

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇAN MEZENTER İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE
MEZENTER ARTER VE İLEUMDAKİ
FONKSİYONEL VE YAPISAL DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE
SİLDENAFİLİN ETKİLERİ**

Dr. Güray SOYDAN

**Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2007

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇAN MEZENTER İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE
MEZENTER ARTER VE İLEUMDAKİ
FONKSİYONEL VE YAPISAL DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE
SİLDENAFİLİN ETKİLERİ**

Dr. Güray SOYDAN

**Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Meral TUNCER**

ANKARA

2007

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmakoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Rüştü Onur
Hacettepe Üniversitesi

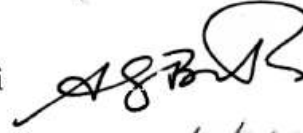


Danışman

Prof. Dr. Meral Tuncer
Hacettepe Üniversitesi



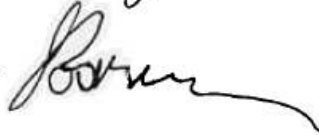
Prof. Dr. Alper İskit
Hacettepe Üniversitesi



Doç. Dr. Ümit Yaşar
Hacettepe Üniversitesi



Doç. Dr. Süreyya Barun
Gazi Üniversitesi



ONAY

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Y. 
Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmadaki değerli katkılarından dolayı en başta danışmanım Sayın Prof. Dr. Meral Tuncer'e, yardımcı danışmanım Sayın Prof. Dr. Rüştü Onur'a, patolojik incelemelerdeki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Cenk SÖKMENSÜER'e, biyokimyasal incelemelerdeki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Kamer Kılınç'a, emeği geçen tüm saygıdeğer öğretim üyelerine, trase ve resimlerin düzenlenmesindeki katkılarından dolayı Dr. Edip Güvenç ÇEKİÇ'e, araştırmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı teknisyen arkadaşlarım ile emeği geçen tüm asistan arkadaşlarıma ve her zaman her yerde benimle olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu çalışmanın bir kısmı Novartis tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Soydan, G., Sıçan mezenter iskemi/reperfüzyon modelinde mezenter arter ve ileumdaki fonksiyonel ve yapısal değişiklikler üzerine sildenafilin etkileri. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Doktora Tezi, Ankara, 2007.

Bu çalışmanın amacı sildenafilin sıçanlarda mezenter iskemi/reperfüzyon (İ/R)'u sonrasındaki vasküler ve intestinal hasar üzerine olan etkilerini araştırmaktır. Superior mezenter arterin 45 dak kapatılmasıyla oluşturulan iskemiye takiben 60 dak reperfüzyon uygulandı. İ/R'nin sebep olduğu endotel hasarı, fonksiyonel olarak, mezenter arterlerde asetilkolin (ACh) gevşemelerindeki değişiklikler olarak değerlendirildi. İntestinal hasarı belirlemek için ileum segmentlerinde ACh'in ve elektriksel alan stimülasyonu (EAS)'nın oluşturduğu kasılmalar ile EAS ile oluşturulan nonadrenerjik nonkolinerjik (NANK) gevşemeler incelendi. Ayrıca ileumda histopatolojik ve biyokimyasal (tiyobarbitürik asit reaktif substans; TBARS miktarı ve miyeloperoksidaz; MPO aktivitesi) değişiklikler araştırıldı. İ/R, mezenter arterde ACh'nin oluşturduğu gevşemeleri azalttı. Sildenafil (1 mg/kg, i.v.) ön tedavisi bu azalmış cevapları geri döndürdü. İleumdaki İ/R sonrası azalan ACh'nin oluşturduğu kasılmalar da sildenafil ile geri döndü. EAS ile elde edilen hem ileumdaki kasılma, hem de NANK gevşemeleri İ/R sonrasında azaldı. Sildenafil ön tedavisi bu fonksiyonel değişiklikleri kısmen düzeltti. İleum TBARS miktarı ve MPO aktivitesi İ/R sonrasında arttı ve sildenafil bu artışı anlamlı olarak azalttı. Patolojik incelemede, İ/R sonrasında çok fazla artmış olan intestinal iskemik alan ve ileum hasarı skorlaması sildenafil ile anlamlı olarak azaltıldı. Bu sonuçlar, sildenafilin İ/R'nin sebep olduğu fonksiyonel ve yapısal değişiklikler üzerine yararlı ve koruyucu etkisi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemi/reperfüzyon, mezenter arter, ileum, elektriksel alan stimülasyonu, sildenafil.

ABSTRACT

Soydan G., The effects of sildenafil on functional and structural changes in mesenteric artery and ileum, in a mesenteric ischemia/reperfusion model of rat. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Pharmacology, Ankara, 2007. The aim of this study was to investigate the effects of sildenafil on intestinal and vascular injury following mesenteric ischemia/reperfusion (I/R) in rats. Following ischemia induced by occlusion of the superior mesenteric artery for 45 min, reperfusion was applied for 60 min. I/R-induced endothelial damage was evaluated, functionally, as changes in acetylcholine (ACh) induced relaxation of mesenteric arteries. To determine intestinal damage, ACh- and electrical field stimulation (EFS)-induced contractions and EFS-induced nonadrenergic noncholinergic (NANC) relaxations were investigated in ileal segments. Additionally, histopathological and biochemical (thiobarbituric acid reactive substances; TBARS content and myeloperoxidase; MPO activity) changes were evaluated in ileal segments. I/R decreased vasorelaxations to ACh, in mesenteric artery. Sildenafil (1 mg/kg, i.v.) pretreatment reversed these impaired responses. The decreased ileal contractions to ACh after I/R was also reversed by sildenafil. Both ileum contractions and NANC relaxation obtained by EFS were decreased after I/R. Sildenafil pretreatment partly improved these functional changes. Ileal TBARS amounts and MPO activity increased after I/R were attenuated significantly by sildenafil pretreatment. In pathological examination, highly increased intestinal ischemic area and the damage scores of ileum after I/R, were significantly decreased by sildenafil. These results suggest that sildenafil may have protective and beneficial effects on I/R-induced functional and structural changes in rat.

Keywords: Ischemia/reperfusion, mesenteric artery, ileum, electrical field stimulation, sildenafil.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	x
TABLO	xii
1 GİRİŞ	1
1.1 Hipotez	2
1.2 Amaç	2
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 İntestinal İskemi	3
2.2 Reperfüzyon Hasarı	3
2.3 Reperfüzyonun İndüklediği Mikrovasküler Disfonksiyonda Nitrik Oksit-Süperoksit Dengesizliği Teorisi	5
2.4 Fosfodiesteraz 5 Enzimi	6
2.5 Sildenafil Sitrat	7
3 GEREÇ ve YÖNTEMLER	10
3.1 Genel Protokol	10
3.2 İskemi/Reperfüzyon Oluşturulması	10
3.3 Deney Grupları	10
3.4 Mezenter Arter Cevapları	11
3.5 İleum Cevapları	12
3.6 Kullanılan İlaçlar	13
3.7 Lipid Peroksidasyon (TBARS)'un Tayini	13
3.8 Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini	14
3.9 Patoloji	15
3.10 Verilerin Analizi	15

4 BULGULAR	17
4.1 İntestinal Perfüzyonun Değerlendirilmesi	17
4.2 Mezenter Arter Fonksiyonel Cevaplarının Değerlendirilmesi	19
4.2.1 İzole Mezenter Arterde Fenilefrinin Oluşturduğu Kasılmalar	19
4.2.2 İzole Mezenter Arterde Asetilkolinin Oluşturduğu Gevşemeler	20
4.3 İzole İleum Segmentlerinde Fonksiyonel Cevaplar	23
4.3.1 İzole İleum Segmentlerinde Asetilkolinin Oluşturduğu Kasılmalar	23
4.3.2 İzole İleum Segmentlerinde Elektriksel Alan Stimülasyonu (EAS)'nın Oluşturduğu Kasılmalar	24
4.3.3 İzole İleum Segmentlerinde Elektriksel Alan Stimülasyonu (EAS)'nın Oluşturduğu Nonadrenerjik Nonkolinerjik (NANK) Gevşemeler	26
4.4 İleumda Biyokimyasal Değişiklikler	30
4.4.1 İntestinal Oksidatif Hasar (TBARS)	30
4.4.2 İntestinal Nötrofil İnfiltrasyonu (MPO)	31
4.5 İntestinal Histopatolojik Değişiklikler	32
4.5.1 İntestinal İskeminin Makroskopik İncelenmesi	32
4.5.2 İntestinal İskemik Hasarın Mikroskopik İncelenmesi	33
5 TARTIŞMA	36
6 SONUÇ ve ÖNERİLER	43
7 KAYNAKLAR	44
EKLER	
EK 1 Dr. Güray SOYDAN'ın bildiri ve yayınları	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
Ca ⁺²	Kalsiyum
COX	Siklooksijenaz
EAS	Elektriksel alan stimülasyonu
eNOS	Endoteliyal nitrik oksit sentaz
HETAB	Hekzadesiltrimetil amonyum
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İ/R	İskemi/Reperfüzyon
K _{ATP}	ATP'ye duyarlı potasyum
L-NOARG	N ^G -Nitro-L-Arjinin
LOX	Lipoksijenaz
LT	Lökotrien
MPO	Miyeloperoksidaz
NANK	Nonadrenerjik nonkolinerjik
NO	Nitrik oksit
PDE	Fosfodiesteraz
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostasiklin
PKG	Protein kinaz G
SF	Serum fizyolojik
sGMP	Siklik guanozin-3',5'-monofosfat
SMA	Superior mezenter arter
T _{1/2}	Yarılma ömrü
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif substansları
TXA ₂	Tromboksan A ₂

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1 PDE 5'in kompetitif inhibitörü sildenafil ile onun doğal substratı olan sGMP'nin kimyasal yapıları	7
4.1 Mezenter İ/R'nin ve sildenafil ön tedavisinin ileum lokal kan akımı üzerine olan etkileri	18
4.2 Mezenter İ/R'nin ve sildenafil ön tedavisinin mezenter arter fenilefrin cevapları üzerine etkileri	19
4.3 (A) Mezenter arter asetilkolin gevşemeleri (B) L-NOARG'ın bu gevşemeler üzerine etkisi	21
4.4 (A) Mezenter İ/R sonrasında mezenter arter asetilkolin gevşemeleri (B) Sildenafil'in İ/R sonrasındaki bu gevşemeler üzerine etkisi	22
4.5 Mezenter İ/R'nin ve sildenafil ön tedavisinin mezenter arter asetilkolin gevşemeleri üzerine etkisi	23
4.6 Mezenter İ/R'nin ve sildenafil ön tedavisinin izole ileum asetilkolin kasılmaları üzerine etkisi	24
4.7 İzole ileumda EAS'nin oluşturduğu kasılmalar	25
4.8 Mezenter İ/R'nin ve sildenafil ön tedavisinin izole ileumda EAS'nin oluşturduğu kasılmalar üzerine etkisi	26
4.9 İzole ileumda atropin ve guanetidin varlığında EAS ile elde edilen NANK gevşemeleri	27
4.10 Tetradotoksinin, L-NOARG'ın ve L-NOARG + L-arjininin izole ileumda EAS ile elde edilen NANK gevşemeleri üzerine etkileri	28
4.11 Mezenter İ/R'nin ve sildenafil ön tedavisinin izole ileumda EAS'nin oluşturduğu NANK gevşemeleri üzerine etkileri	29
4.12 Mezenter İ/R'nin ve sildenafil ön tedavisinin ileumdaki TBARS miktarı üzerine etkileri	30
4.13 Mezenter İ/R'nin ve sildenafil ön tedavisinin ileumdaki MPO miktarı üzerine etkileri	31

4.14	Mezenter İ/R'nin ve sildenafil ön tedavisinin intestinal iskemik alan üzerine etkileri	32
4.15	Sıçanların ileumlarından hazırlanan kesitlerin ışık mikograflarında görülen intestinal hasar ve semi-kantitatif değerlendirilmesi	34
4.16	Mezenter İ/R'nin ve sildenafil ön tedavisinin intestinal iskemik hasar üzerine etkileri	35
5.1	Sildenafilin İ/R hasarını önleyici muhtemel mekanizması	39

TABLO

Tablo	Sayfa
2.1 Oral tek doz olarak alınan 100 mg sildenafil sonrasındaki farmakokinetik parametreler	8

1. GİRİŞ

İntestinal iskemi/reperfüzyonu (İ/R) akut mezenter iskemisi, ince barsak transplantasyonu, abdominal aorta anevrizması, hemoraji, travmatik veya septik şok ve çeşitli yanıklardan sonra gelişebilen çok ciddi bir durumdur (1-3). İnce barsaklardaki İ/R hasarı, endotel hücre şişmesi, kapiler tıkanma, intestinal kan akımı azalması ve mukozal bariyer disfonksiyonu gibi mikrovasküler ve mukozal değişiklikler ile karakterizedir (4-6).

İntestinal İ/R sonucu oluşan hasarın mekanizması günümüzde tam olarak açıklanabilmiş değildir. İ/R sonrası damarlarda meydana gelen endotel disfonksiyonu ve buna bağlı olarak özellikle nitrik oksit (NO) biyoyararlanımının azalmasının neden olduğu vazokonstriksiyon, nötrofil aktivasyonu ve infiltrasyonu ile trombosit agregasyonu, ayrıca serbest oksijen radikallerinin oluşması ile gelişen oksidatif hasar ve bir çok organda hasar ve yetmezliğe sebep olan sistemik inflamatuvar cevap sendromu İ/R'nin günümüzde bilinen sonuçlarıdır (7, 8).

Sildenafil, erektil disfonksiyonda kullanılan ve selektif olarak fosfodiesteraz (PDE) tip 5 enzimi inhibisyonu ile siklik guanozin-3',5'-monofosfat (sGMP) seviyesini yükselterek düz kasta gevşemeye neden olan bir maddedir (9). Mezenter arter düz kası da dahil bir çok memeli dokusunda PDE 5 varlığı gösterilmiştir (10, 11).

Son zamanlarda insanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda, sildenafilin konjestif kalp yetmezliğine, pulmoner hipertansiyona ve kalpte İ/R hasarına karşı olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (12-15). Ayrıca kalpte İ/R ve farklı modellerde oluşturulan endotel disfonksiyonu, apoptoz ve nekrozu, oksidatif hasarı ve trombosit aktivasyonunu azalttığı, ayrıca infarkt alanında azalma meydana getirdiği bildirilmiştir (16-20). Sildenafilin bu etkilerinde, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu ve buna bağlı olarak NO biyoyararlanımını artırmasının rolü olduğu gösterilmiştir (19). Kalpteki İ/R modeli (14, 15) ve insan ön kol İ/R modelinde (16) hedef organ üzerindeki etkileri araştırılmış olan sildenafilin sıçan mezenter İ/R modelinde mezenter arter ve ileumda

meydana gelen hasar üzerindeki etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

1.1 Hipotez

Sildenafil mezenter İ/R sonucu bozulan mezenter arter endotel fonksiyonu ve ileum hasarı üzerine düzeltici etkileri vardır.

1.2 Amaç

Bu projede amaç, mezenter İ/R sonucu oluşan endotel disfonksiyonu ve ileum hasarı üzerine sildenafil etkilerini fonksiyonel, biyokimyasal ve patolojik açıdan incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

İ/R hasarı bir çok dahili ve cerrahi olayın fizyopatolojisinde temel rol oynamakta ve barsakların içiçe geçmesi, akut mezenter arter tıkanması ve hemodinamik şok gibi durumlardan sonra meydana gelebilmektedir (21). Mezenter İ/R'ye bağlı oluşan lezyonlar ince barsak naklinde de görülebilmektedir (22). Mezenter arterlerdeki İ/R sonrasında akut vasküler yetmezlik ve çoklu organ yetmezliği gelişebilmektedir ve bu durumlar morbidite ve mortalite oranlarını artırmaktadır (23).

2.1 İntestinal İskemi

İntestinal iskemi trombüs veya emboliye bağlı olarak gelişen arter tıkanması sonucunda, sıklıkla da tıkanma dışı sebeplerden (kalp yetmezliği, sepsis ve dijital kullanımı ile oluşan düşük mezenterik kan akımı durumlarındaki gibi) dolayı gelişebilmektedir (24, 25). Arteriyel iskemi, oksijenlenmenin azalmasıyla aerobik enerji metabolizmasını engelleyerek dokularda değişikliklere neden olmaktadır. Bu durum intraselüler adenozin trifosfat (ATP) depleksiyonuna ve selüler homeostazisin bozulmasına yol açmaktadır (26). İskemi sırasındaki yetersiz oksijen, mitokondride oksidatif fosforilasyonun bozulmasını takiben direkt veya metabolitleri aracılığıyla hücresel hasar meydana getiren mediyatörlerin birikmesine neden olur (27). İskeminin devam etmesi ise biriken bu mediyatörlerin sürekli etkisiyle nekroza kadar giden progresif hücre değişikliklerine yol açmaktadır. Kalıcı değişiklikler meydana gelmeden önce iskeminin ortadan kalkmasıyla birlikte enerji metabolizması tekrar düzene girerek ve toksik ürünler ortamdaki uzaklaşarak hücre normal fonksiyonlarına hızla geri dönmektedir (5, 26).

2.2 Reperfüzyon Hasarı

İskeminin süresi ve yoğunluğuna bağlı olarak, oksijenin dokulara tekrar ulaşmasıyla birlikte doku hasarı daha da fazla artabilmektedir (oksijen paradoksu) (27). Deneysel mezenter İ/R modelinde, reperfüzyon sırasında oluşan doku lezyonlarının iskemi sırasında oluşanlara göre daha büyük

olduğu gösterilmiştir. (28). İ/R, endotel ve değişik hücre tipleri arasında kompleks etkileşimlere sebep olarak mikrovasküler hasar, hücrel nekroz ve/veya apoptoz oluşmasına öncülük edebilir (22). Splanik arterlerin oklüzyon ve reperfüzyonu, çoğunlukla vasküler permeabilitedeki artış sonucunda meydana gelen sirkülatuar şoku hızlandırarak polimorfonükleer nötrofillerin adezyonuna, proinflamatuvar maddelerin saliverilmesine ve hem azota- hem de oksijene-bağımlı serbest radikallerin oluşmasına neden olur (29). Splanik İ/R sonucunda oluşan hasar çoğunlukla mukoza ve submukozada görülen ve endotelial yıkıma neden olan yoğun inflamasyon ile karakterizedir (29).

İntestinal İ/R sonucunda kontraktıl aktivitede azalma, mikrovasküler permeabilitede artma ve mukozal bariyer disfonksiyonu görülmektedir (30). İskemik dokunun reperfüzyonu süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve peroksinitrit gibi toksik serbest oksijen radikallerinin oluşması için en önemli sebeptir (31). Serbest oksijen radikalleri, çok miktarda fosfolipid ve protein içeren sellüler membran ve subsellüler tabakada hasar meydana getirerek lipid peroksidasyonuna sebep olurlar ve sonucunda yapısal ve metabolik değişikliklere neden olarak hücre ölümü ve nekroza yol açarlar. Ayrıca intestinal İ/R'nin özellikle reperfüzyon sırasında artan bir akut inflamatuvar cevap meydana getirdiği ve lokal etkisinden daha zararlı bir sistemik cevap oluşturduğu bilinmektedir. Aktive olan nötrofiller sitotoksik serbest oksijen radikalleri ve proteolitik enzimler ile birlikte iskemik hasarı artırır (32).

İnce barsaklardaki İ/R, mukoza bariyeri rüptürüne neden olarak bakteriyel translokasyon ve inflamatuvar cevabın aktivasyonu ile birlikte uzak organlarda da gösterilen asit-baz denge bozukluğuna yol açmaktadır (33). Bakteriyel translokasyon, yaşayabilen bakterilerin intestinal mukozadan diğer doku ve uzak organlara dolaşım yoluyla geçmesi sonucunda gerçekleşmektedir. Reperfüzyon ile birlikte kalsiyumun intraselüler ortama geçişi artmakta ve bu durum fosfolipaz A₂ aktivitesinde anlamlı bir yükselme meydana getirmektedir. Fosfolipaz A₂ etkisi ile saliverilen araşidonik asitten siklooksijenaz (COX) enzimi ile prostaglandin (PG)'ler, tromboksan A₂ (TXA₂)

ve prostasiklin (PGI_2), lipoksijenaz (LOX) enzimi ile ise lökotrien (LT)'ler oluşmaktadır (34). Bu oluşan ürünler vazokonstriksiyona (TXA_2 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4), vazodilatasyona (PGI_2 , PGE_1 , PGE_2 , PGD_2), vasküler permeabilitede artışa (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4), trombosit kümelenmesine ve polimorfonükleer lökositlerde kemotaksiye neden olmaktadır (LTB_4).

Bütün bu olaylar sonucunda İ/R, ileumun elektriksel aktivitesini ve kontraktıl cevaplarını etkileyebilmektedir (32, 35). Literatür bilgilerine göre serbest oksijen radikalleri, inflamatuvar mediyatörler ve ekstravaze lökositler ile birlikte NO metabolizmasında oluşan bozukluk da İ/R sonrası görülen kas disfonksiyonunda rol oynamaktadır (35-37). İntestinal dokudaki kas ve sinir hücreleri iskemiden ileri derecede etkilenebilmektedir. İskemiye maruz kalan intestinal dokuda hücrelerde enerji depleksyonu görülmektedir (32). Bununla birlikte reperfüzyon sırasında oluşan serbest oksijen radikalleri de iyonik homeostazisi bozarak hücre fonksiyonlarına zarar vermektedir (32, 38).

Yapılan çalışmalarda nötrofillerin İ/R hasarında kritik bir rolü olduğu bildirilmektedir. Bu hipoteze dayalı çalışmalarda nötrofil depleksyonunun ve nötrofil-endotel hücre etkileşmesi inhibisyonunun İ/R hasarını önleyebildiği gösterilmiştir (39-41). Nötrofiller ilk olarak damar duvarına yaklaştıktan sonra endotel boyunca yuvarlanırlar ve sonunda da endotelin içinden geçmeden önce sıkıca yapışırlar (42). Adezyonu ve sonrasında endotelin içinden göçü takiben aktive nötrofiller daha fazla serbest radikal, proteolitik enzimler (kollajenaz, elastaz, katepsin G) ve peroksidaz salıverilmesini sağlayarak lokal yıkıma sebep olurlar. Aktive nötrofillerin akciğer ve diğer organlar tarafından tutulması, çoklu organ yetmezliği gelişmesindeki önemli bir basamaktır (26).

2.3. Reperfüzyonun İndüklediği Mikrovasküler Disfonksiyonda Nitrik Oksit-Süperoksit Dengesizliği Teorisi

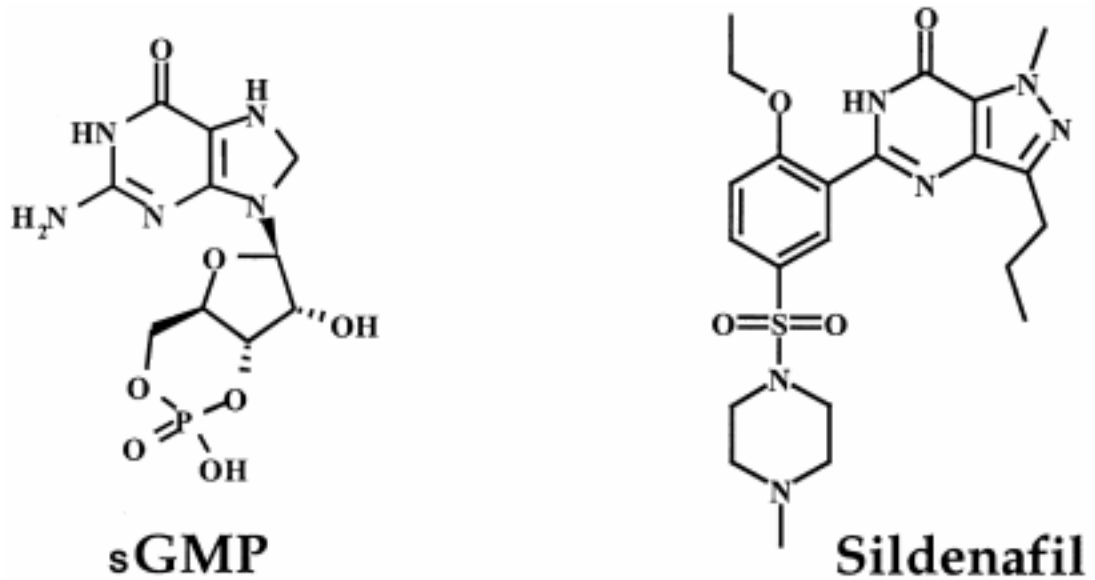
İ/R, endotel hücrelerinde NO ile süperoksit arasındaki dengeyi değiştirerek arteriollerde endotele-bağımlı gevşemelerde azalmaya ve venüllerde akut inflamatuvar cevaba neden olmaktadır (43, 44). Normal koşullar altında NO sentezi süperoksit üretiminden daha fazladır (45). Bu

durum NO'nun düşük miktardaki süperoksidin etkilerini bloke etmesiyle sonuçlanır. NO düz kasta guanilat siklazin aktivasyonu ile arteriyoller tonüsü düşürür, trombosit agregasyonunu ve trombüs oluşumunu azaltır ve endotel yüzeyi ile lökositler arasındaki adeziv etkileşimi minimum düzeye indirir (45). Fakat iskemik dokunun reperfüzyonunu takip eden dakikalar içerisinde NO ile süperoksit arasındaki denge süperoksit lehine bozulur. Bu bozulan denge adezyona uygun lökosit oluşumuna ve eNOS aracılığıyla oluşan NO sentezinde azalmaya yol açar (45). Sonuç olarak NO'nun yeterli miktarda olmamasından dolayı asetilkolin gibi endojen vazodilatör maddelerin endotele-bağımlı NO aracılı vazodilatasyonunda azalma meydana gelir (45).

2.4. Fosfodiesteraz 5 Enzimi

sGMP, düz kas gevşemesi ve trombosit agregasyonu gibi bir çok fizyolojik durumda sinyal transdüksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır (46, 47). sGMP guanilil siklaz aracılığıyla üretilir ve siklik nükleotid PDE'ler aracılığıyla 5'-GMP'ye yıkılır. Vasküler düz kas hücrelerindeki sGMP konsantrasyonu, bu iki olay arasındaki denge ile belirlenmektedir (47, 48). Bu nedenle, vasküler düz kas bozukluklarında intraselüler sGMP seviyelerinin modülasyonu farmakolojik müdahale için hedef teşkil etmektedir (49). Özellikle erektil disfonksiyonda lokal sGMP konsantrasyonunu yükseltmek için, sGMP'ye selektif olan PDE 5 enziminin inhibe edilmesi, uygulanabilir bir tedavi stratejisini ortaya çıkarmıştır.

PDE'lerin memeli dokularında 11 familyası tanımlanmıştır. Bunlardan PDE 5 enziminin vasküler ve bronşiyal düz kaslarda ve trombositlerde bulunduğu gösterilmiştir (50-52). PDE 5 inhibitörleri yapısal olarak sGMP ile benzerdir ve PDE'nin katalitik bölgesinde sGMP ile yarışmaya girerler (Şekil 2.1) (10).



Şekil 2.1 PDE 5'in kompetitif inhibitörü sildenafil ile onun doğal substratı olan sGMP'nin yapısal olarak karşılaştırılması

2.5. Sildenafil Sitrat

Sildenafilin erektil disfonksiyonu azaltıcı etkisinde spesifik olarak sGMP'yi yıkan PDE 5 enzimini inhibe etmesi rol oynamaktadır (11). Artan hücre içi sGMP vazodilatasyona neden olarak kavernoöz dokunun kan akımını artırır. Vasküler düz kasta da PDE 5 enziminin varlığı gösterilmiştir (10). NO-sGMP yolağı aracılığıyla sildenafil orta derecede ve geçici bir hipotansif etki yapar (53). Sağlıklı kişilerde tek doz oral 100 mg sildenafil alınması sistolik/diyastolik kan basıncında ortalama 10/7 mmHg azalmaya yol açmaktadır ve kalp hızında herhangi bir değişiklik olmadan kan basıncı eski seviyelerine 6 saat sonra dönmektedir (53). Sildenafilin yaygın görülen baş ağrısı, yüzde flushing, nazal konjesyon ve dispepsi gibi yan etkileri vasküler ve visseral düz kaslardaki PDE 5 inhibisyonuna bağlı olarak gelişmektedir. Bu durumlar ilacın kısa yarılanma ömrü ($T_{1/2}$) değeriyle uyumlu olarak geçici ve hafif seyretmektedir (54).

Oral alımından sonra sildenafil hızla absorbe olur ve maksimum plazma konsantrasyonuna 1 saat içinde ulaşır (Tablo 2.1) (9, 55). Sildenafil % 96 oranında plazma proteinlerine bağlanır ve geri kalan % 4 bağlı olmayan serbest ilaç plazmada dolaşıma katılarak PDE 5 inhibisyonu ile intraselüler

etkisini gösterir (56). Sildenafil'in eliminasyonu sitokrom P450 3A4 ve ikincil olarak sitokrom P450 2C9 enzimleri aracılığıyla inaktif metabolitlerine dönüşerek gerçekleşir (56, 57). Dolayısıyla sildenafil'in bu enzimlerin inhibitörleri ile birlikte alınması ilacın plazma seviyelerini yükseltmektedir.

Tablo 2.1 Oral tek doz olarak alınan 100 mg sildenafil sonrasındaki farmakokinetik parametreler (9, 55, 56, 65, 66).

Parametre	Ortalama Değer
Cmaks, ng/ml (total ilaç)	450
Cmaks, ng/ml (serbest ilaç)	18
Tmaks (dak)	60
T _{1/2} (saat)	4–5
Proteine bağlanma (%)	96
Biyoyararlanım (%)	40
Dağılım hacmi (l)	105
EAA, ng - h/ml (total ilaç)	1963
EAA, ng - h/ml (serbest ilaç)	79

EAA: Plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki alan; Cmaks: Maksimum plazma konsantrasyonu; Tmaks: Cmaks'a ulaşılan süre; T_{1/2}: Yarılanma ömrü

Sildenafil'in erektil disfonksiyondaki tedavi edici etkisinin yanısıra, konjestif kalp yetmezliği, pulmoner hipertansiyon ve endotel disfonksiyonunun görüldüğü diğer bazı kardiyovasküler durumlarda yararlı etkileri gösterilmiştir (12, 58). Sildenafil koroner arter hastalarında endotele bağımlı vazodilatasyonu ve egzersiz toleransını artırmaktadır (17, 59). Sildenafil'in farklı hayvan modellerinde kalpte İ/R hasarını koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (60, 61). Bu çalışmaların çoğu sildenafil'in önkoşullama-benzeri bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

Sildenafil'in kalpte İ/R sonrası infarkt alanında azalma meydana getirdiği farklı hayvan türlerinde gösterilmiştir (14, 15, 62). Sildenafil'in İ/R'den

başka, farede doksorubisin ile oluşan kardiyomiyopatide apoptozu azaltarak sol ventrikül disfonksiyonunu düzelttiği bildirilmiştir (20).

Sildenafil *in vitro* fare kardiyomyositlerinde iskemi/reoksijenasyon sonucu artan apoptotik hücre sayısını azalttığı, nekroz ve apoptoza karşı NO üzerinden direkt koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (19). Bu durum İ/R'yi takiben oluşan hücre ölümüne karşı sildenafilin terapötik etkisinin olduğunu desteklemektedir.

Hayvan çalışmalarının yanısıra sildenafilin insanda İ/R sonucunda gelişen endotel disfonksiyonunu ATP'ye duyarlı potasyum (K_{ATP}) kanallarını açarak düzelttiği yapılan *in vivo* radyal arter çalışmasında gösterilmiştir (16). Koroner arter hastalığı olanlarda sildenafilin koroner arterlerde dilatasyon yaptığı ve trombosit aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (17). Ayrıca sildenafilin insanda kardiyak outputu artırdığı, pulmoner arter sistolik basıncını, ortalama pulmoner arter basıncını, pulmoner vasküler rezistansı ve ortalama arter basıncını azalttığı bildirilmiştir (13).

Sıçanlarda streptozotosin ile oluşturulan bir diyabet modelinde diyabetin indüklediği oksidatif hasarın sildenafil ile geri döndüğü bildirilmiştir (63). Köpeklerde sildenafil pulmoner embolinin indüklediği oksidatif stresi ve pulmoner hipertansiyonu azaltmaktadır (18).

Pulmoner hipertansiyon hastası çocuklarda sildenafilin hiç bir yan etki göstermeksizin deoksihemoglobin satürasyonunu ve egzersiz toleransını artırarak pulmoner hipertansiyon üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (64).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1 Genel Protokol

Bu araştırmanın yapılabilmesi için gerekli izin, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 10.11.2005 tarih ve 2005/49 kayıt numarası ile alındı. Çalışmalarda 250-300 g ağırlığında erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi'nden sağlandı. Sıçanlar hayvan laboratuvarında 20°C oda sıcaklığında ve 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık olacak bir ortamda barındırıldılar. Bu sırada hayvanlarda su ve gıda alımı serbest bırakıldı.

3.2. İskemi/Reperfüzyon Oluşturulması

Sıçanlara 1,5 g/kg i.p. üretan anestezisi uygulandıktan sonra karınları sagittal bir kesi ile açıldı. Superior mezenter arter (SMA) çevre dokulardan ayrılarak damarı zedelemeyen bir klemp aracılığıyla kapatıldı, böylece mezenter iskemi sağlandı. 45 dakikalık iskemiden sonra klemp açılarak damar yatağı 60 dakika boyunca reperfüze edildi. Tüm deney boyunca barsak perfüzyonunun değerlendirilmesi amacıyla, Laser Doppler Flowmetre probu dik ve organ yüzeyine değecek bir şekilde, sabit bir düzenek aracılığıyla ileuma yerleştirildi ve intestinal kan akımı değişiklikleri OxyLab LDF cihazı ve Lazer Doppler Mikrovasküler Perfüzyon Monitörü aracılığıyla *Blood Perfusion Unit* (BPU) cinsinden kaydedildi. Alınan kayıtlar bazal değere oranlanarak oluşan değişiklikler bazal değer yüzdesi olarak değerlendirildi.

3.3. Deney Grupları

Çalışmada mezenter İ/R'nin oluşturduğu değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine sildenafilin etkilerinin incelenmesi amacıyla 4 grup oluşturuldu:

1) Sham-kontrol grubu: SMA çevre dokulardan ayrıldıktan sonra İ/R süresi kadar (45+60=105 dakika) beklendi. Bu süreç başlamadan 20 dakika

önce ilacın çözücüsü olan serum fizyolojik (SF) ilacın verildiği hacime denk (1 ml/kg, i.v.) olarak verildi. Bu gruptan elde edilen sonuçlar kontrol olarak değerlendirildi.

2) İ/R grubu: SMA'nın kapatılıp 45 dakika iskemi sonrasında klempin açılması ile 60 dakika reperfüzyon uygulandı. SMA kapatılmadan 20 dakika önce 1 ml/kg SF i.v. olarak verildi. Bu grupta İ/R'nin oluşturduğu değişiklikler incelendi.

3) İ/R + sildenafil: SMA kapatılmadan 20 dakika önce 1 mg/kg sildenafil i.v. olarak 1 ml/kg SF içinde çözülerek verildi. Daha sonra SMA aracılığıyla 45 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon oluşturuldu. Sildenafil'in bu dozu yapılan ön deneyler ve literatür değerlendirmeleri sonucunda elde edildi. Bu grupta İ/R'nin oluşturduğu değişiklikler üzerine sildenafil'in etkileri incelendi.

4) Sham + sildenafil: Sham protokolü uygulanan hayvanlara SF yerine sildenafil (1 mg/kg, i.v.) 1 ml/kg çözücü içinde verildi. Bu grupta ilacın kontrol grubu üzerine yapacağı etkiler incelendi.

3.4. Mezenter Arter Cevapları

İ/R uygulaması veya sham grubunda İ/R süresi kadar beklenmesi sonunda mezenter arter, barsaklar ile birlikte çıkarılarak içinde Krebs-Henseleit solüsyonu (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃ ve 10 mM glukoz) olan petrilere alındı. Mikroskop altında ileoçekal valvin 20-30 cm proksimalindeki intestinal bölgeyi besleyen mezenter arterin 100-160 µm çapındaki üçüncü sıra dalları, çevresindeki yağ dokusu ve birlikte seyrettikleri venden ayrılarak çıkarıldı ve içinde Krebs-Henseleit solüsyonu bulunan 5 ml'lik miyograf (Myograph 610 M) bölmelerine alındı. Yaklaşık 2 mm boyundaki her arter segmentinin içinden mikroskop altında 2 tane 40 µm çapında çelik tel geçirilerek biri mikrometre tarafına, diğeri ise *force transducer* tarafına vidalarla sabitlendi. Daha sonra miyograf bölmeleri mikroskop altından tekrar ana cihaza takıldı. Arterler, 40 dakika boyunca hiç gerim verilmeden Krebs-Henseleit solüsyonunda ve 37°C sıcaklıkta % 95 O₂ ve % 5 CO₂ gaz karışımı ile

gazlandırılarak 10 dakikada bir yıkandı. İzole arter segmentlerine, mikrometre kullanılarak, artan gerimler verildi. Bir modül program aracılığıyla arterler normalize edildi ve uygun gerimde 10 dakikada bir yıkanarak 40 dakika süreyle dengelenmeye bırakıldı. İzometrik arter cevapları veri kazanım ünitesi (PowerLab/4SP) aracılığıyla mN olarak bilgisayara kaydedildi.

İzole arter segmentlerinde fenilefrin (10^{-7} - 10^{-4} M) miyograf bölmelerine uygulanarak kasılma cevapları alındı. Maksimum cevap elde edildikten sonra preparatlar 10 dakikada bir yıkanarak 40 dakika beklendi. Miyograf bölmelerine submaksimum kasılma oluşturacak konsantrasyonda (maksimum kasılmanın % 60-80'i) fenilefrin uygulandı. Kasılma platoya ulaştıktan sonra asetilkolin (10^{-8} - 10^{-4} M) uygulanarak gevşeme cevapları elde edildi. Asetilkolinin oluşturduğu gevşeme cevaplarının NO-aracılı olup olmadığını göstermek amacıyla bir grup hayvanda ortama N^G-Nitro-L-Arjinin (L-NOARG, 10^{-4} M) eklenerek 30 dakika boyunca inkübe edildi ve asetilkoline (10^{-7} - 10^{-4} M) bağlı gevşemeler tekrarlandı. Tüm preparatlarda asetilkolinin maksimum gevşemesi alındıktan sonra ortama papaverin (10^{-6} - 10^{-4} M) uygulanarak düz kasa bağlı gevşeme cevapları incelendi.

3.5. İleum Cevapları

I/R uygulaması veya sham grubunda I/R süresi kadar beklenmesi sonunda ileoçekal valvin 20-30 cm proksimalindeki ileum segmentleri izole edilerek Tyrode solüsyonu (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.1 mM MgCl₂, 0.42 mM NaH₂PO₄, 11.9 mM NaHCO₃ ve 5.6 mM glukoz) içine alındı. İzole edilen 3-4 cm uzunluğundaki ileum segmentleri 20 ml'lik organ banyolarına asıldı. İleum preparatları sıcaklığı 37°C'de sabit tutulan banyolarda % 95 O₂ ve % 5 CO₂ içeren gaz karışımı ile gazlandırıldı. Preparatlar, 0.8-1 g istirahat gerimi verilerek bir saat süreyle dengelenmeye bırakıldı. Bu süre içinde 10 dakikada bir yıkanan preparatlardan elde edilen izometrik cevaplar *force displacement transducer* ile poligrafa (Grass Model 7B) kaydedildi. Tüm deneylerin sonunda preparatlar tartılarak yaş doku ağırlıkları (g) ölçüldü ve elde edilen cevaplar (g) yaş doku ağırlıklarına bölünerek değerlendirildi.

İzole ileum segmentlerine asetilkolin (10^{-8} - 10^{-4} M) uygulanarak kasılma cevapları elde edildi. Aynı bir deney grubunda platin elektrotlar arasına yerleştirilen ileumlara Grass S 48 stimülatör ve stimulus izolasyon ünitesi (Grass SIU 5) kullanılarak elektriksel alan stimülasyonu (EAS) uygulandı. 120 V amplitüt büyüklüğünde, 2 ms süreli stimuluslar 5 saniye boyunca farklı frekanslarda (1, 2, 5, 10, 20 Hz) uygulanarak kasılma cevapları elde edildi. Daha sonra preparatlar 5 dakika arayla yıkanarak 15 dakika boyunca dinlenmeye bırakıldı. Nonadrenerjik nonkolinerjik (NANK) cevapların incelenmesi amacıyla, preparatlar atropin (10^{-6}) ve guanetidin (5×10^{-5}) ile 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra preparatlara aynı parametreler (120 V, 2 ms, 5 s boyunca ve 1-20 Hz)'le EAS uygulaması yapıldı. EAS uygulanması sonucunda nitrejik sinir uçlarından açığa çıkan NO ile ilişkiyi araştırmak için ayrı ayrı deneylerde tetrodotoksin (10^{-6}), L-NOARG (10^{-4}) ve L-NOARG (10^{-4}) + L-arjinin (10^{-3}) kullanıldı. Bu maddeler ile 30 dakika inkübasyondan sonra son tanımlanan protokol ile cevaplar yinelendi.

3.6. Kullanılan İlaçlar

Bu çalışma kapsamında yapılan deneylerde, asetilkolin hidroklorür (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, A.B.D.), , atropin sülfat (Sigma), fenilefrin hidroklorür (Sigma), guanetidin sülfat (Ciba-Geigy, Basel, İsviçre), L-arjinin (Sigma), N^G-nitro-L-arjinin (L-NOARG, Sigma), papaverin hidroklorür (Ciba), sildenafil sitrat (Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye), tetrodotoksin (Sigma), üretan (Merck Sharp & Dohme, Rahway, NJ, A.B.D.), kullanıldı. Tüm maddeler distile suda çözülerek uygulandı.

3.7. Tiyoobarbitürik asit reaktif substansları (TBARS)'nın Tayini

Deney sonunda ileoçekal valvden itibaren 20-25 cm proksimalindeki ileum segmentleri 3-4 cm olarak çıkarılarak lümeni Tyrode solüsyonu ile temizlendikten hemen sonra -80 °C'lik ortama konularak saklandı. Tiyoobarbitürik asit reaktif substansları (TBARS), lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak Mihara ve Uchiyama (67) tarafından tanımlanan yöntemle göre tayin edildi. Dondurularak saklanmış doku örnekleri yağ ağırlıklarının 10

katı potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH: 7.4) içinde mekanik homojenizatör (Ultra Turrax) kullanılarak homojenize edildi. Buradan 0.5 ml homojenat 3 ml % 1'lik fosforik asit ile karıştırılarak 1 ml % 0.67'lik tiyobarbitürik asit eklendi. Karışım tüpler içerisinde kaynar su banyosunda 45 dakika bekletildikten sonra soğutularak üzerine n-butanol eklendi. Tüpler vorteks ile çalkalanarak oluşan rengin n-butanol fazına geçişi sağlanarak örneklerin absorbanları spektrofotometre aracılığıyla 532 nm'de okundu (Shimadzu UV-1700). Tiyobarbitürik asidin malondialdehit ile oluşturduğu kompleksin $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak alınan molar absorpsiyonundan yararlanılarak, doku lipid peroksidaz seviyeleri TBARS olarak g doku başına nanomol olarak hesaplandı.

3.8. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini

Deney sonunda ileoçekal valvden itibaren 20-25 cm proksimalindeki ileum segmentleri 3-4 cm olarak çıkarılarak lümeni Tyrode solüsyonu ile temizlendikten hemen sonra -80 °C'lik ortama konularak saklandı. İleuma bağlı MPO aktivitesi Suzuki ve diğerleri (68) tarafından tanımlanan yöntemle göre tayin edildi. Dondurularak saklanmış doku örnekleri yaş ağırlıklarının 10 katı buz soğukluğundaki potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH: 7.4) içinde mekanik homojenizatör (Ultra Turrax) kullanılarak homojenize edildi. Buradan 1 ml homojenat 10000x g'de 5 dakika boyunca santrifüje edildi ve pelletler % 0.5 Hekzadesiltrimetil amonyum (HETAB) içeren 50 mM fosfat tamponu (pH: 6.0) ve 5 mM EDTA'nın denk hacimlerinde (1 ml) tekrar süspande edildi. Elde edilen süspansiyon 5000x g'de 2 dakika boyunca santrifüje edildi ve süpernatant aktivite ölçümleri için kullanıldı.

MPO aktivitesi son olarak 80 mM fosfat tamponu (pH: 5.4), % 0.5 HETAB, başlangıçta dimetilformamidde çözülen 1.6 mM sentetik tetrametilbenzidin substratı, 2 mM H_2O_2 ve örneği içeren 1 ml hacim içerisinde ölçüldü. Reaksiyon 37 °C'de H_2O_2 eklenmesiyle başladı. MPO'nun katalizlediği tetrametilbenzidin oksidasyonunun başlangıçtaki oranı, spektrofotometre aracılığıyla 655 nm'deki artış kaydedilerek takip edildi (Shimadzu UV-1700). MPO aktivitesi, analiz koşullarında dakikada bir

absorbans değişikliğine neden olan enzim miktarı olarak eksprese edildi. Dokuya bağlı MPO aktivitesi, g cinsinden yaşı doku başına düşen ünite olarak hesap edildi.

3.9 Patoloji

Makroskobik olarak tüm jejunoileal ince barsak çıkarıldı ve metrik kağıt üzerinde uzunluğu ölçüldü. Tüm iskemik bölgenin uzunluğu ölçülerek total uzunluğa oranlandı. Barsaklardaki renk değişikliği (pembe-mor) iskemik alanlar olarak değerlendirildi.

İleoçekal valvden itibaren 20-25 cm proksimalindeki 4-5 cm'lik ileum segmentleri çıkarıldı. Çıkarılan barsak segmenti ince makasla açılarak içi SF ile yıkandıktan sonra mukavva kartonlarda gerilerek sabitlendi. Zaman kaybetmeden % 4 tamponatlı formalin içinde tespiti bırakıldı.

Daha önce tespit edilen segmentlerden alınan örnekler takip işleminden geçirildikten sonra parafin bloklama yapıldı. Parafin bloklardan alınan 4-5 mikronluk kesitler hemotoksilen/eozin ile boyandı. Tüm değerlendirmeler kör olarak yapıldı. Hemotoksilen/eozin boyalı kesitlerdeki iskemik değişiklikler ışık mikroskobik olarak preparatta tespit edilen en şiddetli hasar alanına göre 6 farklı grupta derecelendirdi. Gruplar aşığıdaki değişiklikler olarak belirlendi:

- | | |
|---|--|
| 0 | Normal |
| 1 | Yüzey epitelin dökülmesi |
| 2 | Mukozada kriptlerin 1/3 yüzey kısımlarında kayıp |
| 3 | Mukozada kriptlerin 2/3 yüzey kısımlarında kayıp |
| 4 | Mural infarkt (Mukozada ve submukozada nekroz) |
| 5 | Tüm duvarda nekroz |

3.10. Verilerin Analizi

Tüm veriler aritmetik ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak ifade edildi.

Mezenter arter kasılma cevapları arter uzunluğuna oranlanarak mm başına mN olarak değerlendirildi. Arter gevşeme cevapları ise submaksimum

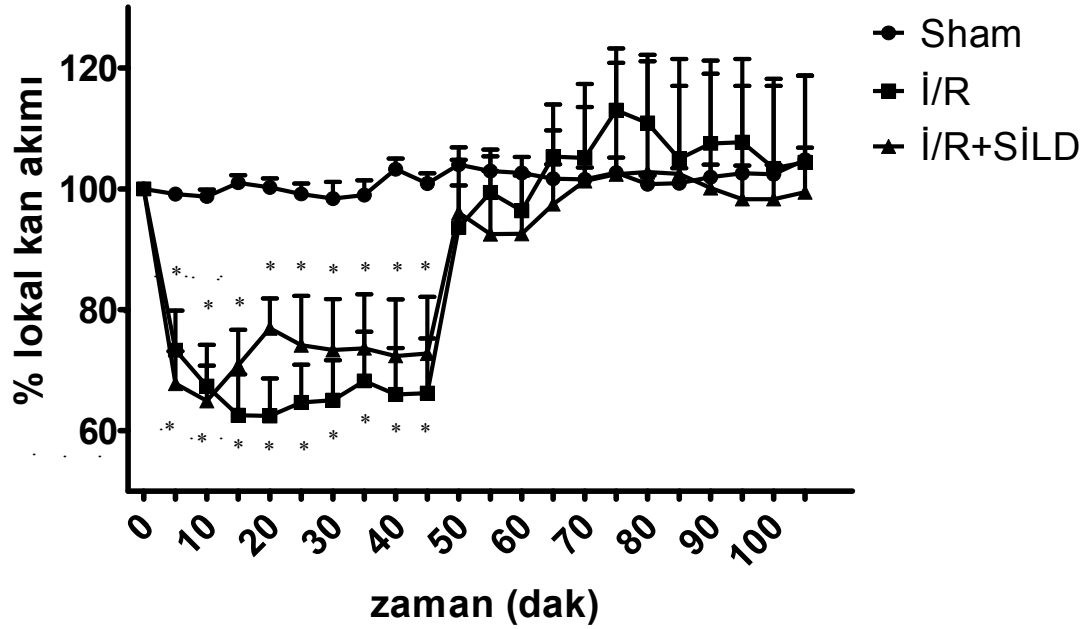
fenilefrin kasılmalarına oranlanarak yüzde olarak ifade edildi. İleumdan elde edilen tüm izometrik cevaplar g yaş doku başına g kasılma veya gevşeme olarak verildi.

Verilerin istatistiksel analizi, konsantrasyon-cevap ve zaman-perfüzyon eğrilerinde tekrarlayan ölçümler için iki yönlü varyans analizi (ANOVA), frekans cevaplarında iki yönlü ANOVA ve gerekirse *post hoc Bonferroni* testi, TBARS, MPO ile intestinal makroskopi değerlerinde Student'ın *t*-testi ve patolojik skorlamada ise gruplar arası anlamlılık için Kruskal-Wallis analizi, sonrasında ikili karşılaştırma için Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm değerlendirmelerde P değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İntestinal Perfüzyonun Değerlendirilmesi

İ/R uygulaması 5. dakikadan itibaren ileum lokal kan akımında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma oluşturdu ($\% 73.3 \pm 6.5$). Bu azalma iskeminin devam ettiği süre boyunca 45. dakikaya kadar devam etti. Reperfüzyonun başlamasıyla birlikte 50. dakikadan itibaren ileum lokal kan akımı kontrol seviyelerine geri döndü ($\% 93.6 \pm 6.9$) ve deneyin sonu olan 105. dakikaya kadar kontrolden anlamlı bir farklılık göstermedi. Sildenafil ön tedavisinden sonra (1 mg/kg, i.v) İ/R uygulamasında da ileum lokal kan akımı 5. dakikadan itibaren kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma oluşturdu ($\% 67.7 \pm 5.3$). Bu azalma iskeminin sonu olan 45. dakikaya kadar devam etti. 45. dakikada reperfüzyon başladıktan sonra 50. dakikada ileum lokal kan akımı $\% 96 \pm 8.6$ olarak ölçüldü ve kontrolden anlamlı bir farklılık göstermedi. Bu dakikadan İ/R uygulamasının sonu olan 105. dakikaya kadarki ölçümlerde kontrolden anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.1). Sham grubunda sildenafilin lokal kan akımı üzerine etkisi yoktu (gösterilmedi).



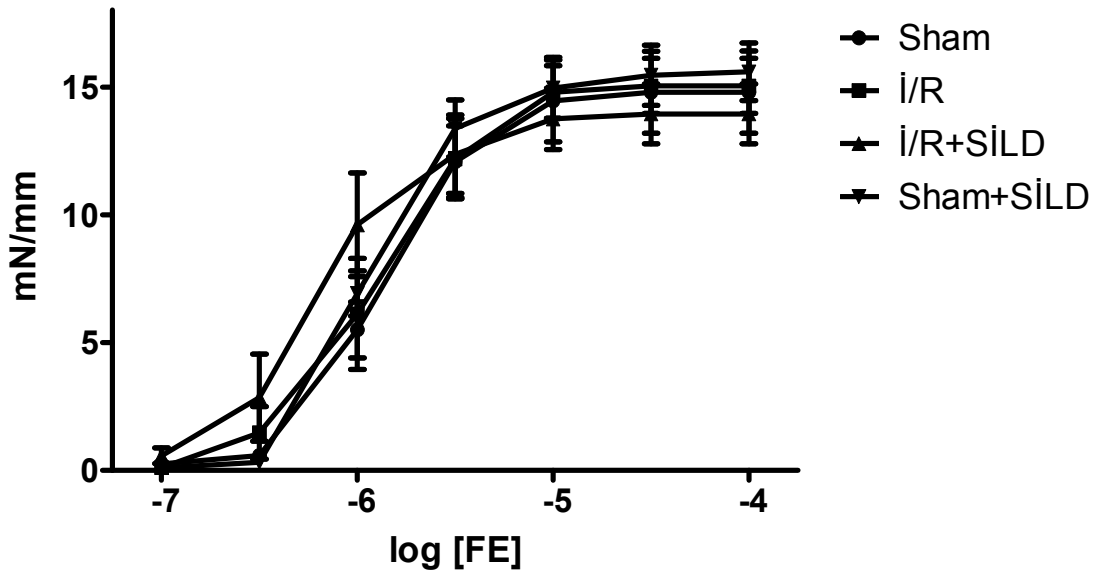
Şekil 4.1. Superior mezenter arterin 45 dakika kapatıldıktan sonra 60 dakika boyunca açılarak oluşturulan mezenter iskemi/reperfüzyon (İ/R) uygulamasının ve bu uygulama üzerine sildenafil ön tedavisinin (1 mg/kg, i.v.) sıçanda ileum lokal kan akımı üzerine olan etkileri (n=5-6).

* $P<0.05$ kontrol'e göre

4.2. Mezenter Arter Fonksiyonel Cevaplarının Değerlendirilmesi

4.2.1. İzole Mezenter Arterde Fenilefrinin Oluşturduğu Kasılmalar

Sıçan izole mezenter arterinde fenilefrinin yaptığı konsantrasyona bağımlı (10^{-7} - 10^{-4} M) kasılmalar İ/R sonunda bir farklılık göstermedi. Sildenafil ön tedavisi de (1 mg/kg, i.v) hem İ/R'de hem de sham grubundaki bu cevaplar üzerinde anlamlı bir değişiklik yapmadı (Şekil 4.2).



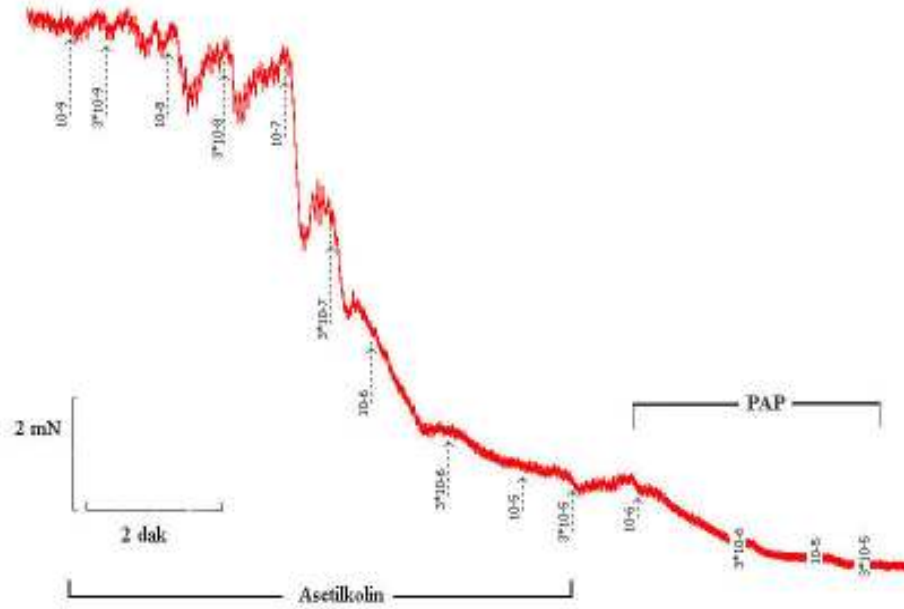
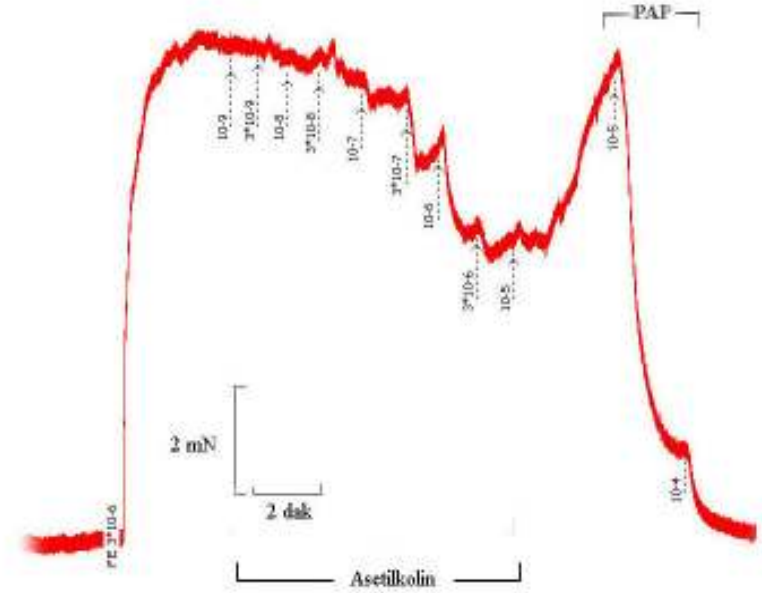
Şekil 4.2. İzole sıçan mezenter arterinde fenilefrin (FE) cevapları üzerine mezenter iskemi/reperfüzyonu (İ/R, 45 dak/60 dak)'nın ve sildenafil (1 mg/kg, i.v) ön tedavisinin etkileri (n=6-8).

4.2.2. İzole Mezenter Arterde Asetilkolinin Oluşturduğu Gevşemeler

Sıçan izole mezenter arterinde fenilefrinin oluşturduğu submaksimal kasılmanın değeri 5.2 ± 0.6 mN/mm ($n=17$) idi. Oluşturulan bu ön kasılma sonrasında asetilkolin konsantrasyona bağımlı (10^{-8} - 10^{-4} M) gevşemelere neden oldu (Şekil 4.3A). Sıçan izole mezenter arterlerinde asetilkolinin oluşturduğu gevşemelerin NO ile ilişkisini incelemek amacıyla ortama ilave edilen L-NOARG (10^{-4} M), asetilkolin gevşemelerini anlamlı olarak azalttı (Şekil 4.3B). Maksimum asetilkolin gevşemesi submaksimum fenilefrin kasılmasının $\% 91.9 \pm 2.3$ 'ü iken L-NOARG varlığında $\% 51.2 \pm 10.1$ oldu ($n=4$).

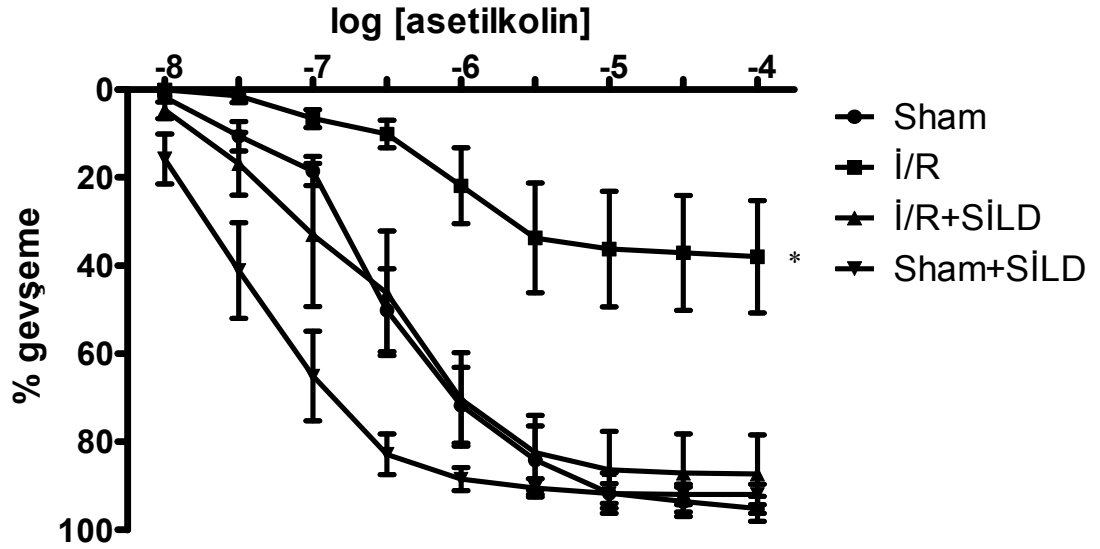
Asetilkolinin oluşturduğu gevşemeler İ/R uygulanan hayvanlarda anlamlı olarak azaldı (Şekiller 4.4A ve 4.5). Sildenafil ön tedavisi (1 mg/kg, i.v), mezenter arterdeki İ/R'ye bağlı azalan asetilkolin gevşeme cevaplarını kontrol seviyelerine döndürdü (Şekiller 4.4B ve 4.5). Sildenafil ön tedavisi sham grubunda asetilkolin gevşeme cevapları üzerinde kontrole göre bir farklılık göstermedi (Şekil 4.5).

Tüm gruplarda sıçan izole mezenter arterinde asetilkolin ile maksimum gevşemeler alındıktan sonra ortama eklenen papaverin (10^{-6} - 10^{-4} M) ile $\% 100$ gevşeme elde edildi ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Şekiller 4.3 ve 4.4).

A**B**

Şekil 4.3. Fenilefrin (FE) ile ön kasılma oluşturulmuş izole sıçan mezenter arterinde asetilkolin (10^{-9} - 10^{-4} M)'in oluşturduğu gevşemeler **(A)** ve N^G -Nitro-L-Arjinin (L-NOARG, 10^{-4})'in bu gevşemeler üzerine etkisi **(B)**.

PAP: papaverin



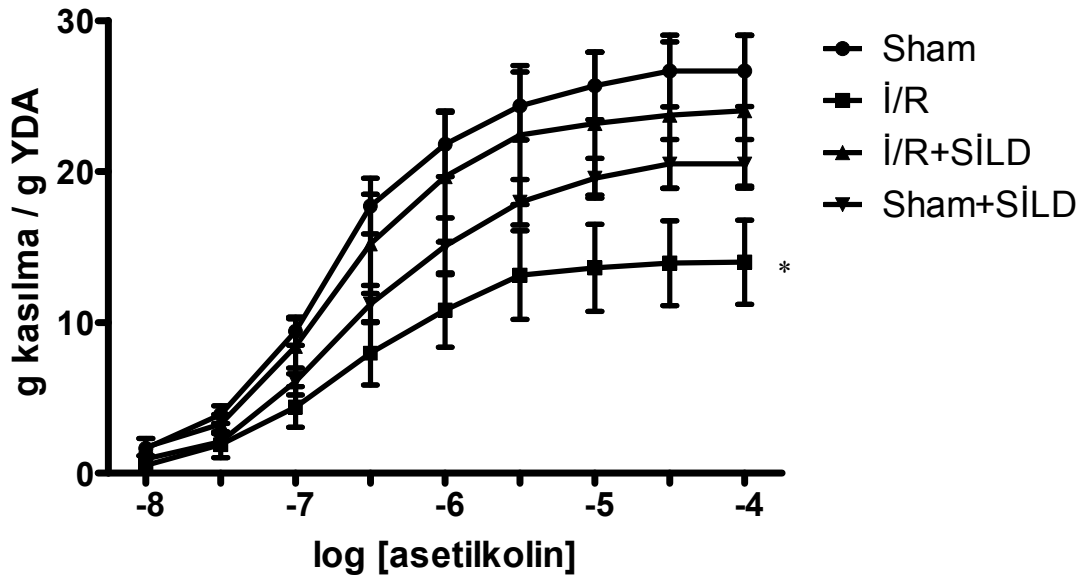
Şekil 4.5. İzole sıçan mezenter arterinde asetilkolin gevşeme cevapları üzerine mezenter iskemi/reperfüzyonu (I/R, 45 dak/60 dak)'nın ve sildenafil (1 mg/kg, i.v) ön tedavisinin etkileri (n=5-6).

* $P < 0.05$ kontrol'e göre

4.3. İzole İleum Segmentlerinde Fonksiyonel Cevaplar

4.3.1. İzole İleum Segmentlerinde Asetilkolinin Oluşturduğu Kasılmalar

Sıçan izole ileum segmentlerinde asetilkolin konsantrasyona bağımlı (10^{-8} - 10^{-4} M) kasılmalar oluşturdu (Şekil 4.6). Mezenter I/R uygulaması asetilkolin kasılmalarını anlamlı olarak azalttı (Şekil 4.6). Sildenafil (1 mg/kg, i.v.) ön tedavisi, ileumdaki I/R'ye bağılı olarak azalan asetilkolin kasılmalarını kontrol seviyelerine döndürdü (Şekil 4.6). Sham grubunda sildenafil ön tedavisi anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.6).

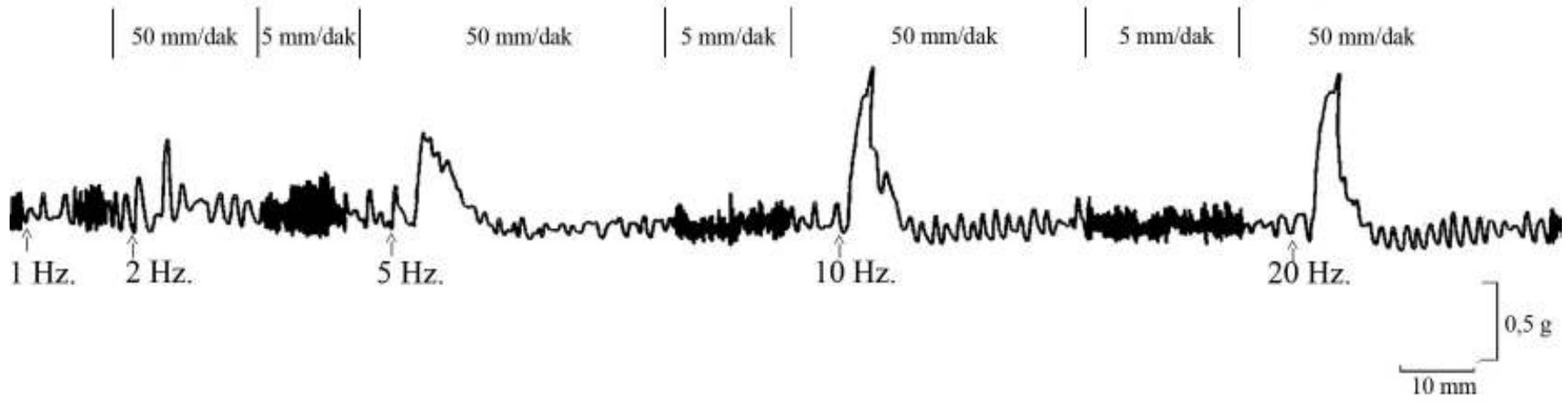


Şekil 4.6. İzole sıçan ileumunda asetilkolin cevapları üzerine mezenter iskemi/reperfüzyonu (İ/R, 45 dak/60 dak)'nın ve sildenafil (1 mg/kg, i.v) ön tedavisinin etkileri (n=5-7). YDA: Yaş doku ağırlığı.

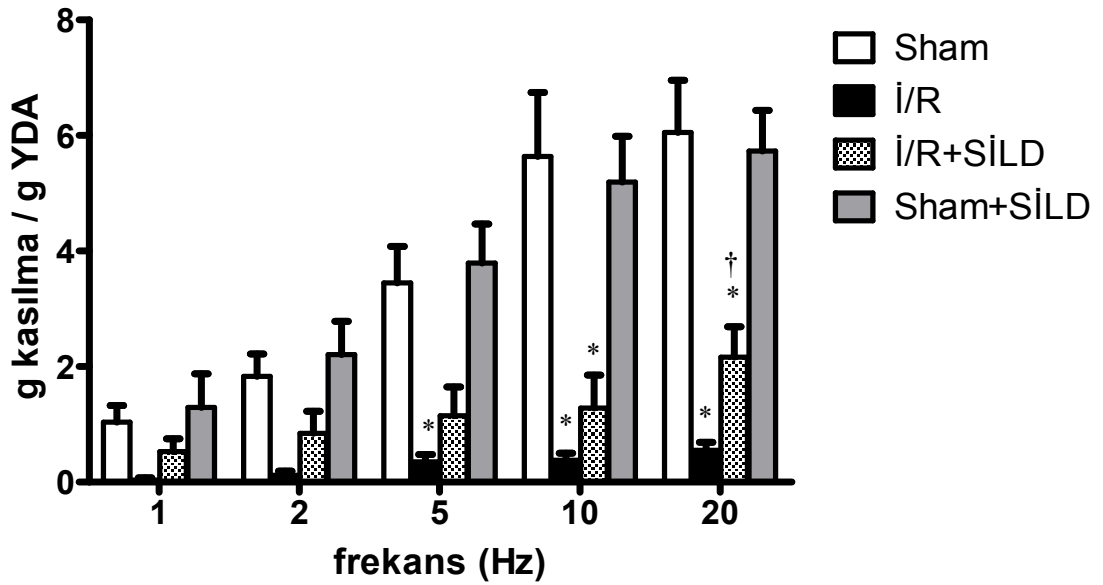
* $P < 0.05$ kontrol'e göre

4.3.2. İzole İleum Segmentlerinde Elektriksel Alan Stimülasyonu (EAS)'nın Oluşturduğu Kasılmalar

Sıçan izole ileum segmentlerine uygulanan EAS frekansa bağımlı kasılmalar oluşturdu (Şekil 4.7). Mezenter İ/R uygulaması EAS ile oluşturulan kasılmaları, 1 ve 2 Hz haricinde, anlamlı olarak azalttı (Şekil 4.8). Sildenafil (1 mg/kg, i.v.) ön tedavisi, ileumdaki azalan EAS kasılma cevaplarını artırdı, ancak kontrol seviyelerine geri çekemedi. (Şekil 4.8). Sildenafilin etkisi sadece maksimum NANK kasılma cevabının elde edildiği 20 Hz ile oluşturulan cevap üzerinde anlamlı bulundu. Sham grubunda sildenafil ön tedavisinin kontrol EAS kasılmaları üzerine bir etkisi yoktu (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. İzole sıçan ileumunda elektriksel alan stimülasyonu (120 V, 2 ms süreli, 5 s boyunca)'nın oluşturduğu kasılmalar.



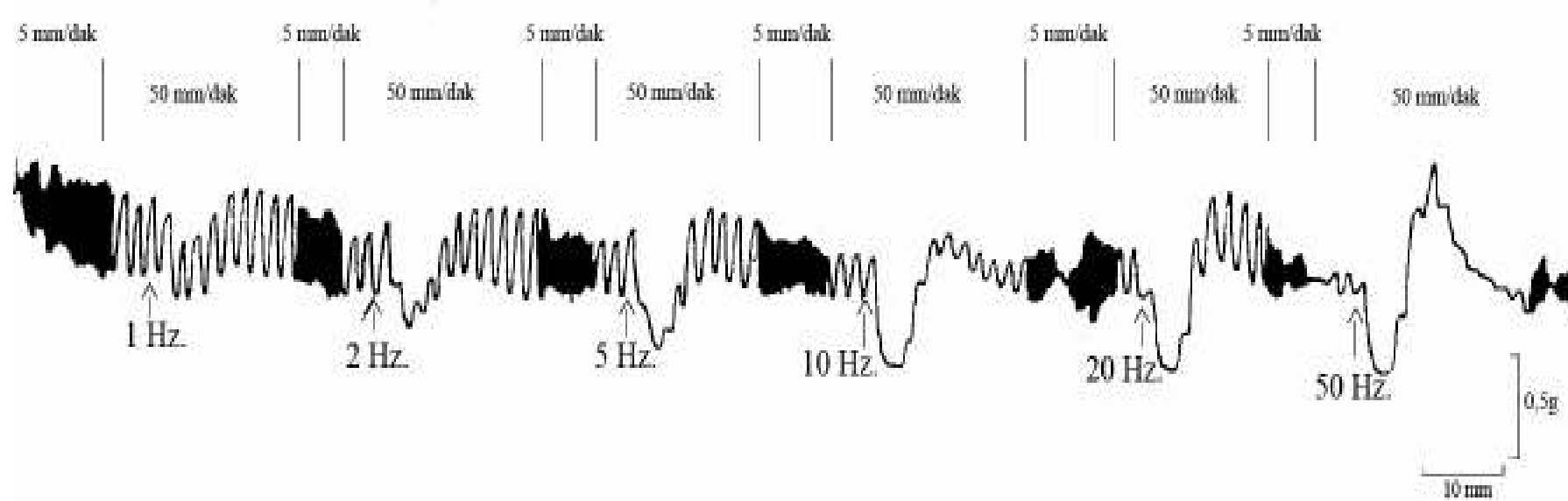
Şekil 4.8. İzole sıçan ileumunda elektriksel alan stimülasyonu (120 V, 2 ms süreli, 5 s boyunca)’nın oluşturduğu kasılmalar üzerine mezenter iskem/reperfüzyonu (I/R, 45 dak/60 dak)’nın ve sildenafile (1 mg/kg, i.v) ön tedavisinin etkileri (n=5-7). YDA: Yaş doku ağırlığı.

* $P < 0.05$ kontrol’e göre

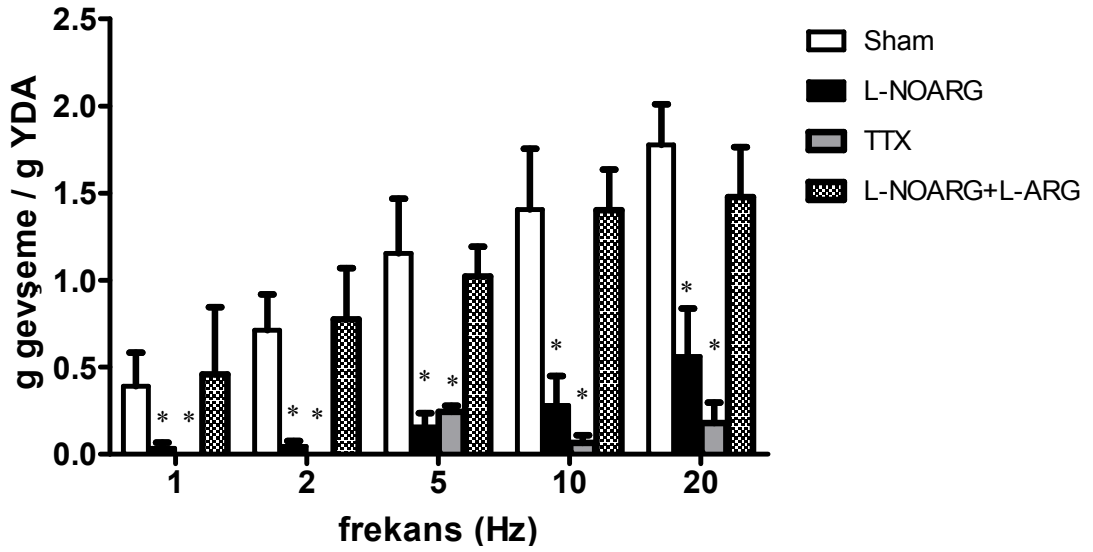
† $P < 0.05$ I/R’ye göre

4.3.3. İzole İleum Segmentlerinde Elektriksel Alan Stimülasyonu (EAS)’nın Oluşturduğu Nonadrenerjik Nonkolinerjik (NANK) Gevşemeler

Sıçan izole ileum segmentlerinde atropin (10^{-6} M) ve guanetidin (5×10^{-5} M) varlığında EAS (120 V, 2 ms. süreli, 5 s, boyunca) uygulanması ile frekansa bağımlı (1-20 Hz) gevşemeler elde edildi (Şekiller 4.9 ve 4.10). İleumda elde edilen bu NANK gevşemelerini tetrodotoksin (10^{-6} M) tüm frekanslarda tama yakın bloke etti (Şekil 4.10). L-NOARG (10^{-4} M) NANK gevşemelerini anlamlı olarak azalttı (Şekil 4.10). L-arjinin (10^{-3} M) oluşan bu azalmayı kontrol seviyelerine döndürdü (Şekil 4.10).



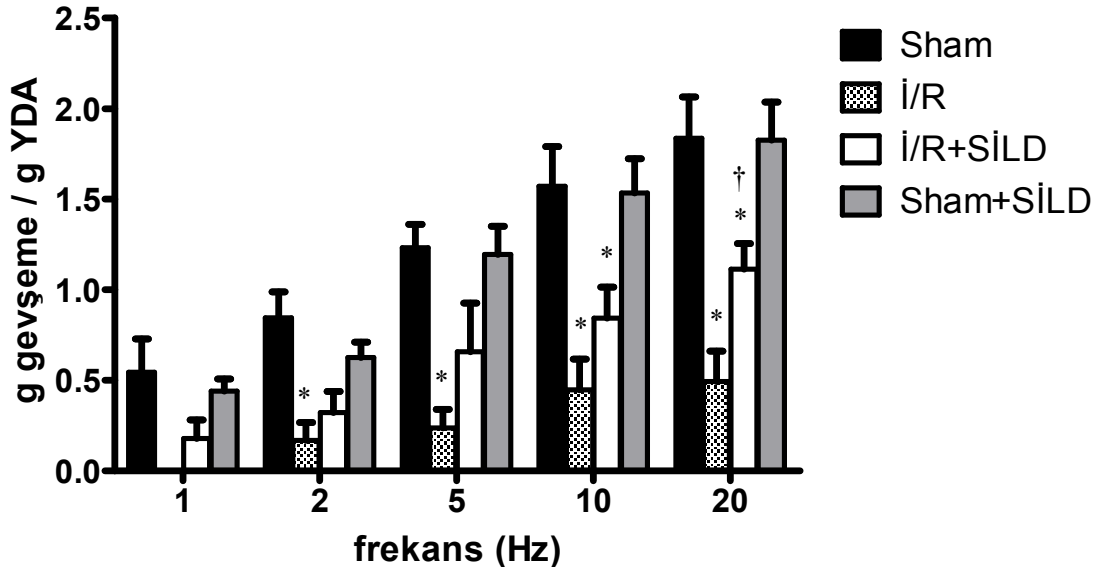
Şekil 4.9. İzole sıçan ileumunda atropin (10^{-6} M) ve guanetidin (5×10^{-5} M) varlığında elektriksel alan stimülasyonu (120 V, 2 ms süreli, 5 s boyunca) ile elde edilen nonadrenerjik nonkolinerjik gevşemeler.



Şekil 4.10. İzole sıçan ileumunda atropin (10^{-6} M) ve guanetidin (5×10^{-5} M) varlığında elektriksel alan stimülasyonu (120 V, 2 ms süreli, 5 s boyunca) ile elde edilen nonadrenerjik nonkolinerjik gevşemeler üzerine tetrodotoksin (TTX, 10^{-6} M)'in, N^G-Nitro-L-Arjinin (L-NOARG, 10^{-4})'in ve L-NOARG (10^{-4} M) + L-arjinin (L-ARG, 10^{-3} M)'in etkileri (n=4).

* $P < 0.05$ kontrol'e göre

Mezenter İ/R uygulaması, EAS ile elde edilen NANK gevşemelerini anlamlı olarak azalttı (Şekil 4.11). Sildenafil ön tedavisi, azalmış olan NANK gevşeme cevaplarını artırdı ancak kontrol seviyelerine geri döndüremedi. Sildenafilin etkisi sadece maksimum NANK gevşeme cevabının elde edildiği 20 Hz ile oluşturulan cevap üzerinde anlamlı bulundu. Sham grubunda sildenafil ön tedavisi gevşeme cevaplarını değiştirmede (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. İzole sıçan ileumunda atropin (10^{-6} M) ve guanetidin (5×10^{-5} M) varlığında elektriksel alan stimülasyonu (120 V, 2 ms süreli, 5 s boyunca) ile elde edilen nonadrenerjik nonkolinerjik gevşemeler üzerine mezenter iskemi/reperfüzyonu (I/R, 45 dak/60 dak)'nın ve sildenafile (1 mg/kg, i.v) ön tedavisinin etkileri (n=5-6). YDA: Yaş doku ağırlığı.

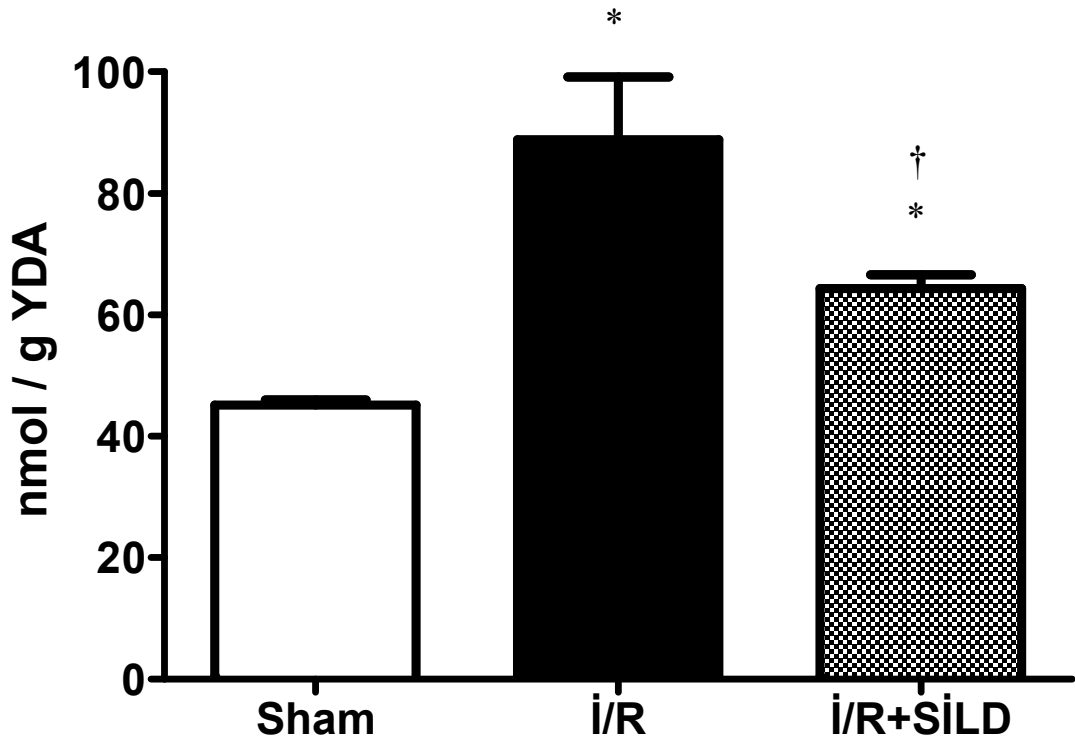
* $P < 0.05$ kontrol'e göre

† $P < 0.05$ I/R'ye göre

4.4. İleumda Biyokimyasal Değişiklikler

4.4.1. İntestinal Oksidatif Hasar (TBARS)

İleumda ölçülen TBARS seviyeleri mezenter İ/R uygulaması sonrasında anlamlı olarak arttı (Şekil 4.12). Sildenafil ön tedavisi (1 mg/kg, i.v.) artmış olan TBARS değerlerini anlamlı olarak azalttı ancak kontrol seviyelerine geri döndüremedi (Şekil 4.12). Sham grubunda sildenafil ön tedavisi TBARS değerlerini değiştirmede (gösterilmedi).



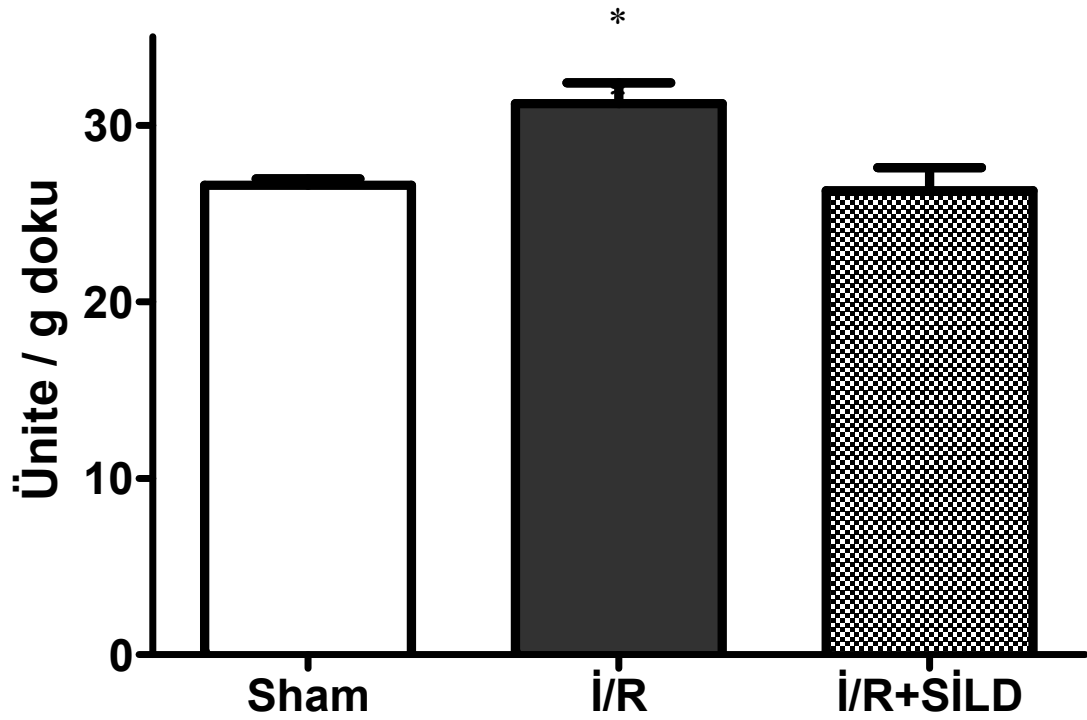
Şekil 4.12. Sıçan ileumunda tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) üzerine mezenter iskemi/reperfüzyonu (İ/R, 45 dak/60 dak)'nın ve sildenafil (1 mg/kg, i.v) ön tedavisinin etkileri (n=10-14). YDA: Yaş doku ağırlığı.

* $P < 0.05$ kontrol'e göre

† $P < 0.05$ İ/R'ye göre

4.4.2. İntestinal Nötrofil İnfiltrasyonu (MPO)

İleumda ölçülen MPO değerleri, mezenter İ/R uygulaması sonrasında anlamlı olarak arttı (Şekil 4.13). Sildenafil (1 mg/kg, i.v.) ön tedavisi artmış olan MPO aktivasyonunu anlamlı olarak azalttı (Şekil 4.13). Sham grubunda sildenafil ön tedavisi MPO değerlerini değiştirmede (gösterilmedi).



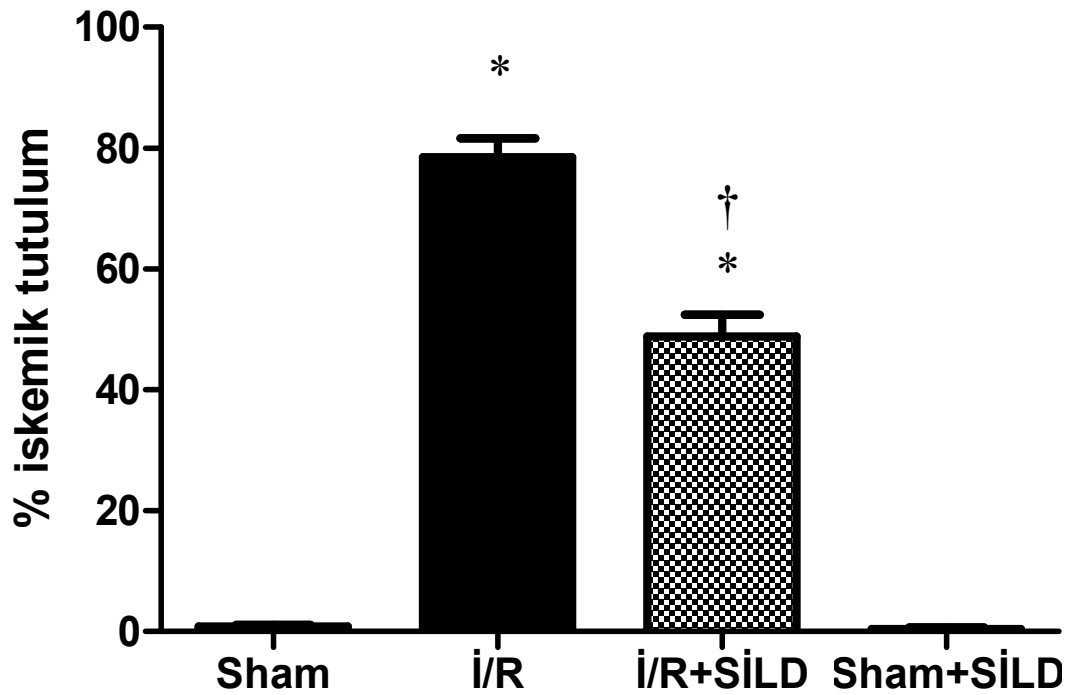
Şekil 4.13. Sıçan ileumunda miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi üzerine mezenter iskemi/reperfüzyonu (İ/R, 45 dak/60 dak)'nın ve sildenafil (1 mg/kg, i.v) ön tedavisinin etkileri (n=7-13).

* $P < 0.05$ kontrol'e göre

4.5. İntestinal Histopatolojik Değişiklikler

4.5.1 İntestinal İskeminin Makroskobik İncelenmesi

Mezenter İ/R sonrasında oluşan iskemik bölgelerin uzunluğunun, İ/R'ye maruz kalan toplam barsakların uzunluğuna bölünerek elde edilen iskemik tutulumun oranı % 78.5 ± 2.9 olarak ölçüldü (Şekil 4.14). Sildenafil (1 mg/kg, i.v.) ön tedavisi artmış olan bu infarkt alanını anlamlı olarak azalttı (% 48.8 ± 3.7 , Şekil 4.14).



Şekil 4.14. İntestinal iskemik tutulum üzerine mezenter iskemi/reperfüzyonu (İ/R, 45 dak/60 dak)'nın ve sildenafil (1 mg/kg, i.v) ön tedavisinin etkileri (n=9-11).

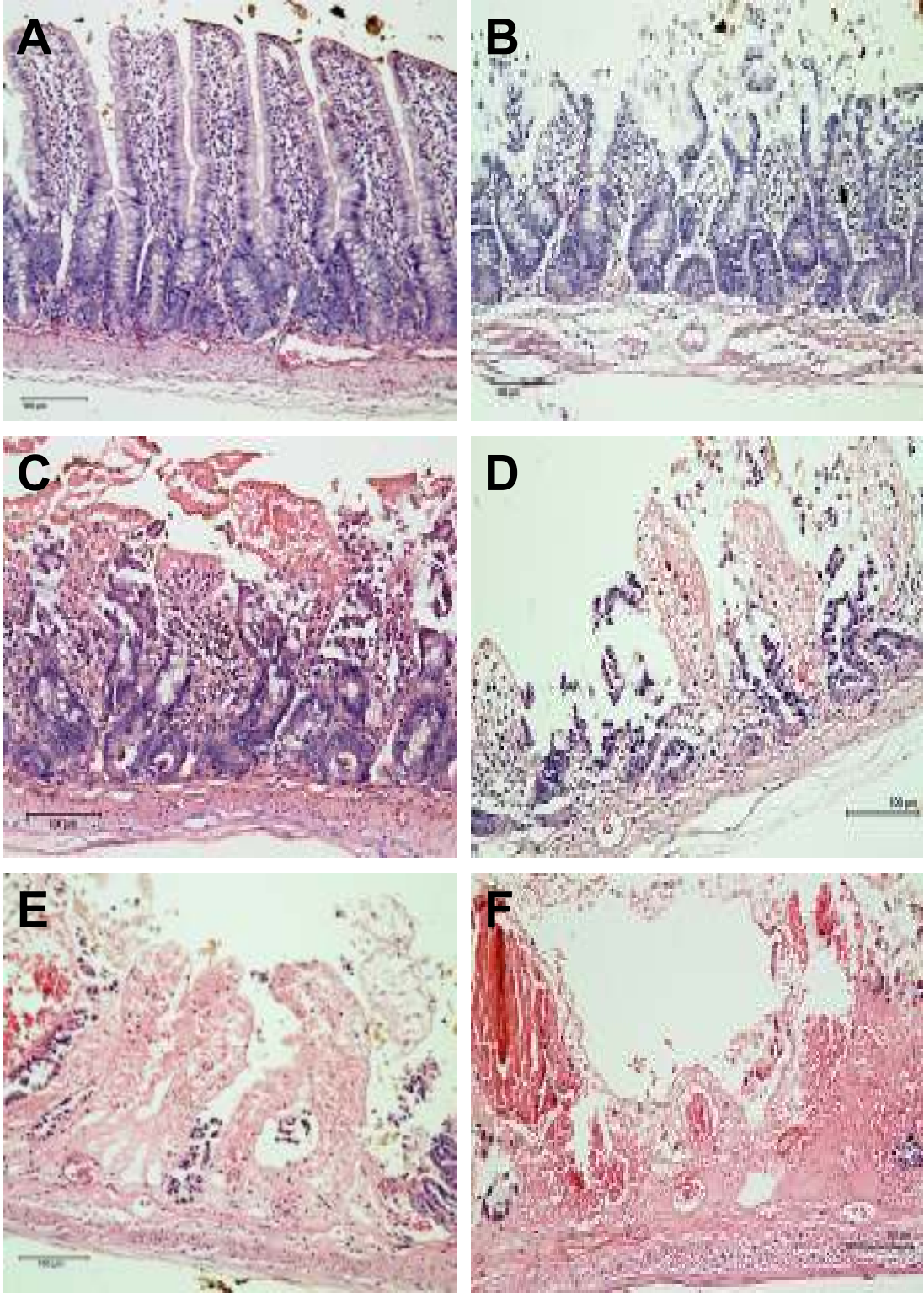
* $P < 0.05$ kontrol'e göre

† $P < 0.05$ İ/R'ye göre

4.5.2 İntestinal İskemik Hasarın Mikroskopik İncelenmesi

Sıçan ileumunda mikroskopik olarak saptanan iskemik hasarın skorumaya sistemine göre görüntüleri Şekil 4.15’de toplu olarak gösterilmiştir.

Mezenter İ/R ileumda ciddi şekilde yapısal hasar oluşturdu (4.1 ± 0.3 ; Şekil 4.16). Sildenafil ön tedavisi bu hasarı anlamlı olarak azalttı (2.8 ± 0.2 ; Şekil 4.16). Patolojik olarak yapısal hasarın şiddeti medyan değerleri göz önünde bulundurularak değerlendirildiğinde İ/R sonrasında barsaklarda gelişen mural infarkt, sildenafil ön tedavisi sonucunda sadece viluslarla sınırlı kaldı (Şekil 4.16).



Şekil.4.15. Sıçanların ileumlarından hazırlanan kesitlerin ışık mikrograflarında görülen intestinal hasar ve semi-kantitatif değerlendirilmesi: 0: Normal (**A**), 1: Yüzey epitelde dökülme (**B**), 2: Vilusların 1/3'ü nekrotik (**C**), 3: Vilusların 2/3'ü nekrotik (**D**), 4: Mural infarkt (**E**), 5: Transmural infarkt (**F**).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, sildenafil ön tedavisinin, sıçanda oluşturulan mezenter İ/R sonrasında, izole mezenter arterde azalan endotele bağımlı gevşeme cevaplarını düzelttiğini ve ileumdaki bozulan fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler ile karakterize intestinal hasara karşı düzeltici etkileri olduğunu göstermiştir.

Doku perfüzyonundaki değişikliklerin değerlendirilmesi sonucunda, iskemi sırasında dramatik şekilde azalan perfüzyon, oklüzyonun ortadan kalkmasıyla birlikte tüm gruplarda hızla geri döndü ve deney sonunda başlangıç seviyelerinden farklılık göstermedi. Ancak perfüzyondaki yüzde değişiklikler kendi bazal seviyelerine oranlanarak elde edildiğinden dolayı, gruplar arasındaki bazal değerler arasındaki farklılık bu yöntemle değerlendirilemedi. Bununla birlikte elde edilen bu sonuçlar oklüzyon sırasında dokunun iskemik kaldığını, sonrasında ise tekrar perfüze olduğunu, tromboz ve benzeri herhangi bir sebebe bağlı olarak damarlarda bir tıkanıklık olmadığını göstermektedir. Elde edilen sonuç İ/R yönteminin bu çalışmada gerektiği gibi uygulandığına işaret etmektedir.

Bu çalışmada İ/R sonrası mezenter arterde asetilkolinin oluşturduğu gevşemelerin azalması endotel fonksiyonunun bozulduğunu göstermektedir. Fenilefrin ve papaverinin oluşturduğu kasılma ve gevşemeler İ/R sonucunda değişmediği için düz kas fonksiyonunda bir bozukluk olmadığı düşünüldü. Benzer şekilde, Lefer ve Ma (69) sıçan SMA'da uyguladıkları İ/R sonrasında izole mezenter arter halkalarında sodyum nitroprusiyat cevaplarında bir değişiklik olmaksızın asetilkolinin oluşturduğu gevşemelerde dramatik bir azalma meydana geldiğini göstermişlerdir. Daha önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi mezenter arterdeki asetilkolinin oluşturduğu gevşeme cevaplarının önemli bir kısmı endotel kaynaklı NO-aracılığıyla gerçekleşmektedir (70-73). Nitekim bu çalışmada da sham grubunda asetilkolinin oluşturduğu gevşemeler NOS inhibitörü L-NOARG ile anlamlı derecede bloke edilmiştir. İ/R sonucunda endotelin hasarlanması ile birlikte

NO biyoyararlanımında bir azalma meydana gelmektedir ve böylece NO-süperoksit dengesinde süperoksit lehine bir kayma oluşmaktadır. Aynı zamanda oksijen kaynaklı serbest radikallerde de bir artma meydana gelmektedir (74, 75). İ/R sonrasında ilk olarak etkilenen yerlerden biri endotel tabakasıdır.

İ/R sonucu görülen vasküler disfonksiyonun mezenter arterin distal kısımlarında proksimale göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (69). Bu nedenle bu çalışmada mezenter arterin distal kısmı olan üçüncü sıra dalları izole edilerek vasküler cevaplar araştırılmıştır.

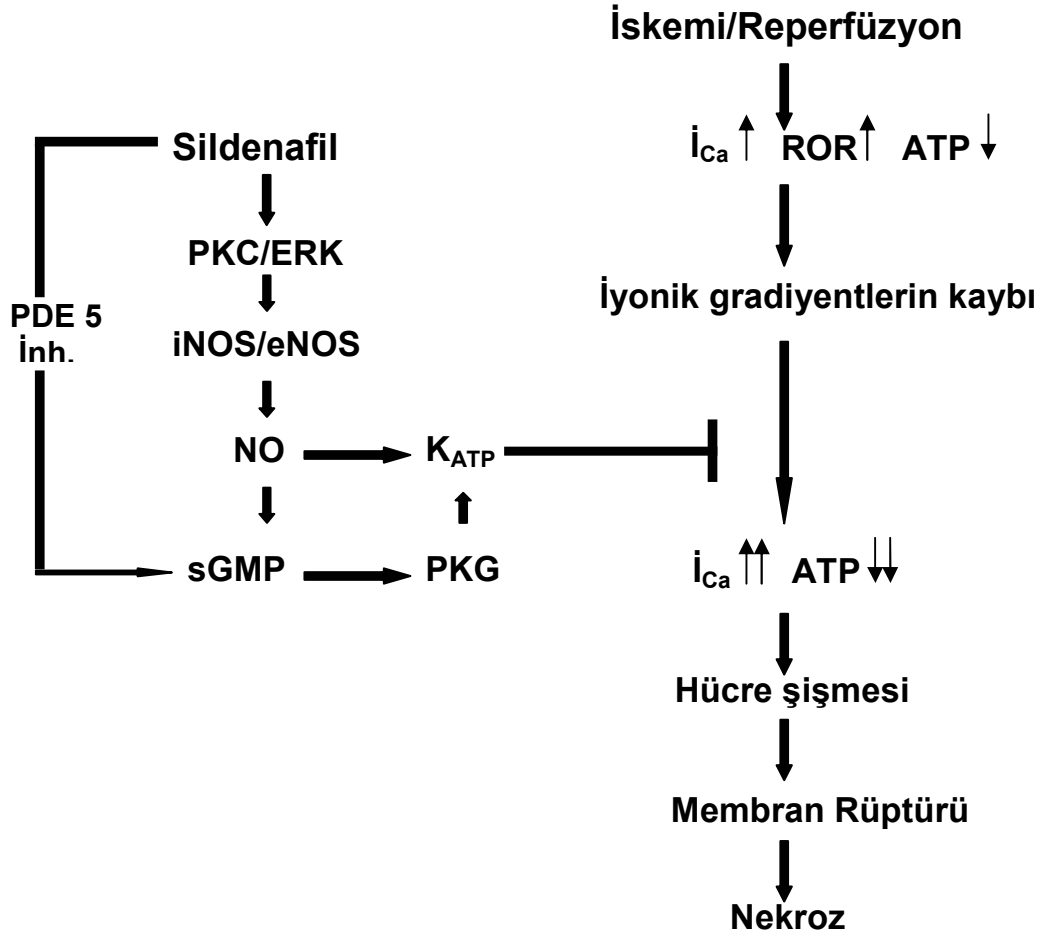
Sildenafil ön tedavisi İ/R sonucu mezenter arterde azalan asetilkolin gevşemelerini geri döndürdü. Bu da göstermektedir ki sildenafil mezenter İ/R sonucu bozulan endotel fonksiyonu üzerinde düzeltici bir rol oynamaktadır. Sildenafilin bu etkisi ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir.

Mezenterik İ/R sonrasında NO üretiminin azaldığı ve NO donörü uygulamasının vasküler hasarı azalttığı gösterilmiştir (44, 76). Ayrıca sildenafilin kalpte İ/R hasarında koruyucu bir etki gösterdiği ve NOS-bağımlı sinyal kaskadının bu etkiden sorumlu tutulduğu çalışmalar vardır (15, 19, 77). İzole fare kalbinde sildenafil ön tedavisi İ/R sonrasında gelişen kalpteki infarkt alanını azaltmış ve sildenafilin bu etkisi selektif bir iNOS inhibitörü olan 1400 W ile ortadan kalkmıştır (15). Ayrıca sildenafilin bu infarkt-kısıtlayıcı etkisi ventriküler fonksiyon üzerinde herhangi bir değişiklik göstermeksizin gerçekleşmektedir. Sildenafil uygulaması sonrasında kalpte eNOS ve iNOS mRNA ekspresyonunun hızla arttığı, pik değerlerine eNOS'un 45 dakika, iNOS'un ise 2 saat sonra ulaştığı ve normal seviyelerine ise saatler sonra geri döndüğü gösterilmiştir (15). Aynı çalışmada sildenafil tedavisinin kalpte eNOS ve iNOS protein ekspresyonlarını da 24 saat sonunda anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir. Benzer olarak izole kardiyomiyositlerinde sildenafil uygulaması eNOS ve iNOS mRNA ve protein ekspresyonlarını artırmaktadır (19). Sildenafil veya diğer PDE 5 inhibitörlerinin vazodilatör etkisi, adenosin ve/veya bradikinin gibi ön koşullama benzeri etki gösteren endojen mediyatörlerin salıverilmesine neden olarak, kinazların aktivasyonu sonucu NOS fosforilasyonuna ve sonrasında NO oluşmasıyla sonuçlanacak bir sinyal

yolağını tetikleyebilir (Şekil 5.1) (61). Daha sonra NO'nun guanilat siklazı aktive ederek sGMP oluşturduğu ve oluşan sGMP'nin protein kinaz G (PKG) aktivasyonu ile mitokondriyal K_{ATP} kanallarını açarak kardiyoprotektif etki yaptığı ileri sürülmüştür (Şekil 5.1) (61, 78). Sildenafil'in mezenter İ/R sonucu bozulan endotel fonksiyonunu düzeltici etkisi için aynı mekanizma geçerli olabilir. Diğer taraftan sildenafil'in kardiyovasküler koruyucu etkisini başlıca doku sGMP düzeylerini artırarak ve PKG yolağı üzerinden gösterdiği bildirilmiştir (77, 79). Dolayısıyla bu çalışmada, sildenafil'in NO üzerinden olabilecek etkisinden bağımsız olarak yaptığı PDE 5 inhibisyonu sonucu hücre içi sGMP miktarını artırarak PKG aracılığıyla K_{ATP} kanallarını açabileceği ve böylece sonraki basamakları etkileyebileceği ileri sürülebilir. ATP sentezinde ve Ca^{+2} homeostazisinin devamlılığında temel rol oynayan mitokondride bulunan K_{ATP} kanallarının açılması, membran potansiyelinin kompensasyonunu sağlamaktadır. Bu sayede mitokondri, H^{+} elektrokimyasal gradiyenti oluşturabilmek amacıyla dışarıya daha fazla proton atma imkanı bulmaktadır. Çünkü İ/R sonrasında hücre içi pH'sı ve ATP sentezi azalmış, hücre içi Ca^{+2} miktarı artmıştır. (80, 81) (Şekil 5.1). K_{ATP} kanallarının varlığı sadece kalpte değil, aynı zamanda endotel hücrelerinde de gösterilmiştir (82). İnsanda yapılan bir *in vivo* çalışmada, brakiyal arterin kapatılıp açılmasıyla oluşturulan İ/R'de, sildenafil'in K_{ATP} kanallarını açarak güçlü bir endotel koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (16).

Barsak mukozası iskeminin oluşturacağı hasar açısından çok hassastır. İskemik barsakların reperfüzyonu, oluşan hasarı daha da artırmaktadır (5, 83). İ/R sonucunda oluşan oksijen radikalleri lipid peroksidasyonuna ve inflamasyona neden olmakta ve hücre içi Ca^{+2} ve ATP homeostazisi bozulmaktadır (26, 84, 85). İskemi gibi hipoksik durumlar enerjiden zengin fosfatazları tüketerek kontraktilite gibi hücre fonksiyonlarının ya reversibl olarak azalmasına ya da tamamen ortadan kalkmasına neden olmaktadır. İleum düz kas hücrelerinin tüm bu hasar verici etkilere maruz kalması sonucunda, asetilkoline karşı verdiği reseptör-aracılı kasılma cevapları azalmaktadır (32, 35). Nitekim bu çalışmada da, izole ileum

segmentlerinde asetilkolin ile elde edilen kasılmalar mezenter İ/R sonrasında azalmıştır.



Şekil 5.1 Sildenafil'in iskemi/reperfüzyon hasarını önleyici muhtemel mekanizması

Kukreja ve diğ. (61)'den uyarlanmıştır.

I_{Ca} : İntraselüler Ca^{+2} ; ROR: Reaktif oksijen radikalleri; PKC: Protein kinaz C; ERK: Ekstraselüler regüle kinaz; iNOS veya eNOS: İndüklenebilir veya endotelial nitrik oksit sentaz; NO: Nitrik oksit; PKG: Protein kinaz G; K_{ATP} : ATP'ye duyarlı potasyum kanalları; PDE 5 İn: fosfodiesteraz 5 inhibisyonu

İ/R sonrasında reaktif oksijen radikalleri ile birlikte nötrofillerde kemotaktik aktivite oluşması gibi dramatik hasarlar, intestinal İ/R sonrasında ileumun ekzojen elektriksel aktivitesini ve buna bağlı kasılma cevaplarını değiştirmektedir (32, 86). Bu çalışmada izole ileum segmentlerinde EAS

uygulamasý ile elde edilen kontraksiyon cevaplarý da İ/R sonrasında anlamlý olarak azaldý. Gastrointestinal motilitede, peristaltizmin düzenlenmesinde ve sfinkter fonksiyonunda NO bařlıca NANK mediyatörü olarak temel bir rol oynamaktadır (87). Bu çalıřmada izole ileum segmentlerinde atropin ve guanetidin varlıęında EAS uygulamasý ile elde edilen NANK gevřemelerin L-NOARG varlıęında ortadan kalkması ve L-arjinin ile geri dönmesi bu gevřemelerin NO aracılıęıyla olduęunu göstermektedir. Bu gevřemelerin tetrodotoksin tarafından bloke edilmesi de nitrejik sinir uçlarından salıverilen NO'nun rolüne iřaret etmektedir. İleumdaki NANK gevřemeleri İ/R sonrasında anlamlý olarak azaldý. Bu bulgular konu ile ilgili daha önce yapılan çalıřmaların sonuçları ile uyumludur (86, 88, 89).

İ/R sonrasında ileumdaki azalan asetilkolin kasılmasının sildenafil ön tedavisi ile tamamen, EAS'ın oluşturduğu kasılmaların ve NANK aracılı gevşemelerin kısmen geri döndürölmesi, sildenafilin ileumdaki hasar üzerinde de düzeltici etkileri olduğunu göstermektedir. Bu çalışma, mezenter İ/R sonrasında, ileumun bozulan fonksiyonel cevapları üzerine sildenafilin etkileri ile ilgili olarak da yapılan ilk araştırmadır ve sonuçlar olumlu bulunmuştur. Bu çalışmanın diğer önemli bir bulgusu da şudur: İ/R sonucu oluşan mezenter arter endotel ve ileum düz kas disfonksiyonu sildenafil tarafından sinirsel yapıların fonksiyon bozukluğuna göre daha etkili bir biçimde düzeltildi. Bu nokta sinirsel yapıların düz kasa göre İ/R'den daha fazla etkilendiğini de gösterebilir.

Bu çalışmada sildenafilin ileumda elde edilen olumlu etkileri biyokimyasal ve patolojik bulgularla da desteklendi. İleumda oksidatif hasarın göstergesi olan TBARS miktarının İ/R sonrasında artması ve sildenafil ön tedavisinin bu artışı anlamlý olarak azaltması sildenafilin ileumdaki etkisinin mekanizmasını açıklamaya ışık tutabilir. Aynı şekilde polimorfonükleer nötrofil infiltrasyonunun bir indeksi olan MPO aktivitesinin İ/R sonrasında ileumda artması ve sildenafil ön tedavisinin bu artışı azaltması sildenafilin etki mekanizmasını açıklaması bakımından önemlidir. İ/R gibi bir çok inflamatuvar durumda TBARS miktarlarında ve MPO aktivitesinde artış gösterilmiştir (90, 91). Bir damarın oklüzyonu ve sonrasında reperfüzyonu, bu duruma maruz

kalmış dokuda nötrofil infiltrasyonu ile karakterize bir inflamatuvar cevabı tetiklemektedir (92). Postiskemik dokuda nötrofil birikmesi çok hızlı gerçekleşmektedir ve endotel hücre ve nötrofil yüzeylerinde eksprese edilen bazı adezyon molekülleriyle (P-, E-, L-selektin) modüle edilmektedir (93). Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, mezenter İ/R sonrasında nötrofillerin dokuya infiltrasyonu ile birlikte serbest oksijen radikallerinin artması sonucu, lipid peroksidasyonu ile bir oksidatif hasar meydana geldiğini ve sildenafilin artan bu oksidatif hasarı ve nötrofil infiltrasyonundaki artışı azalttığını göstermektedir. Sildenafil oksidatif hasar ve lökosit infiltrasyonunu azaltması, izole ileum segmentlerindeki fonksiyonel cevapları düzeltmesi açısından en basit açıklamayı getirmektedir.

Barsak mukozası İ/R'ye karşı çok hassastır ve iskemik bir olaydan hemen sonra burada yapısal bir hasar oluşmaya başlar. Uzamış ve ağırlaşmış iskemi ise ödem, kanama ve ülserasyon gibi durumlara sebep olur. Reperfüzyon sırasında ise oksijene bağlı oluşan serbest radikaller, iskemik barsaklarda hücre hasarını artırır ve barsak mukozasında önemli bir zedelenme meydana getirirler (4, 94). Literatürdeki bulgulara paralel bir şekilde, bu çalışmada İ/R sonrasında ileumda transmural infarkt seviyelerine kadar ilerleyebilen yapısal harabiyet olduğu gösterildi. Sildenafil ön tedavisinin bu yapısal harabiyeti sınırlaması, bu çalışmada elde edilen diğer olumlu etkileriyle paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen bulgular sildenafil ön tedavisinin, sıçandaki mezenter İ/R sonrasında gelişen vasküler endotel disfonksiyonu ile ileumda bozulan fonksiyonel cevaplar ve patolojik değişiklikler üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Sildenafilin hasarı sınırlayıcı etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, NO biyoyararlanımını artırarak gerek NO sentezini artırarak gerekse NO'nun ikincil ulaşığı olan sGMP düzeylerini artırarak etki gösterdiği düşünülmektedir. Sildenafilin günümüzde erektil disfonksiyon dışında pulmoner arter hipertansiyonu gibi farklı endikasyonlardaki olumlu etkileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda sildenafil için yeni kullanım alanları

bulunabilir. İntestinal iskeminin eşlik edeceği yeni bir endikasyon tedavisinde sildenafil tercih edilebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar sildenafilin, günümüzde bilinen endikasyonu dışında yeni bir kullanım alanının bulunması için yapılmakta olan ve yapılacak çalışmalara ışık tutabilir.

İlerde yapılacak olan çalışmalarda sildenafilin mezenter İ/R üzerine olan olumlu etkisinin mekanizması ile ilgili olarak özellikle K_{ATP} kanallarının ve PKG'nin rolü araştırılabilir. Ayrıca sildenafilin mezenter İ/R üzerindeki etkileri ile eNOS ve iNOS arasındaki ilişki incelenebilir. Farklı PDE 5 inhibitörlerinin mezenter İ/R üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi de sildenafilin rolü açısından önemli sonuçlar doğurabilir. Sildenafil ön tedavisinin farklı hayvan türleri ile oluşturulacak farklı inflamasyon modellerinde adezyon molekülleri ile etkileşmesinin incelenmesi de önemli olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Cappell, MS. (1998). Intestinal (mesenteric) vasculopathy. I. Acute superior mesenteric arteriopathy and venopathy. *Gastroenterology Clinics of North America*, 27(4), 783-825.
2. Cappell, MS. (1998). Intestinal (mesenteric) vasculopathy. II. Ischemic colitis and chronic mesenteric ischemia. *Gastroenterology Clinics of North America*, 27(4), 827-860.
3. Homer-Vanniasinkam, S., Crinnion, JN. ve Gough, MJ. (1997). Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 14(3), 195-203.
4. Schoenberg, MH., Muhl, E., Sellin, D., Younes, M., Schildberg, FW., ve Haglund, U. (1984). Posthypotensive generation of superoxide free radicals--possible role in the pathogenesis of the intestinal mucosal damage. *Acta Chirurgica Scandinavica*, 150(4), 301-309.
5. Granger, DN., Hollwarth, ME., ve Parks, DA. (1986). Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiologica Scandinavica*, 548, 47-63.
6. Haglund, U., Bulkley, GB., ve Granger, DN. (1987). On the pathophysiology of intestinal ischemic injury. *Acta Chirurgica Scandinavica*, 153(5-6), 321-324.
7. Oldenburg, WA., Lau, LL., Rodenberg, TJ., Edmonds, HJ., ve Burger, CD. (2004). Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Archives of Internal Medicine*, 164(10), 1054-1062.

8. Kozuch, PL., ve Brandt, LJ. (2005). Diagnosis and management of mesenteric ischaemia with an emphasis on pharmacotherapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 21(3), 201-215.
9. Boolell, M., Allen, MJ., Ballard, SA., Gepi-Attee, S., Muirhead, GJ., Naylor, AM., ve diğerleri. (1996). Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*, 8(2), 47-52.
10. Corbin, JD., ve Francis, SH. (2002). Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *International Journal of Clinical Practice*, 56(6), 453-459.
11. Corbin, JD., Francis, SH., ve Webb, DJ. (2002). Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology*, 60 (Suppl 2), 4-11.
12. Bocchi, EA., Guimaraes, G., Mocelin, A., Bacal, F., Bellotti, G., ve Ramires, JF. (2002). Sildenafil effects on exercise, neurohormonal activation, and erectile dysfunction in congestive heart failure: a double-blind, placebo-controlled, randomized study followed by a prospective treatment for erectile dysfunction. *Circulation*, 106(9), 1097-1103.
13. Bhatia, S., Frantz, RP., Severson, CJ., Durst, LA., ve McGoon, MD. (2003). Immediate and long-term hemodynamic and clinical effects of sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension receiving vasodilator therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(10), 1207-1213.

14. Ockaili, R., Salloum, F., Hawkins, J., ve Kukreja, RC. (2002). Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 283(3), 1263-1269.
15. Salloum, F., Yin, C., Xi, L., ve Kukreja, RC. (2003). Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. *Circulation Research*, 92(6), 595-597.
16. Gori, T., Sicuro, S., Dragoni, S., Donati, G., Forconi, S. ve Parker, JD. (2005). Sildenafil prevents endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion via opening of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels: a human in vivo study. *Circulation*.;111(6):742-746.
17. Halcox, JP., Nour, KR., Zalos, G., Mincemoyer, RA., Wacławski, M., Rivera, CE., ve diğerleri. (2002). The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*, 40(7), 1232-1240.
18. Dias-Junior, CA., Souza-Costa, DC., Zerbini, T., da Rocha, JB., Gerlach, RF., ve Tanus-Santos, JE. (2005). The effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Anesthesia and Analgesia*, 101(1), 115-120.
19. Das, A., Xi, L., ve Kukreja, RC. (2005). Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12944-12955.

20. Fisher, PW., Salloum, F., Das, A., Hyder, H., ve Kukreja, RC. (2005). Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation*, 111(13), 1601-1610.
21. Stefanutti, G., Vejchapipat, P., Williams, SR., Pierro, A., ve Eaton, S. (2004). Heart energy metabolism after intestinal ischaemia and reperfusion. *Journal of Pediatric Surgery*, 39, 179-183.
22. Massberg, S., ve Messmer, K. (1998). The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplantation Proceedings*, 30, 4217-4223.
23. Berlanga, J., Prats, P., Ramirez, D., Gonzalez, R., Lopez-Saura, P., Aguiar, J., ve diğerleri. (2002). Prophylactic use of epidermal growth factor reduces ischemia/reperfusion intestinal damage. *The American Journal of Pathology*, 161, 373-379.
24. Stoney, RJ., ve Cunningham, CG. (1993). Acute mesenteric ischemia. *Surgery*, 114, 489-490.
25. Chang, RW., Chang, JB., ve Longo, WE. (2006). Update in management of mesenteric ischemia. *World Journal of Gastroenterology*, 12(20), 3243-3247.
26. Grace, PA. (1994). Ischaemia-reperfusion injury. *The British Journal of Surgery*, 81, 637-647.
27. McCord, JM. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England Journal of Medicine*, 312, 159-163.

28. Parks, DA., ve Granger, DN. (1986). Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *The American Journal of Physiology*, 250, 749-753.
29. Cuzzocrea, S., Chatterjee, P., Mazzon, E., Dugo, L., De Sarro, A., Van de Loo, FAJ., ve diğerleri. (2002). Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. *Shock*, 18, 169-176.
30. Lodato, RF., Khan, AR., Zembowicz, MJ., Weisbrodt, NW., Pressley, TA., Li, YF. ve diğerleri. (1999). Roles of IL-1 and TNF in the decreased ileal muscle contractility induced by lipopolysaccharide. *The American Journal of Physiology*, 276(6), 1356-1362.
31. Poussios, D., Andreadou, I., Papalois, A., Rekka, E., Gavalakis, N., Aroni, K., ve diğerleri. (2003). Protective effect of a novel antioxidant non-steroidal anti-inflammatory agent (compound 1A) on intestinal viability after acute mesenteric ischemia and reperfusion. *European Journal of Pharmacology*, 465(3), 275-280.
32. Takahashi, A., Tomomasa, T., Kaneko, H., Watanabe, T., Tabata, M., Morikawa, H., ve diğerleri. (2001). Intestinal motility in an in vivo rat model of intestinal ischemia-reperfusion with special reference to the effects of nitric oxide on the motility changes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 33(3), 283-288.
33. Turnage, RH., Guice, KS., ve Oldham, KT. (1994). Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion. *The Journal of Surgical Research*, 56, 571-578.
34. Cuzzocrea, S., Rossi, A., Serraino, I., Di Paola, R., Dugo, L., Genovese, T., ve diğerleri. (2003). 5-Lipoxygenase knockout mice

exhibit a resistance to splanchnic artery occlusion shock. *Shock*, 20, 230-236.

35. Hassoun, HT., Weisbrodt, NW., Mercer, DW., Kozar, RA., Moody, FG., ve Moore, FA. (2001). Inducible nitric oxide synthase mediates gut ischemia/reperfusion-induced ileus only after severe insults. *The Journal of Surgical Research*, 97(2), 150-154.

36. Hierholzer, C., Kalff, JC., Audolfsson, G., Billiar, TR., Tweardy, DJ., ve Bauer, AJ. (1999). Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*, 68(9), 1244-1254.

37. Sinha, K., Degaonkar, MN., Jagannathan, NR., ve Gupta, YK. (2001). Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *European Journal of Pharmacology*, 428(2), 185-192.

38. Okatani, Y., Wakatsuki, A., Reiter, RJ., Enzan, H., ve Miyahara, Y. (2003). Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *European Journal of Pharmacology*, 469(1-3), 145-152.

39. Hernandez, LA., Grisham, MB., Twohig, B., Arfors, KE., Harlan, JM., ve Granger, DN. (1987). Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *The American Journal of Physiology*, 253(3), 699-703.

40. Sisley, AC., Desai, T., Harig, JM., ve Gewertz, BL. (1994). Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. *The Journal of Surgical Research*, 57(1), 192-196.

41. Kurose, I., Anderson, DC., Miyasaka, M., Tamatani, T., Paulson, JC., Todd, RF., ve diğerleri. (1994). Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circulation Research*, 74(2), 336-343.
42. Xia, G., Martin, AE., ve Besner, GE. (2003). Heparin-binding EGF-like growth factor downregulates expression of adhesion molecules and infiltration of inflammatory cells after intestinal ischemia/reperfusion injury. *Journal of Pediatric Surgery*, 38(3), 434-439.
43. Grisham, MB., Granger, DN., ve Lefer, DL. (1998). Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 25, 404-433.
44. Kurose, I., Wolf, R., Grisham, MB., ve Granger, DN. (1994). Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circulation Research*, 74, 376-382.
45. Carden, D.L., ve Granger, D. N. (2000). Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *The Journal of Pathology*, 190, 255-266.
46. McDonald, L.J., ve Murad, F. (1996). Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 211, 1-6.
47. Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., ve diğerleri. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*, 52, 375-414.

48. Corbin, J.D., ve Francis, S.H. (1999). Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 13729–13732.
49. Lue, T.F. (2000). Erectile dysfunction. *The New England Journal of Medicine*, 342, 1802–1813.
50. Beavo, J.A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiological Reviews*, 75, 725–748.
51. Wallis, R.M., Corbin, J.D., Francis, S.H., ve Ellis, P. (1999). Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *The American Journal of Cardiology*, 83 (5A), 3C–12C.
52. Sugiyama, A., Satoh, Y., Shiina H., Takahara, A., Yoneyama, M., ve Hashimoto, K. (2001). Cardiac electrophysiologic and hemodynamic effects of sildenafil, a PDE5 inhibitor, in anesthetized dogs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 38, 940–946.
53. Jackson, G., Benjamin N., Jackson N., ve Allen, MJ. (1999). Effects of sildenafil citrate on human hemodynamics. *The American Journal of Cardiology*, 83 (5A), 13C–20C.
54. Morales, A., Gingell, C., Collins M., Wicker, PA., ve Osterloh, IH. (1998). Clinical safety of oral sildenafil citrate (VIAGRA) in the treatment of erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*, 10, 69–74.

55. Milligan, P.A., Marshall, S.F., ve Karlsson, M.O. (2002). A population pharmacokinetic analysis of sildenafil citrate in patients with erectile dysfunction. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 53, 45S–52S.
56. Walker, D.K., Ackland, M.J., James, G.C., Muirhead, GJ., Rance, DJ., Wastall, P., ve diğerleri. (1999). Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica*, 29, 297–310.
57. Hyland, R., Roe, E.G., Jones, B.C., ve Smith, DA. (2001). Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-demethylation of sildenafil. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 51, 239–248.
58. Reffelmann, T., ve Kloner, RA. (2003). Therapeutic potential of phosphodiesterase 5 inhibition for cardiovascular disease. *Circulation*, 108(2), 239-244.
59. Fox, KM., Thadani, U., Ma, PT., Nash, SD., Keating, Z., Czorniak, MA. ve diğerleri. (2003). Sildenafil citrate does not reduce exercise tolerance in men with erectile dysfunction and chronic stable angina. *European Heart Journal*. 24(24), 2206-2212.
60. Kukreja, RC., Ockaili, R., Salloum, F., Yin, C., Hawkins, J., Das, A., ve diğerleri. (2004). Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition--a novel preconditioning strategy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(2), 165-173.
61. Kukreja, RC., Salloum, F., Das, A., Ockaili, R., Yin, C., Bremer, YA., ve diğerleri. (2005). Pharmacological preconditioning with

sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. *Vascular Pharmacology*, 42(5-6), 219-232.

62. Das, S., Maulik, N., Das, DK., Kadowitz, P.J., ve Bivalacqua, T.J. (2002). Cardioprotection with sildenafil, a selective inhibitor of cyclic 3',5'-monophosphate-specific phosphodiesterase 5. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 28(6), 213-219.

63. Milani, E., Nikfar, S., Khorasani, R., Zamani, M.J., ve Abdollahi, M. (2005). Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 140(2), 251-255.

64. Karatza, AA., Bush, A., ve Magee, AG.. (2005). Safety and efficacy of Sildenafil therapy in children with pulmonary hypertension. *International Journal of Cardiology*, 100(2), 267-273.

65. Nichols, D.J., Muirhead, G.J., ve Harness, J.A. (2002). Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects, and dose proportionality. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 53, 5S–12S.

66. Muirhead, G.J., Allen, M.J., ve James G.C. (1996). Pharmacokinetics of sildenafil (VIAGRA), a selective cGMP PDE5 inhibitor, after single oral doses in fasted and fed healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 42, 268.

67. Mihara, M., ve Uchiyama, M. (1977). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86, 271-278.

68. Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., ve Fujikura, T. (1982) Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leucocytes. *Analytical Biochemistry*, 127, 346-350.

69. Lefer, A. M., ve Ma, X. L. (1991). Endothelial dysfunction in the splanchnic circulation following ischemia and reperfusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 17, Suppl. 3, S186–S190.

70. Simonsen, U., Wadsworth, R.M., Buus, N.H., ve Mulvany, M.J. (1999). In vitro simultaneous measurements of relaxation and nitric oxide concentration in rat superior mesenteric artery. *Journal of Physiology*, 516, 271–282.

71. Vanheel, B., ve Van De Voorde, J. (2000). EDHF and residual NO: different factors. *Cardiovascular Research*, 46, 370–375.

72. Arnal, JF., Warin, L., ve Michel, JB. (1992). Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *The Journal of Clinical Investigation*, 90, 647–652.

73. Moncada, S., Rees, DD., Schulz, R., ve Palmer, RM. (1991). Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 2166–2170.

74. Tsao, P. S., Aoki, N., Lefer, D. J., Johnson G., ve Lefer A. M. (1990). Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation*, 82, 1402–1412.

75. Zweier, J. L., Flaherty, J. T. ve Weisfeldt, M. L. (1987). Observation of free radical generation in the post-ischemic heart *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 1404–1407.

76. Ma, X. L., Weyrich, A. S., Lefer, D. J., ve Lefer. A. M. (1993). Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circulation Research*, 72, 403–412.

77. Rossoni, G., Manfredi, B., De Gennaro Colonna, V., Berti, M., Guazzi, M., ve Berti, F. (2007). Sildenafil reduces L-NAME-induced severe hypertension and worsening of myocardial ischaemia-reperfusion damage in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 150(5), 567-576.

78. Salloum, FN., Takenoshita, Y., Ockaili, RA., Daoud, VP., Chou, E., Yoshida, K., ve diğerleri. (2007). Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(2), 453-458.

79. Senthilkumar, A., Smith, RD., Khitha, J., Arora, N., Veerareddy, S., Langston, W., ve diğerleri. (2007). Sildenafil Promotes Ischemia-Induced Angiogenesis Through a PKG-Dependent Pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and Vascular Biology*, baskıda.

80. Takashi, E., Wang, Y., ve Ashraf, M., 1999. Activation of mitochondrial KATP channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circulation Research*, 85, 1146–1153.

81. Gross, G.J. (2000). The role of mitochondrial KATP channels in cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 95, 280–284.
82. Katnik, C., ve Adams, DJ. (1995). An ATP-sensitive potassium conductance in rabbit arterial endothelial cells. *Journal of Physiology*, 485(3), 595–606.
83. Anaya-Prado, R., Toledo-Pereira, L., Lentsch, A. B., ve Ward, P. A. (2002). Ischemia/reperfusion injury. Research review. *The Journal of Surgical Research*, 105, 248-258.
84. Hakguder, G., Akgur, F.M., Ates, O., Olguner, M., Aktug, T., ve Ozer, E., (2002). Short-term intestinal ischemia-reperfusion alters intestinal motility that can be preserved by xanthine oxidase inhibition. *Digestive Diseases and Sciences*, 47(6), 1279–1283.
85. Ozacmak V. H., Sayan H., Arslan S. O., Altaner S., ve Aktas R. G. (2005). Protective effect of melatonin on contractile activity and oxidative injury induced by ischemia and reperfusion of rat ileum. *Life Sciences*, 76, 1575-1588.
86. Ballabeni, V., Barocelli, E., Bertoni, S., ve Impicciatore, M. (2002). Alterations of intestinal motor responsiveness in a model of mild mesenteric ischemia/reperfusion. *Life Sciences*, 71, 2025–2035.
87. Saltzman, AL. (1997). Nitric oxide in the gut. *New Horizons*, 3, 352–364.
88. Belai, A., ve Burnstock, G. (1994). Evidence for coexistence of ATP and nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic (NANC)

inhibitory neurones in the rat ileum, colon and anococcygeus muscle. *Cell and Tissue Research*, 278, 197–200.

89. Smits, GJM., ve Lefevre, RA. (1996). ATP and nitric oxide: inhibitory NANC neurotransmitters in the longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the rat ileum. *British Journal of Pharmacology*, 118, 695-703.

90. Hayward, R. ve Lefer, A. M. (1998). Time course of endothelial-neutrophil interaction in splanchnic artery ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 275, 2080-2086.

91. Berlanga, J., Prats, P., Ramirez, D., Gonzalez, R., Lopez-Saura, P., Aguiar, J., ve diğerleri. (2002). Prophylactic Use of Epidermal Growth Factor Reduces Ischemia/Reperfusion Intestinal Damage. *American Journal of Pathology*, 161(2), 373-379.

92. Lucchesi, B. R. (1991). Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annual Review of Physiology*, 84, 400–411.

93. Entman, M. L., Michael, L. H., Rossen, R. D., Dreyer, W. J., Anderson, D. C. ve Smith C. W. (1991). Inflammation in the time course of early myocardial ischemia. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5, 2529–2537.

94. Takagi, T., Yoshida, N., Isozaki, Y., Shimozawa, M., Katada, K., Manabe, H., ve diğerleri. (2006). CV-11974, angiotensin II type I receptor antagonist, protects against ischemia–reperfusion injury of the small intestine in rats. *European Journal of Pharmacology*, 535, 283–290.

EKLER

Yayınlar

Soydan G, Tekes E, Tuncer M

Short-term and Long-term FK506 Treatment Alters the Vascular Reactivity of Renal and Mesenteric Vascular Beds.

J Pharmacol Sci. 2006; 102(4): 359-367.

Soydan G, Tekes E, Tuncer M

Investigation of serotonin (5-HT) receptors in the isolated penile bulb of rats.

Int J Impot Res. 2006; 18(6): 510-516.

Tekes E, **Soydan G**, Tuncer M

The role of endothelin in FK506-induced vascular reactivity changes in rat perfused kidney.

Eur J Pharmacol. 2005; 517 (1-2): 92-96.

Soydan G, Babaoğlu MÖ

Anjiyotensin II reseptör blokörleri – Klinik Farmakoloji

Türk Kardiyoloji Seminerleri. 2004; 4 (3), 273-283.

Poster ve Bildiriler

A) Uluslararası:

Soydan G, Cekic EG, Tuncer M

Does nebivolol have preventive action in vascular and ileal dysfunction in a ischaemia/reperfusion model in rat?

14th International Congress on Cardiovascular Pharmacotherapy,
Kemer, Antalya, 29 Kasım – 02 Aralık 2007

Gönderildi.

Soydan G, Tuncer M

Sildenafil has beneficial effects on functional changes in mesenteric artery and ileum, induced by ischaemia-reperfusion

14th International Congress on Cardiovascular Pharmacotherapy,
Kemer, Antalya, 29 Kasım – 02 Aralık 2007

Gönderildi.

Soydan G, Tekes E, Tuncer M

FK506 Treatment Alters the Vascular Reactivity of Renal and Mesenteric Vascular Beds

15th World Congress of Pharmacology, July 02-07, 2006, Beijing, China

Acta Pharmacologica Sinica, Suppl 1 to Vol 27, 2006, No. P390018, p.: 415

Soydan G, Tekes E, Tuncer M

Effects of FK506 Treatment on EFS-induced Responses of Isolated Penile Bulb of Rats

4th Panhellenic Congress of Pharmacology, May 19-20, 2006, Patras, Greece

Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, Vol. 20, No. 2, p.: 323

B) Ulusal:

Soydan G, Çekiç EG, Tuncer M

Nebivolol'ün Mezenter İskemi/Reperfüzyon Hasarında Nitrik Oksit Aracılı Olumlu Etkileri

19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, KATÜ, Trabzon, 24-28 Ekim 2007

Gönderildi.

Soydan G, Sökmensüer C, Kılınç K, Tuncer M

Sıçan Mezenter İskemi/Reperfüzyon Modelinde Oluşan Fonksiyonel ve Yapısal Değişiklikler Üzerine Sildenafil Etkileri

19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, KATÜ, Trabzon, 24-28 Ekim 2007

Gönderildi.

Soydan G, Tekeş E, Tuncer M

Sıçan Penil Bulb Dokusunda Serotonin (5-HT)'in Oluşturduğu Cevapların İncelenmesi (**Oral Prezantasyon**)

18. Ulusal Farmakoloji Kongresi, DESAM, İzmir, 28 Eylül – 01 Ekim 2005

Soydan G, Tekeş E, Tuncer M

Kısa ve Uzun Süre Uygulanan Takrolimus'un Sıçan İzole Penil Bulb Dokusundaki EAS Cevapları Üzerine Etkisi (**Oral Prezantasyon**)

18.Ulusal Farmakoloji Kongresi, DESAM, İzmir, 28 Eylül – 01 Ekim
2005

Soydan G, Tekeş E, Korkusuz P, Aşan E, Kılınç K, Tuncer M

Kısa ve uzun süre FK506 uygulanan sıçanlardaki kan basıncı
artışında ve nefrotoksisitede ET-1'in rolü

18.Ulusal Farmakoloji Kongresi, DESAM, İzmir, 28 Eylül – 01 Ekim
2005

Tekeş E, **Soydan G**, Bayar B, Tuncer M

The effects of acute administration and chronic treatment of tacrolimus
on the rat renal and mesenteric vascular beds

17th National Congress of Turkish Pharmacological Society and 1st
Clinical Pharmacology Symposia and Joint Meeting of Turkish and
Netherlands Pharmacological Societies, Belek, Antalya, 17-21 Ekim
2003