

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

**LEVOSİMENDANIN MİYOKARDİYAL İSKEMİDE KORUYUCU
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Nida EDEVLER

Tez danışmanı
Doç. Dr. Nilüfer N. TURAN

ANKARA
Eylül 2009

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

**LEVOSİMENDANIN MİYOKARDİYAL İSKEMİDE KORUYUCU
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Nida EDEVLER

Tez danışmanı
Doç. Dr. Nilüfer N. TURAN

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından
02/2008- 14 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Eylül 2009

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller	iii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Miyokard Fizyolojisi	3
2.2. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarı	7
2.3. Miyokardiyal İskemide Koruyucu Olarak İskemik Ardkoşullama ve Önkoşullama	13
2.4. Ardkoşullamanın Olası Mekanizmaları	15
2.5. Levosimendan	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Gereçler	24
3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları	24
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.1.3. Kullanılan Aletler	25
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Sıçan İzole Kalp Preparatının Hazırlanması ve Ölçülen Hemodinamik Parametreler	25
3.2.2. Deney Protokolü	26
3.2.3. İskemi ve Ardkoşullama Oluşturulması	28
3.2.4. İnfarkt Alan Değerlendirilmesi	28
3.2.5. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. İnfarkt Alan	30
4.2. Hemodinamik Parametreler	32
4.2.1. Sol Ventrikül Gelişen Basıncı	32
4.2.2. Sol Ventrikül Son Diyastolik Basıncı	33
4.2.3. $-dP/dt$ ve $+dP/dt$	35
4.2.4. Hz- Basıncı Çarpımı	38
4. TARTIŞMA	40
5. SONUÇ	46
6. ÖZET	47
7. SUMMARY	48
8. KAYNAKLAR	50
9. ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER

Şekil 1: A-Miyozin Moleküler Yapı	
B-Aktin Moleküler Yapı	6
Şekil 2: İskemi ve Reperfüzyonda Geriye Dönüşüz Hasara Yol Açan Temel Hücresel Mekanizmalar	11
Şekil 3: Levosimendan Etki Mekanizması	22
Şekil 4: Deney Protokolü	27
Şekil 5: İnfarkt Alan Değerlendirmesi	30
Şekil 6: TTC ile Boyanan Sağ Kalpleri	31
Şekil 7: Sol Ventrikül Gelişen Basınç Değerlendirilmesi	33
Şekil 8: Sol Ventrikül Son Diyastolik Basınç Değerlendirilmesi	34
Şekil 9: $-dP/dt$ Değerlendirmesi	36
Şekil 10: $+dP/dt$ Değerlendirmesi	37
Şekil 11: Hız Basınç Çarpımı Değerlendirmesi	38
Şekil 12: Hemodinamik Parametre Orjinal Traseleri	39

1. GİRİŞ

İskemik kalp hastaları, hızla endüstrileşen dünyada ölüm sebepleri arasında önemli bir yere sahiptir¹. Bu bağlamda kardiyoprotektif tedavi yaklaşımları üzerinde yapılan çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Kardiyoprotektif tedavi yaklaşımları içerisinde son zamanlarda en çok dikkat çeken yöntemlerden biri de ardkoşullama'dır.

Dokuların temel bir takım gereksinimlerini karşılayabilmek için dolaşımın bütünlüğünü ve sürekliliğini sağlamak, kardiyovasküler hastalıkların tedavisindeki asıl hedeftir. Dolaşımı kesintiye uğratarak iskemik kalan canlı dokuda, dolaşım tekrar sağlandığında oluşan reperfüzyonun neden olduğu zararlı etkiler ise, yani reperfüzyon hasarı ise iskemik hasardan daha geniş çaplı ve daha ciddi olabilmektedir.

Kalpte meydana gelen uzun süreli iskemiye karşı çeşitli koruma yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlardan biri olan iskemik ardkoşullama, reperfüzyon başlamadan hemen önce kısa ve tekrarlayan iskemi-reperfüzyon periyodlarının uygulanmasıdır ve iskemi-reperfüzyon algoritmelerinin toplam süresi ise türlere bağlı olarak 1- 3 dakika arasında sürmektedir².

Yapılan çalışmalar ardkoşullama ile ilgili olarak beş temel mekanizmayı ortaya çıkarmıştır. Bunlar; 1- Endojen adenosin varlığı ve adenosin reseptör alt tiplerinin aktivasyonu, 2- NO/ cGMP yolunun rolü, 3- ATP'ye bağımlı mitokondriyal potasyum kanallarının katılımı, 4- Reperfüzyon hasarı koruyucu kinaz (RISK -Reperfusion Injury Salvage Kinases) yolunun aktivasyonu³ 5- reperfüzyonda mitokondriyal

permeabilite transizyon porunun (mPTP- mitochondrial permeability transition pore) açılması'nın inhibisyonu olarak belirtilebilir¹.

İskemik ardkoşullamanın koruyucu etkilerinin araştırılmasında çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Klinikte kolay uygulanabilir olması nedeniyle çeşitli maddelerin ardkoşullamayı taklit ettiğinin saptanması, farmakolojik ön ve ardkoşullama kavramının gündeme getirmiştir. Biz de bu çalışmamızda hücre içi kalsiyum miktarının arttırılmaksızın miyokardiyal kontraktileti arttıran⁴, kalsiyum duyarlılaştırıcı bir ajan olan levosimendan⁵, miyokardiyal iskemiye karşı infarkt alan ve hemodinamik parametreler üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Miyokard Fiziyojisi

Kalbin birincil görevi kanın vücutta dolaşımını sağlamaktır. Kalp bu görevi mekaniksel bir pompa gibi davranarak yapar⁶. İnsan kalbi iki pompadan oluşur: kanı organlardan alıp akciğerlere pompalayan sağ kalp ve oksijenlenmiş kanı akciğerlerden alıp yeniden organlara pompalayan sol kalp. Her pompa bir giriş (atrium) ve bir çıkış (ventrikül) boşluğundan oluşur. Atriumlar ventriküllerin kanla dolmasını sağlayan bir ön pompa görevi yaparlar. Ventriküller, kanın damarlarda dolaşmasını sağlayacak biçimde yüksek bir basınçla kasılır ve kanı fırlatır. Kalp, kendi ritmik kasılmasını sağlayacak ve aksiyon potansiyellerinin kalp kası boyunca yayılmasını sağlayacak özel bir ileti sistemine sahiptir⁷.

Kalp başlıca üç tip kalp kasından meydana gelir. Bunlar atrium kası, ventrikül kası, özelleşmiş uyarıcı ve iletici kas lifleridir. Kasın süresinin daha uzun olması dışında, atrium ve ventrikül kasları iskelet kasına oldukça benzer şekilde kasılırlar. Çok az miktarda kasılabilir fibril içeren özelleşmiş uyarıcı ve ileti lifleri ise, yalnızca belli belirsiz kasılırlar. Bunun yerine ritmisite ve değişik hızlarda ileti göstererek, kalbe bir uyarı sistemi sağlarlar⁸.

Kalp kasında kas hücreleri arasında ara diskler (interkale disk) bulunur. Bu disklerin elektrik direnci çok düşüktür ve aksiyon potansiyelinin kalp kası lifleri arasında kolayca yayılmasını sağlarlar⁷. Kalp kası aksiyon potansiyelinin bir uçtan bir uca kolayca yayıldığı tek bir bileşik hücre gibidir (sinsisyum). Kalp gerçekte iki sinsisyumdan meydana gelir. Bunlar ilki atrium duvarını oluşturan atrium sinsisyumu ve ikincisi ventrikül duvarını oluşturan ventrikül sinsisyumudur. Normalde aksiyon

potansiyelleri, atrium sinsiyumundan ventrikül sinsisyumuna yalnızca özelleşmiş bir ileti sistemi aracılığı ile iletilebilirler. Kalbin kas kitlesinin bu şekilde iki işlevsel sinsisyuma bölünmesi, atriumların ventriküllerden kasılmaya bir süre önce kasılmaya olanak verir⁸.

Aksiyon potansiyelinin kasılma oluşturabilmesi için elektriksel akımların kalp kas lifinin iç kısımlarına kadar inmeleri gerekir. Bu durum aksiyon potansiyellerinin kas lifi boyunca bir yandan diğer yana uzanan transfer tübüllerle (T tübüleri) taşınması sayesinde gerçekleşir. Aksiyon potansiyeli, böylelikle sarkoplazmik tübüllerden kalsiyumun sarkoplazmik retikuluma salınmasına neden olur⁷.

Miyokardın kasılmasında rol alan anahtar proteinler miyozin, aktin, tropomiyozin ve troponin kompleksidir. Kas kasılması kayan iplikçikler mekanizmasıyla oluşur. Miyozin çapraz bağlarının aktin iplikçığı ile etkileşmesi sonucu oluşan mekanik güç, aktin iplikçığının miyozin iplikçiklerinin arasında kaymasını sağlar. Dinlenme koşullarında bu güçler baskılanmıştır ama bir aksiyon potansiyeli kas hücresinin zarı boyunca yayıldığında, sarkoplazmik retikulumdan aktin ve miyozin arasındaki güçleri aktive eden çok miktarda kalsiyum iyonu serbestlenir ve kasılma başlar⁸. Sarkoplazmik retikulumun fonksiyonu şiddetli iskemi, reperfüzyon ve kalp yetmezliğinde bozulmaktadır. Bu değişiklikler kasılma fonksiyonunun bozulmasına katkıda bulunabilir⁹.

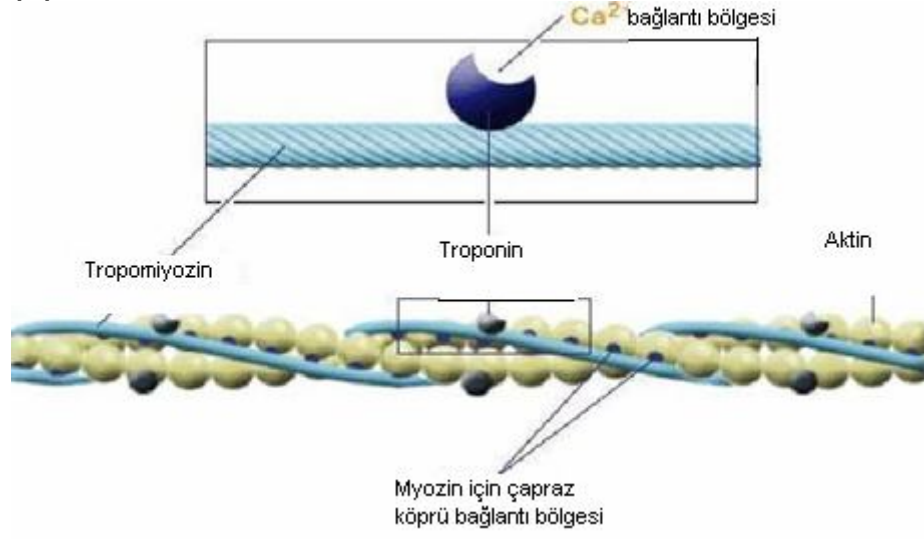
Miyozin iplikçığı çok sayıda miyozin molekülünden oluşmuştur⁷. Miyozin heliks yapısında büyük bir protein molekülü olup 4 hafif ve 2 ağır zincir olmak üzere 6 polipeptid zincirden oluşmuştur. İki ağır zincir bir çift sarmal oluşturmak üzere birbiri etrafına spiral olarak sarılır. Bu zincirlerden her birinin ucu kıvrılarak miyozin başı denilen globüler polipeptid yapıyı meydana getirir. Dolayısıyla çift sarmal miyozin

molekölünün bir ucunda yan yana uzanan iki serbest baş vardır. Sarmal n devam eden kısma kuyruk denir⁸. Miyozinin kuyruğu demetler halinde iplikçiğin gövdesini oluşturur, miyozin başlar ve her bir miyozin molekülünün dışarı doğru sarkan bölümleri birlikte gövdeden dışarı doğru uzanan bir kol gibidir. Bu yapıya çapraz köprüler denir. Miyozin başın önemli bir özelliği ATP'yi ADP'ye dönüştürecek kasılma süreci için gerekli enerjiyi sağlayan bir ATPaz enzim olmasıdır⁷.

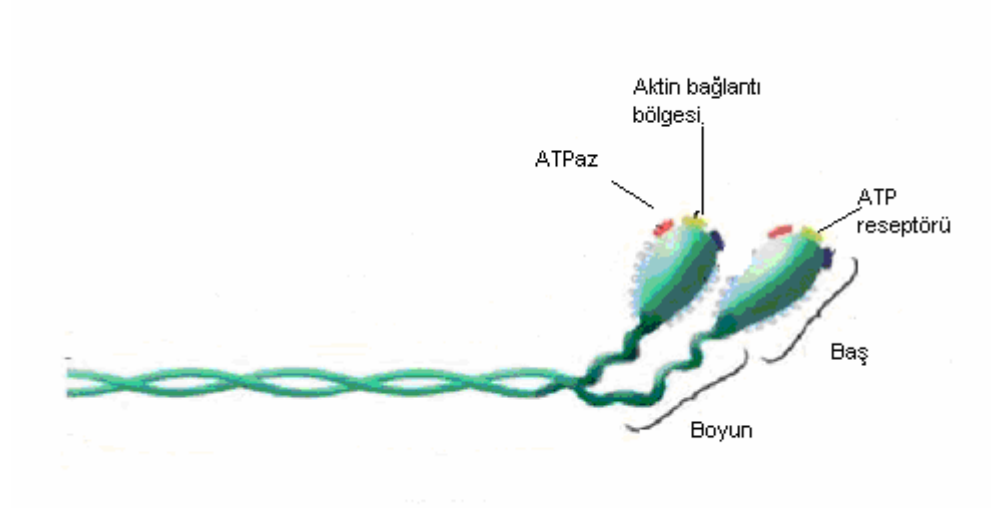
Aktin iplikçisi de üç protein komponentinden oluşmuş bir komplekstir: aktin, tropomiyozin ve troponin. Aktinin bir ucu Z disklerine (bir miyofibrili diğerine bağlayan yapı) sıkı biçimde bağlıyken diğer ucu komşu sarkomerde (iki Z çizgisi arasındaki yapı) yer alan miyozin iplikçikleri arasındaki boşluklara doğru uzanır⁷.

Aktin iplikçisini oluşturan moleküllerden biri olan tropomiyozin moleküllerinin istirahat durumunda aktin ipliklerinin aktif bölgesini kapattıkları, dolayısıyla aktin ile miyozin arasındaki kasılmaya neden olacak çekimi engellediği düşünülür. Buna troponin-tropomiyozin birleşimiyle baskılanma da denebilir. Troponin ise tropomiyozin molekülüne tutulmuş, her biri kas kasılmasında özgün bir göreve sahip zayıf bağlı üç protein altbirimden oluşmuş bir komplekstir. Troponin I aktin için, troponin T tropomiyozin için, troponin C ise kalsiyum iyonları için kuvvetli affiniteye sahiptir. Troponin C kalsiyumun bağlanması için 4 bağlanma yeri bulunan bir proteindir. Aktin iplikçisi troponin-tropomiyozin kompleksi tarafından baskılanır. Kasılma esnasında aktin iplikçisinin üzerinde bulunan aktif noktaların baskılanması kalsiyum iyonunun varlığında ortadan kalkar. Kalsiyum troponin ile bağlanarak troponin kompleksinin tropomiyozinden ayrılmasına sebep olur ve aktin üzerindeki aktif noktalar açılır ve kasılma gerçekleşir⁷.

(A)



(B)



Şekil 1: (A) Aktin moleküler yapı (B) Miyozin moleküler yapı ⁸.

2.2. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Koroner arter hastalıkları dünya genelinde ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır. Her yıl 3.8 milyon erkek ve 3.4 milyon kadın koroner arter hastalıkları nedeniyle yaşamını yitirmektedir¹⁰. Koroner arter hastalıklarının temel patofizyolojik göstergelerinden biri de akut miyokardiyal iske mi-reperfüzyon hasarıdır¹¹.

Miyokardiyal iske mi; koroner spazm gelişimi, trombus nedeniyle reperfüzyon blokajı, arteriyoskleroz esnasında koroner arterlerin daralmasıyla birlikte koroner akımın azalması sonucu oluşur. Miyokardiyal iske mi esnasında dokuya giden kan akımının ani azalması sebebiyle iske mi oluşan bölge veya bölgelere substratların gelmesi ve oluşan metabolitlerin temizlenmesinin aksaması, oksidatif metabolit yollarının inhibe olması sonucu hücre hasarı ve nihayetinde hücre ölümüne neden olan olaylar başlamış olur. İske mi sonrası kan akımının yeniden sağlanması ise reperfüzyon denir. Reperfüzyon iskemik dokunun canlılığını koruyabilmesi için oldukça önemlidir¹². Miyokardiyal reperfüzyon hasarı; reperfüzyon sırasında henüz sağlam olan miyositlerin reperfüzyonla tetiklenen metabolik, fonksiyonel ve yapısal olaylar zinciri sonucunda hasarı görmesi olarak tanımlanabilir. Reperfüzyon hasarı, ilk olarak 1960 yılında Jennings ve ark. tarafından öne sürülmüştür¹³. Reperfüzyon hasarı olgusunun 1960 yılında yapılan bu çalışma ile gündeme gelişinin ardından, Buckberg ve daha sonraları Braunwald ve Kloner tarafından yapılan çalışmalarla 1970'lerin sonları ile 1980'lerin başlarında dikkatleri çekmiştir^{14, 15}.

Reperfüzyon hasarının patofizyolojisini belirlemedeki en önemli zorluk, iskemik fazda meydana gelen hasarla reperfüzyon fazında oluşan hasarın tam ayrımının yapılmasının oldukça güç olmasıdır¹⁶.

Deneysel modellerde çeşitli farmakolojik ajanlarla reperfüzyon hasarı'nı azaltılma ve reperfüzyon hasarı'nın önlenmesinin moleküler mekanizma'na temel oluşturacak olan RISK yolağının³ ve mPTP' nin miyokartta gösterilmiş olması¹⁷ kardiyak koruma sağlamada reperfüzyon periyodunun önemini gündeme getirmiştir¹⁶.

Reperfüzyon hasarı iskemik sürecin uzunluğuna bağlı olarak geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz olabilir¹⁸. Yapılan çalışmalar dört tip reperfüzyon hasarının olduğunu göstermiştir: 1. Ölümcül reperfüzyon hasarı; reperfüzyondan hemen önce hala canlı olan kardiomyositlerin reperfüzyona bağlı olarak apoptozis ve nekrozis sonucu ölmesi, 2. Koroner vazodilatör rezervin azalması ile sonuçlanan ilerleyici mikrovasküler hasar; Ciddi mikrovasküler disfonksiyon, reperfüzyon sonrası miyokardiyal perfüzyonu tümüyle sınırlandırabilir ve bu durum '*no-reflow fenomeni*' olarak adlandırılır. 3. Miyokardiyal sersemleme (myocardial stunning), 4. Reperfüzyon aritmileri; reperfüzyonu takip eden saniyelerde ventriküler taşikardi veya fibrilasyon gelişmesidir¹⁹.

Reperfüzyon, aynı zamanda bazı morfolojik değişikliklere, enzim yıkımına, endotelial disfonksiyona²⁰ neden olabilir²¹. Tüm bu nedenlerden dolayı, kardiyoprotektif ajanların geliştirilmesi iskemi-reperfüzyon sırasında infarktüsün azaltılması, nekrozun başlamasının geciktirilmesi, aritmi insidanslarının düşürülmesi, miyokardiyal fonksiyonun düzeltilmesi için klinikte oldukça önemlidir¹. Klinikte, erken reperfüzyon sağlayan trombolitikler, anjioplasti ve cerrahi gibi tedaviler kullanılmaktadır. Ancak reperfüzyon hasarının, reperfüzyonun bir takım faydalarına baskın gelmesi olgusu da giderek artan bir şekilde ortaya konmaktadır²².

İskemi sonucu miyokard dokusunda kan akımının aniden kesilmesi kardiyomiyositlerdeki yüksek enerjili fosfatlar hızla azaltarak anaerobik glikolize doğru kaymaya ve sitozolik pH'da düşüğe neden olur²³. ATP ve kreatin fosfattaki bu azalma kontraktiletiyi azaltır ve hücre membranındaki ATP bağımlı iyon kanallarının aktivitesini bozarak intraselüler kalsiyum artışına sebep olur¹⁶. Uzun süren iskemilerde reperfüzyonun kendisi direkt olarak veya apoptozis yoluyla kardiyomiyositlerin ölümüne sebep olur. Ölümcül reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan bu durumdan sorumlu temel mekanizmalar sitozolik ve mitokondriyal kalsiyum yüklenmesi, oksidatif stres, pH paradoksu, akut inflamatuvar cevaptır^{24,25}.

Miyokardiyal reperfüzyon esnasında sarkolemmal membran hasarına ve oksidatif stresin indüklediği sarkoplazmik retikulum disfonksiyonuna bağlı olarak intraselüler kalsiyum miktarında belirgin artış olur. Bu olay kalsiyum paradoksu olarak nitelendirilir¹⁶. Burada rol oynayan temel hücresel mekanizmalar iskemi esnasında aktive olan Na^+/Ca^{2+} değiştirici kanalı ve düşen intraselüler pH'yı normalize etmek için reperfüzyon esnasında aktive olan ve hücre dışına H^+ iyonu atarken hücre içine; kalsiyum ile değiştirilecek olan Na^+ girişini sağlayan Na^+/H^+ değiştirici kanallarıdır. Artan intraselüler ve mitokondriyal kalsiyum hücrelerde hiperkontraktüre neden olarak ve mPTP'nin açılması sonucunda hücre ölümünü indükler²⁶. mPTP mitokondri zarının içinde lokalize nonselektif bir porudur¹⁰. Reperfüzyonun ilk zamanlarında mPTP'nin açılması net olarak geri dönüşümsüz hücre ölümüyle bağlantılıdır¹. Bu nedenle mPTP'yi hedefleyen kardiyak koruma yaklaşımları son zamanlarda oldukça önem kazanmıştır¹⁰.

Reperfüzyondan hemen sonra nötrofillerin nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz sistemi aracılığı ile yeniden

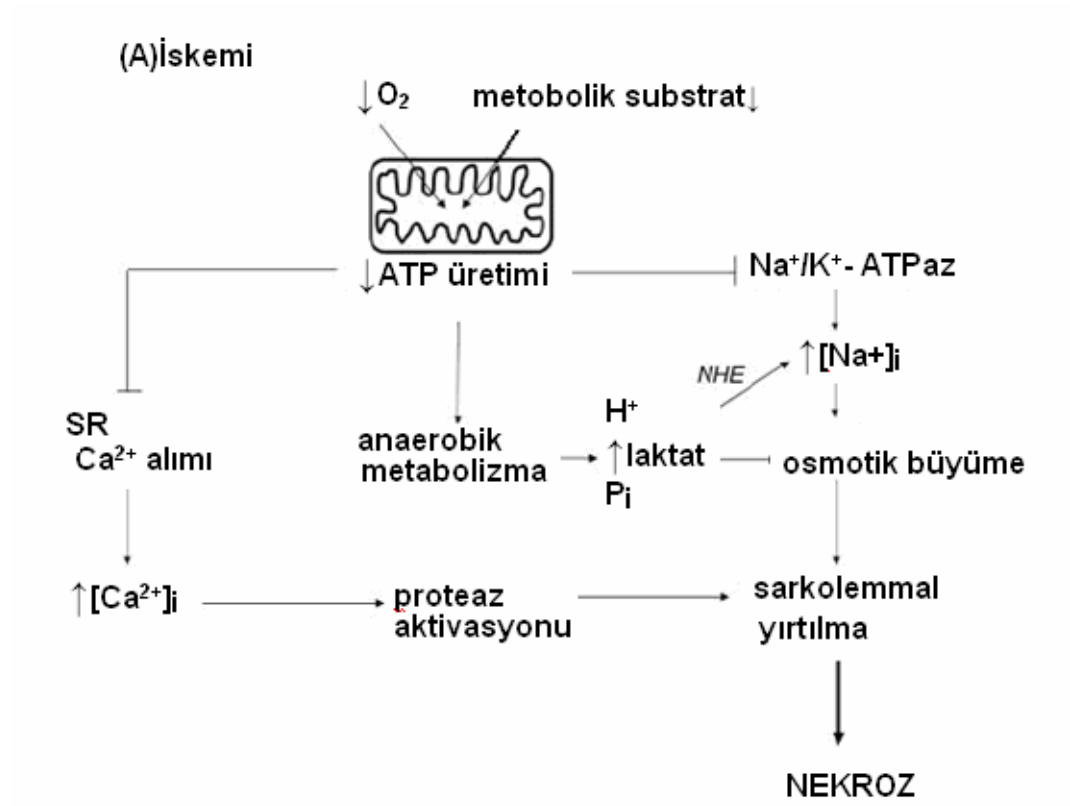
oksijenlenmiş dokuda oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin (ROT) hızlı üretimi endotel hasarına, kemotaktik sitokinlerin salınmasına ve endotel üzerinde hücresel adezyon moleküllerinin ekspresyonuna neden olarak miyokardiyal hasar yapar^{27,28}.

Miyokardiyal kontraktilitenin azalması miyokardiyal iskemide meydana gelen ilk patolojidir²⁹ ve akut kardiyak yetmezlik ile sonuçlanabilir¹. Miyokardiyal sersemleme, reperfüzyondan sonra koroner kan akımının normal veya normale yakın olarak düzelmesine ve geri dönüşümsüz hasarın olmamasına karşın, inatçı mekanik disfonksiyon olarak tanımlanabilir³⁰. Sersemleme, miyokardiyal erken dönem reperfüzyon hasarı ile eşanlamalıdır. İlk olarak Heyndrickx ve ark. tarafından 1975 yılında tanımlanmıştır³¹. Miyokardiyal sersemlemeyi açıklayan mekanizmalar oldukça kompleksdir. Ancak reperfüzyonun direkt sonucu olan ROT üretimi ve intraselüler kalsiyumun aşırı yüklenmesi bu patolojinin ana sebepleridir^{32, 33, 34}.

Miyokardda azalmış perfüzyona bağlı olarak kontraktilitenin azalmasının başka bir şekli de 'hibernasyon' olarak tanımlanabilir^{35,36}. Miyokardiyumun hibernasyonunda koroner kan akımının azalması sonucunda metabolizma ve kontraktilite azalır. Ancak, reperfüzyon ile kontraktıl fonksiyon normale dönecektir¹.

İskemi esnasında, izole ventriküler prematür atımlardan ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyona kadar uzanan bir aralıkta aritmiler meydana gelebilir^{29,37}. İskemi ve reperfüzyon sonrası aritmilerin oluşmasında potasyum artışı önemli rol oynar^{38,39}. Deneysel koroner oklüzyon modellerinde, aritmilerin insidansı ve süreleri oluşan hasarı değerlendirmek için kullanılır. Aynı zamanda geri dönüşümsüz doku hasarı

başlamadan önce aritmilerin meydana gelmesi de hasar değerlendirilmesi yaparken oldukça önemli bir parametredir¹.



2.3. Miyokardiyal İskemide Koruyucu Olarak İskemik Ardkoşullama ve Önkoşullama

İskemik önkoşullama, tek veya tekrarlayan kısa süreli iskemi periyodlarının, daha sonraki uzun süreli iskemi sırasında⁴⁰, iskemik hasara karşı miyokardı koruduğu iyi bilinen bir fenomendir⁴¹. İskemik önkoşullama ilk olarak 1986 yılında Murry ve ark. tarafından yapılan araştırma ile tanımlanmıştır. Murry ve ark., kısa süreli iskeminin, daha uzun süreli iskeminin olumsuz sonuçlarına karşı koruyucu olabileceğini ve infarkt alanının büyüklüğünü belirgin bir şekilde azaltabileceğini savunmuşlardır.⁴² Aynı zamanda, yapılan çalışmalar önkoşullamanın antiaritmik⁴³ ve reperfüzyon hasarına karşı koroner endotel hücrelerinde koruyucu etkisinin⁴⁴ olduğunu da göstermiştir. Ancak önkoşullama iskemi başlamadan önce uygulandığı için klinikte uygulanması oldukça kısıtlı bir yöntemdir.

Reperfüzyon başlamadan hemen önce kısa ve tekrarlayan iskemi-reperfüzyon periyodlarının uygulanması ardkoşullama olarak tanımlanıp, reperfüzyon hasarını azaltmaktadır^{45,46}. Ardkoşullamada yer alan iskemi-reperfüzyon periyodlarının süresi türlere bağlı olarak 1-3 dakika arasında değişmektedir². Örneğin, sıçan⁴⁷ ve farede⁴⁸ 10 -15 saniye, köpek⁴⁹ ve tavşanda⁵⁰ 30 saniye, insanda⁵¹ 60 saniye olarak yapıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Yang ve ark. çalışmalarında *insitu* tavşan modelinde otuz dakika koroner arter oklüzyonu sonra otuz saniyelik ardkoşullama algoritmi kullanarak miyokardiyal reperfüzyon hasarının patogenezinde reperfüzyonun ilk dakikalarının kritik olduğu sonucu vurgulanmıştır. Ayrıca bu kısa ve kritik periyotta yapılan girişimlerin, reperfüzyonun sonraki dönemlerine göre, ortaya çıkan hasarda daha belirgin azalmaya yol açtığı gösterilmiştir⁵². Ardkoşullama algoritminin zamansal değişkenleri, uygulanan siklus sayısı, reperfüzyon ve reperfüzyon epizotlarının süresidir⁵³.

İlk olarak 2003 yılında, Zhao ve ark., 45 dakikalık iske mi epizodundan sonra 3 kez 30 saniye süresince reperfüzyon ve iske mi periyodların köpeklerde miyokardiyal infarkt alan %47'den %11'e düşürdüğünü göstermişlerdir⁴⁹. Yine Zhao ve ark., 2004 yılında s anlarda uza ıř miyokard iskemisi sonrası reperfüzyonun başlangıc ında, tekrarlayan, kısa, aralıklı iske mi periyodları oluşturarak infarktüs alan ında küçülme olduğunu bildirmişlerdir⁵⁴. Yang ve ark. 2004 yılında ardkoşullanmış tavşan kalbinin trifeniltetrazolyum klorür (TTC-tripheniyltetrazolium chloride) ile boyanması sonucu infarkt alanlar ında belirgin azalma olduğunu ortaya koymuşlardır⁵².

Ardkoşullama, reperfüzyonun zararlı etkilerini azaltmaya yönelik endojen mekanizmaları uya ır. Bu mekanizmalar, moleküler olaylar tetikleyen adenosin ve opioidler gibi ligandlarla , protein Kinaz C, mK_{ATP} ve koruyucu kinazlarla ı kapsar⁵⁶.

İskemik ardkoşullama ile indüklenen kardiyak koruma mekanizması tümüyle anlaşılamamıştır. Fakat oksidatif stresin, intraselüler kalsiyum aşırı yüklenmesinin azalması, endotelial fonksiyonun iyileşmesi, apoptotik kardiyomiyosit ölümünün azalması , nötrofil akümü lasyonunun düşmesi⁵⁷, pH'nin düzelmesi⁵⁸ ilaçlanabilir. Aynı zamanda, iskemik ardkoşullama, RISK yolağını aktive ederken³ mPTP'nin açılması ise inhibe eder¹. Her iki durumda ardkoşullamanın lethal reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğunu gösteren önemli parametrelerdir. İskemik ardkoşullama, iskemik önkoşullamaya benzer mekanizmalar ile reperfüzyon hasarını inhibe etmektedir¹⁰. Bugüne kadar denenen tüm hayvan modellerinin iskemik ardkoşullanabileceği gösterilmiştir⁵⁹. Ardkoşullama klinik açıdan kısıtlayıcı faktör ise invaziv girişim gerektiriyor olmasıdır. İskemik ardkoşullamanın aktive ettiği yolları

aktive edebilecek farmakolojik ajanların bulunması ile bu kısıtlılık aşılabilir¹⁶.

Reperfüzyondan hemen önce ya da reperfüzyon ile birlikte yapılan işlemlerle reperfüzyon hasarı azaltılmaya çalışılmaktadır. Bu işlemlerden mekanik olarak ardkoşullama olabileceği gibi farmakolojik girişimler de olabilir. Chiari ve ark. inhalasyon anesteziğinden izofluran koroner oklüzyondan sonra reperfüzyonun ilk dakikalarında verilmesi sonucu ardkoşullama ile oluşan kalp korumaya benzer bir koruma oluştuğunu bildirmişlerdir⁶⁴.

Özetle, ardkoşullama ile ilgili olarak beş temel mekanik duruma dikkat çekilmiştir. Bunlar; 1-Endojen adenozin varlığı ve adenozin reseptör alt tiplerinin aktivasyonu, 2-NO/cGMP yolağının rolü, 3-ATP'ye bağımlı mitokondriyal potasyum kanallarının katılması, 4-RISK yolağının aktivasyonu³, 5- reperfüzyonda mPTP'nin açılmasının inhibisyonu olarak belirtilebilir¹.

2.4. Ardkoşullamanın Olası Mekanizmaları

Ardkoşullama sürecinde etki gösteren tetikleyici ve mediyatörlerin, hücre ölümünde azalma ile fonksiyonel bağlantısı bulunduğu kanıtlanmıştır. Ardkoşullama ile oluşan miyokard korunmasında; eNOS, nitrik oksit, guanilil siklaz, K_{ATP} kanallarının açılması, mPTP kapanması ve adenozin rol almaktadır. Ayrıca hayatta kalmayı sağlayan hücre içi yolların etkinleşmesi de ardkoşullama ile bağlantılıdır⁵⁶.

Adenozin iskemik hücrenin bir katabolizma ürünüdür. ATP'nin yıkımı ile iki yüksek enerjili fosfat ayrılır ve AMP oluşur. AMP'nin, 5'-nükleotidaz ile defosforilasyonu, hücreden kolay bir şekilde çıkabilen serbest adenozin oluşumuna sebep olur. Kardiyomiyositlerdeki hücreler arası boşlukta, adenozin yüzey reseptörlerine bağlanır⁶⁰.

Adenozin reseptör antagonistlerinin reperfüzyon periyodunda uygulandığında, iskemik ardkoşullamanın koruyucu etkisini ortadan kaldırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{61,50,62}. Daha önceki çalışmalar, adenozin reseptör alt tiplerinin farmakolojik olarak aktive edilmesinin⁶³ miyokardiyal reperfüzyonda kardiyak koruma sağladığını kanıtlamıştır. Bu bağlamda Downey ve ark., ardkoşullama ile indüklenen korumaya, adenozin reseptör bağlanmasının katkısını araştırmışlardır. Selektif olmayan adenozin reseptör antagonisti SPT(8-p-(sulfophenyl) theophylline)'nin izole tavşan kalbinde ardkoşullamanın infarkt alanı azaltan etkisini ortadan kaldırdığını bulmuşlardır⁵⁰.

NO, L- arjinin aminoasidinin iki basamaklı bir reaksiyon sonucu L-sitruiline oksidasyonu sonucu oluşur. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi bu dönüşümden sorumludur. Bugüne kadar nöronal (nNOS-tip1), indüklenebilir (iNOS-tip2) ve endotelyal (eNOS-tip3) NOS olmak üzere üç izoformu tesbit edilmiştir.

NO'nun ardkoşullama ile sağlanan kalp koruyucu etkilerde rol aldığı Yang ve ark. göstermiştir. *In situ* tavşan koroner arter oklüzyonunda, NOS inhibitörü L-NAME(N-nitro-L-arginine methyl ester) reperfüzyondan hemen önce verildiğinde ardkoşullamanın infarkt azaltıcı etkisi ortadan kalır⁵².

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller ve ROT'un, iskemik dokunun reperfüzyonu sonucu oluşan hasara neden olduğuna yönelik pek çok çalışma mevcuttur^{65,66}. Son zamanlarda yapılan çalışmalar; mPTP açılmasının inhibisyonu ile PKC-ε (protein kinase C) aracılıklı mK_{ATP} kanallarının açılması mitokondriyal ROT ile ilişkili olduğunu göstermiştir⁶⁷.

Penna ve ark. miyokardiyal reperfüzyon esnasında ROT süpürücüsü N-asetilsistein uygulandığında izole perfüze sıçan kalbinde ardkoşullamanın infarkt alanı azaltıcı etkisi ortadan kalktığını ve bu etkinin reperfüzyon başladıktan sonraki ilk üç dakika. N-asetilsistein uygulanmazsa görülmediğini raporlamıştır⁶⁸. İzole tavşan kalbinde doğrulanmış bu sıçan dışı bulgu⁶⁹, ROT'un ardkoşullanmış kalplerde çift taraflı rolü olduğunu önermektedir. Örneğin ardkoşullamanın koruyucu etkisinde sinyal iletici olarak ROT'u kullanırken eş zamanlı olarak, ardkoşullama zararlı ROT üretimini azaltmaktadır⁷⁰.

PKC, substrat proteinlerin serin ve treonin kalıntıların fosforilleyen kinaz gurubunun bir üyesidir. Ping ve ark. tavşan kalbinde yaptıkları çalışmada PKC'nin 11 değişik izoformunu belirlemişlerdir⁷¹. İzole perfüze sıçan kalbi⁶⁸, *in situ* tavşan kalbinde yapılan⁶² çalışmalarda miyokardiyal reperfüzyon esnasında protein kinaz C antagonisti kleritirin verilmesi ardkoşullama ile tetiklenen koruma önlediği belirtilmiştir. Bu çalışmalarda ardkoşullama ile sağlanan kardiyak korumanın bir mediyatörü olarak PKC gösterilmektedir. Ardkoşullanmış kalplerde PKC ile aktive olan mekanizma henüz aydınlatılamamıştır⁷⁰.

Dokulardan elde edilen bir grup kinaz MAPK olarak isimlendirilmiştir. Kalp dokusunda MAPK'ların, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinazlar (ERK), NH₂ terminal kinazlar/stres aktivasyonlu

protein kinazlar ve p38 mitojenle aktive edilen protein kinazlar (p38 MAPK) olmak üzere alt grupları izole edilmiştir. Sayılan MAPK alt grupları s ras yla G proteine bağlı reseptörler, iskemiye de içeren hücrel stres oluşturan faktörler ve fosfolipaz C tarafından aktive edilirler. Genel olarak MAPK'lar çekirdekte özgül genlerin transkripsiyonu ve/veya ribozomlarda gerçekleşen translasyonu stimüle edebilirler, bağırsal faktörlerin aktivasyonunu sağlayabilirler. Bu etkileriyle hedef hücrelerde proliferasyon, farklılaşma, hipertrofi, morfolojik değişimler, apoptoz ile hücre ölümünün engellenmesi, glikojen ve küçük ısı şok proteinlerinin sentezinin artırılması ve enerji metabolizmasının düzenlenmesi gibi olaylara aracılık ederler⁷².

p38 MAPK, c-Jun NHP2 terminal kinaz (JNK) 42 ve 44-kDa Erk 1/2 MAPK ve büyük MAPK1 olmak üzere MAPK kalpte 4 major protein kinaz kaskadını içermektedir. Bu kaskadlar, birçok intraselüler hücre yolaklarının aktivasyonu ile intraselüler hedeflerine ekstraselüler sinyalleri iletirler ve bir dizi hücrel protein kontrolünü sağlarlar⁷³.

Hücredeki serin-treonin kalıntıların etkileyen PKC'ye benzer şekilde, tirozin kalıntıların fosforilleyen kinaz grupları tirozin kinaz olarak isimlendirilmektedir. PKC, tirozin kinaz olan mitojenle aktive edilen protein kinaz (MEK), MAPK' fosforilasyon suretiyle aktive eder. Sonuçta oluşan MAPK, miyokardiyal iNOS aktivasyonu ile NO oluşumunu sağlar. NO, peroksinitrite dönüşerek doğrudan veya PKC'yi aktive ederek dolaylı olarak sarkolemmal ve mK_{ATP} kanallarını aktive eder⁷².

Ardkoşullama ile sağlanan kardiyak koruma, miyokardiyal reperfüzyonun ilk dakikalarında izole perfüze tavşan kalbinde Erk1/2'nin aktivasyonu ile bağlantılı bulunmuştur ve Erk 1/2'nin inhibisyonunun sonucunda ardkoşullama ile indüklenen kardiyak koruma engellenmiştir⁵⁵.

Janus kinaz transkripsiyonun aktivatörü ve sinyal iletici kinaz (Janus kinaz (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT)) yolağı stres ve sitokinler sonucu hücre yüzeyinden aldığı cevapla oluşan sinyali gen ekspresyonunun düzenlendiği çekirdeğe iletir⁷⁴. Suleman ve ark. miyokardiyal reperfüzyon esnasında STAT-3'ün farmakolojik inhibisyonu izole perfüze sçan kalbinde ardkoşullama ile sağlanan kardiyak korumayı önlediğini bildirmişlerdir⁷⁵.

K_{ATP} kanallar , hücrede ATP düzeylerinin yeteri kadar yüksek olduğu durumlarda kapalıdır. İskemi gibi kalpte ATP düzeylerini düşüren olaylarda aktive olur. Kalpteki K_{ATP} kanalları sarkolemma ve mitokondri dış zarında yerleşmişlerdir. Sarkolemmal K_{ATP} kanalların aktivasyonu, hücre içinden dışına doğru potasyum iyonunun akışını artırır. Bu etkiyle beraber voltaj bağımlı kanallardan akışın azalması sonucunda, hücre içi Ca^{++} konsantrasyonlarının düşmesi iskemik hasarı azaltır. mK_{ATP} kanal aktivasyonunun korumaya nasıl katkıda bulunduğu konusunda iki farklı görüş öne sürülmüştür. Bu görüşlerden ilki mK_{ATP} kanal aktivasyonunun mitokondride Ca^{++} aşırı yükünü engellediği ve bu etkiyle Ca^{++} 'a bağlı mitokondriyal yapılar üzerindeki muhtemel hasarı önlediği yönündedir⁷⁶. Diğer görüş ise mK_{ATP} kanal aktivasyonunun aslında bir uç efektör olmadığı, sonrasında henüz aydınlatılamamış birçok mekanizmanın tetikleyicisi olduğu şeklindedir^{77,78}. Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki; hücredeki ardkoşullama ile sağlanan kardiyak koruma mK_{ATP} kanal blokörü olduğu düşünülen 5-hidroksidekonat tarafından ortadan kaldırılabilir⁷⁹.

Fizyolojik koşullarda mitokondri iç membranı iyonlara karşı geçirgen değildir. Hücresel stres oluşturan durumlarda, mitokondri iç membranında yer alan mPTP geçirgen hale gelir ve bu durum mitokondrilerde Ca^{++} aşırı yüküne, inorganik fosfatın, serbest oksijen

radikallerinin birikimine, adenin nükleotidlerinin kaybına ve mitokondri dış membranında yığılmaya neden olur. Son yıllarda yapılan iskemi reperfüzyon çalışmalarında mPTP'nin, daha çok reperfüzyon döneminde aktif hale geldiği ve bu aktivasyonun öldürücü reperfüzyon hasarından sorumlu olduğu gösterilmiştir. Shiang ve ark. mPTP komponentinin anahtar olan siklosipin D'deki eksikliğin, iskemik ve farmakolojik önkoşullama ve ardkoşullama ile sağlanan kardiyak korumayı engelleyebileceğini savunmuşlardır⁸⁰.

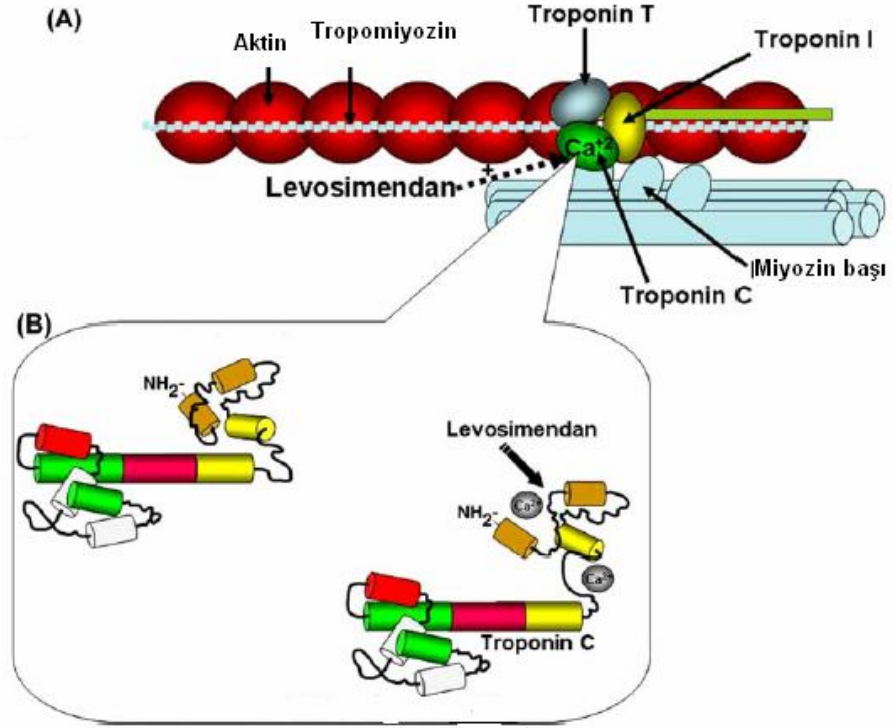
RISK yolağı, lethal reperfüzyon hasarının önlenmesi ile kardiyak koruma sağlayan, miyokardiyal reperfüzyon esnasında spesifik olarak aktive olan bir protein kinaz grubu olarak tanımlanabilir^{3,81}. Farmakolojik ajanlarla veya iskemik önkoşullama veya ardkoşullama gibi mekanik müdahalelerle RISK yolağının aktive olduğu düşünülmektedir. Buradaki kardiyak koruma mekanizması mPTP açılmasının inhibisyonuna⁸², sarkoplazmik retikulumda kalsiyum salınımının düzeltilmesine⁸³ ve antiapoptotik yolların güçlendirilmesine⁸¹ bağlanmıştır.

2.5. Levosimendan

Levosimendan akut ve dekompanse kalp yetmezliğinde kullanılan, pozitif inotropik, intraselüler kalsiyum konsantrasyonunu artırmadan⁴ kontraktıl proteinlerin kalsiyuma duyarlılaştırılması aracılığıyla miyokardiyal sersemlemeyi önleyici⁹¹, vasküler çizgili kas hücrelerinde K_{ATP} kanallarının açılma⁸⁴ yoluyla antiiskemik, koroner ve periferel vazodilatör etkili ve miyokardiyal önkoşullamayı indükleyen⁸⁵ bir ilaçtır. İskemi-reperfüzyonda levosimendanın kardiyak koruyucu etki olasılığı ilk Toit ve ark tarafından kobay kalbinde yapılan çalışma ile öne sürülmüştür. Bu çalışmada, iskemi ve reperfüzyon esnasında levosimendan uygulanan

izole perfüze kobay kalplerinde klasik pozitif inotrop ilaç olan dobutamine göre levosimendan n kalp fonksiyonla nda yaptığı iyileşmenin daha iyi olduğu gösterilmiştir⁸⁶.

Levosimendan n pozitif inotropik mekanizmas , kardiyak troponin C'ye bağlanarak miyofilamentlerin kalsiyuma duyarlılığını artırmasıyla açıklanır⁸⁷. Levosimendan, troponin C'nin N-terminal kısmına kalsiyuma bağımlı olarak bağlanır ve böylelikle kalsiyum bağlanması sonucu aktive olan troponin C'nin oluşturduğu kontraksiyonun şiddetini artırır⁸⁸. Bu durum diastolik gevşeme yanıtının bozulmadan pozitif inotrop etki göstermesini^{89,87} ve sitozolik kalsiyumun aşırı yüklenmesini engelleyerek kardiyomiyosit disfonksiyonun, aritmilerin ve hücre ölümlerinin önüne geçilmesini sağlar⁹⁰.



Şekil 3: Levosimendan'ın etki mekanizması . **(A)** Levosimendan inotropik bir ajandır. Levosimendan kasılma sırasında troponin C'ye bağlanır, miyofilamentlerin kalsiyuma duyarlılığını artırır. Bu olay kasılma sırasında miyokardın kontraktilitesini artırır, fakat diyastolik fonksiyonları etkilemez. **(B)** Levosimendan troponin C'nin aktif kısmının açılmasına öncülük eder, bu yolla da kalsiyuma duyarlılığını artırır⁵.

Potansiyel miyokardiyal sersemlemeyi ve iskemiye önleyici etki ile periferik ve koroner vazodilatasyonu indüklemektedir⁹¹. İntraselüler ADP'nin arttığı, ATP'nin ise azaldığı iskemik miyokartta, levosimendanın K_{ATP} kanallarını aktive ettiği⁹², iskemi ve/veya reperfüzyon hasarının sonuçlarından biri olan miyokardiyal sersemlemede de levosimendanın yararlı etkiler gösterebileceği sonucuna varılmıştır⁹⁰. Miyokardiyal sersemleme, muhtemelen reperfüzyonda geçici kalsiyum aşırı yüklenmesi ya da serbest radikallerin üretimi ile kalsiyuma miyofibrillerin hassasiyetinin azalması sonucu gelişir⁹³. Miyokardiyal sersemleme tablosu varolan hastalarda sistolik disfonksiyonla birlikte genellikle diyastolik

disfonksiyonda görülür. Bu nedenle levosimendan n diyastolik fonksiyonlar bozmadan sistolik fonksiyonlar düzeltme etkisi de bu hastalar açısından oldukça avantajlıdır.

Son zamanlarda ise, mK_{ATP} kanallarının üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Bu etki iskemi-reperfüzyon hasarına karşı kalbin korunması ile ilişkilendirilmiştir⁹⁴. Levosimendan n sıçan ventriküler miyositlerinde K_{ATP} 'yi aktive ettiği gösterilmiştir⁸⁴. İskemi reperfüzyon hayvan modelinde, levosimendan K_{ATP} kanallarının aktivasyonu ile infarkt alan azaltmıştır⁹⁵.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığından G. Ü. ET- 08.014 kod numaras ile etik kurul izni alınmıştır.

Deneylerde Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanlar Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM)' dan temin edilen Wistar 250-300g ağırlığında erkek sıçanlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tiyopental sodyum (ABBOTT), Simdax® (Levosimendan) (ABBOTT), Heparin, Trifeniltetrazolyum klorür (TTC) (Sigma), Formol (Sigma), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4

Krebs-Heinsleit Çözeltisi

NaCl	118,0 mM
KCl	4,5 mM
KH_2PO_4	1,2 mM
MgSO_4	1,2 mM
NaHCO_3	25 mM
CaCl_2	2.5mM
Glukoz	11 mM

3.1.3. Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Shimadzu)

Mikropipet (Eppendorff Research)

Vortex (Firlabo)

Su banyosu (NÜVE)

Langendorff cihaz (MAY LS06 seri no:3006-005)

MP 35 veri kayı t sistemi (Biopac systems,INC)

Sirkülatör (MAY WBC 3044V3)

pH metre (JENCO)

%95 O₂, %5 CO₂ içeren gaz karışım tüpü

Cerrahi malzeme (Makas, pens, bulldog)

ECG için invitro elektrod (Commat Ltd., Türkiye)

Kan Basıncı Transducer (Commat Ltd., Türkiye)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Sıçan İzole Kalp Preparatının Hazırlanması ve Ölçülen Hemodinamik Parametreler

Deney hayvanlar 50 mg/kg tiyopental sodyum (i.p.) ile anesteziye edilmiş ve femoral ven yoluyla 500IU/kg (iv) heparin verilmesini takiben toraks hızlı bir şekilde açılarak kalp çıkartılmış ve buzlu Krebs-Heinseleit çözeltisinin (pH=7,4) içerisine alınmıştır. Daha sonra izole kalp, yine hızlı bir şekilde sıcaklığı 37°C' olan ve %95 O₂, %5 CO₂ gaz karışımı ile havalandırılan Krebs-Heinseleit çözeltisi ile sabit basınçlı Langendorff

cihaz na aorttan as larak retrograd olarak perfüze edilmiştir. Krebs Henseleit rezervuar› izole organ banyosundan 100 cm yukar da olacak şekilde yerleştirilerek, perfüzyon boyunca istenilen sabit basınç (100 cm H₂O=75 mmHg) sağlanmıştır. Sol ventrikül basıncı kalbin sol ventrikülüne yerleştirilen bir lateks balon yardımıyla ölçülmüştür.

Deneyler sırasında transducer aracılığıyla perfüzyon basıncı ve sol ventrikül sistolik ve diyastolik basıncı ve iki adet elektrod yardımıyla EKG eş zamanlı olarak veri kayıt sistemi (MP 35 biopac systems, INC) yardımıyla kaydedilmiştir. Sol ventrikül gelişen basıncı (LVDP; left ventricular developed pressure); ventriküler sistolik basınç-ventriküler diyastolik basınç formülü ile hesaplanmıştır. Deney sonunda kalp hızı, +dP/dt (kontraksiyon hızının göstergesidir ve inotropizm indeksi olarak kullanılmaktadır)⁹⁶ ve -dP/dt (gevşeme indeksi olarak kullanılmaktadır)⁹⁶ hesaplanmıştır.

3.2.2. Deney Protokolü

Çalışmada üç grup deney yapılmıştır. Her bir deney grubunda 6'şar adet sıçan kullanılmıştır.

Grup 1 (kontrol): 15 dakikalık dengeleme periyodunu takiben 30 dakikalık global iskemi ve ardından 120 dakikalık reperfüzyon yapılmıştır.

Grup 2 (iskemik ardkoşullama): 15 dakikalık dengeleme periyodundan sonra 30 dakikalık global iskemi, ardından 10'ar saniyelik üç siklus halinde ardkoşullama ve 120 dakikalık reperfüzyon yapılmıştır.

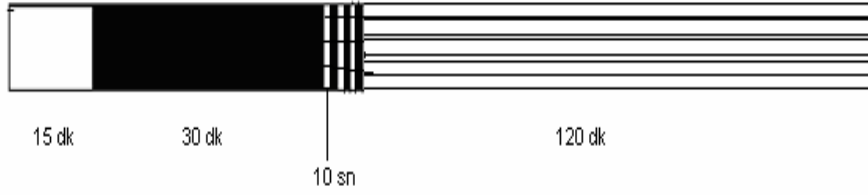
Grup 3 (levosimendan): 15 dakikalık dengeleme periyodunu takiben 30 dakikalık global iskemi ve 250 ml Krebs Henseleit çözeltisi içerisinde kalp kendi çalışma hızına bağlı olarak 10^{-7,-8,-9} mol levosimendan ile reperfüze edilmiştir. İskemiden sonra toplam reperfüzyon süresi 120 dakikadır.

Her bir deney boyunca perfüzyon basıncı, kalp hızı, SVGB kaydedilmiştir. $\pm dP/dt$; SVGB 'nin türevi alınarak MP35 veri kayıt sistemi aracılığıyla hesaplanmıştır.

Grup 1: Kontrol



Grup 2: İskemik Arkoşullama



Grup 3: Levosimendan



Şekil. 4. Deney protokolü: açık alan; perfüzyon periyodu, kapalı alan; iskemi periyodu, taralı alan; reperfüzyon periyodudur.

3.2.3. İskemi ve Ardkoşullama Oluşturulması

15 dakikalık dengeleme periyodundan sonra aorttan perfüzyon kesilerek 30 dakika süreyle global iskemi yapılmıştır. 30 dakikalık global iskemi periyodu sonunda perfüzyon açılarak 120 dakika süreyle kalpler reperfüze edilmiştir.

Ardkoşullama 15 dakikalık dengeleme periyodundan sonra 30 dakika iskemiye takiben 10'ar saniyelik global iskemi ve reperfüzyon periyodu 3 kez tekrarlanarak oluşturulmuştur ve 120 dakika reperfüzyon yapılmıştır.

Diğer gruplarda ise 15 dakikalık dengelemeden ve 30 dakikalık iskemiden sonra izole kalplere levosimendan, $10^{-7,-8,-9}$ mol konsantrasyonda Krebs Henseleit çözeltisi içerisinde verilmiştir. Tüm deney gruplarında iskemi öncesi, iskemi sonrası 30. dakika ve reperfüzyonun 120. dakikalarındaki perfüzyon basıncı, sol ventrikül basıncı değerleri karşılaştırılmıştır.

3.2.4. İnfarkt Alan Değerlendirilmesi

Trifeniltetrazolium klorür (TTC) pH'sı 7.4'e ayarlanmış, 1 L 0,1 M NaH_2PO_4 ve 2 L 0,1 M Na_2HPO_4 karıştırılarak hazırlanan, fosfat tamponunda çözülerek %1'lik çözeltisi hazırlanır.

Kalpler Langendorff düzeneğinde reperfüzyondan sonra %1'lik tetrazolyum içeren pH > 7.4 olan fosfat tamponuna 37°C'de 20 dakika süreyle maruz bırakılır. Dokuda canlılığını koruyan alanlar, TTC ile

koyu kırmızı renkte boyanırken nekrotik bölge ise soluk sarımsık renkte boyanır.

Kalpler Lagendorff düzeneğinden alınıp aliminyum folyoya sarılarak -20°C 'de dondurulduktan sonra, bistürü ile 2- 3 mm kalınlıkta olacak şekilde dilimlenir. Kalp dilimleri % 10 formol çözeltisinde boyayış fiske etmek amacıyla 30 dakika bekletilir. Boyama işlemini takiben, kalp dilimleri iki cam levhanın arasında yerleştirilir ve kenarlara takılan iki klemp yardımıyla sıkıştırılır. Camın üzerine nekrotik bölge sınırları çizildikten sonra cam üzerindeki kopya %25 oranında büyütülür. Kağıt üzerinde çizilmiş alanlar kesilip hassas terazide tartılır. İnfarkt alan; her bir kalp için $100 \times \text{infarkt alan} / \text{tüm alan}$ şeklinde hesaplanır.

3.2.5. İstatistiksel analiz

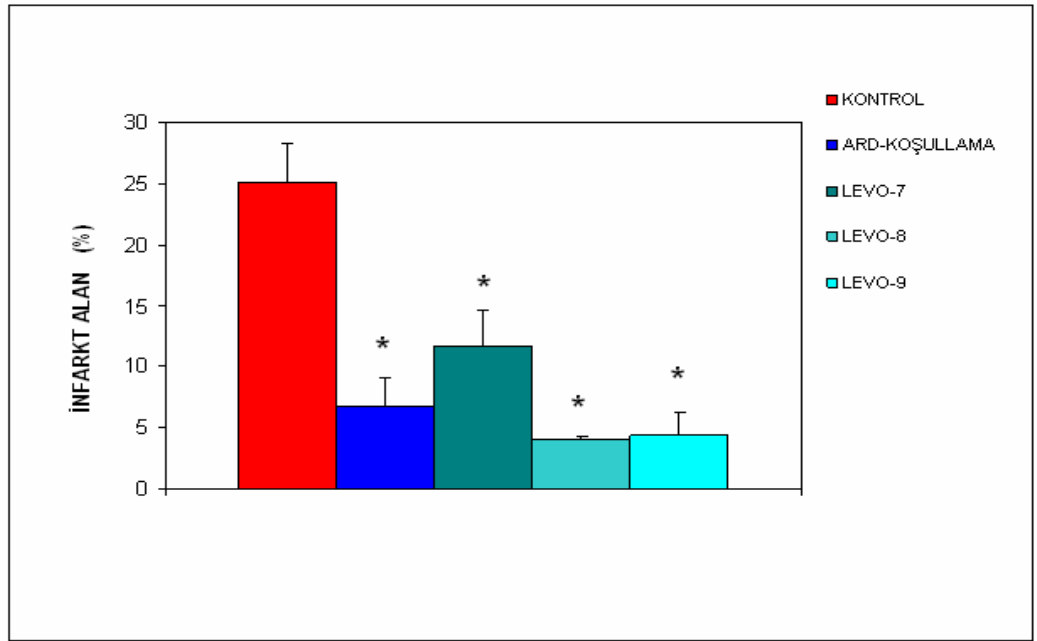
Tüm gruplarda elde edilen SVGB, SVSDB, $\pm dP/dt$, infarkt alan değerleri, ortalama \pm ortalamaların standart hata şeklinde ifade edilmiştir.

Gruplar arasındaki anlamlılık tek yönlü varyans analizi ANOVA ve post-hoc test olarak Tukey yapılarak karşılaştırıldı. $P < 0,05$ 'den küçük olan değerler anlamlı kabul edildi.

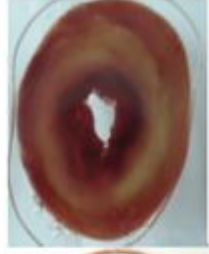
4. BULGULAR

4.1. İnfarkt alan

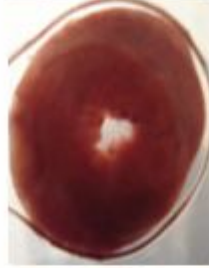
30 dakikal k iskemiye takiben 120 dakikal k reperfüzyonunun sonunda kalpler TTC ile boyanarak infarkt alan hesaplanıp yapıldı. (Şekil 6). Ardkoşullama (8.2±1.0 mg) ve levosimendan (10^{-7,-8,-9} mol) (sırasıyla 11.6±2.9, 4.0±0.3, 4.3±0.3 mg) gruplarında infarkt alanın kontrole (21.2±2.2 mg) göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur.



Şekil 5: 120 dakikal k reperfüzyondan sonra TTC ile boyanan kalplerde infarkt alan değerlendirilmesi, * Kontrol grubuna göre anlamlı, $P < 0.05$, $n = 4-7$



KONTROL



ARDKOŞULLAMA



LEVOSİMENDAN

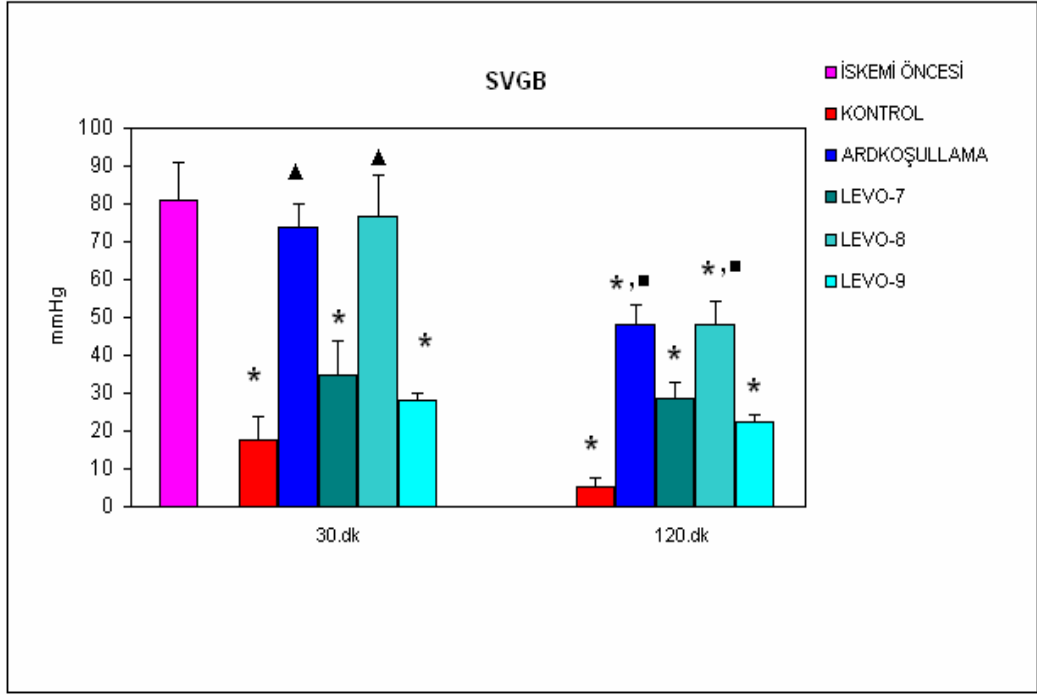
Şekil 6. Kontrol grubu, ardkoşullama ve 10^{-8} mol levosimendan uygulanan ve TTC ile boyanan s çan kalpleri.

4.2.Hemodinamik Parametreler

4. 2. 1 Sol Ventrikül Gelişen Basıncı (SVGB)

Kontrol (17.7 ± 6.2 mmHg) ve 10^{-7} , 10^{-9} mol (sırasıyla 34.5 ± 9.4 mmHg, $28,2\pm1.9$ mmHg) levosimendan uygulanan kalplerde, reperfüzyonun 30. dakikasında SVGB değerleri, iskemi öncesi (81 ± 10.1 mmHg) dönemde gözlenen SVGB değerlerine göre anlamlı olarak azalmıştır. Buna karşın reperfüzyonun 30. dakikasında iskemik ardkoşullama (73.8 ± 6.3 mmHg) ve 10^{-8} mol levosimendan (76.5 ± 11.1 mmHg) uygulanan gruplarda SVGB iskemi öncesindeki döneme göre farklılık göstermemiştir. Reperfüzyonun 30. dakika ve 120. dakikasında iskemik ardkoşullama (73.8 ± 6.3 mmHg, 48.08 ± 5.0 mmHg) ve 10^{-8} mol levosimendan (76.5 ± 11.1 mmHg, 48.2 ± 6.1 mmHg) uygulanan grup kontrol grubuyla (17.7 ± 6.2 mmHg, 5.2 ± 2.4 mmHg) karşılaştırıldığında ise anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.

Reperfüzyonun 120. dakikasında tüm gruplarda SVGB değerleri iskemi öncesine göre anlamlı olarak azalmıştır.

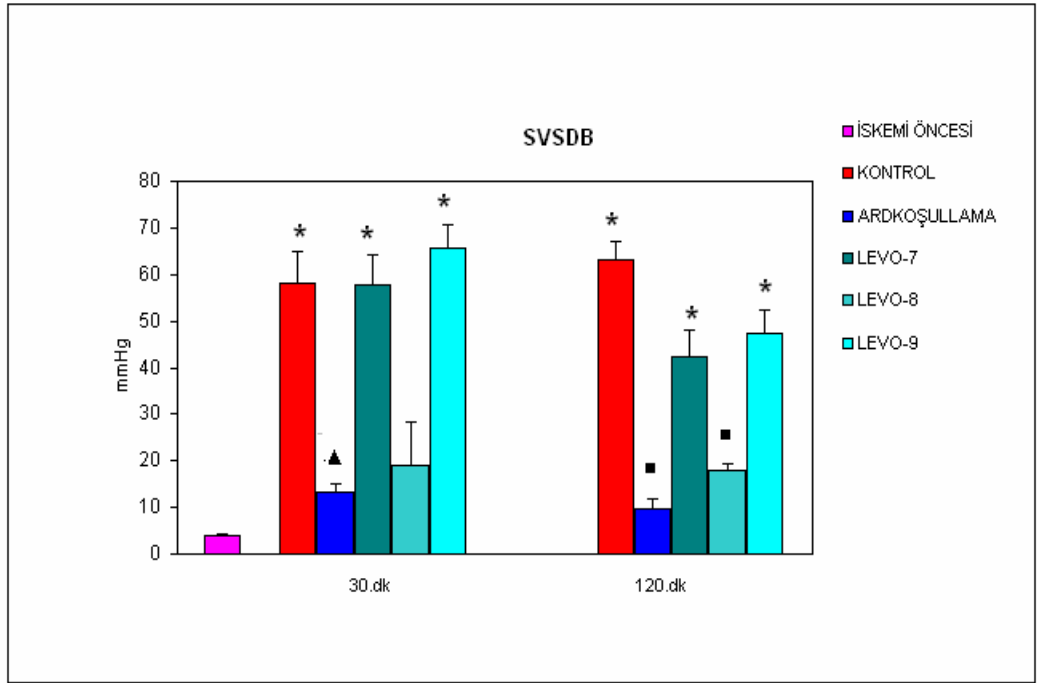


Şekil. 7. Kontrol, iskemik ardkoşullama ve levosimendanın 3 farklı (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol) konsantrasyonunun iskemi öncesi, reperfüzyonun 30 dakika ve 120. dakikalarındaki SVGB'lerinin karşılaştırılması. *İskemi öncesine göre, ▲30. dakika kontrol grubuna göre, ■ 120. dakika kontrol grubuna göre ($P < 0,05$), $n=3-6$.

4.2.2. Sol Ventrikül Son Diyastolik Basınç (SVSDB)

SVSDB değerleri kontrol grubunda (58 ± 4.0 mmHg) ve levosimendan $10^{-7,9}$ mol (58 ± 6.3 mmHg, 66 ± 5.2 mmHg sırasıyla), uygulanmış kalplerde reperfüzyonun 30. ve 120. dakikasında iskemi öncesine (5.0 ± 0.7 mmHg) göre anlamlı olarak artmıştır, yani miyokardiyal gevşemenin bu gruplarda azaldığı görülmüştür. 10^{-8} mol levosimendan ve iskemik ardkoşullamanın reperfüzyonun 30. (18.9 ± 9.3 mmHg, 9.7 ± 2.1 mmHg sırasıyla) ve 120. dakikadaki (18.0 ± 1.5 mmHg, 9.8 ± 2.1 mmHg sırasıyla) SVSDB değerlerinde iskemi öncesine göre anlamlı fark bulunmamıştır. Yani hem iskemik ardkoşullama hem de 10^{-8} mol levosimendan uygulanan gruplarda uzun süreli iskemi sonrasında

gevşeme cevaplarının korunduğu görülmüştür. Reperfüzyonun 30. ve 120. dakikalarında iskemik ardkoşullama uygulanan grup kontrole göre anlamlı olarak gevşeme sağlarken 10^{-8} mol levosimendan sadece reperfüzyonun 120. dakikasında kontrole göre anlamlı bir koruma sağlamıştır.

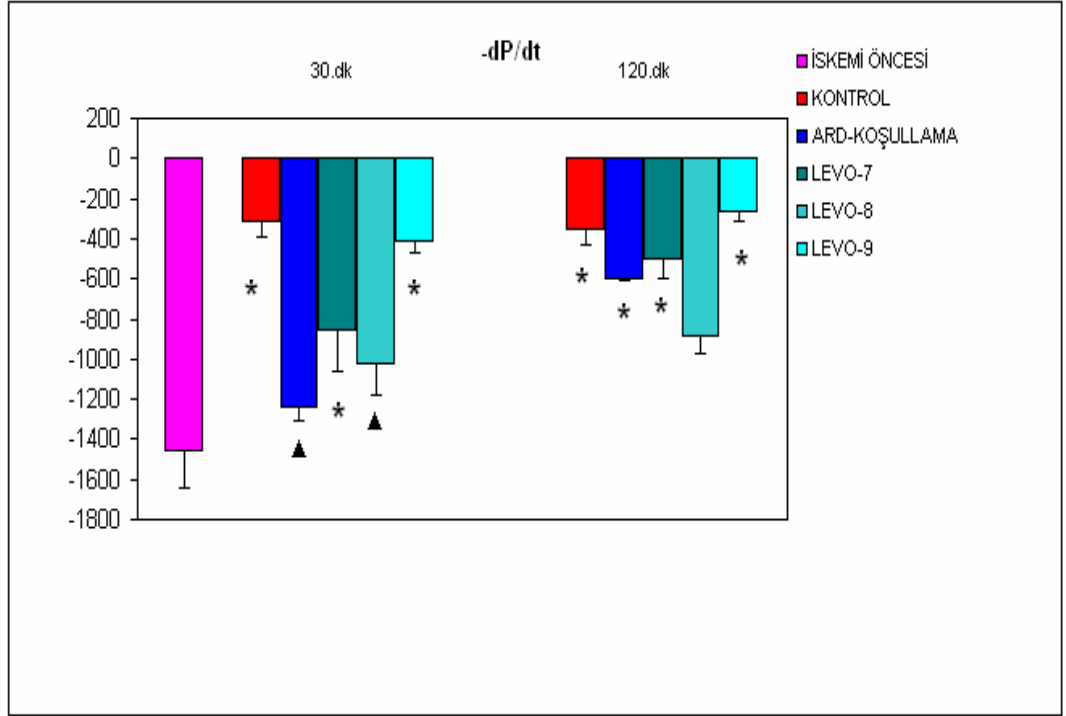


Şekil 8. Kontrol, ardkoşullama, levosimendan ($10^{-7,-8,-9}$ mol) uygulanan gruplarda 30. dakika. ve 120. dakikada kaydedilmiş SVSDB değerlerinin iskemi öncesine göre karşılaştırılması. *,İskemi öncesine, ▲30. dakika kontrol grubu, ■ 120. dakika kontrol grubu ($P<0,05$) n=3- 6

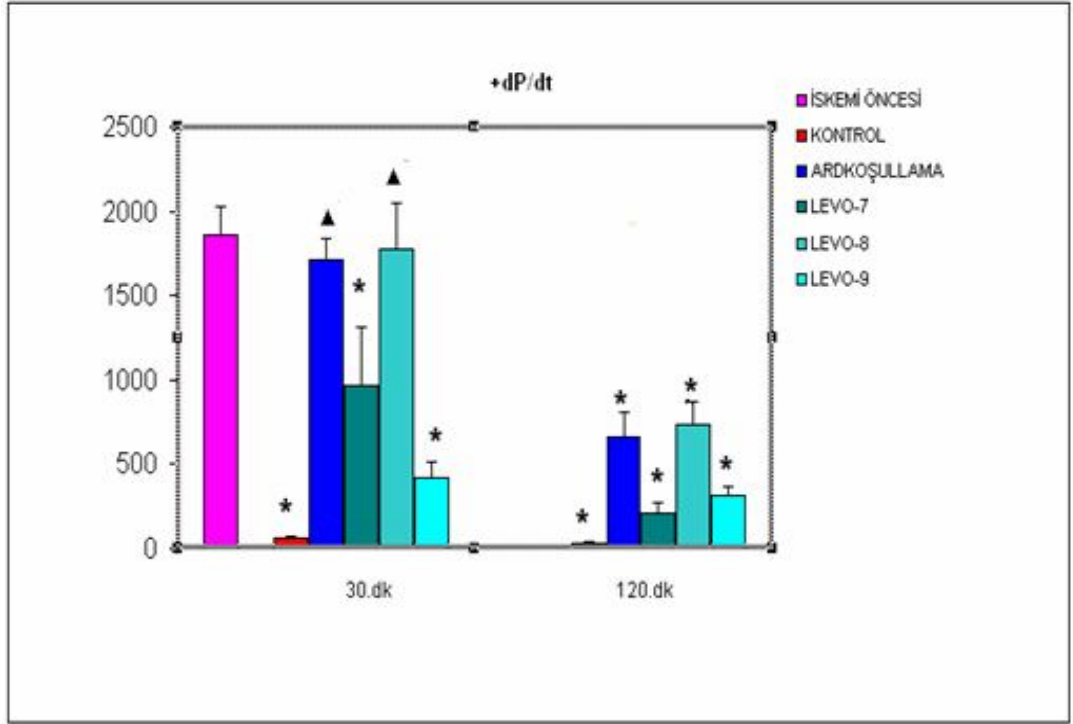
4.2.3. +dP/dt, -dP/dt Değerleri

Kontrol (-309±82.8) ve 10^{-9} mol (-412±56.2) levosimendan uygulanmış gruplarda reperfüzyonun 30. dakikas nda -dP/dt değerleri iskemi öncesi döneme göre anlamlı olarak azalmıştır. İskemik ardkoşullama (-1237±68.1) ve 10^{-8} mol (-886.3±87.4) levosimendan uygulanmış grubun 30. dakika reperfüzyon değerleri iskemi öncesine (-1459±179.1) göre anlamlı fark göstermemiştir. Ardkoşullama ve 10^{-8} mol levosimendan uygulanan gruplarda gevşeme indeksi kontrole göre anlamlı farklı bulunmuştur. Aynı zamanda reperfüzyonun 120. dakikas nda 10^{-8} mol levosimendan hariç tüm gruplarda -dP/dt anlamlı düşüş göstermiştir.

İskemik ardkoşullama (1712±125.7) ve 10^{-8} mol (1779±273) levosimendan uygulanmış grubun 30. dakikadaki +dP/dt değerleri iskemi öncesine göre anlamlı fark göstermemiştir. Yine aynı gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak kasılma indekslerinin arttığı gözlemlenmiştir. Kontrol (66.1±3.7) ve $10^{-7,-9}$ mol (969±345, 420±95.4 sırasıyla) levosimendan uygulanmış gruplarda reperfüzyonun 30. dakikas nda +dP/dt değerleri anlamlı olarak azaldığını görmekteyiz. Reperfüzyonun 120. dakikasında ise tüm grupların +dP/dt değerleri iskemi öncesine göre anlamlı olarak azalmıştır.



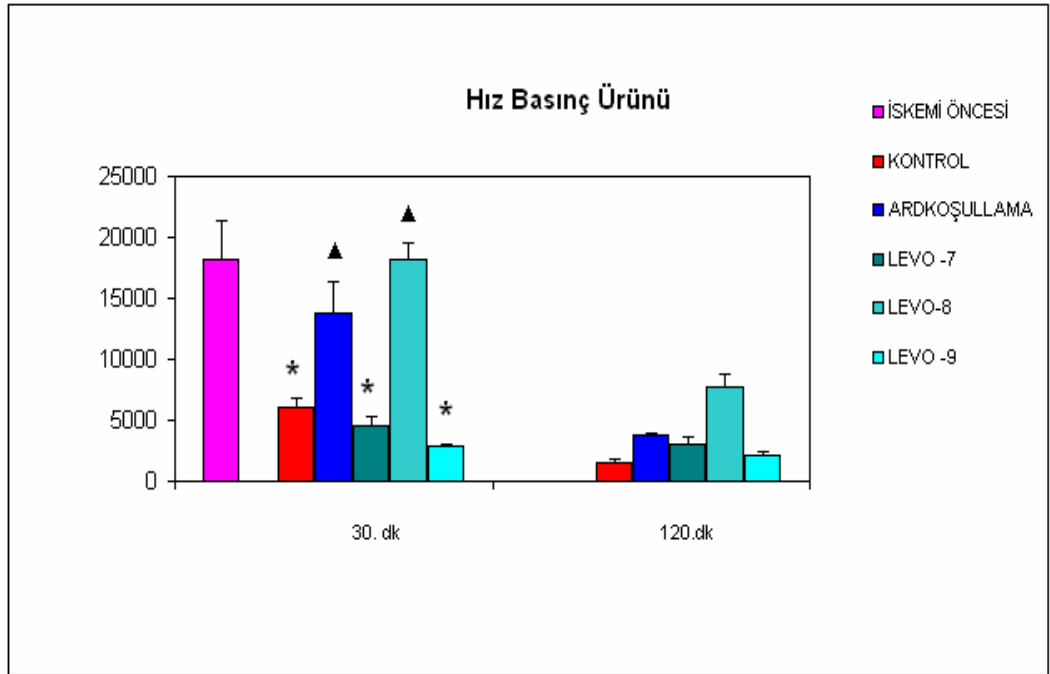
Şekil 9. Tüm deney gruplarının n 30. dakika ve 120. dakikada kaydedilmiş – dP/dt değerlerinin karşılaştırılması ve değerlendirilmesi, * İskemi öncesi ▲ 30. dakika kontrol grubu (P<0,05).n=3- 6



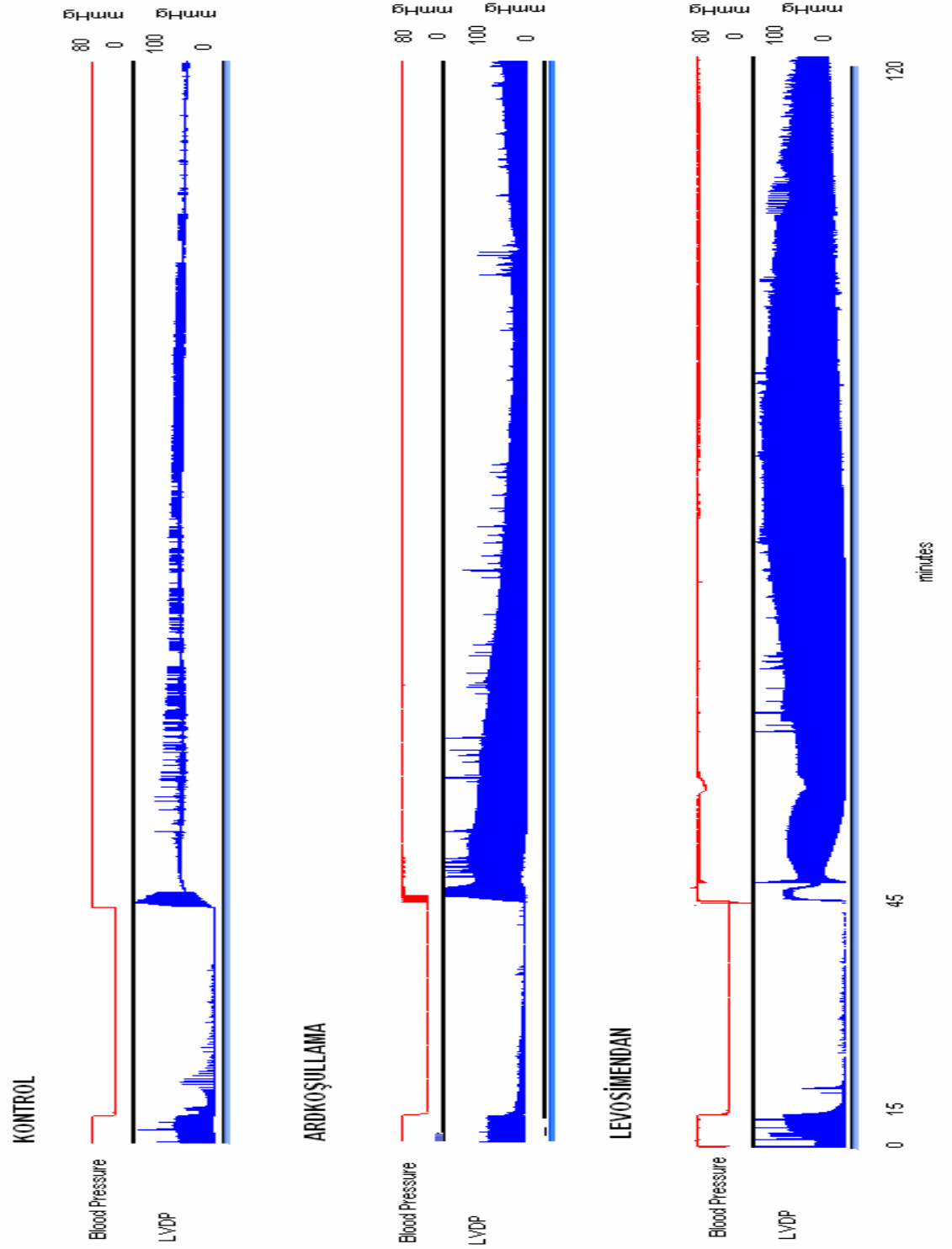
Şekil 10. Tüm deney grupları'nın 30. dakika ve 120. dakikada kaydedilmiş +dP/dt değerlerinin karşılaştırılması ve değerlendirilmesi, * İskemi öncesi, ▲30. dakika kontrol grubu (P<0,05).n=3- 6

4.2.4. Hız Basınç Çarpımı (Rate Pressure Product) (RPP)

Kontrol ve $10^{-7,-9}$ mol levosimendan uygulanmış grupların “Kalp Atım Hızı X Sistolik Kan Basınç” formülüyle hesaplanan RPP değerleri iskemi öncesi döneme göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ardkoşullama ve 10^{-8} mol levosimendan uygulanmış grubun 30. dakikada ölçülen RPP değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Yani, bu gruplar iskemi öncesine benzer bir tablo göstermiş ve miyokardı korumuşlardır. 120. dakikada ise bu grupların oluşturduğu koruma ortadan kalkmıştır.



Şekil 11. Tüm deney gruplarının 30. dakika ve 120. dakikada kaydedilmiş RPP değerlerinin karşılaştırılması ve değerlendirilmesi, * İskemi öncesi , ▲ 30. dakika kontrol grubu (P<0,05). n=3- 5



Şekil 12. MP35 kayıt sistemi yardımıyla ölçülen SVGB ve perfüzyon basıncı değerlerinin orijinal traseleri.

5. TARTIŞMA

Levosimendan, akut ve dekompanse kalp yetmezliğinde kullanılan, kontraktıl proteinlerin kalsiyuma duyarlılaştırılması aracılığıyla pozitif inotropik⁸⁸, sersemlemeyi önleyici⁹¹ ve vasküler çizgili kas hücrelerinde K_{ATP} kanallarının açılma⁹⁷ yoluyla antiiskemik etki gösteren bir ilaçtır. Bu tez çalışmasında, klinikte kalp yetmezliğinin tedavisinde kullanılan ancak miyokardiyal iskemi ve/veya reperfüzyon hasar üzerinde de yararlı etkisi olduğu düşünülen^{98,99} levosimendan ve kardioprotektif yöntemlerden biri olan iskemik ardkoşullamanın izole sıçan kalbinde infarkt alan ve hemodinamik parametreler üzerindeki etkilerini inceledik. Biz bu çalışmamızda 30 dakikalık iskemi sonrasında 10⁻⁸ mol levosimendan ve iskemik ardkoşullama uygulanan grupların kontrol kalpler ile karşılaştırıldığında miyokardiyal kontraktılite üzerinde koruyucu etkili olduğunu bulduk.

Daha önce infarkt alan değerlendirilmesiyle ilgili yapılan çalışmalarda köpek⁹⁵, tavşan⁴¹, kobay¹⁰⁰ kalplerinde, levosimendan infarkt alanı azaltarak kardiyak koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamız ise levosimendanın sıçan kalbinde infarkt alanı azalttığını gösteren ilk çalışmadır.

İskemik ardkoşullama uygulanmış *in suti* köpek⁴⁹, *invivo* sıçan⁵⁴ ve *in vitro* tavşan⁵⁰, sıçan¹⁰¹, fare¹⁰² hayvan modellerinde infarkt alanının azalması gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da, iskemik ardkoşullama yapılmış gruplarda infarkt alanının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

İskemik ardkoşullamanın koruyucu mekanizmasında yer alan ana mediyatörler ve efektörler: adenozin, nitrik oksit, K_{ATP} kanalları,

koruyucu kinazlar ve mPTP'dir. Bu mediyatörlerin biyolojik ekspresyonun, iskemi- reperfüzyon periyodlarına ve hayvan türlerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Şu ana kadar elde edilen bilgiler iskemik ardkoşullamanın, kardiyak korumada güçlü endojen bir mekanizma olduğunu göstermektedir. Çünkü iskemik ardkoşullama endotelial disfonksiyonu⁴⁹, vasküler endotelyuma nötrofillerin adezyonunu¹⁰³, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu, reperfüzyon aritmelerini¹⁰⁴, miyokardiyal ödemi¹⁰⁵ ve apoptozisi¹⁰⁶ azaltmaktadır. Ardkoşullamanın sinyal iletim ve altında yatan mekanizmaları detaylı bir şekilde anlayamamıştır¹⁰⁷. Ancak ardkoşullamanın insanlar¹⁰⁸ da dahil olmak üzere bütün türlerde infarkt alanı azalttığı doğrulanmıştır⁵³.

Bu tez çalışmasında, iskemik ardkoşullama, levosimendan uygulanmış ($10^{-7,-8,-9}$ mol) gruplarda infarkt alanın kontrole göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Kontrol ve $10^{-7,-9}$ mol levosimendan uygulanmış kalplerde, reperfüzyonun 30. dakikas nda SVGB iskemi öncesi döneme göre azalmıştır. Buna karşın reperfüzyonun 30. dakikas nda s ndaki SVGB ortalama değerleri 73.8 ± 6.3 mmHg olan iskemik ardkoşullama ve 76.5 ± 11.1 mmHg olan 10^{-8} mol levosimendan n, iskemi öncesindeki değerlerine göre azalmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.

Ardkoşullama ve 10^{-8} mol levosimendan uygulanan gruplarda reperfüzyonun 30. dakikada ki SVGB değerleri iskemi öncesine göre farklı değilken, reperfüzyon 120. dakikas nda anlamlı olarak azalmıştır. Bu durum da bize ardkoşullama ve 10^{-8} mol levosimendan n kardiyak koruyuculuğunun reperfüzyonun erken döneminde belirgin olabileceğini göstermiştir.

Kontrol ve $10^{-7,-9}$ mol levosimendan uygulanmış grupların RPP değerleri 10^{-8} mol levosimendan uygulanmış guruba göre düşük bulunmuştur.

SVSDB değerleri ise iskemik ardkoşullama ve 10^{-8} mol levosimendan uygulanan grupta reperfüzyonun 30. ve 120. dakikalar nda iskemi öncesi döneme göre anlamlı bir değişiklik göstermemiş ve kalbi uzun süreli miyokardiyal iskemiye karşı korumuştur. İskemik ardkoşullama ve 10^{-8} mol levosimendan uygulanmış gurubun 30. dakikada ölçülen gevşeme indeksi (-dP/dt) değerleri kontrol ve 10^{-9} mol levosimendan uygulanmış grubun değerlerine göre anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Bu da bize gösterir ki iskemik arkoşullama ve 10^{-8} mol levosimendan uygulanmış kalplerde diğer gruplara göre gevşeme cevabı daha iyidir. Yani iskemi sonrası kalpler daha iyi gevşemiştir. Miyokardiyal reperfüzyon esnas nda sarkolemmal membran hasar na ve oksidatif stresin indüklediği sarkoplazmik retikulum disfonksiyonuna bağlı olarak intraselüler kalsiyum miktarında belirgin artış olur. Bu olay kalsiyum paradoksu olarak nitelendirilir¹⁶. Artan intraselüler ve mitokondriyal kalsiyum hücrelerde hiperkontraktüre neden olmaktadır. Miyokardiyal sersemleme, reperfüzyondan sonra koroner kan akımının normal veya normale yakın olarak düzelmesine ve geri dönüşümsüz hasarın olmamasına karşın, inatç mekanik disfonksiyon olarak tanımlanabilir³⁰. Miyokardiyal sersemlemeyi aç klayan mekanizmalar oldukça karmaşıktır. Ancak reperfüzyonun direkt sonucu olan ROT üretimi ve intraselüler kalsiyumun aşırı yüklenmesi bu patolojinin ana sebepleridir^{32, 34}. İskemi esnasında, meydana gelen bir diğer patolojide aritmilerin oluşmasıdır²⁹. Reperfüzyon sonrası aritmilerin oluşmasında potasyum artışı önemli rol oynar³⁹.

Ardkoşullamanın miyokard üzerinde koruyucu etkisi olduğu gösteren ilk çalışma Zhao ve ark.⁴⁹ köpek kalbinde yaptıkları çalışmadır.

Bu çalışmada ardkoşullama uygulanan köpek kalbinde SVSDB, -dP/dt, +dP/dt reperfüzyon süresince ölçülen değerleri iskemi öncesi döneme göre anlamlı fark göstermemiştir. Bu çalışmadan elde edilen SVSDB sonuçları bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Aynı zamanda Haikala ve ark. 1995 yılında kobay papiller kasında yaptıkları çalışmada, klasik pozitif inotropilerden farklı olarak levosimendanın gevşeme zamanını değiştirmeden kontraksiyon üzerinde pozitif etkili olduğu sonucuna ulaşmışlardır¹⁰⁹. Bizim çalışmamızda da 10^{-8} mol levosimendan uygulanan grupta, gevşemenin göstergeleri olan SVSDB ve -dP/dt değerlerinin reperfüzyonun 30. dakikasında iskemi öncesi döneme göre anlamlı olarak değişmediği görülmüştür.

İskemi uygulanmayıp sadece 10^{-8} mol levosimendan uygulanmış grubun SVGB değerlerine baktığımızda SVGB değerlerinde 30. dakikada %38'lik bir artış görülmüştür. Kontrol grubunda ise SVGB değerlerinde iskemi öncesine göre %37.5 civarında bir azalma olmuştur. İskemi yapıp 10^{-8} mol levosimendan uygulanan grupta ise, kontrol grubundaki bu azalma ortadan kalkmış ve SVGB iskemi öncesi dönemdeki değerlere dönmüştür. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere levosimendan reperfüzyon hasarı üzerinde koruyucu etki göstermiştir.

Pinheiro ve ark. sıçan kalbinde yaptıkları çalışmada¹¹⁰ 10/10 saniye algoritma ile yapılan ardkoşullama grubunda reperfüzyonun yirminci dakikasında ölçülen kasılman n indeksi (+dP/dt) değeri bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuca benzer bir şekilde kontrole göre iyileşmiştir. Yine bizim çalışmamızı destekler şekilde Tamareille S ve ark. 2009 yılında sıçan kalbinde yaptıkları çalışmada¹¹¹ SVGB değerleri kontrole göre ardkoşullama uygulanan grupta artmıştır. Başka bir izole sıçan ardkoşullama kalp modeliyle yapılan çalışmada ise RPP ve SVSDB değerlerinde kontrole göre anlamlı iyileşme olduğu gösterilmiştir¹¹².

Modern ve etkili terapötik yaklaşımlar akut koroner sendrom ve akut miyokard enfarktüsünün sonuçlarını ve gidişatını iyileştirmektedir. İskemi reperfüzyon hasarının patogeneğinde yer alan temel mekanizma enerji metabolizmasının baskılanması, oksidatif hasarın artması ve kalsiyum homeostazının değişmesidir. Deneysel çalışmalarda iskemi-reperfüzyon hasarının tedavisi ve önlenmesi için birçok ilaç ve yöntem denenmektedir. Yapılan bu deneyler sonucunda, kalsiyum duyarlılaştırıcı ajan olan levosimendanın, iskemi-reperfüzyon hasarı üzerinde koruyucu olabileceği düşündürülen sonuçlara varılmıştır⁹⁸. İzole edilmiş hayvan kalpleriyle yapılan deneysel çalışmalarda⁸⁶ ve akut miyokardiyal iskemi sonucu anjioplasti sonrası hastalarda levosimendan uygulaması ile iskemi ve reperfüzyonu takiben kardiyak fonksiyonların iyileştiği bildirilmiştir¹¹³.

Meyer ve ark. izole tavşan kalbinde yaptıkları çalışmada plasebo⁸⁵ grubuyla karşılaştırıldığında levosimendanın (0.75µmol) reperfüzyon esnasında hemodinamik parametreler üzerinde belirgin bir iyileşme oluşturduğunu göstermiş ve levosimendanın kalbi koruduğu ve kardiyak cerrahi sonrası fonksiyon kaybı olan kalpleri tedavi etmek için uygun olduğu sonucuna varmışlardır.

Literatürde daha çok levosimendanın iskemi öncesi uygulanması ve önkoşullayıcı etkisi üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Levosimendanın ardkoşullama oluşturma potansiyeline dair yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur. Bunlardan biri, Toit ve ark. izole kobay kalbinde levosimendan ile indüklenen ön ve ardkoşullamada RISK yolağının ve K_{ATP} kanallarının rolünü inceleyen çalışmasıdır. Bu çalışmada, kobay kalbinin levosimendan ile ön ve ardkoşullanabileceği, levosimendanın tedavi öncesi kullanımının infarkt alan azaltmada etkili bir yol olduğu, K_{ATP} kanal blokerleri ile koruyucu etkinin ortadan kalacağı

gösterilmiştir¹⁰⁰. Başka bir çalışmada ise, Busk ve ark. domuz kalbinde miyokardiyal infarktüstten önce ve sonra levosimendan tedavisinin iskemi öncesi ve reperfüzyon dönemlerinde kalbin mekanik fonksiyonların iyileştirdiğini gözlemlemiştir¹¹⁴. Levosimendan n kalsiyumun hücre içine alınmasını artırarak kontraktil proteinlerin kalsiyuma duyarlılığını artırarak etki gösterdiği kanıtlanmıştır⁵.

Hipoksik veya iskemik miyokarda oluşan intrasellüler asidoz ve troponin I'in cAMP'ye bağlı fosforilasyon artışı nedeniyle ortamda bulunan kalsiyum miyofibriller tarafından yeterince kullanılamaz. Çeşitli inotropik ajanlarla kalsiyum düzeyinin artırılması ise kontraktilite artışından ziyade, aşırı kalsiyum yüklenmesi ve doku hasarına neden olabilir⁹⁸. Bu nedenle teorik olarak miyokardiyal kontraktiliteyi artıran kalsiyuma duyarlılığının artırılması ideal bir terapötik yaklaşım gibi görünmektedir.

6.SONUÇ

Bu çalışmada iskemik ardkoşullamanın ve kalsiyum duyarlılaştırıcı pozitif inotrop bir ajan olan levosimendanın değişik dozlarda iskemi reperfüzyon hasarı üzerinde koruyucu rolünün olup olmadığını inceledik.

Çalışmalarımız sonunda SVGB, SVSDB, $\pm dP/dt$ değerleri incelendiğinde, 30 dakikalık iskemi sonrasında, 10^{-8} mol levosimendan ve iskemik ardkoşullama uygulamasının, iskemi öncesine ve reperfüzyonun 30. dakika kontrol değerlerine göre miyokardiyal kontraktilite üzerinde anlamlı iyileşme sağladığı görülmüştür. Reperfüzyonun 120. dakikasında ise SVSDB ve SVGB değerlerinin 120. dakikada kontrole göre anlamlı olarak düzeldiği bulunmuştur.

İnfarkt alan bulguları ise levosimendan ve iskemik ardkoşullama grubunun miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında kardiyak koruyucu etkili olduğunu desteklemektedir.

Ardkoşullamanın koruyucu mekanizmasının en önemli özelliği önkoşullamadan farklı olarak iskemi öncesi değil, iskemi sonrasında müdahale gerektiriyor olmasıdır. Bu sebeple ardkoşullama klinikte uygulanabilir bir yöntemdir. Ardkoşullama, kardiyoplejik arrestten sonra, önkoşullamanın zor veya imkansız olduğu durumlarda, akut iskemi esnasında, kalp naklinde koruyucu olarak uygulanmaktadır¹⁰.

7.ÖZET

Yapılan tüm deneylerde, infarkt alan ve MP35 kayıt sistemiyle ölçülen hemodinamik parametreler (SVSDB, SVGB, $\pm dP/dt$) kendi deney grupları arasında değerlendirilerek karşılaştırılmıştır. İzole sıçan kalplerinden elde edilen deney grupları iskemik ardkoşullama ve 30 dakikalık iskemi sonrası levosimendan ($10^{-7,-8,-9}$ mol) ile perfüzyon işlemine ayrı ayrı tabi tutulmuştur.

Sıçanlar tiyopental sodyum ile anesteziye edildikten sonra toraks hizla açılarak kalp buzlu Krebs-Heinseleit çözeltisi içerisine alınarak hızlıca Langendorff sistemine asılmıştır. SVGB kalbin sol ventrikülüne yerleştirilen lateks balon yardımıyla ölçülmüştür. 15 dakikalık dengelenme periyodundan sonra ayrı gruplar halinde levosimendan ile ($10^{-7,-8,-9}$ Mol) perfüze edilmiş ve iskemik ardkoşullama uygulanmıştır. İskemi sonrasında reperfüzyonun 30. ve 120. dakikalarındaki hemodinamik parametreleri incelenmiştir. Kalp dokular TTC ile boyanarak infarkt alan tayini yapılmıştır. İskemik ardkoşullama ve 10^{-8} mol levosimendan uygulanan gruplarda SVGB, SVSDB ve $\pm dP/dt$ reperfüzyonun 30. dakikasında iskemi öncesindeki döneme yakın değerlerdeyken, 120. dakikada anlamlı olarak azalmıştır. Buna karşılık SVGB ve SVSDB değerleri kontrole göre anlamlı fark göstermemiştir. İskemik ardkoşullama ve levosimendan ($10^{-7,-8,-9}$ mol) uygulanmış tüm gruplarda infarkt alanının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar; levosimendanın ve iskemik ardkoşullamanın, miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı üzerinde kardiyak koruma sağlayabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Levosimendan, Miyokardiyal İskemi, Langendorff

8.SUMMARY

In all experiments, the infarct size and hemodynamic parameters (LVDP, LVEDP, $\pm dP/dt$), measured by MP35 recording system, were evaluated and compared among their experiment groups. These groups that were obtained from isolated rat hearts were exposed individually to ischemic postconditioning and reperfusion with levosimendan after a 30-minute period of ischemia.

Firstly, Wistar rats were anaesthetized with thiopental sodium and hearts were put into solution after thorax was immediately opened. Finally, the hearts were mounted on the Langendorff system quickly. Left ventricular pressure was measured with a water-filled balloon. After a 15 minute stabilisation period, the hearts were performed by ischemic postconditioning and reperfused by levosimendan with different groups. After ischemia, the hemodynamic parameters were examined at 30th and the 120th minutes of reperfusion. The heart tissues were dyed with TTC for infarct size measurement.

It was also observed that LVDP, LVEDP and $\pm dP/dt$ results of reperfusion at 30th minute were similar to the pre-ischemia period in the groups in which ischemic postconditioning and levosimendan were performed. However at the 120th minute period, the results were reduced in the same groups. No statistically significant difference was observed in LVDP and LVEDP results of both 30th and 120th minute period. The infarct size was significantly reduced in levosimendan and ischemic postconditioning groups compared to the control group.

The results showed that, levosimendan and ischemic postconditioning may provide cardioprotection over the myocardial ischemia reperfusion injury.

Keywords: Levosimendan, Myocardial ischemia, Langendorff

9. KAYNAKLAR

1. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007; 59: 418- 458.
2. Vinten-johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ. Postconditioning A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2005;100:295- 310.
3. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61: 448- 60.
4. Koumallos N, Antoniadis C, Tousoulis D, Shirodaria C, Stefanadis C. Levosimendan: a novel agent in heart failure. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2006; 1(2):185- 191.
5. Pollesello P, Ovaska M, Kaivola J, Tilgmann C, Lundström K, Kalkkinen N, Ulmanen I, Nissinen E, Taskinen J. Binding of a new Ca²⁺ sensitizer, levosimendan to recombinant human cardiac troponin C. A molecular modelling, fluorescence probe, and proton nuclear magnetic resonance study. *J Biol Chem* 1994; 269(46): 28584- 28590.
6. Downey JM, Heusch G. Sequence of Cardiac Activation and Ventricular Mechanics. In: Sperelakis N, Kurachi Y, Cohen MV, Terzic A, editors. *Heart Physiology an Pathophysiology*. fourth ed. U.S.A: Elsevier; 2001: 3- 18.
7. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji Cep Kitabı Solakođlu Z(Çev)*, 10. Basım, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2003.
8. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji Çavuşoğlu H, Çađlayan Yeđen B, Aydın Z, Alican İ.(Çev)*, 9.Basım, İstanbul: NobelTıp Kitapevleri; 1996.
9. Vardar SA, Kaymak K, Altun A. Kalp kasının kasılmasında kalsiyum ve sarkoplazmik retikulumun rolü. *T Klin J Med Sci* 2002; 22: 630- 634.
10. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med* 2007; 357:1121- 1135.
11. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: Underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis* 2009; 204(2): 334- 341.
12. Şahna E, Deniz E, Aksulu HE. Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasar ve melatonin. *Anadolu kardiyol Derg* 2006; 6: 163- 168.
13. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960; 70: 68- 78.
14. Follette DM, Fey K, Buckberg GD. Reducing postischemic damage by temporary modification of reperfusate calcium, potassium, pH and osmolarity. *J ThoracCardiovasc Surg* 1981; 82: 221- 38.
15. Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword?. *J Clin Invest*. 1985;76(5): 1713- 1719.

16. Çağlı K, Özeke Ö, Aras D, Çağlı K. Miyokardiyal Reperfüzyon Hasarı. *Türk J Cardiol* 2007;10: 131- 140.
17. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 339- 341.
18. Aka AS, Sargın M. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Turkiye Klinikleri J Kardiyovasküler Cerrahi* 2004;5(3): 202- 206.
19. Kloner R. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol* 1993;21: 537- 545.
20. Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Der* 2008; 35: 211- 215.
21. Aksulu HE, Ercan ZS, Türker RK. Further studies on the antiarrhythmic effects of iloprost. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1985; 277: 223- 234.
22. Bolli R, Becker L, Gross G, Mentzer R Jr, Balshaw D, Lathrop DA; NHLBI Working Group on the Translation of Therapies for Protecting the Heart from Ischemia. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ Res* 2004; 95(2): 125- 34.
23. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C Jr, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990; 82: 2- 12.
24. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 860- 78.
25. Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation* 1998;97: 795- 804.
26. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 291- 300.
27. Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart: evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* 1988; 263: 1353- 57.
28. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res* 2000; 86: 117- 118.
29. Tennant R, Wiggers CJ. The Effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol* 1935; 112: 351- 361.
30. Bolli R. Mechanism of myocardial stunning. *Circulation* 1990; 82: 723- 738.
31. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975; 56: 978- 985.
32. Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca²⁺ activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J Clin Invest* 1987; 79(3): 950- 61.

33. Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EL, McCay PB. Marked Reduction of Free Radical Generation and Contractile Dysfunction by Antioxidant Therapy Begun at the Time of Reperfusion. *Circ Res* 1989;65: 607- 622.
34. Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 1989; 80(4): 1049- 1062.
35. Rahimtoola SH. Concept and evaluation of hibernating myocardium. *Annu Rev Med* 1999; 50: 75- 86.
36. Schulz R, Heusch G. Hibernating myocardium. *Heart* 2000; 84(6): 587- 594.
37. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia from channels to arrhythmias *Physiol Rev* 1999; 79(3): 917- 1017.
38. Harris AS. Potassium and Experimental Coronary Occlusion. *Am. Heart Journal* 1965; 797- 802.
39. Coronel R, Fiolet JWT, Wilms-Schopman FJG, Schaapherder AFM, Johnson TA, Gettes LS, Janse MJ. Distribution of extracellular potassium and its relation to electrophysiologic changes during acute myocardial ischemia in the isolated perfused porcine heart. *Circulation* 1988; 77(5): 1125- 1138.
40. Nakano A, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Ther* 2000; 86: 263- 75.
41. Leprán I, Pollesello P, Vajda S, Varró A, Papp JG. Preconditioning effects of levosimendan in a rabbit cardiac ischemia-reperfusion model. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 48(4): 148- 152.
42. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74(5):1124- 1136.
43. Altug S, Demiryürek AT, Kane KA, Kanzik I. Evidence for the involvement of peroxynitrite in ischaemic preconditioning in rat isolated hearts. *Br J Pharmacol* 2000; 130(1): 125- 131.
44. Richard V, Kaeffer N, Tron C, Thuillez C. Ischemic preconditioning protects against endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. 1994; 89(3):1254- 1261.
45. Reimer KA, Jennings RB. The 'wavefront phenomenon' of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979; 40: 633– 644.
46. Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, Mayer SE Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circ Res* 1981; 49: 892– 900.
47. Kaljusto ML, Mori T, Mohammad Husain Rizvi S, Galagudza M, Frantzen ML, Valen G, Vaage J. Postconditioning in rats and mice. *Scand Cardiovasc J* 2006; 40(6): 334- 341.

48. Xi L, Das A, Zhao ZQ, Merino VF, Bader M, Kukreja RC. Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice. *Circulation* 2008;118: 32- 37.
49. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: 579- 588.
50. Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol* 2005; 100: 57- 63.
51. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005; 112(14): 2143- 2148.
52. Yang X-M, Proctor JB, Cui L. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1103- 1110.
53. Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, Schulz R, Kremastinos DT, Heusch G. Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol* 2009;104(5): 469- 483.
54. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 74- 85.
55. Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(4):1618- 1626.
56. Güneş TÜ. Alt Ekstremité İskelet Kasında İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine İskemik Önkosullama Ve İskemik Ardkosullamanın Etkisinin Rat Modelinde Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi; 2006
57. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion induced injury. *Cardiovasc Res* 2006;70(2): 200- 211.
58. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation* 2007; 115: 1895- 1903.
59. Kloner RA, Rezkalla SH. Preconditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology. *Cardiovasc Res* 2006;70: 297- 307
60. Demiray S. S çanda 3-nitropropiyonik asidin hemodinamik etkilerinin ve miyokardiyal koruyucu etkisinin incelenmesi. Yüksek lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2004.
61. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, Zhao ZQ, Guyton RA, Headrick JP, Vinten-Johansen J. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 124- 133.

62. Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 308- 314.
63. Xu Z, Yang XM, Cohen MV, Neumann T, Heusch G, Downey JM. Limitation of infarct size in rabbit hearts by the novel adenosine receptor agonist AMP 579 administered at reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 2339- 47.
64. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC. Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 2005; 102(1):102-109
65. Zweier JL, Rayburn BK, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentrations in reperfused myocardium. *J Clin Invest* 1987; 80(6): 1728- 1734.
66. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). *J Mol Cell Cardiol* 1988; 12(1): 239- 249.
67. Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 2006; 281(30): 20801- 20808.
68. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol* 2006; 101(2):190- 191.
69. Downey JM, Cohen MV. We think we see a pattern emerging here. *Circulation* 2005; 111: 120- 121.
70. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Preconditioning and postconditioning: United at reperfusion. Pharmacol Ther* 2007; 116(2): 173- 191.
71. Ping P, Zhang Y, Tang XL. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res* 1997;81(3): 404- 414.
72. Ludwig LM, Weihrauch D, Kersten, JR, Pagel PS, Warltier DC: Protein kinaseC translocation and Src protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane-induced preconditioning in vivo: potential downstream targets of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reactive oxygen species. *Anesthesiology*. 2004;100(3):532- 539
73. Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 2006; 70(2): 240- 253.
74. Bolli R, Dawn B, Xuan YT. Role of the JAK-STAT pathway in protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med*. 2003; 13(2):72- 79.

75. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, Opie LH. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor- α activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation* 2005; 112(25): 3911-3918.
76. O'Rourke B. Pathophysiological and protective roles of mitochondrial ion channels. *J Physiol* 2000; 529: 23-36.
77. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(2): 649-657.
78. Garlid KD. Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol* 2000; 95(4): 275-279.
79. Pasdois P, Beauvoit B, Tariosse L, Vinassa B, Bonoron-Adèle S, Santos PD. MitoK(ATP)-dependent changes in mitochondrial volume and in complex II activity during ischemic and pharmacological preconditioning of Langendorff-perfused rat heart. *J Bioenerg Biomembr* 2006; 38(2): 101-112.
80. Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 530-535.
81. Yellon DM, Baxter GF. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med* 1999; 9: 245-249.
82. Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. Signalling via the Reperfusion Injury Signalling Kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 414-419.
83. Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res* 2006;70: 346-353.
84. Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. The novel calcium sensitizer levosimendan activates the ATP-sensitive K⁺ channel in rat ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 375-383.
85. Meyer K, Schipke JD, Klocke RC, Gams E, Korbmayer B. Inotropic, vasodilating and preconditioning actions of levosimendan in the heart. *Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 56(7): 379-385.
86. Du Toit EF, Muller CA, McCarthy J, Opie LH. Levosimendan: effects of a calcium sensitizer on function and arrhythmias and cyclic nucleotide levels during ischemia/reperfusion in the Langendorff-perfused guinea pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290(2): 505-514.
87. Haikala H, Kaivola J, Nissinen E, Wall P, Levijoki J, Linden IB. Cardiac troponin C as a target protein for a novel calcium sensitizing drug, levosimendan. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1859-1866.
88. Haikala H, Linden IB. Mechanisms of action of calcium-sensitizing drugs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: 10-19.

89. Pagel PS, Harkin CP, Hettrick DA, Warltier DC. Levosimendan (OR-1259), a myofilament calcium sensitizer, enhances myocardial contractility but does not alter isovolumic relaxation in conscious and anesthetized dogs. *Anesthesiology* 1994; 81(4): 974- 987.
90. Antoniadou C, Tousoulis D, Koumalos N, Marinou K, Stefanadis C. Levosimendan: beyond its simple inotropic effect in heart failure. *Pharmacol Ther* 2007; 114(2): 184- 197.
91. Jamali IN, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. Intracoronary levosimendan enhances contractile function of stunned myocardium. *Anesth Analg* 1997; 85(1): 23- 29.
92. De Luca L, Colucci WS, Nieminen MS, Massie BM, Gheorghide M. Evidence-based use of levosimendan in different clinical settings. *Eur Heart J* 2006; 27(16): 1908- 1920.
93. Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79(2): 609- 634.
94. Cammarata GA, Weil MH, Sun S, Huang L, Fang X, Tang W. Levosimendan improves cardiopulmonary resuscitation and survival by K(ATP) channel activation. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47(5):1083- 1085.
95. Kersten JR, Montgomery MW, Pagel PS, Warltier DC. Levosimendan, a new positive inotropic drug, decreases myocardial infarct size via activation of K(ATP) channels. *Anesth Analg* 2000; 90: 5–11.
96. Ülker S, McKeown PP, Bayraktutan U. Aprotinin impairs coronary endothelial function and down-regulates endothelial NOS in rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res* 2002; 55: 830- 837.
97. Kopustinskiene DM, Pollesello P, Saris NE. Levosimendan is a mitochondrial K(ATP) channel opener. *Eur J Pharmacol* 2001;428(3): 311- 314.
98. Garcia-Gonzalez MJ, Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P. New pharmacologic options in the treatment of acute coronary syndromes and myocardial ischemia-reperfusion injury: potential role of levosimendan. *Minerva Cardioangiol* 2007; 55(5): 625- 635.
99. Yapici D, Altuncan Z, Ozeren M, Bilgin E, Balli E, Tamer L, Doruk N, Birbicer H, Apa D, Oral U. Effects of levosimendan on myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiol* 2008; 25(1):8- 14.
100. du Toit EF, Genis A, Opie LH, Pollesello P, Lochner A. A role for the RISK pathway and K_{ATP} channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart. *Br J Pharmacol* 2008; 154(1): 41- 50.
101. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 2004; 95(3): 230- 232.
102. Heusch G, Büchert A, Feldhaus S, Schulz R. No loss of cardioprotection by postconditioning in connexin 43-deficient mice. *Basic Res Cardiol* 2006;101(4): 354- 356.

103. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Corvera JS, Morris CD, Budde JM, Thourani VH, Guyton RA. Adenosine in myocardial protection in on-pump and off-pump cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2003;75(2):691- 699
104. Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Kin H, Payne CS, Sun HY, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg* 2004; 78(3): 961- 969.
105. Tsang A, Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(1): 2- 7
106. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Jiang R, Zatta AJ. Myocardial protection in reperfusion with postconditioning. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3(6):1035- 1045
107. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: nitricoxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation* 2008;118: 1915–1919.
108. Luo W, Li B, Lin G, Chen R, Huang R. Does cardioplegia leave room for postconditioning in paediatric cardiac surgery? *Cardiol Young* 2008; 18: 282–287.
109. Haikala H, Nissinen E, Etemadzadeh E, Levijoki J, Lindén IB. Troponin C-mediated calcium sensitization induced by levosimendan does not impair relaxation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995; 25(5):794- 801
110. Pinheiro BB, Fiorelli AI, Gomes OM. Effects of ischemic postconditioning on left ventricular function of isolated rat hearts. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2009; 24(1): 31- 37.
111. Tamarelle S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croué A, Henrion D, Furber A, Prunier F. Myocardial reperfusion injury management: Erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; Elektronik bask Jul 17.
112. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res* 2006;69(1):178- 85.
113. Sonntag S, Sundberg S, Lehtonen LA, Kleber FX. The calcium sensitizer levosimendan improves the function of stunned myocardium after percutaneous transluminal coronary angioplasty in acute myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12): 2177- 21882.
114. Busk M, Maeng M, Kristensen J, Berg JS, Mortensen UM, Nielsen TT, Nielsen-Kudsk JE. Effects of levosimendan on myocardial infarct size and hemodynamics in a closed-chest porcine ischemia-reperfusion model. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006;20(5): 335- 342.

10. ÖZGEÇMİŞ

Ad	Nida
Soyad	EDEVLER
Doğum Yeri ve Tarihi	Elbistan- K.MARAŞ 15.09.1984
Eğitimi	
	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2002- 2006
	Ali Kenger Lisesi 1999- 2002
	Elbistan Anadolu Lisesi 1995- 1999
Yabancı Dili	İngilizce

Teşekkür

Yüksek Lisansım sırasında başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sayın Nurettin ABACIOĞLU'na, bölümdeki bütün hocalarıma, Prof. Dr. Sayın Tanju ÖZÇELİKAY'a ve tez dönemim boyunca benden desteğini esirgemeyen, tecrübeleri ile her türlü yardımda bulunan tez danışmanım **Doç. Dr. Sayın Nilüfer N. TURAN** teşekkür ederim.

Öğrencilik hayatım ve tez dönemim boyunca benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, bana olan güvenlerini her zaman hissettiren **aileme** sonsuz teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca bana, her türlü yardımda bulunan ve destekleyen arkadaşım **Ecz. Sayın Gürkan Şahan'a** sonsuz teşekkür ederim.

Tezli yüksek lisans eğitimim boyunca, Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile beni destekledikleri için Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu –Bilim İnsanı Destekleme Başkanlığı'na teşekkür ederim.



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

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/64-6497
KONU :

29. /04 / 2009

Sayın

Doç.Dr.Nilüfer TURAN DURAL
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Daha önce onay alan, G.Ü.ET-08.014 kod numaralı "*Levosimendanın Miyokardial İskemide Koruyucu Rolünün İncelenmesi*" adlı çalışmanız hakkında vermiş olduğunuz 09.04.2009 tarihli dilekçeniz incelenmiş olup, Başkanlığımızca uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı