(1):73-83.
18. Medvedev AE, Glover V. Tribulin and endogenous MAO-inhibitory regulation in vivo. *Neurotoxicology* 2004; 25(1-2):185-92.
19. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 2006; 27(1):47-72.
20. Wiedemann K, Jahn H, Kellner M. Effects of natriuretic peptides upon hypothalamo-pituitary-adrenocortical system activity and anxiety behaviour. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108(1):5-13.
21. Fatma Ucar, Serpil Turhan. Natriuretic peptitler. *Türk Hij Den Biy Derg* 2005;(62):49-54.
22. Telegdy G, Adamik A, Glover V. The action of isatin (2,3-dioxoindole) an endogenous indole on brain natriuretic and C-type natriuretic peptide-induced facilitation of memory consolidation in passive-avoidance learning in rats. *Brain Res Bull* 2000; 53(3):367-70.
23. Medvedev A, Adamik A, Glover V, Telegdy G. Cyclic GMP excretion blocked by isatin administration under conditions of fluid overload. *Biochem Pharmacol* 2001; 62(2):225-7.
24. İlker Şengül, Demet Şengül. İskemik ön koşullanma ve sonradan koşullanma mekenizmaları olarak intraselüler sinyalizasyon ve adenozin. *Cumhuriyet Tıp Dergisi* 2010;(32):127-31.
25. Narin F, Başarslan F, Akgün H, Akın A, Baykan A, Saraymen R, Kuzugüden S, Yavaşcan S. Hipoksi ile oluşturulan myokardiyal hasar üzerine melatoninin etkisi. *Erciyes üni sağ bil derg* 2004;(13):64-72.
26. Lionel H. Opie. III. Edition. *The Heart Physiology, from cell to circulation.* Lippincott Williams Wilkins Philadelphia PA 1997;551-6

27. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res* 1985; 57(6):864-75.
28. Boersma E, Maas AC, Deckers JW, Simoons ML. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet* 1996; 348(9030):771-5.
29. Hasan Akkoç. Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı. *Dicle Tıp Dergisi* 2008;(35):211-5.
30. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
31. Kloner RA, Arimie RB, Kay GL et al. Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron Artery Dis* 2001; 12(5):349-56.
32. Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003; 75(2):S644-S648.
33. Das UN. Free radicals, cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2000; 215(1-2):145-52.
34. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 2001; 104(25):3158-67.
35. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res* 1990; 66(4):913-31.
36. Downey JM, Cohen MV. Mitochondrial K(ATP)channel opening during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(4):651-3.
37. Lemasters JJ. V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999; 276(1):G1-G6.
38. Thompson JA, Hess ML. The oxygen free radical system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1986; 28(6):449-62.
39. Yellon DM, Dana A. The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or a clinical reality? *Circ Res* 2000; 87(7):543-50.
40. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Medici D. Oxygen free radicals and reperfusion injury; the effect of ischaemia and reperfusion on the cellular ability to neutralise oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1986; 18 Suppl 4:67-9.
41. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312(3):159-63.
42. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59(6):612-9.
43. Pryor W.A. Free radical mechanisms of tissue injury. *Biochem J* 1984;(222):1-15.

44. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991; 161(4):488-503.
45. Bolli R, Shinmura K, Tang XL, Kodani E, Xuan YT, Guo Y et al. Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc Res* 2002; 55(3):506-19.
46. El-Sayed M, Taha MM. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in astrocytoma: correlation with angiogenesis, tumor progression and survival. *Turk Neurosurg* 2011; 21(1):27-35.
47. Döring HJ. The isolated perfused heart according to langendorff. *Physiologia Bohemoslovaca* 1989, 39(6):481-504.
48. Ramasamy R, Trueblood N, Schaefer S. Metabolic effects of aldose reductase inhibition during low-flow ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1998; 275(1):H195-H203.
49. Bouma P, Ferdinandy P, Sipkema P, Allaart CP, Westerhof N. Nitric oxide is an important determinant of coronary flow in the isolated blood perfused rat heart. *Basic Res Cardiol* 1992; 87(6):570-84.
50. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3):95-125.
51. Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 2003; 4(11):1120-8.
52. Bert Vogelstein, Kenneth W Kinzler. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* 2004(10); 789-799.
53. Mocellin S, Rossi CR, Marincola FM. Quantitative real-time PCR in cancer research. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2003; 51(5):301-13.
54. Brown DA, Lynch JM, Armstrong CJ, Caruso NM; Ehlers LB, Johnson MS et al. Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *J Physiol* 2005; 564(Pt 2):619-30.
55. Ercüment Ölmez. Miyokardiyal iskemi reperfüzyonda nekrotik alanın değerlendirilmesi. (tez) İnönü Üniversitesi, Farmakoloji Anabilim Dalı 2013;8-11
56. Celal Ceylan. Akut miyokard infarktüsünde serum nt-probnp düzeyi ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ilişkisi. (tez) İst. Eğit. Ve araş. Hast. Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü. 2005.
57. Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. Atrial natriuretic peptide administered just prior to reperfusion limits infarction in rabbit hearts. *Basic Res Cardiol* 2006; 101(4):311-8.
58. Chapman JG, Magee WP, Stukenbrok HA, Beckius GE, Milici AJ, Tracey WR et al. A novel nonpeptidic caspase-3/7 inhibitor, (S)-(+)-5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidinyl)sulfonyl]isatin reduces myocardial ischemic injury. *Eur J Pharmacol* 2002; 456(1-3):59-68.

59. Sam F, Sawyer DB, Chang DL, Eberli FR, Ngoy S, Jain M et al. Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(1):H422-H428.
60. Görmüş U, Özmen D. “cGMP ve klinik önemi”, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2005;25(5), 678-687.
61. Süzer Ö, Bozkurt AK, Süzer A, Aykoç Z, Barlas A. İzole kobay kalplerinde iskemik arrest sonrası levamisidon ve amrinonun inotropik etkilerinin karşılaştırılması. *Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 1996(1-2);4-8.
62. Pandeya SN, Smitha S, Jyoti M, Sridhar SK. Biological activities of isatin and its derivatives. *Acta Pharm* 2005; 55(1):27-46.
63. Medvedev A, Sandler M, Glover V. The influence of isatin on guanylyl cyclase of rat heart membranes. *Eur J Pharmacol* 1999; 384(2-3):239-41.
64. Guma M, Stepniak D, Shaked H, Spehlmann ME, Shenouda S, Eckmann L et al. Constitutive intestinal NF-kappaB does not trigger destructive inflammation unless accompanied by MAPK activation. *J Exp Med* 2011; 208(9):1889-900.

RESİMLEMELER LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İsatinin oluşum mekanizması ve katabolizması.....	5
Şekil 2. İsatın bağlanma yerlerinin miktarı dokulara göre farklılık gösterir	6
Şekil 3. Grup K.....	18
Şekil 4. Grup İ.....	19
Şekil 5. Grup ANP	19
Şekil 6. Grup İ+ANP	20
Şekil 7. Kontrol grubu	21
Şekil 8. İsatın grubu	21
Şekil 9. ANP grubu	22
Şekil 10. İ+ANP grubu.....	22
Şekil 11. R60 SVGB değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması	29
Şekil 12. R60 dp/dt _{min} değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması.....	31
Şekil 13. Gruplarda iskemik alanlar, medyan (minumum-maksimum)	32

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Sıçan dokularında isatin konsantrasyonları	4
Tablo 2. Deney Grupları	18
Tablo 3. Test kitinde bulunan malzemeler.....	22
Tablo 4. cDNA sentezi için kullanılan miks içeriği.....	26
Tablo 5. Real- Time PCR için miks içeriği	26

Tablo 6. primerler ve referans gen configürasyon numaraları.....	26
Tablo 7. Graplarda sol ventrikül gelişim (svgb) basınç ölçümleri	28
Tablo 8. Grpların maksimum sol ventrikül basınç değişim oranları	30
Tablo 9. Grpların minumum sol ventrikül basınç değişim oranları.....	30
Tablo 10. Grplardaki kalp hızları.....	31
Tablo 11. Grpların cGMP değerleri	33
Tablo 12. Grplarda mRNA COX-2 ve NF- κ B değerleri.....	33

ÖZGEÇMİŞ

31.01.1983 tarihinde Kırklareli’de doğmuşum. İlköğrenimi Kırklareli’ye bağlı Babaeski ilçesinin Terzili köyünde tamamladım. Orta öğrenimimi Babaeski Merkez Ortaokulu’nda bitirdim. 2000 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Ebelik Bölümü’ne girdim ve 2004 yılında mezun oldum. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Nefroloji Klinik’inde çalışmaya başladım. 2009 yılında Trakya Üniversitesi Kadın Doğum Klinik’inde görev yapmaya başladım ve halen bu serviste çalışmaktayım. 2010-2011 yılı bahar döneminden beri Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk annesiyim.

EKLER

Ek 1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI


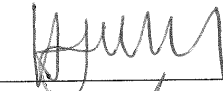

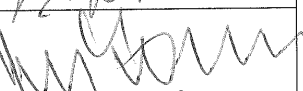


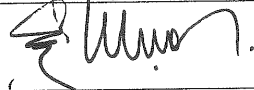

EDİRNE

Oturum Sayısı: 03

Karar Tarihi: 05.04.2013

KARAR NO: 2013.03.10

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr.Selma Arzu VARDAR'ın yaptığı Zuhâl Guksu'nun Yüksek Lisans Tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/37 protokol nolu "İsatinin izole sıçan kalbinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarındaki etkileri" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, geç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; çalışmadaki değişiklik önerisinin uygun olduğuna ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	