

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

**KRONİK NİTRİK OKSİT SENTAZ İNHİBİSYONU  
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA MELATONİNİN KAN  
BASINCI VE MİYOKARDİYAL İSKEMİ-REPERFÜZYONA  
BAĞLI İNFARKT ALANINA ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ESRA DENİZ**

**ELAZIĞ-2005**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Hakkı Engin AKSULU.

Anabilim Dalı Başkanı

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

Yrd. Doç. Dr. Engin ŞAHNA

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Hakkı Engin AKSULU

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Doç. Dr. Nevin İLHAN

Doç. Dr. Bayram YILMAZ

Yrd. Doç. Dr. Engin ŞAHNA

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimleri ile bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Engin ŞAHNA' ya ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hakkı Engin AKSULU' ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalına teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Esra DENİZ

## KISALTMALAR LİSTESİ

|                                   |                                                                               |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>NO</b>                         | Nitrik Oksit                                                                  |
| <b>NOS</b>                        | Nitrik Oksit Sentaz                                                           |
| <b>eNOS</b>                       | Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz                                                |
| <b>nNOS</b>                       | Nöronal Nitrik Oksit Sentaz                                                   |
| <b>iNOS</b>                       | Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz                                              |
| <b>L-NAME</b>                     | N <sup>G</sup> -nitro-L-arjinin metil ester                                   |
| <b>L-NMMA</b>                     | N <sup>G</sup> -monometil-L-arjinin                                           |
| <b>L-NNA</b>                      | N <sup>ω</sup> -nitro-L-arjinin                                               |
| <b>İ/R</b>                        | İskemi/reperfüzyon                                                            |
| <b>EDHF</b>                       | Endotelden derive olan hiperpolarize edici faktör                             |
| <b>PGI<sub>2</sub></b>            | Prostasiklin                                                                  |
| <b>TXA<sub>2</sub></b>            | Tromboksan A <sub>2</sub>                                                     |
| <b>PGH<sub>2</sub></b>            | Prostaglandin H <sub>2</sub>                                                  |
| <b>Ach</b>                        | Asetilkolin                                                                   |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>  | Süperoksit anyonu                                                             |
| <b>Ag-I</b>                       | Anjiyotensin-I                                                                |
| <b>Ag-II</b>                      | Anjiyotensin-II                                                               |
| <b>SOD</b>                        | Süperoksit dismutaz                                                           |
| <b>ONOO<sup>-</sup></b>           | Peroksinitrit                                                                 |
| <b>LDL</b>                        | Düşük dansiteli lipoprotein                                                   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Hidrojen peroksit                                                             |
| <b>NADH/NADPH oksidaz</b>         | Nikotinamid adenin dinükleotid /Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz |
| <b>BH<sub>4</sub></b>             | Tetrahidrobiopterin                                                           |

|                                |                                             |
|--------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>XO</b>                      | Ksantin oksidaz                             |
| <b>MDA</b>                     | Malondialdehit                              |
| <b>ROS</b>                     | Reaktif oksijen türleri                     |
| <b>OH•</b>                     | Hidroksil radikali                          |
| <b>KAT</b>                     | Katalaz                                     |
| <b>GPx</b>                     | Glutasyon peroksidaz                        |
| <b>GRd</b>                     | Glutasyon redüktaz                          |
| <b>GSH</b>                     | İndirgenmiş glutasyon                       |
| <b>GSSG</b>                    | Okside glutasyon                            |
| <b>PMN</b>                     | Polimorfonükleer lökosit                    |
| <b>IL</b>                      | İnterlökin                                  |
| <b>LT-B4</b>                   | Lökotrien B4                                |
| <b>PAF</b>                     | Platelet Aktive Edici Faktör                |
| <b>PG</b>                      | Prostaglandin                               |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Tümör Nekrozis Faktör- $\alpha$             |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> | Nükleer transkripsiyon faktör               |
| <b>eNOS-KO</b>                 | eNOS knock-out                              |
| <b>SCN</b>                     | Suprakiazmatik nükleus                      |
| <b>NAT</b>                     | N-asetil transferaz                         |
| <b>HOMT</b>                    | Hidroksiindol-o-metil transferaz            |
| <b>ML</b>                      | Melatonin reseptörü                         |
| <b>PARS</b>                    | Poli ADP-riboz sentaz                       |
| <b>5MCA-NAT</b>                | 5-methoxy-carbonylamino-N-acetyl-tryptamine |
| <b>G-6-PD</b>                  | Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz                |
| <b>5-MAFK</b>                  | 5-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine       |
| <b>ICAM</b>                    | Hücreler arası adezyon molekülü             |
| <b>KKH</b>                     | Koroner kalp hastalığı                      |
| <b>OKB</b>                     | Ortalama kan basıncı                        |
| <b>SKB</b>                     | Sistolik kan basıncı                        |
| <b>DKB</b>                     | Diyastolik kan basıncı                      |
| <b>TTC</b>                     | Trifenil tetrazolyum klorid                 |
| <b>MEL</b>                     | Melatonin                                   |

|              |                                       |
|--------------|---------------------------------------|
| <b>PVC</b>   | Prematüre ventriküler kontraksiyon    |
| <b>VF</b>    | Ventriküler fibrilasyon               |
| <b>MPO</b>   | Myeloperoksidaz                       |
| <b>TUNEL</b> | TdT-mediated X-dUTP nick end labeling |

## TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                              | SAYFA |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Tablo 1.</b> Endotelial fonksiyon bozukluğu ile ilişkili durumlar .....                                   | 9     |
| <b>Tablo 2.</b> Melatoninin radikaller ve antioksidan enzimlere etkileri .....                               | 25    |
| <b>Tablo 3.</b> L-NAME ve melatonin uygulamalarının kan basıncı üzerine etkileri .....                       | 30    |
| <b>Tablo 4.</b> L-NAME ve melatonin uygulamalarının infarkt alanı üzerine etkileri .....                     | 32    |
| <b>Tablo 5.</b> L-NAME ve melatonin uygulamalarının iskemi-reperfüzyona bağlı ölüm oranlarına etkileri ..... | 34    |
| <br>                                                                                                         |       |
| <b>Şekil 1.</b> Hipertansiyon ve iskemi arasındaki ilişkinin muhtemel mekanizması .....                      | 13    |
| <b>Şekil 2.</b> Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı mediyatörleri ve muhtemel mekanizmaları .....         | 16    |
| <b>Şekil 3.</b> L-NAME ve melatonin uygulamalarının OKB üzerine etkileri .....                               | 31    |
| <b>Şekil 4.</b> İskemi-reperfüzyon uygulanan deneklerde infarkt alanı değerleri .....                        | 32    |
| <b>Şekil 5.</b> İskemi-reperfüzyon uygulanan deneklerde tüm kalp/infarkt alanı oranları.....                 | 33    |

## İÇİNDEKİLER

SAYFA

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. ÖZET .....</b>                                          | <b>1</b>  |
| <b>2. ABSTRACT.....</b>                                       | <b>3</b>  |
| <b>3. GİRİŞ.....</b>                                          | <b>5</b>  |
| <b>3.1. HİPERTANSİYON.....</b>                                | <b>7</b>  |
| 3.1.1. Hipertansiyonda endotelyumun rolü.....                 | 7         |
| 3.1.2. Hipertansiyonda nitrik oksitin rolü.....               | 9         |
| 3.1.3. Hipertansiyon-oksidatif stres .....                    | 10        |
| 3.1.4. Kronik NOS inhibisyonuna bağlı organ hasarı.....       | 13        |
| <b>3.2. MİYOKARDİYAL İSKEMİ-REPERFÜZYON.....</b>              | <b>14</b> |
| 3.2.1. İskemi-reperfüzyon hasarı.....                         | 14        |
| 3.2.1.1. Oksidatif stres.....                                 | 17        |
| 3.2.1.2. Aktif iyon pompaları.....                            | 18        |
| 3.2.1.3. Hücre infiltrasyonu ve kompleman sistem.....         | 18        |
| 3.2.1.4. Nitrik oksit.....                                    | 20        |
| <b>3.3. MELATONİN.....</b>                                    | <b>21</b> |
| 3.3.1. Melatonin sentezi, salıverilmesi ve metabolizması..... | 22        |
| 3.3.2. Etki mekanizması.....                                  | 23        |
| 3.3.3. Oksidatif stres ve melatonin.....                      | 23        |
| 3.3.4. İskemi-reperfüzyon hasarı ve melatonin.....            | 25        |
| 3.3.5. Melatoninin kan basıncını düşürücü etkileri.....       | 26        |

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>4. GEREÇ-YÖNTEM</b> .....                                                          | 27 |
| 4.1. Deney hayvanları.....                                                            | 27 |
| 4.2. Deney planı ve ilaç uygulamaları.....                                            | 27 |
| 4.3. Cerrahi uygulama: İskemi-reperfüzyon.....                                        | 28 |
| 4.4. Hemodinamik parametrelerin değerlendirilmesi.....                                | 28 |
| 4.5. Nekroz alanının ölçülmesi.....                                                   | 29 |
| 4.6. İstatistik.....                                                                  | 29 |
| <b>5. BULGULAR</b> .....                                                              | 30 |
| 5.1. Kronik L-NAME ve melatonin uygulamalarının kan<br>basıncı üzerine etkileri ..... | 30 |
| 5.2. İskemi-reperfüzyona bağlı miyokardiyal infarkt alanı<br>değerlendirmeleri .....  | 31 |
| 5.3. Ölüm oranları.....                                                               | 33 |
| <b>6. TARTIŞMA</b> .....                                                              | 35 |
| <b>7. KAYNAKLAR</b> .....                                                             | 47 |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....                                                              | 59 |

## 1. ÖZET

Nitrik oksit sentezinin ya da biyoyararlanımının azalması vazokonstriksiyona, periferik damar direncinin artmasına ve hipertansiyona neden olabilir. Hipertansiyon, ateroskleroz ve endotelyal disfonksiyon kardiyovasküler mortalite ve morbiditeyi artıran en önemli risk faktörleri arasındadır ve hipertansiyon miyokard infarktüsünün prognozunu daha da kötüleştirebilir.

Melatonin güçlü bir serbest radikal yakalayıcıdır, antioksidan etkilidir ve hücre içi aşırı kalsiyum yükünü azaltabilir. Ayrıca melatonin sempatik sinir fonksiyonunu baskılayabilir ve katekolamin salınımını azaltabilir böylece antihipertansif etki gösterebilir. Melatoninin miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında koruyuculuğunu gösteren bir çok çalışma vardır.

Bu çalışmada N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ile kronik nitrik oksit sentaz (NOS) inhibisyonu oluşturulan sıçanlarda ekzojen olarak uygulanan melatoninin kan basıncı ve miyokardiyal iskemi-reperfüzyona bağlı infarkt alanına etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Deney hayvanları kontrol, L-NAME (15 gün, 40 mg/kg, i.p.) ve L-NAME+Melatonin (L-NAME uygulamasının son 5 günü, 10 mg/kg, i.p.) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Sıçanlarda kardiyak hasar oluşturmak için sol ana koroner artere 30 dakika iskemiye takiben 120 dakika reperfüzyon yapıldı. Deney boyunca kan basıncı ve EKG değişiklikleri kaydedildi.

L-NAME uygulaması kan basıncını kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırırken, melatonin uygulaması kan basıncını anlamlı azalttı. İnfarkt alanı L-NAME grubunda kontrol grubundan daha büyüktü, fakat melatonin uygulaması infarkt alanını L-NAME grubuna göre anlamlı olarak azalttı. L-NAME grubunda iskemi-reperfüzyona bağlı ölüm oranlarındaki artış,

melatonin uygulaması ile azalma eğiliminde olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bu çalışma, bizim bilgilerimize göre, L-NAME ile NOS inhibisyonu oluşturulan sıçanlarda melatoninin kan basıncı ve iskemi-reperfüzyon hasarındaki etkinliğini gösteren ilk çalışmadır ve sonuçlar melatoninin hipertansif bireylerde de miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** L-NAME, melatonin, kan basıncı, iskemi-reperfüzyon, infarkt alanı, kalp

## 2. ABSTRACT

Reduced nitric oxide synthesis or bioavailability would lead to vasoconstriction, increased peripheral vascular resistance and may cause to hypertension. Hypertension, atherosclerosis and endothelial dysfunction are the major risk factors increasing morbidity and mortality of cardiovascular origin and worsen the prognosis of myocardial infarction.

Melatonin is a potent free radical scavenger, has antioxidant effect and may decrease the intracellular calcium overload. Furthermore, melatonin can suppress sympathetic nerve function and decrease catecholamine release so it can exhibit antihypertensive effect. There are many studies associated with the protective effects of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion injury.

This study was designed to investigate the effects of exogenous administration of melatonin on blood pressure and ischemia-reperfusion-induced infarct size in chronic nitric oxide synthase (NOS) inhibition with N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in rats. The experimental animals were divided into three groups: control, L-NAME (40mg/kg for 15 days) and L-NAME+Melatonin (10 mg/kg for last 5 days, i.p.) groups. To produce cardiac damage the left main coronary artery was occluded for 30 minutes followed by 120 minutes reperfusion in rats. Blood pressure and ECG changes were recorded during experiments.

While L-NAME administration significantly increased blood pressure compared with control group, melatonin administration significantly reduced blood pressure. Infarct size in L-NAME group was higher than control group but melatonin treatment significantly attenuated the infarct size compared with L-NAME group. While the death ratio resulted from myocardial ischemia-reperfusion increased in L-NAME group, melatonin administration decreased but this changes was not statistically significant.

According to our knowledges, this study which was demonstrated the activity of melatonin treatment on the ischemia-reperfusion injury in chronic NOS inhibition by L-

NAME in rats is the first study and the results have been suggested that melatonin may be also effective to prevent reduce ischemia-reperfusion injury in hypertensive individuals.

**Keywords:** L-NAME, melatonin, blood pressure, ischemia-reperfusion, infarct size, heart

### 3. GİRİŞ

Atmosferik bir gaz olan nitrik oksit (NO) ortam havasında, kirli havada, egzoz gazında ve sigara dumanında yoğun bir şekilde bulunmaktadır. NO, bir amino asit olan L-arjinin' den nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından sentezlenir (33). İnsan ve diğer canlı hücrelerinde 3 farklı NOS tipi tespit edilmiştir: Yapısal nitelikte olan endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) olarak isimlendirilen izoformlar kalsiyum ( $Ca^{+2}$ )/kalmodulin bağımlıdır ve ilk olarak beyinde ve endoteliumda tanımlanmıştır; uyarılabilir NOS (iNOS) formu ise makrofajlar, endotelial hücreler, hepatositler, miyokardiyum ve vasküler düz kas hücrelerinde immunolojik olarak uyarılabilir ve  $Ca^{2+}$  bağımlı değildir (69).

Güçlü bir vazodilatör olan NO çok kısa yarı ömürlüdür. Endotelial hücrelerden bazal ya da uyarılmış olarak salınır ve arteriyel kan basıncı ile kan akımının düzenlenmesinde önemli rol oynar (70). Antiagregan ve antiadeziv özellikleri de olan NO damar düz kas proliferasyonunu inhibe eder (83). Bu etkileri ile endotelial NO' in antiaterosklerotik özellikte olduğu söylenebilir.  $N^G$  monometil-L-arjinin (L-NMMA),  $N^G$ -nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) ve  $N^O$ -nitro-L-arjinin (L-NNA) gibi bazı arjinin analogları NO sentezini inhibe ederek vazokonstriksiyona ve sistemik hipertansiyona neden olurlar (36). Kronik NOS inhibisyonu sol ventrikül hipertrofisi ve miyokardiyal iskemik lezyonlar ile ilişkili arteriyel hipertansiyona neden olmaktadır (93). Kalp yetmezliği ve koroner trombozis için önemli bir risk faktörü olan hipertansiyon endotelial hasara veya endotelium disfonksiyonuna neden olduğu için kardiyovasküler sistem ile ilgili patolojilerin büyük kısmından sorumlu tutulmaktadır (22,31).

İskemik kalp hastalığı en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olarak hala güncelliğini korumaktadır. En sık görülen şekli "koroner aterosklerotik kalp hastalığı" denilen ve aterosklerotik plaklara ve vazospazma bağlı olarak miyokardı besleyen koroner kan akımının klinik ve patolojik belirti verecek kadar azalmış olduğu durumdur (63).

İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı; miyokard infarktüsü, serebral iskemi, inme, hemorajik şok, organ transplantasyonu gibi cerrahi müdahaleler ve trombolitik tedaviye bağlı oluşan patofizyolojinin temelidir (118). İ/R' a bağlı miyokard hasarı, kardiyak kontraktıl disfonksiyon, aritmiler, apoptozis ve irreverzibl miyosit hasarını içerir (27). İ/R hasarının nedeni hala spekülatif olmakla birlikte, iskemi sırasındaki elektrofizyolojik anormallikler (özellikle  $Ca^{+2}$  ve potasyum ( $K^{+}$ ) için iyonik dengesizlik) ve reperfüzyonda aşırı serbest radikal üretimi geçerli hipotezler olarak kabul edilmektedir (42). Bunlara paralel olarak koroner endotelial hücreler, lökositler, plateletler ve kardiyak miyositler de hasar oluşumunda önemli rol oynar. Reperfüzyon nötrofil adezyonu ve agregasyonunu uyarır (50). Ayrıca meydana gelen endotelial disfonksiyon, plateletler, pro-inflamatuvar sitokinler ve lökosit aktivasyonu oksidanların üretimine neden olur (18). NO koroner arter tonusunun ve miyokard fonksiyonlarının fizyolojik modülasyonunda çok önemli role sahip olmasına rağmen aşırı sentezlenen NO' in iskemik kalp hastalarında miyokardiyal disfonksiyona ve hasara katkısından dolayı zararlı etkilerinin olduğu düşünülmektedir (13).

Sirkadiyen ritimler, uyku, ruhsal durum, üreme, tümör gelişimi ve yaşlanma gibi birçok olayın biyolojik regülasyonunda rolü olduğuna inanılan melatonin pineal bezden (epifiz bezi) salınan bir hormondur. Melatonin dış çevrenin aydınlık ve karanlık olmasına göre organizmanın başta endokrin sistem olmak üzere bir çok sistemin fonksiyonundaki değişiklikleri düzenler. Melatonin hem güçlü bir radikal süpürücü hem de antioksidan özelliği ile İ/R hasarında etkili bir koruyucu olabilir (91). Serbest radikal süpürücü etkisine ek olarak, aşırı  $Ca^{+2}$  yükünü önleyerek hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyini ayarlayabilir (77,102). Melatonin iskemik dokudaki lökosit adezyonunu, platelet agregasyonunu ve lipit peroksidasyonunu azaltabilir (91). Melatoninin kan basıncını düşürebilen antihipertansif etkili bir hormon olduğu düşünülmektedir (107). Melatoninin sempatik sinir fonksiyonunu baskılayabildiği (75) ve katekolamin salınımını azaltabildiği (29) rapor edilmiştir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda melatoninin İ/R ile indüklenen infarkt alanı, aritmiler ve mortalite üzerine yararlı etkileri bildirilmiştir (96,97,100,102,108). Ancak bizim bilgilerimize göre, L-NAME ile NOS inhibisyonu oluşturulan sıçanlarda melatoninin kan basıncı ve miyokardiyal İ/R' a bağlı infarkt alanına etkileri ile ilgili bilgi mevcut değildir. Biz de bu çalışmada kronik NOS inhibisyonu oluşturulan sıçanlarda *in vivo* miyokardiyal İ/R' a bağlı meydana gelen infarkt alanını ve melatoninin etkilerini araştırmayı amaçladık.

### **3.1. HİPERTANSİYON**

#### **3.1.1. Hipertansiyonda endotelyumun rolü**

Endotelyum tüm kan damarlarının luminal yüzünü döşeyen hücre tabakası olması yanında oldukça karmaşık ve çevresel uyarılara cevap veren bir yapıdır. Endotelial hücrelerin fonksiyonel anormallikleri çeşitli hastalıkların fizyopatolojisinde önemli rol oynar. Fizyolojik şartlar altında endotelyumdan salınan kasıcı ve gevşetici faktörler denge halinde iken ateroskleroz, hipertansiyon, kronik kalp yetmezliği, koroner kalp hastalığı ve diyabet gibi çeşitli patolojik durumlarda (Tablo 1) bu denge bozulur ve kasıcı faktörlerin salınımı artarken endotelyum bağımlı gevşeme bozulur (15). Endotelyumun kan akışkanlığı, lipoprotein metabolizması, kapiller transport, anjiyogenezis, dolaşan kan elementleri ile kan damarları arasındaki karşılıklı etkileşimde ve vasküler yapıda önemli görevleri vardır. Endotelial hücreler fizyolojik ve patolojik uyarılara karşı damar düz kas hücrelerinin tonusunu ayarlar (126). Endotelyum güçlü bir antiplatelet ve vazodilatör ajan olan NO, prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) ve endotelden derive olan hiperpolarize edici faktör (EDHF) sentezi ve salınımını (23) ayrıca vazokonstriktör ve platelet agregasyonu agonisti olan tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), PGH<sub>2</sub> gibi prostanoidlerin; endotelin ve anjiyotensin-I (Ag-I) gibi vazoaktif ajanların ve muhtemelen de anjiyotensin-II (Ag-II)' in açığa çıkmasını sağlar (23,126). Endotelial hücrelerden salınan gevşetici faktörler damar tonusunu ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu modüle ederken; platelet ve monosit fonksiyonlarını, trombogenezisi ve fibrinolizisi kontrol altında

tutarlar (9). Hipoksi, humoral faktörler, basınç, gerilme ve sürtünme stresi gibi mekanik faktörler de endotelyumun fonksiyonlarını modüle etmektedir (4,86). Endotelial disfonksiyon azalmış NO üretimi ya da NO etkisini bozan kasıcı faktörlerin endotelden beraber salınımı ile birliktedir. L-NAME uygulaması sırasında yükselen kan basıncından vasküler düz kasların vazokonstriktörlere duyarlılığının artması ve vazodilatörlere duyarlılığının azalması sorumlu tutulabilir (76,86). Normal endotelyumda asetilkolin (Ach) vazodilatasyona neden olurken endotelyum hasarında Ach' e bağlı olan bu fizyolojik cevap tersine dönmektedir. Başka bir deyişle, endotelyum disfonksiyonunda vazodilatör bir uyarı vazokonstriktör uyarıya dönüşebilmektedir (67,113). Endotelyum disfonksiyonda rol oynayan birçok mekanizmanın olduğu bilinmektedir. Hipertansiyonda endotelyum hasarına bağlı olarak ortaya çıkan mediyatörler periferik damar tonusunu artırmaktadır. Ancak hipertansif olgularda endotelyum bozukluğu ile damar kas tonusunun bozulmasında hangi mediyatörün daha önemli role sahip olduğu hakkında henüz kesin bir bilgi mevcut değildir (126). Endotelyum bağımlı vazodilatasyonun varlığı ve derecesi en çok NO salınımı ile ilgilidir. NO sentezinin azalması akıma bağlı vazodilatasyonu azaltmakta iken stimülasyonu ise vazodilatasyonda belirgin bir artışa neden olmaktadır (49,113). Hipertansiyonun tedavisinde tercih edilecek ilaçların endotelyum fonksiyonları üzerinde olumlu etkisi olabilmesi için NO metabolizması üzerinde de etkili olması gerekmektedir.

## Tablo 1. Endotelial fonksiyon bozukluğu ile ilişkili durumlar (95)

- 
- Ateroskleroz
  - Hipertansiyon
  - İskemi/reperfüzyon
  - Diyabet
  - Sigara kullanımı
-

- 
- Konjestif kalp yetmezliği
  - Pulmoner hipertansiyon
  - Hiperkolesterolemi
- 

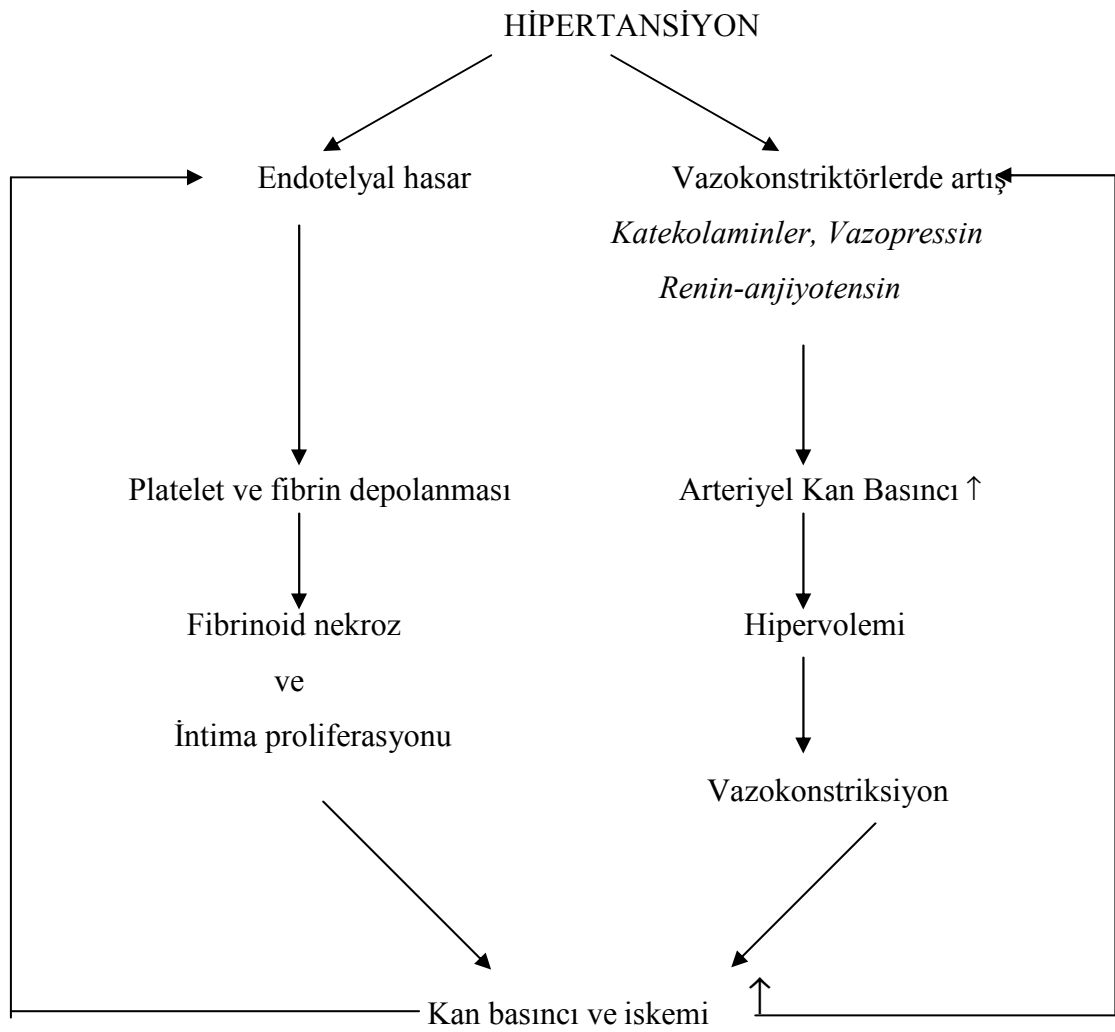
### **3.1.2. Hipertansiyonda NO' in rolü**

NO, büyük arterlerden en küçük kapiller damarlara kadar bütün endotelial dokularda vardır ve sağlam damar endotelinden bazal bir hızda üretilmektedir. Endotelden düşük düzeylerde salınan NO damar tonusunun ve arteriyel kan basıncının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. NO' in bu etkisi guanilat siklazı ve sGMP' i aktive ederek vazodilatasyon yapmasına bağlıdır ve NO salınımındaki azalma kan basıncının yükselmesine neden olmaktadır (126). NO vasküler düz kas hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eder (24,116), lökosit ve platelet adezyonunu, aktivasyonunu ve agregasyonunu azaltır (58). NO sentez yolağındaki değişiklikler endotelial fonksiyonun değerlendirilmesi açısından önemli bir ipucudur. Plazma L-arjinin düzeyinin ve NO sentezi için gerekli ko-faktörlerinin azalması, endojen NOS inhibitörleri düzeyinin, vasküler yatakta çeşitli nedenlere bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve süperoksit ( $O_2^-$ ) üretimini artırması gibi birçok faktöre bağlı olarak NO biyoyararlanımında azalma meydana gelebilir. NO sentezinin inhibisyonu ile oluşturulan akut yada kronik hipertansiyonun mekanizması tam olarak bilinmese de en çok kabul gören açıklama endotelial hücrelerde NO üretiminin yetersizliğine bağlı olarak damarların yetersiz gevşemesi ve kasılmalara abartılı cevap vermesidir (37). L-NAME gibi NOS inhibitörlerinin akut yada kronik uygulaması artmış damar direnci ile karakterize hipertansiyon oluşturur. NO antiaterojenik, antiproliferatif ve antitrombotik faktör olarak ta düşünülebilir. Bu nedenle NO sentezindeki veya biyoaktivitesindeki azalma hipertansiyon fizyopatolojisinde önemli rol oynamaktadır.

### **3.1.3. Hipertansiyon-oksidatif stres ilişkisi:**

Hipertansiyon kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür ve oksidatif stresle ilişkilidir. Artmış oksidatif stres hipertansiyonun bir sonucu olabileceği gibi hipertansiyonun nedenlerinden biri de olabilir (Şekil 1). Hipertansiyon gibi çeşitli patolojik durumlarda vasküler duvarda ROS üretimi artar (80). Endotelyal hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlar ROS üretme yeteneğine sahiptir. ROS hücre gelişimini, apoptozisi, migrasyonu, inflamasyonu modüle ederek vasküler fonksiyonu düzenler (111). Oksidatif stres sırasında artan ROS sentezi (özellikle  $O_2^-$  anyonu) NO biyoyararlanımını bozar ve endotelyal hücrelerde fonksiyon kaybına neden olur. Hipertansiyon sırasında meydana gelen endotelyal disfonksiyonun en önemli nedeni de NO biyoyararlanımının azalmasıdır. Endotelyal hücrelerdeki redoks dengesinin bozulması  $O_2^-$  üretiminde artmaya ve oksidatif strese neden olur. Bu dengenin bozukluğu sadece vasküler tonusu etkilemekle kalmaz ayrıca platelet aktivasyonu, lökosit adezyonu, vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve adezyon molekülü sentezi gibi önemli mekanizmaları da aktive edebilir. Bu mekanizmaların aktivasyonu hipertansiyon sırasında hedef organ hasarının patogeneğinde önemli rol oynar (84). ROS direkt olarak NO' i süpürür ve toksik bir radikal olan peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) oluşturur. Hipertansif bireylerde NO sentezinde yada etkisinde azalma meydana geldiği gibi, hipertansif vazokonstriksiyon serbest radikallerin NO düzeyini azaltmalarına da bağlı olabilir. Hipertansif bireylerin kan damarlarındaki oksidatif stres NOS blokajı, Ag-II tip 1 ve  $TXA_2$  reseptörlerinin aktivasyonu gibi farklı vazokonstriktör mekanizmalar ile indüklenebilir. Ag-II, Nikotinamid adenin dinükleotid/Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidazı (NADH/NADPH oksidaz) aktive ederek hipertansiyon sırasında ROS üretimine katkı sağlar (46). Bu serbest radikaller arasında hipertansiyonda en önemli etkiye sahip olan  $O_2^-$  anyonu fonksiyonları bozulmuş endotelyumdan salınır. Fizyolojik şartlarda organizmadaki  $O_2^-$  konsantrasyonu süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisine bağlı olarak oldukça düşük düzeydedir. Ancak arteriyel hipertansiyon gibi patolojik durumlarda bu radikallerin

retiminde artış olabileceği gibi SOD enzim düzeyinde de bir azalma meydana gelebilir. NO, SOD enzimi ile  $O_2^-$  anyonuna bağlanmak için yarışır; sonuçta kuvvetli bir oksidan olan ve şiddetli hücre hasarına neden olabilen  $ONOO^-$  retimi gerçekleşir (12,76).  $ONOO^-$  hcreesel proteinlerin, lipidlerin ve düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonuna neden olarak ya da direkt toksik etkisi ile vasküler fonksiyonlara zarar verebilir (7,119).  $ONOO^-$  oldukça toksik hidroksil radikaline ( $OH^\bullet$ ) de dönüşür. Bununla beraber üretilen  $ONOO^-$ 'un vazodilatasyona neden olduğu ve platelet agregasyonunu ihhıbe ettiği bildirilmiştir (72). Fonksiyon kaybına uğramış endotelden aşırı miktarda salınan serbest radikaller kasıcı ajanların sentezini de uyarabilir. Vasküler duvarda oksidatif stresin artması birçok önemli fizyolojik fonksiyonun değişmesine neden olur. Kan akımının düzenlenmesi, platelet agregasyonunun ve lökosit adezyonunun inhibisyonu ve hücre gelişiminin kontrolü oksidan streten etkilenmektedir.  $O_2^-$  ve  $ONOO^-$  yanında hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve lipid hidroperoksitleri de vasküler biyolojide önemli reaktif oksijen türleridir (55). Vasküler hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olan birçok enzim sistemi vardır. Bunlardan en emlileri; NADH/NADPH oksidaz, ksantin oksidaz (XO) ve NOS' dur. nNOS ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda bu enzimin hem L-arjinin hem de NOS ko-faktörü tetrahidrobiopterin ( $BH_4$ ) yokluğunda ROS üretebildiği gösterilmiştir (45,85). Ayrıca  $BH_4$ 'n de enzimatik olmayan yolaklarla  $O_2^-$  ürettiği ve bununla NOS' un NO retme yeteneğini azalttığı belirlenmiştir (47). zet olarak NO ve  $O_2^-$  arasındaki reaksiyonlar hipertansiyonda meydana gelen endotelial disfonksiyonunun en önemli nedeni olarak düşünülebilir. Bu amaçla serbest radikal süpürücüler ve antioksidan ajanların hipertansiyon sırasında meydana gelen oksidatif strese bağlı  $O_2^-$  üretimini önleyebileceği, bozulmuş endotelium bağımlı vazodilatasyonu ve endotelium fonksiyonunu iyileştirebileceği, inflamasyonu ve artmış olan kan basıncını azaltabileceği belirtilmektedir (111).



Şekil.1. Hipertansiyon ve iskemi arasındaki ilişkinin muhtemel mekanizması.

### **3.1.4. Kronik NOS inhibisyonuna bağlı organ hasarı**

Kronik NOS inhibisyonu sonucu gelişen hipertansiyonda uygulanan NOS inhibitörlerinin kullanım sürelerine ve dozlarına bağlı olarak kalp ve böbrekler başta olmak üzere birçok organ ve dokuda hasarlar meydana gelmektedir. Yüksek doz L-NAME uygulanan sıçanlarda hipertansiyon sonrasında süregelen kan basıncı yüksekliğinin sonucu olarak kardiyovasküler hipertrofi, rezistan damarların media kalınlığı/lümen çapı ve kalp/vücut ağırlığı oranlarında artış olmuştur (73). Kronik NOS inhibisyonu kardiyak hipertrofi ile beraber arteriyel hipertansiyona (57,66), koroner arter ve aort etrafında fibröz doku oluşumuna ve bu damarların media tabakasında hiperplaziye, sol ventrikül hipertrofisine ve miyokardda iskemik lezyonlara (6) neden olmaktadır. Spontan hipertansif sıçanlarda yapılan bir çalışmada hipertansiyona bağlı olarak kardiyak hipertrofi, miyokardiyal fibrozis, fokal miyosit dejenerasyonu ve miyokardiyal küçük arterlerde mikroarteriyopati meydana gelmiştir (3). Yine yapılan başka bir çalışmada kronik L-NAME uygulamasının kardiyak NO düzeyinde, NOS aktivitesinde, eNOS, nNOS ve iNOS proteinlerinin sentezinde, kardiyak antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaya; XO aktivitesi ve malondialdehit (MDA) düzeyinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (48).

NO' in böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesindeki rolü çok önemlidir ve bu konu ile ilgili olarak birçok çalışma yapılmıştır (35,40,94,109,123). Akut NOS inhibisyonunun şiddetli böbrek vazokonstriksiyonu ile birlikte böbrek plazma akımında belirgin bir azalmaya neden olurken glomeruler filtrasyon hızında küçük bir düşüş oluşturmıştır. NO' in renin sentezi ve sekresyonunu inhibe ettiğini bildiren çalışmalar yanında (40) renin sentezini uyardığını belirten çalışmalar da mevcuttur (109). Kronik NOS inhibisyonunun neden olduğu böbrek hasarı oldukça şiddetlidir. Klasik glomeruloskleroz, glomeruler iskemi, glomeruler nekroz, interstisyel genişleme, tubuler atrofi, vakuolizasyon; luminal oklüzyon, damar duvarının fibrinoid nekrozu ve arterler çevresinde fibröz oluşumu ile karakterize

mikrovasküler lezyonlar hipertansiyonun neden olduğu böbrek hasarının karakteristik bulgularıdır (35,94,123).

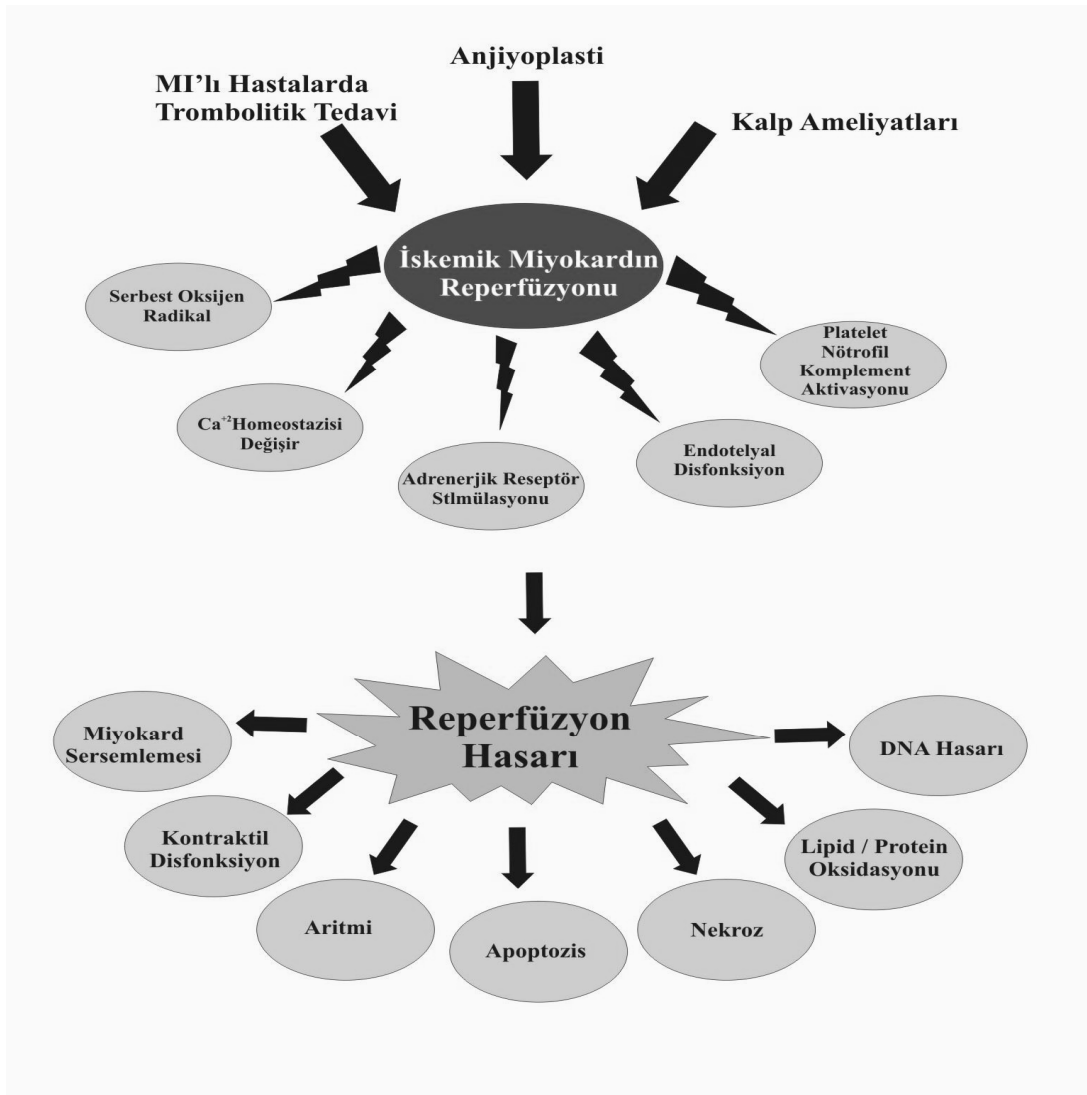
### **3.2. MİYOKARDİYAL İSKEMİ-REPERFÜZYON**

#### **3.2.1. İskemi-reperfüzyon hasarı:**

İskemik kalp hastalığının en sık görülen şekli “koroner aterosklerotik kalp hastalığı”dır ve aterosklerotik plaklara ve vazospazma bağlı olarak miyokardı besleyen koroner kan akımının klinik ve patolojik belirti verecek kadar azalmış olduğu durumdur (63). İ/R hasarı; miyokard infarktüsü, serebral iskemi, inme, hemorajik şok, organ transplantasyonu gibi cerrahi müdahaleler ve trombolitik tedaviye bağlı oluşan patofizyolojinin temelidir (118). İskemi terimi, besleyici ürünlerin azlığı ve metabolik artıkların temizlenmemesi kavramlarını gösterse de oksijen yetmezliği temel kriter faktördür. Miyokardiyal iskemi ve komplikasyonlarında tedavide gerekli müdahalelerin zamanlama ve sırasının ve uygun ajanların belirlenmesinin hayati öneme sahip olabileceği düşünülmektedir (14). İskemi sonrası kan akımının yeniden sağlanmasına reperfüzyon adı verilir. Reperfüzyon, iskemik dokunun canlılığını koruyabilmesi için çok önemlidir. Buna karşın reperfüzyon, uygun koşullarda ve zamanında yapılmadığında bir takım ciddi ve istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır. Reperfüzyon, paradoksik olarak bazı morfolojik değişikliklere, enzim yıkımının ve miyokardiyum istirahat geriliminin artması gibi hasarlara, ventriküler fibrilasyon gibi ciddi ventriküler aritmilere ve hatta henüz canlı ve kurtarılabilir durumda olan bazı hücrelerin ölümüne yol açabilir (1,16) (Şekil 2). Miyokardiyal iskemi ve komplikasyonlarının tedavisinde gerekli müdahalelerin zamanlama ve sırasının ve uygun ajanların belirlenmesi hayati öneme sahiptir (43).

Miyokard infarktüsü gibi çeşitli kardiyovasküler patolojilerde meydana gelen İ/R’ a bağlı miyokard hasarı, kardiyak kontraktıl disfonksiyon, aritmiler, apoptozis ve irreverzibl miyosit hasarını içerir (27) (Şekil 2). Bu hasarın nedeni hala spekülatif olmakla birlikte,

iskemideki elektrofizyolojik anormallikler (özellikle  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{K}^{+}$  için iyonik dengesizlik - $\text{Ca}^{+2}$  homeostazı reperfüzyon hasarının gelişmesinde önemli rol oynar) ve reperfüzyonda aşırı serbest radikal üretimi, geçerli hipotezler olarak kabul edilmektedir (42). Reperfüzyon sırasında miyokarda gelen mikrovasküler kan akımının azalması, yüksek enerji fosfatlarının tüketilmesi, kompleman sistemin aktivasyonu ve aşırı iNOS uyarımı sonucu da reperfüzyon hasarı şiddetlenebilir. Bunlara paralel olarak koroner endotelial hücreler, lökositler, plateletler, ve kardiyak miyositler de hasar oluşumunda önemli rol oynar. Reperfüzyon nötrofil adezyonu ve agregasyonunu stimüle eder (50). Ayrıca meydana gelen endotel hücre disfonksiyonu plateletler, pro-inflamatuvar sitokinler ve lökosit aktivasyonu oksidanların üretimine neden olur (18) (şekil.2).



Şekil 2. Miyokardiyal İ/R hasarı mediyatörleri ve muhtemel mekanizmaları.

*Verma S, Fedak PWM, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li RK, MD, Dhillon B, Yau TM.*

*(2002). Fundamentals of Reperfusion Injury for the Clinical Cardiologist Circulation. 105:2332-2336'*

dan değiştirilerek alınmıştır (115)

#### 3.2.1.1. Oksidatif Stres:

ROS, İ/R sırasında miyokardda hızlı bir şekilde oluşmaktadır ve İ/R hasarının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir (8). Reperfüzyonun başında mitokondriyal solunum hızı ve serbest radikal üretimi belirgin derecede artar. Bu radikaller hücre intrinsik serbest radikal yakalayıcı sistemlerin kapasitesini aşabilir ve hücrel disfonksiyona yol açabilirler. Dokuların tükettiği oksijenin büyük bir kısmı (%95) aerobik metabolizma için kullanılırken, %5'inin ROS' a çevrildiği tahmin edilmektedir. Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$ ,  $ONOO^-$  vardır. Bu radikaller; membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümü meydana getirmektedirler (91) (Şekil-2).

Mitokondriler, XO enzimi, prostaglandin (PG) biyosentezi ve inflamatuvar cevapta rol oynayan fagositler (nötrofil ve monosit) serbest radikallerin kaynağı olarak bilinirler. Bakır, demir, manganez ve molibden gibi geçiş metalleri de reaksiyonları katalize ettikleri için serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Reaktif oksijen ürünleriyle reaksiyona giren endojen bileşikler olan antioksidanlar SOD, katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GRd) ve inflamatuvar hücrelerin serbest radikal üretimini engelleyen ekzojen ajanlar (ibuprofen ve allopurinol gibi) doku hasarını azaltabilirler (64). SOD;  $O_2^-$  anyonunu daha az toksik olan  $H_2O_2$  ve  $O_2'$  e çevirir. KAT;  $H_2O_2$ 'i  $H_2O$  ve  $O_2'$  e dönüştürür. GPx; yaşamsal fonksiyona sahip diğer bir antioksidan enzimdir. Lipit ve lipid olmayan hidroperoksitlerin detoksifikasyonunu sağlar. İndirgenmiş glutatyon (GSH) varlığında  $H_2O_2'$  den  $H_2O$  ve okside glutatyon (GSSG) oluşturur. Oluşan GSSG; GRd ile tekrar GSH

oluşturmak için NADPH gerektiren siklusa girer. İskemi suresince NADPH azalır ve reperfüzyon sırasında NADPH düzeyi iskemi öncesi düzeye ulaşamaz. Bundan dolayı düşük NADPH ve yüksek GSSG konsantrasyonları, reperfüzyon sırasında GPx' in antioksidan aktivitesinin azalmasına neden olur (19).

#### **3.2.1.2. Aktif iyon pompaları:**

Reperfüzyon sırasında miyokardiyal dokularda üretilen ROS proteinler, membran lipitleri ve nükleik asitlerin oksidasyonuna yol açar, membran iyon kanallarının  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  ve sodyum ( $Na^+$ ) geçirgenliğini değiştirir. Oksidatif strese maruz kalan dokuda  $Na^+/K^+ATPaz$ ,  $Ca^{+2}ATPaz$  gibi iyon pompalarının aktivitesi azalmıştır (122). Hücrenin sürekli  $K^+$  kaybetmesi, yüksek enerjili fosfatların tüketimi, hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun artması, sistolik kan basıncının azalması, diyastolik kan basıncının artması, metabolik fonksiyonların depresyonu, aritmiler ve nekrozu kapsayan reperfüzyon hasarına neden olabilir. İ/R da hücre içine  $Ca^{+2}$  girişi artıp, çıkışı azaldığı için hücre içi  $Ca^{+2}$  homeostazı bozular. Bu etki, L-tipi  $Ca^{+2}$  kanalları aracılığıyla sarkolemal  $Ca^{+2}$  girişinin artmasıyla ya da sekonder olarak sarkoplazmik retikulum- $Ca^{+2}$  siklusundaki değişikliklerle ilişkilidir. İskemi sırasında hücrede enerji tükendiğinden sitoplazmada ve mitokondride aşırı miktarda  $Ca^{+2}$  birikmekte ve  $Ca^{+2}$ 'un toksik etki göstermesine neden olmaktadır. Fizyolojik koşullarda hücre içinde biriken fazla  $Ca^{+2}$  dışarı atılarak yada hücre içinde depolanarak tolere edilir. Ancak iskemi sırasında enerji eksikliği nedeniyle pompalar ve depolama mekanizmaları iflas eder ve artan  $Ca^{+2}$  düzeyi fosfolipazları, proteazları aktive ederek radikal ve yağ asitleri oluşumunu artırır ve hücreyi lme srkleyebilirler (44).

#### **3.2.1.3. Hücre infiltrasyonu ve kompleman sistem:**

Reperfüzyonda oksijenden başka, kan hücreleri ve kompleman sisteminin aktivasyonu gibi diğer bazı faktörler de doku hasarına yol açar. Yapılan alışmalar, tam kan reperfzyonundaki polimorfonükleer (PMN) lökositlerin de bu hasarın oluşmasında önemli

bir rolü olduğunu göstermiştir (65). Kompleman birimlerinin dolaşımında azalması iskemik dokuya nötrofil infiltrasyonunu ve doku hasarını azaltmaktadır (80). Reperfüzyonda inflamatuvar hücrelerin toplanması ve inflamatuvar mediyatörlerin salınması ile karakterize bir hücrel reaksiyon vardır. Bu durum, doku hasarının artmasına yol açmaktadır. Reperfüzyon başlangıcında meydana gelen olaylar inflamatuvar cevabın en önemli bileşenleri olan nötrofiller ve endotelyum arasındadır ve erken reperfüzyon hasarı olarak ifade edilir. İnfiltrate olan aktif nötrofiller, reaktif oksijen radikalleri ve proteazları salgırlar. Hücre içi savunma mekanizmalarında kullanılan serbest radikal süpürücü SOD ile peroksit yıkıcı KAT ve GPx enzimleri, lökositlerin salgıladıkları bu sitotoksik reaktif oksijen metabolitleri tarafından oluşturulan hasarı azaltabilme kapasitesine sahiptir (65). Fakat bu radikal süpürücü ajanlar hücre içinde bulundukları için, hücre dışı mekanizmalarla olan bir hasarı önlemede yetersiz kalabilirler. Bu nedenle serbest radikal süpürücü ajanların dışarıdan vücuda verilmesi uygun bir tedavi seçeneği olabilir.

Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli olan kemotaktik ajanlar arasında interlökin-1 (IL-1), lökotrien B4 (LT-B4), platelet aktive edici faktör (PAF) gibi araşidonik asit ürünleri vardır. Araşidonik asit metabolizmasında oluşan LT-B4; güçlü bir nötrofil çekici ajandır, nötrofillerde  $O_2^-$  üretimini uyarır, nötrofillerin damar duvarına yapışmasını, damar hassasiyetini ve kapiller permeabilityi artırır, vazokonstriksiyon yapar ve doku ödemeine neden olur. Hem akut koroner sendromlar hem de kalp ameliyatları sırasında bu maddelerin sentezi önemli derecede artmaktadır (30). Yine araşidonik asit metabolizmasında oluşan PG türleri; plateletlerin fonksiyonunu modüle eder, vazokonstriktör etki gösterir ve nötrofillerin hızlı bir şekilde fibrinojene yapışmasını tetikler (32). Aktif lökositler, makrofajlarda ve mast hücrelerinde tümör nekrozis faktör (TNF- $\alpha$ ) sentezine de yol açar. TNF- $\alpha$ , lökositlerin adezyon ve degranülasyonuna neden olur, NADPH oksidazları, IL-1, IL-2, IL-6 sentezini ve PAF reseptörü sentezini uyarır (34). TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi kemotaktik ajanların sekresyonu,

iskeminin ilk dakikalarında olur ve dolaşımdaki PMN lökositlerin mobilizasyonuna yol açarlar. Lökositler; nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF- $\kappa$ B) aktivasyonuna yol açar. Sonuç olarak; lökositler endotelyuma yapışarak kardiyak hasara katılan olaylar dizisine sebep olur. Nötrofillerin salgıladıkları maddelerle yol açtıkları hasarın yanısıra, aktif nötrofillerin damar içinde oluşturdıkları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif plateletlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya neden olmalarından dolayı İ/R hasarının önemli mediyatörleri olarak kabul edilmektedir. Yapılan son çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur (124). IL-1 $\beta$ , nötrofillerin kemotaksisini uyarırken, oksijen radikalleri ile birlikte apoptozise neden olabilir. Oksidatif stres, membran proteinlerinin ve lipitlerinin oksidasyonu ve hücrenin aşırı Ca<sup>+2</sup> yüklenmesi ve bunun yanında diğer bazı metabolik değişiklikler apoptozisi tetikleyebilir (56). Doku reperfüzyon hasarının apoptozisle kuvvetli bir ilişkisi vardır. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozis normal insan gelişiminin, immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir. Bu hücre ölüm yolağındaki düzensizlikler; kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları, iskemik epizodu takiben reperfüzyon hasarı ve nörodejeneratif hastalıklara yol açar.

#### **3.2.1.4. Nitrik oksit (NO):**

Hem iskemi hem de reperfüzyonu takiben zarar gören endotelyumda NO sentezi belirgin derecede azalır. NO gibi inhibitör etkisi çok kuvvetli bir ajanın eksikliği nötrofil aktivasyonunun kolaylaşmasına ve doku hasarının artmasına yol açar (21). İskemiden önce NO ve NO donörlerinin uygulanması ile infarkt alanı ve endotelial disfonksiyon gibi İ/R' un neden olduğu miyokardiyal hasar azaltılabilir (117). Ekzojen NO ve NO donörlerinin yararlı etkilerinin bir kısmı İ/R sırasında nötrofillerin vasküler endotelyuma yapışmasını engellemeleri aracılığıyla olmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki NO' in kardiyak miyosit

fonksiyonunu baskılaması, İ/R' u takiben inflamatuvar süreçleri uyarması, mitokondriyal solunumu bozması, nekroza ve apoptozise neden olması gibi birçok zararlı etkisi vardır. Ancak düşük konsantrasyonlardaki NO kardiyak miyositlerin fonksiyonunu artırır, İ/R' u takiben platelet agregasyonunu ve nötrofil-endotelyum etkileşimlerini azaltabilir (117). eNOS knock-out (eNOS-KO) farelerle yapılan deneylerde; İ/R da ilk olarak eNOS' un aktive olduğu ve İ/R süresince kalp için koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir (106). Reperfüzyonun geç fazında üretilen NO ve ONOO<sup>-</sup> in reperfüzyonun erken fazına oranla çok daha fazla olduğu ve bu durumun iNOS up-regülasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. NO düzeyindeki bu gecikmiş artış, doku hasarının daha da artmasına neden olur. Wildhirt ve arkadaşları, selektif iNOS inhibisyonunun koroner kan akımı, hücrel infiltrasyon, nekroz, infarkt alanı ve miyokard performansı üzerinde koruyucu etkilerinin olduğunu göstermişlerdir (120).

### **3.3. MELATONİN**

Epifiz bezi olarak ta bilinen pineal bez, beyinde bulunan nöroendokrin bir organdır. Dış çevrenin aydınlık ve karanlık olmasına göre organizmanın başta endokrin sistem olmak üzere bir çok sistemin fonksiyonundaki değişiklikleri düzenler. Suprakiazmatik nükleus (SCN) ile birlikte aktivitelerimizi doğa ile senkronize bir şekilde yapmamızı sağlayan pineal bezin biyolojik saat olduğu düşünülmektedir (77). Üç yüzyıl önce, Fransız filozof Rene Descartes, pineal bezi “ruhun sandalyesi” olarak tanımlamıştır. Buradan salgılanan ana maddenin melatonin olduğu ise, ancak 1950’li yılların sonlarına doğru gösterilmiştir. Melatoninin, sirkadiyen ritimler, uyku, ruhsal durum, üreme, tümör gelişimi ve yaşlanma gibi birçok olayın biyolojik regülasyonunda rolü olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (77).

#### **3.3.1. Melatonin sentezi, salıverilmesi ve metabolizması:**

Melatonin salgılanma hızını belirleyen en önemli faktör çevrenin ışık düzeyidir. Genel olarak, ışık melatonin yapımını azaltırken, karanlık artırır. Melatonin sentezinde başlangıç maddesi, plazmadan alınan ve bir indol aminoasit olan “triptofan” dır., Esansiyel bir

aminoasit olan triptofanın besinlerle birlikte dışarıdan alınması gerekmektedir. Triptofan, triptofan hidroksilaz enzimi ile pinealositlerde 5-hidroksitriptofana hidroksillenir. 5-hidroksitriptofan, aromatik-L-aminoasit dekarboksilaz ile 5-hidroksitriptamine (serotonin) dekarboksillenir. Serotonin, N-asetil transferaz (NAT) enzimi ile N-asetil seratonine ve bu da, hidroksiindol-o-metil transferaz (HOMT) etkisi ile melatonine (N-asetil-5-metoksitriptamin) dönüşür. Serotonin melatonin dönüşümünü sağlayan NAT ve HOMT aktivitelerinin geceleri daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Melatonin sentezi için gerekli enzimlerin, pinealositler dışında, SCN, retina ve ince bağırsakta da bulunduğu, immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Dolaşımdaki melatonin konsantrasyonu pineal bezdeki melatonin üretimini yansıtır (114).

Melatonin, pineal bezde sentezlenip depolanmadan hızlı bir şekilde komşu kapiller damarlara geçer. Lipofilikliğin çok yüksek olmasından dolayı, tüm biyolojik doku ve sıvılara dağılır. Plazmada yaklaşık %70' i albumine bağlı olarak taşınır. Çoğu karaciğer de olmak üzere, böbrekte de metabolize edilir. Karaciğerde 6-hidroksimelatonine dönüşür; bu da, böbrekte sülfat ve glukuronik aside bağlanarak idrarla atılır. Karanlık başladığında melatonin seviyesi yükselmeye başlar. Gece yarısından sonra (02.00-04.00) pik seviyesine ulaşır ve sonra giderek düşer. Serum melatonin konsantrasyonu, yaşa göre de anlamlı olarak değişir. Yaşlanma ile birlikte melatonin düzeyinin de giderek azaldığı bilinmektedir.

### **3.3.2.Etki mekanizması:**

Melatoninin farmakolojik olarak tanımlanmış iki membran reseptörü bulunmaktadır. ML1, yüksek affiniteli (pikomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yeri olup, a ve b alt tipleri gösterilmiştir. ML2 ise, düşük affiniteli (nanomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yerleri olarak tanımlanmıştır. ML1 reseptörlerinin aktivasyonu, G proteini üzerinden, adenilat siklazı inhibe ederek, hedef hücrelerde siklik AMP (sAMP) düzeyini düşürür. Bu reseptörler, muhtemelen, retinal fonksiyonların, sirkadiyen ritimlerin ve üremenin regülasyonunda rol

oynamaktadır. ML2 reseptörlerinin aktivasyonu ve dağılımı hakkında henüz kesin bilgi mevcut değildir. Melatonin hücre içine kolayca geçerek, buradaki yapısal proteinlerle de etkileşebilir; direkt olarak sitozolik kalmodüline bağlanarak,  $Ca^{+2}$  sinyalini bu yolla da etkileyebilir (11).

### 3.3.3. Oksidatif stres ve melatonin:

Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda melatoninin güçlü bir serbest radikal yakalayıcı ajan olduğu gösterilmiştir. Oldukça toksik olan  $OH^{\bullet}$  radikali başta olmak üzere diğer serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasardan makromolekülleri özellikle de DNA'yı koruyabilir. DNA hasarı oluşturan radikaller hücrede nükleer bir enzim olan poli ADP-riboz sentazı (PARS) aktive ederler. Bu enzim, DNA tek zincirinin kırılması ile aktive olur ve hücrelerde şiddetli enerji tüketimine yol açarak sonuçta nekrotik tipte hücre ölümüne neden olur. Melatoninin PARS aktivitesini inhibe ederek; şok, inflamasyon ve İ/R da organ hasarını önleyebileceği bildirilmektedir (25). Serbest radikal yakalayıcı etkisi bakımından, bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutatyon ve vitamin E gibi) daha güçlüdür. Diğer antioksidanların büyük çoğunluğunun aksine melatonin hem suda hem de yağda çözünebildiğinden hücrenin tüm bölümlerine etki eder.

Melatoninin birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, güçlü bir radikal süpürücü ve antioksidan (SOD, GPx, GRd, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) stimülasyonu ve NOS inhibisyonu) özelliğinin olması, İ/R hasarında etkili bir koruyucu olabileceğini düşündürmektedir (91). Melatonin direkt radikal süpürerek, indirekt spesifik melatonin reseptörleri aracılığı ile antioksidan enzimleri aktive ederek yada pro-oksidatif enzimleri inhibe ederek doku koruyucu özellik gösterir (91).  $O_2^{\bullet -}$  radikaline en önemli etkisi  $O_2^{\bullet -}$  in dismutasyonunda en büyük rol oynayan SOD' un mRNA'sını artırmasıdır.  $H_2O_2$  hücrelerde KAT ve GPx ile toksik olmayan ürünlere dönüştürülür. GPx ve GRd aktivitesi melatonin ile uyarılmaktadır. Melatonin,  $H_2O_2$ ' in hücre içi konsantrasyonunu azaltır. GRd aktivitesinde ko-

faktör olan NADPH, G-6-PD ile oluşturulur. Melatonin G-6-PD aktivitesini de uyarır (Tablo 2). Melatonin, indol nükleusun yan zincirindeki metoksi ve asetil grupları OH<sup>•</sup> radikalinin giderilmesinde rol oynar. Melatonin bir elektron vererek hidroksili nötralize eder ve toksik olmayan indolil katyon radikaline (melatonil) dönüşür. Bu nitrojen merkezli melatonil radikalinin de O<sub>2</sub><sup>-</sup> anyon radikali ile etkileşip 5-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine (5-MAFK) oluştururken bu radikali de süpürdüğüne inanılır. Melatonin singlet oksijeni direkt olarak nötralize etmektedir (88).

NO tek başına değil O<sub>2</sub> varlığında peroksinitrite dönüşerek toksik etkilere aracılık eder. ONOO<sup>-</sup>, peroksinitröz asit ve hidroksil radikaline dönüşebilmektedir. Bu nedenle, NO sentezini gerçekleştiren NOS (özellikle iNOS) pro-oksidatif bir enzimdir. Melatoninin iNOS aktivitesini inhibe edebileceği bildirilmiştir (Tablo 2). NO inhibisyonunun ONOO<sup>-</sup> oluşumunu engelleyeceği ve kardiyak performansı artırabileceği gösterilmiştir (103).

Serbest radikal süpürücü etkisine ek olarak, melatonin membran Ca<sup>+2</sup> pompası aktivesini artırır ve kalmodulini regüle eder (5). Aşırı Ca<sup>+2</sup> yükünü önleyerek hücre içi Ca<sup>+2</sup> düzeyini ayarlayabilir (77,102). Hücre içi Ca<sup>+2</sup>'un aşırı artması ve diğer iyon dengesizlikleri miyokardiyal elektriksel instabilite, kardiyak aritmiler ve miyokardiyal nekroz gibi hasarlarla sonuçlanabilir. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> değiş-tokuş sistemi de hücrede aşırı Ca<sup>+2</sup> yüklenmesinden sorumlu tutulmaktadır. Müteakibinde hücre şişmesi ve nekroz oluşmaktadır. Bu sistemin bloke edilmesiyle de nekroz oluşumu engellenebilmektedir (110).

Tablo 2. Melatoninin radikaller ve antioksidan enzimlere etkileri (91).

| ETKİLENEN MOLEKÜL         | MELATONİNİN ETKİSİ |
|---------------------------|--------------------|
| Hidroksil Radikali        | Süpürür            |
| Peroksil Radikali         | Süpürür            |
| Süperoksit Anyon Radikali | Süpürür            |
| Singlet Oksijen           | Süpürür            |

| ETKİLENEN MOLEKÜL            | MELATONİNİN ETKİSİ        |
|------------------------------|---------------------------|
| Peroksinitrit Anyonu         | Süpürür                   |
| Süperoksit Dismutaz          | mRNA'sını uyarır          |
| Glutasyon Peroksidaz         | Aktivasyonunu uyarır      |
| Glutasyon Redüktaz           | Aktivasyonunu uyarır      |
| Glikoz-6-Fosfat Dehidrojenaz | Aktivasyonunu uyarır      |
| iNOS                         | Aktivasyonunu inhibe eder |

### 3.3.4. İskemi-reperfüzyon hasarı ve melatonin:

Melatoninin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarının İ/R' un neden olduğu miyokardiyal hasarı (mortalite, aritmiler ve infarkt alanı) azaltabildiği bildirilmiştir (93,96,97,100,102,108). İ/R süresince artan serbest radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipit ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümü meydana getirmektedirler (108). Miyokardiyal iskemi nötrofil migrasyonuna neden olur ve çok miktarda reaktif oksijen üretir. Melatoninin, iskemik dokudaki bir diğer koruyucu etkisi de, lökosit adezyonunu azaltmasıdır (28). Melatonin, adezyon molekülleri P-selektin ve hücreler arası adezyon molekülü (ICAM) sentezini azaltarak; nükleustaki NF- $\kappa$ B' ün aktivasyonunu baskılayarak İ/R süresince kardiyak hasarın azalmasında yararlı etkiler gösterir (90). Bunlar lipit peroksidasyonu ve beraberinde hücreyi nekroza götüren olaylara yol açarlar. Melatoninin platelet agregasyonunu ve lipit peroksidasyonunu azaltabilir (91).

### 3.3.5. Melatonin kan basıncını düşürücü etkileri:

Melatoninin kan basıncının düşürülmesinde de olumlu etkileri vardır. Melatoninin antihipertansif etkisi; hipotalamus üzerindeki direkt etkisine, antioksidan olarak kan basıncını düşürücü etkisine, katekolamin düzeyini düşürmesine, aorta duvarındaki düz kasları

gevşetmesine bağı olarak ortaya çıkabilir (107). Koroner kalp hastalıklarında nokturnal üriner noradrenalin salınımının artmış olduğı bildirilmiştir. Melatonin spontan hipertansif sıçanlarda plazma epinefrin düzeyini %60 ve norepinefrin düzeyini de %30 azaltarak ortalama arteriyel kan basıncında azalma meydana getirmiştir. Bu çalışmada melatoninin hipotansif etkisine bazal sempatik tonusu inhibe etmesinin ve  $\alpha$ -1 adrenerjik cevabı azaltmasının aracılık edebileceğı gösterilmiştir (59). Ayrıca ROS' un da hipertansiyonla ilişkisi olduğı belirtilmektedir. Melatoninin radikal süpürücü ve antioksidan özellikleri de kan basıncını düşürücü etkisine katkıda bulunabilir.

## **4. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **4.1. Deney hayvanları:**

Deneylerde Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezince üretilen Wistar-albino cinsi, 200-250 gr ağırlığında 38 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlara 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık sıklısta, havalandırılmalı, sabit ısı (21±1 C°) odalarda ve özel kafeslerde standartlara uygun olarak bakıldı. Beslenmeleri 8 mm' lik standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile sağlandı.

### **4.2. Deney planı ve ilaç uygulamaları:**

**Kontrol grubu (n=10):** 15 gün süre ile her gün 0,5 cc intraperitoneal (i.p.) %0,9 izotonik NaCl enjeksiyonu yapıldı.

**L-NAME grubu (n=14):** Sıçanlarda hipertansiyon oluşturmak amacı ile non-spesifik NOS enzimi inhibitörü L-NAME (Fluka Chemie, Switzerland), 40mg/kg dozda 15 gün süreyle i.p. olarak uygulandı. L-NAME izotonik (%0,9) NaCl solüsyonda çözündürülerek her hayvana 0,5 cc olacak şekilde enjekte edildi. Bu gruptaki sıçanlara son 5 gün melatoninin çözücüsü etanol %1 konsantrasyonda 0,5 cc olacak şekilde verildi. İlaç solüsyonları her gün taze olarak hazırlandı ve enjeksiyonlar düzenli olarak her gün aynı saatte yapıldı.

**L-NAME+Melatonin grubu (L-NAME+MEL, n=14):** Bu gruba 15 günlük kronik L-NAME uygulamasının son 5 günü L-NAME ile birlikte melatonin (10 mg/kg) uygulandı. Melatonin (Sigma Chemical Company., St. Louis, MO, U.S.A.) saf etanolde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Az miktarlarda hazırlanan stoklar deneylerin yapıldığı süre boyunca ışık almayacak şekilde -20 C' de saklandı. Stok çözeltiler melatonin uygulaması öncesi, izotonik (%0,9) NaCl solüsyonu ile sulandırıldı.

15 gün sonunda bütün gruplara miyokardiyal İ/R uygulandı.

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

Sıçanlar, 1.2-1.4 gr/kg ürethanın i.p. olarak verilmesi ile anestezi edildi. Yapay solunum için trakea kanülasyonu yapıldı ve sıçanlar solunum pompasına bağlandı. Karotid artere yerleştirilen bir kanülden, trandüser (Harvard model, 50-8952) ve bir kaydedici (Harvard Universal ossilograf (penrecorder)) yardımıyla kan basıncı ve EKG yazdırıldı. Göğsün sol tarafına 1-1.5 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldıktan sonra cilt altı dokuları ve göğüs kasları geçildi, sternumun hemen solunda dördüncü kosta kesilerek sol torakotomi yapıldı. Toraks açıldığı anda, içerideki negatif basıncın ortadan kalkması nedeniyle, solunumun devamı ve normal pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> ve pH değerlerini korumak amacıyla ventilasyon cihazıyla (Harvard Animal Rodent Ventilator) 1.5ml/100g.'lık hacim ve 60 atım/dakikalık bir hızla oda havası verilerek pozitif basınçlı solunum uygulanmaya başlandı. Perikardiyum yavaşça sıyrılarak kalp serbestleştirildi ve göğsün sağ tarafına hafifçe basılarak kalp dışarı alınıp, 10mm'lik yuvarlak uçlu iğneyle 6/0 ipek iplik sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızlıca geçildi. Daha sonra kalp yeniden göğüs içine yerleştirilerek 20 dakika stabilizasyon için beklendi. Konulmuş olan ipliğin uçları 1 mm çap ve 1cm boyda ufak bir plastik tüp içinden geçirilerek, 20 dakikalık stabilizasyon periyodu sonunda damarın altından geçirilmiş olan ip plastik tüp ve bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak damarın kapatılması (oklüzyonu) sağlandı. 30 dakikalık iskemi sonunda klemp açılarak tüp içinden geçen iplik gevşetildi ve böylece yeniden kanlanma yani reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon süresi 120 dakika olarak uygulandı. Deneye son verilmeden önce heparin uygulandı ve kalpler hızlıca çıkartıldı.

#### **4.4. Hemodinamik parametrelerin değerlendirilmesi**

Deneylerde direkt yöntemle ölçülen sistolik ve diyastolik kan basıncı değerlendirildi. Ayrıca sistolik kan basıncının % 40'ı, diyastolik kan basıncının % 60'ı toplanarak ortalama kan basıncı hesaplandı. Sıçanların kan basıncı değerlendirmelerinde kanülün takılması ile

iskeminin başlamasına kadar geçen stabilizasyon periyodundaki bazal, iskeminin başlangıcı ve sonundaki, reperfüzyonun başlangıcı, 1. saati ve sonundaki kan basıncı verileri kullanıldı.

#### **4.5. Nekroz alanının ölçülmesi:**

Her deneyin sonunda hızlıca çıkarılan kalpler serum fizyolojik ile yıkanarak 12 saat dondurucuda bekletilmek üzere alüminyum folyoya sarıldı. Dondurulmuş kalpler 2 mm kalınlığında dilimlendi ve %1'lik trifenil tetrazolyum klorid (TTC) içeren tamponda (pH=7.4) 37 C ° de 15-20 dakika süreyle inkübe edildi. TTC, dokuda NADH, dehidrojenazlar ve diaforazlar bulunduğunda formazan pigmentlerini indirger. Canlı dokular, bu enzimler ve kofaktörleri içermeleri için koyu kırmızı renkte boyanırken, infarkt alanları bunları içermediklerinden boyanmazlar. Boyamadan sonra kalp dilimleri birbirinden 2 mm uzaklığı olan iki cam levhanın arasına konuldu. Canlı doku ve nekrotik doku ayırt edilerek şeffaf bir asetat üzerine çizildi. Planimetrik metot ile ölçülen infarkt alanı tüm kalbin yüzdesi olarak ifade edildi.

#### **4.6. İstatistik**

Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak belirlendi. Ortalama kan basıncı ve nekroz değerlerinin istatistiksel anlamlılık düzeyleri 'Origin 5.0' istatistik programı kullanılarak ANOVA testi ile belirlendi. Ölüm oranlarının istatistiksel anlamlılık düzeylerini belirlemek için ki-kare testi kullanıldı.  $p < 0,05$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

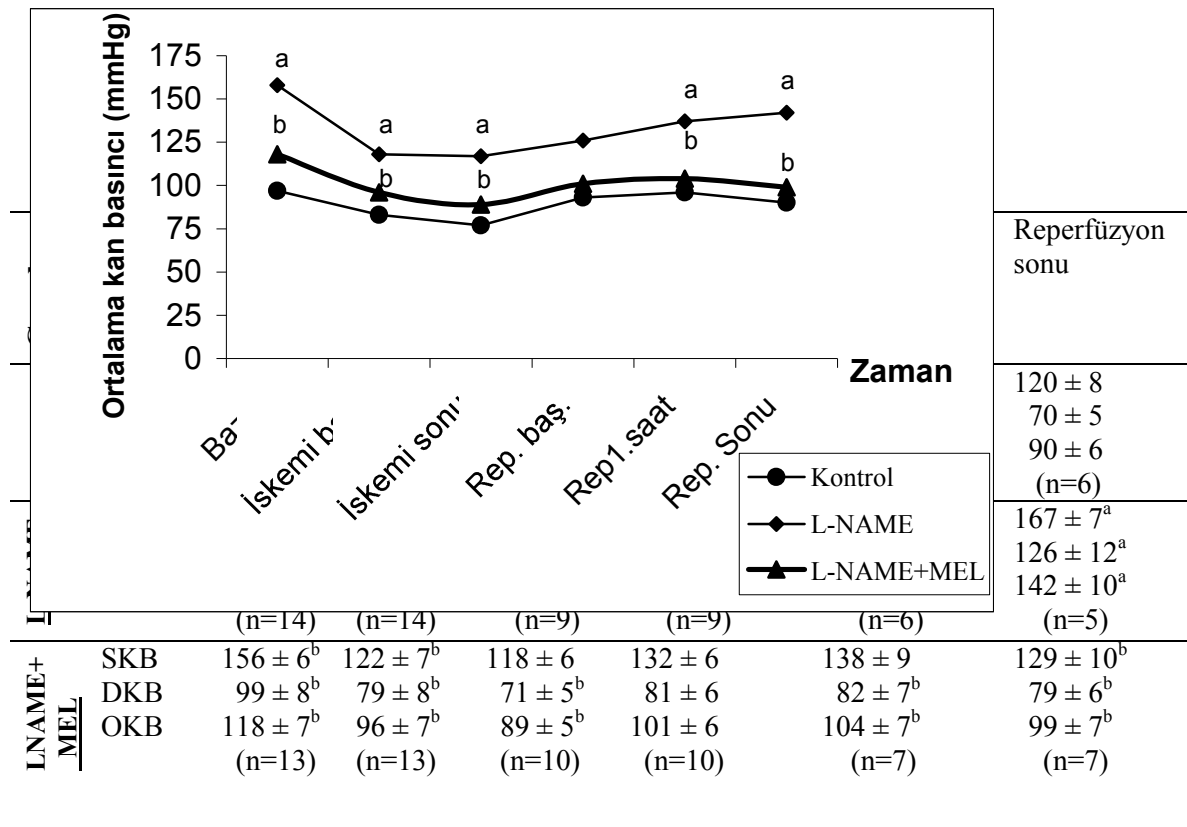
## 5. BULGULAR

### 5.1. Kronik L-NAME ve melatonin uygulamalarının kan basıncı üzerine

#### etkileri

Bazal ortalama kan basıncı (OKB) değerleri kontrol grubunda  $97 \pm 6$  mmHg, L-NAME grubunda  $158 \pm 5$  mmHg, melatonin grubunda ise  $118 \pm 7$  mmHg olarak hesaplandı. L-NAME grubunun bazal OKB değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek iken melatonin uygulaması ile bazal OKB anlamlı olarak azaldı. L-NAME grubunun OKB, sistolik (SKB) ve diyastolik (DKB) kan basıncı değerleri iskemi ve reperfüzyon süresince (reperfüzyonun başlangıcı hariç) kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. Melatonin iskemi ve reperfüzyon boyunca OKB, SKB ve DKB değerlerini (reperfüzyonun başlangıcı hariç) anlamlı olarak azalttı. Sonuçlar tablo 3 ve şekil 3 de özetlenmektedir.

Tablo 3. L-NAME ve melatonin uygulamalarının kan basıncı üzerine etkileri. a: kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, b: L-NAME grubuna göre anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ ).



Şekil 3. L-NAME ve melatonin uygulamalarının OKB üzerine etkileri. a: kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, b: L-NAME grubuna göre anlamlı farklılık (p<0.05).

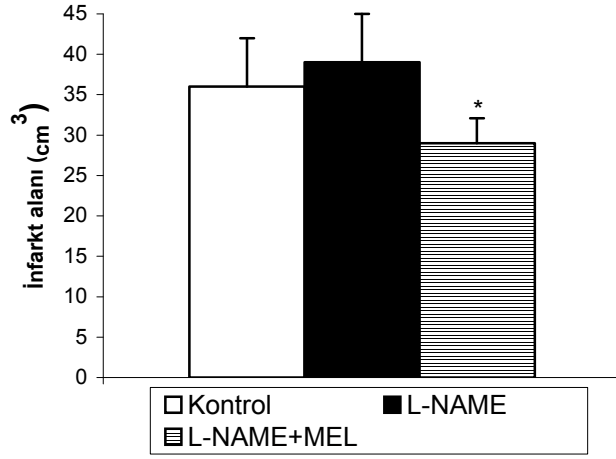
### 5.2. İskemi-reperfüzyona bağlı miyokardiyal infarkt alanı değerlendirmeleri

İ/R' a bağlı olarak meydana gelen miyokardiyal infarkt alanı sırası ile kontrol grubunda  $36\pm6\text{ cm}^3$ , L-NAME grubunda  $39\pm6\text{ cm}^3$ , melatonin uygulanan grupta  $29\pm3\text{ cm}^3$  olarak belirlendi. L-NAME uygulaması infarkt alanını artırırken melatonin bu artışı anlamlı olarak azalttı. İnfarkt alanı/tüm kalp oranı kontrol grubunda %  $29\pm4$ , L-NAME grubunda %  $33\pm6$  ve L-NAME+MEL grubunda %  $23\pm3$  olarak hesaplandı. L-NAME uygulanan grupta infarkt alanı/tüm kalp oranı kontrol grubuna göre artarken, melatonin uygulaması ile bu artış anlamlı olarak azaldı. Sonuçlar Tablo 4, şekil 4 ve 5 te özetlenmektedir.

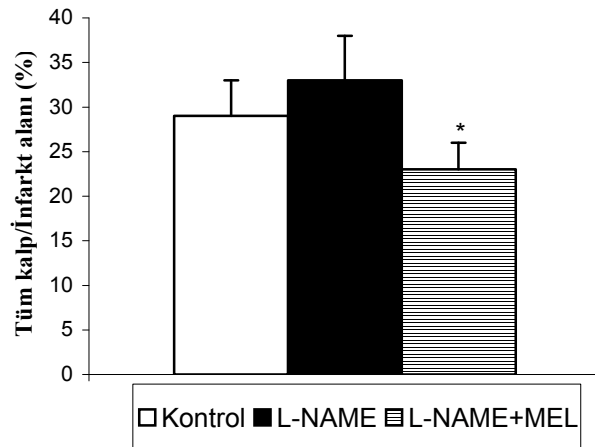
Tablo 4. L-NAME ve melatonin uygulamalarının infarkt alanı üzerine etkileri. L-NAME (N<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginine methyl ester), MEL (melatonin). \*: melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık (p<0.05)

| Gruplar       | Tüm kalp (cm <sup>3</sup> ) | İnfarkt alanı (cm <sup>3</sup> ) | İnfarkt alanı/Tüm kalp (%) |
|---------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Kontrol (n:6) | 124±6                       | 36±6                             | 29±4                       |
| L-NAME (n:5)  | 121±21                      | 39±6                             | 33±6                       |

|                  |        |                   |                   |
|------------------|--------|-------------------|-------------------|
| L-NAME+MEL (n:7) | 119±11 | 29±3 <sup>*</sup> | 23±3 <sup>*</sup> |
|------------------|--------|-------------------|-------------------|



Şekil 4. İskemi-reperfüzyon uygulanan deneklerde infarkt alanı değerleri (cm<sup>3</sup>). L-NAME (N<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginine methyl ester), MEL (melatonin). \*: melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık (p<0.05).



Şekil 5. İskemi-reperfüzyon uygulanan deneklerde tüm kalp/infarkt alanı oranları (%). L-NAME (N<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginine methyl ester), MEL (melatonin).

\*: melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık (p<0.05).

### 5.3. Ölüm oranları

Deneylere başlarken L-NAME uygulanan gruplarda I/R a bağlı ölümlerin daha fazla olacağı düşünülerek bu gruplardaki denek sayıları kontrol grubundan fazla tutuldu. Deneyler boyunca kontrol grubunda (n=10) iskemi sırasında ölüm meydana gelmezken reperfüzyonda 4 sıçan öldü (4/10) ve reperfüzyonu 6 sıçan tamamladı. Ancak L-NAME uygulanan grupta (n=14) iskemi ve reperfüzyon sırasında kontrol grubuna göre daha fazla ölüm meydana geldi. L-NAME grubunda iskemi sırasında 5 sıçan (5/14) reperfüzyon sırasında da 4 sıçan (4/9) öldü. Melatonin uygulanan grupta iskemiye hazırlık sırasında kanülasyon işlemine bağlı olarak 1 sıçan öldü. Melatonin uygulanan sıçanlarda iskemi ve reperfüzyon periyodunun değişik aşamalarında daha az ölüm meydana geldi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kontrol grubunda deneyler boyunca toplam ölüm oranı %40 iken L-NAME grubunda bu oran %64,3, melatonin uygulanan grupta ise % 46 olarak bulundu (Tablo 5). Deneyler sonunda toplam ölüm oranları değerlendirildiğinde en fazla ölümün sadece L-NAME grubunda meydana geldiği ve melatonin uygulaması ile ölüm oranının istatistiksel anlamlı olmamakla beraber azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi. Sonuçlar tablo 5’ de özetlenmektedir. Tablo 5. L-NAME ve melatonin uygulamalarının iskemi ve reperfüzyon bağlı ölüm oranlarına etkileri. L-NAME (N<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginine methyl ester), MEL (melatonin).

| GRUP              | İSKEMİ |          | REPERFÜZYON |           | TOPLAM |           |
|-------------------|--------|----------|-------------|-----------|--------|-----------|
|                   | Oran   | Yüzde(%) | Oran        | Yüzde (%) | Oran   | Yüzde (%) |
| Kontrol (n:10)    | 0/10   | 0        | 4/10        | 40        | 4/10   | 40        |
| L-NAME (n:14)     | 5/14   | 35,7     | 4/9         | 44,4      | 9/14   | 64,3      |
| L-NAME+MEL (n:13) | 3/13   | 23,1     | 3/10        | 30        | 6/13   | 46        |

## 6. TARTIŞMA

Bu çalışmada kronik NOS inhibisyonu oluşturulan sıçanlarda ekzojen olarak uygulanan melatoninin kan basıncı ve miyokardiyal I/R'a bağlı infarkt alanı üzerine etkilerini incelenmiştir.

Kronik NOS inhibisyonuna bağlı olarak oluşan kan basıncı artışı, son yıllarda üzerinde çok fazla çalışılan bir hipertansiyon modeli olmuştur. NOS inhibisyonu için en fazla kullanılan L-arjinin analogları L-NAME, L-NNA ve L-NMMA' dır. Deneyler sırasında kullanılan farklı NOS inhibitörleri, bunların farklı dozları, kullanım süreleri ve uygulama yolları; deneklerin cinsi, yaşı ve kan basınçlarındaki farklılıklar çelişkili bulgular elde edilmesine neden olmuştur ve bundan dolayı da NOS inhibisyonuna bağlı oluşan hipertansiyonun mekanizmasını ve çeşitli endojen vazoaktif sistemlerin hipertansiyona olan etkisini açıklamak zorlaşmıştır.

Çalışmamızda hipertansiyon oluşturmak amacı ile spesifik olmayan NOS inhibitörü L-NAME kullanıldı. L-NAME ile kronik NOS inhibisyonu sonucu kan basıncındaki anlamlı artışı gösteren birçok çalışma vardır (10,48,82,94,105,125). Peotta ve arkadaşları, 7 gün boyunca 400µg/g dozunda i.p olarak L-NAME uygulamışlar ve kalp hızında anlamlı bir değişiklik olmaksızın ortalama arteriyel kan basıncının L-NAME uygulanan farelerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını ( $126 \pm 9$  mmHg;  $79 \pm 2$  mmHg) tespit etmişlerdir (82). Zicha ve arkadaşları ise 4 ve 12 haftalık Wistar sıçanlara 4 hafta içme suyu ile 40mg/kg/gün L-NAME uygulamışlar ve hem genç hem de yetişkin sıçanların sistolik, diyastolik ve ortalama kan basıncı değerlerinin kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yükseldiğini; ve bu artışın genç ve yetişkin bireylerin kendi aralarında herhangi bir anlamlılık ifade etmediğini belirtmişlerdir (125). L-NAME' i 2 ay süre ile 5mg/100 ml dozda uygulayan Baylis ve arkadaşları (10) 2 ay sonunda kan basıncının  $136 \pm 2$  mmHg' a ulaştığını ve kalıcı bir hipertansiyon meydana geldiğini, hipertansiyonla birlikte glomeruloskleroz oluştuğunu rapor

etmişlerdir. Ribeiro ve arkadaşları yüksek dozda 4-6 hafta uygulanan L-NAME' in şiddetli ve progresif bir hipertansiyonla ( $164 \pm 4$  mmHg) birlikte, glomeruler iskemi, glomeruloskleroz ve böbrekte interstisyel genişleme gözlemlemiştir (94). Kronik NOS inhibisyonunun sistolik kan basıncında devamlı bir artışa, neden olduğu gösterilmiştir (81). Başka bir çalışmada ise 10mg/kg dozda 8 hafta derialtı L- NAME uygulaması ile kan basıncının 4. haftaya kadar anlamlı olarak yükseldiğini, 5. hafta da pik yaptığını ve 8. haftaya kadar arttığı belirlenmiştir. Kan basıncına ilaveten MDA, laktat, NADH/NADPH oksidaz düzeylerinin arttığını ve GSH/GSSG, SOD, GST düzeylerinin ise azaldığını ifade etmişlerdir (48). Bütün bu sonuçlardan yola çıkarak NO' in kan basıncının kontrolünde birincil ve önemli bir faktör olduğu görülmektedir. Bununla birlikte NOS inhibiyonu sonucu oluşan hipertansiyonda rol oynayan periferik vasküler direnç artışında endotelyumdan kaynaklanan kasıcı faktörlerinde katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda, L-NAME, 15 gün süre ile 40mg/kg dozda i.p. olarak uygulandı. 15 gün sonunda miyokardiyal İ/R uygulaması sırasında bazal, iskeminin başlangıcı ve sonunda, reperfüzyonun başlangıcı, 1. saati ve sonunda karotit arterin kanülasyonu ile direkt kan basıncı ölçümleri yapıldı. Kronik L-NAME uygulamasına bağlı olarak L-NAME grubunda yükselen kan basıncının yine ekzojen olarak uygulanan melatonin ile anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Bizim bilgilerimize göre, bu bulgularımız L-NAME ile kronik NOS inhibisyonu sonucu artan kan basıncının ekzojen olarak verilen melatonin ile azaldığını gösteren ilk çalışmadır. Melatoninin antihipertansif etkisinin hipotalamus üzerindeki direkt etkisine, antioksidan olarak kan basıncını düşürücü etkisine, plazma katekolamin düzeyini düşürmesine, aorta duvarındaki düz kasları gevşetmesine bağlı olarak ortaya çıkabileceği belirtilmektedir (107). Ayrıca yapılan çalışmalarda melatoninin sempatik sinir fonksiyonunu baskılayabildiği (75) ve katekolamin salınımını azaltabildiği (29) rapor edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki melatoninin spontan hipertansif (SHR) ve wistar-kyoto (WKY)

sıçanların mezenterik arterlerinde  $\alpha$ -1 adrenerjik reseptörünün aktivasyonu ile meydana gelen vazokonstriksiyonu inhibe ettiği belirtilmiştir (59)  $\alpha$ -1 adrenerjik yolak büyük ölçüde endotelyum tarafından etkilenmekte ve kronik melatonin uygulaması SHR mezenterik arterlerinde endotelyum bağımlı vazorelaksasyonu iyileştirmiştir. Akut ve kronik melatonin uygulamasının SHR da arteriyel kan basıncını azalttığı gösterilmiştir (53). Bizim çalışmamızda da hipertansif sıçanlara 5 gün süre ile uygulanan melatonin ortalama arteriyel kan basıncını anlamlı olarak azaltmıştır ve bu çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Yapılan başka bir çalışmada 10mg/kg dozda uygulanan melatoninin kalp hızını değiştirmeden ortalama arteriyel basınçta zaman bağımlı devamlı bir düşüşe neden olmuş ve melatonin uygulamasından 20 dakika sonra plazma adrenalin düzeyinde % 60 lık, noradrenalin düzeyinde ise yaklaşık % 30 luk bir azalma olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre de melatoninin hipotansif etkisinin bazal sempatoadrenerjik tonusun inhibisyonu ve kısmen de postsinaptik  $\alpha$ -1adrenerjik reseptör aktivasyonunun neden olduğu inozitoltrifosfat (IP-3) üretiminin baskılanması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Girouard ve arkadaşları (38) yaptıkları çalışmada spontan hipertansif sıçanlara kronik melatonin uygulamasının (30 mg/kg/gün 4 hafta) aorta ve mezenterik arterde vazodilatör bir etkiye neden olduğunu göstermişlerdir. Bu faktörler kan basıncını düşürücü etkisini açıklayabilir. Ayrıca hipertansiyonda artmış kan basıncı ROS ilede ilişkilendirilmektedir (84,86). Melatonin güçlü rarikal süpürücü ve antioksidan özelliğide kan basıncını regüle etmesinde önemli olabilir.

Son yıllarda yapılan birçok çalışma azalmış oksijen kullanımının yada artmış ROS üretiminin kardiyovasküler hastalıkların ilerlemesinde büyük etkisinin olduğunu göstermiştir (84,86). Hipertansiyon sırasında meydana gelen ve ROS tarafından indüklenen vasküler düz kas hücre proliferasyonu hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmıştır (41,112). Hipertansiyonda meydana gelen endotelyal disfonksiyon  $O_2^-$  üretimine neden olmaktadır (51).

Miyokard metabolizmasının değişmesine, ROS üretimine ve hücre ölümüne neden olan koroner perfüzyonun ve oksijen kullanımının azalması akut miyokardiyal İ/R hasarı ve miyokard infarktüsü ile ilişkilidir.

Farklı doz ve sürelerde L-NAME gibi NOS inhibitörleri ile NO sentezinin baskılanması ya da NO biyoyararlanımının azalması ile kan basıncının artmasına ilave olarak kardiyovasküler sistemde, özellikle miyokard ve damarlarda önemli yapısal değişkilikler meydana geldiği birçok çalışmada gösterilmiştir. 12mg/kg L-NAME' in 15 hafta içme suyuna karıştırılarak verilmesi sonucunda sistolik kan basıncının yaklaşık %50 artmış ve perivasküler ve interstisyel fibrozis, miyositlerde hipertrofi meydana gelmiştir (39). Yine başka bir çalışmada 40 mg/kg dozda verilen L-NAME sistolik arteriyel kan basıncını %30 artırmıştır ve miyokardiyal ve perivasküler fibrozis, koroner arter ve aorta gibi büyük damarların media tabakasında hiperplaziye neden olmuştur (6). 8 haftalık kronik L-NAME uygulamasından sonra miyokardiyal nekroz ve aşırı miktarda fibröz oluşmuş alanların varlığı belirlenmiştir (71).

Bizim çalışmamızda yukardaki verilere paralel olarak L-NAME uygulanan sıçanlarda miyokardiyal İ/R sonucu meydana gelen infarkt alanının daha büyük olduğunu ve yine aynı grupta ölüm oranının kontrol grubundan daha fazla olduğu tespit edildi. Ekzojen olarak uygulanan melatonin anlamlı olarak infarkt alanını azalttı. Melatonin ayrıca İ/R'a bağlı ölüm oranlarında azalttı.

İ/R hasarında melatoninin koruyuculuğunu rapor eden bir çok çalışma vardır. Tan ve arkadaşları (108) melatoninin kalpteki etkilerini araştırdıkları *in vitro* bir çalışmada; 10 dakikalık miyokardiyal iskemiye takiben 10 dakika reperfüzyon uygulamışlar ve reperfüzyon sırasında kalplerde prematüre ventriküler kontraksiyonlar (PVC) ve ventriküler fibrilasyonlar (VF) gözlemlemişlerdir. İskemi sırasında ve reperfüzyon başlangıcında uyguladıkları melatoninin hem PVC' ı hem de VF' u hızla ve önemli derecede azalttığını belirtmişlerdir. 30

dakika iskemi, 30 dakika reperfüzyon uygulayan Kaneko ve arkadaşlarının (52) yapmış olduğu benzer bir çalışmada; reperfüzyon başlangıcında verilen melatoninin hem ventriküler taşikardiyi hem de VF' u azalttığı ve sol ventrikül fonksiyonunu önemli derecede düzelttiğini saptamışlardır. İskemiden önce ya da reperfüzyon sırasında farmakolojik dozlarda verilen melatoninin reperfüzyonun neden olduğu VF insidensini ve aritmi sayısını azalttığı ve melatoninin bu koruyucu etkilerinin serbest radikal süpürücü aktivitesi (melatonin hidroksil radikalini süpürüp, lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermişler) ile ilgili olduğu sonucuna varmışlardır (52).

Kalpte de melatonin spesifik reseptörlerin varlığı (memelilerde varlığı bilinen ML-1 ve ML-2 ye ilave olarak putatif M3) gösterilmiş ve yapılan bir çalışmada spesifik ML-3 reseptör analogu 5-methoxy-carbonylamino-N-acetyl-tryptamine (5MCA-NAT) melatonine oranla daha fazla koruyucu etki göstermiştir (60).

Yukardaki çalışmalar melatoninin farmakolojik dozlarının İ/R uygulanan kalplerdeki etkilerini araştırmaya yönelikti ve *in vitro* çalışmalardı. Şahna ve arkadaşları da (96,97) ilk defa fizyolojik konsantrasyonlardaki melatoninin etkilerini *in vivo* olarak araştırmış ve endojen melatonin konsantrasyonlarının etkinliğini belirlemek amacıyla sıçanlara pinealektomi uygulamışlardır. Pinealektomi sonrası 2 ay beklenen sıçanlarda (pinealektominin hipertansiyona neden olduğu ve 2 ay sonrası kan basıncının normale döndüğü bildirilmektedir) *in vivo* 7 dakika iskemi, 7 dakika reperfüzyonu takiben kardiyak aritmilerin derecesinin ve mortalitenin kontrol grubuna oranla çok daha ciddi boyutlarda olduğunu belirlemişlerdir. Takip eden çalışmalarında (96); *in vivo* sol ana koronere 30 dakika iskemi, 120 dakika reperfüzyon uygulamış ve kalplerde infarkt alanının çok büyük olduğu göstermişlerdir. Bütün bu bulgular, endojen melatonin düzeyinin iskemi ve reperfüzyon süresince kalp için koruyucu etkilere sahip olduğunu düşündürmüştür. Son çalışmalarında 10 mg/kg melatoninin *in vivo* İ/R da infarkt alanını ve miyokardda oksidatif hasarın göstergesi

MDA (I/R ile artmış olan) düzeyini anlamlı azalttığını ve antioksidan savunma sisteminde önemli rolü olan GSH seviyesini artırdığını belirlemişlerdir (100).

Lee ve arkadaşları (62) melatoninin iskemik kalpteki koruyucu etkilerini *in vivo* olarak araştırmışlar; iskemi öncesinde intravenöz (i.v.) bolus enjeksiyonla uygulanan melatoninin ventriküler taşikardiye ve fibrilasyonu baskıladığı ve total PVC sayısını düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Melatoninin İ/R sırasında  $O_2^-$  üretimini ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini önemli düzeyde azalttığını görmüşler ve melatoninin hem İ/R uygulanan dokularda nötrofil aktivasyonunu azalttığı hem de indolün antioksidan özelliklerine bağlı olarak koruyucu etkilerinin ortaya çıktığı sonucuna varmışlardır.

Gerek fizyolojik gerekse de farmakolojik dozlardaki melatoninin sıçan İ/R modellerinde kalbin morfolojisi ve fonksiyonları için koruyucu etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Tavşanlarda yapılan benzer bir çalışmada (26); i.v. 10 ve 50 mg/kg dozda melatonin uygulamasının kalbin hemodinamik parametrelerini ve infarkt alanını değiştirmedığı fakat kötüleştirmedığı de belirlenmiştir. Sıçanların aksine tavşanlarda melatoninin herhangi bir koruyucu etkisinin ortaya çıkmaması tavşanlardaki XO enziminin olmamasına bağlanmıştır. XO enziminin eksikliği kardiyak İ/R sırasında meydana gelen fonksiyon bozukluğunun azaltılmasında melatoninin yetersiz kalmasının başlıca nedeni olabilir.

Melatoninin hipoksik/reoksijenize kardiyak miyositler üzerindeki etkilerinin *in vitro* araştırmasını Salie ve arkadaşları yapmıştır. Oluşturulan kimyasal hipoksi, kardiyak miyositlerde ciddi morfolojik değişikliklere neden olurken;  $H_2O_2$ , ROS, ve  $[Ca^{+2}]$  birikiminde önemli artışlara neden olmuştur. Uygulanan melatonin ile bu değişikliklerinin önemli derecede azalması; hipoksi/reoksijenasyona karşı melatoninin koruyucu etkilerini ve antioksidan özelliklerini desteklemektedir (102).

Melatoninin membran  $Ca^{+2}$  pompası aktivesini artırır (5) ve  $Ca^{+2}$  overloadunu önleyerek hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyini ayarlayabilir (77,102). Hücre içi  $Ca^{+2}$ 'un aşırı artması ve diğer iyon dengesizlikleri miyokardiyal elektriksel instabilite, kardiyak aritmiler ve miyokardiyal nekroz gibi hasarlarla sonuçlanabilir. Melatoninin kardiyak sarkolemma da  $Ca^{+2}$  bağımlı ATPaz' ı stimüle edebileceği ve tavuk embriyo ventrikül myositlerinde yapılan bir çalışmada da melatoninin yüksek voltajla aktive olan  $Ca^{+2}$  kanallarını etkileyerek miyokard kontraktilitesini ve kardiyak debiyi artırabileceği bildirilmiştir (68).

Programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis oluşumunda da önemli mekanizmalar arasında serbest radikal oluşumu ve aşırı  $Ca^{+2}$  birikimi öne çıkmaktadır. Miyokardiyal İ/R neticesinde oluşan serbest radikallerin ve artan  $Ca^{+2}$ 'un apoptozis kaskadını tetikleyerek hücrel hasar oluşturduğu düşünülmektedir. Bu hipotez ışığında Şahna ve arkadaşları; pineal bezin ana hormonu olan ve bilinen en güçlü serbest radikal süpürücü, antioksidan özellikli ve  $Ca^{+2}$  homeostazını sağlayan melatoninin miyokardiyal İ/R' un tetiklediği apoptotik değişiklikler üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bu amaçla sol koroner arterin inen dalına (LAD) 30 dakika iskemiye takiben 2 saat reperfüzyon uygulandı. Apoptotik DNA kırıklarının tayininde sıkça kullanılan bir yöntem olan TdT-mediated X-dUTP nick end labeling (TUNEL) karışımı uygulandı. TUNEL boyama sonuçlarına göre; İ/R grubunda özellikle sol ventrikül serbest duvarı ve apekse yakın bölgeler yoğun boyanma alanları gösterirken; melatonin (10 mg/kg) uygulamasının İ/R grubuna göre aynı kesit düzleminde önemli ölçüde TUNEL pozitifliğini azalttı. İ/R grubunda sol ventrikülde pozitif boyanan TUNEL pozitif apoptotik alanlar gösterirken melatonin bu apoptotik boyanan hücre pozitifliğini azalttı (79).

Melatoninin İ/R hasarını azaltıcı etkisi sadece kalpte değil beyin, böbrek ve karaciğer gibi diğer birçok organda da belirlenmiştir. İ/R ile indüklenen gastrik mukoza hasarında, lipid peroksidasyonunun ve oksijen metabolitlerinin rol oynadığı ve melatoninin, sıçandaki mide

İ/R hasarını önlediği rapor edilmiştir (61). Melatoninin karaciğerde de, İ/R hasarı önlediği (104) ve yine sıçan beyinde oksidatif lipid ve DNA hasarına karşı koruyuculuğu olduğu bildirilmiştir (91). Böbrek (98) ve beyin (54) İ/R modellerinde de, melatoninin, büyük oranda hasarı azalttığı bir çok çalışmada rapor edilmiştir. Şahna ve arkadaşları; sağ nefrektomi yaptıkları sıçanların sol böbreklerine klemple ile 60 dakika iskemi 24 saat reperfüzyon uygulamış ve morfolojik değişiklikleri incelemiştir. Melatonin hem İ/R' un indüklediği yapısal değişiklikleri azaltırken, hem de lipid peroksidasyonunun göstergesi MDA düzeyini anlamlı olarak azaltmıştır (98).

Melatonin spesifik olarak sadece İ/R hasarında değil yüksek oksidatif stresin neden olduğu diğer birçok durumda da O<sub>2</sub> kaynaklı reaktanları zararsız ya da daha az toksik maddelere dönüştürebilir. Ayrıca diğer ajanların kullanılmasıyla meydana gelen oksidatif stres ekzojen melatonin uygulaması ile azalmıştır (78,99). Şahna ve arkadaşları oldukça sık kullanılan ve oluşturdukları radikaller aracılığıyla toksik etkilere neden olabilen kemoterapotiklerin yan etkilerinin önlenmesinde de melatoninin oldukça yararlı etkilerini belirlemişlerdir (78,99). Doksorubisinin radikaller aracılığıyla miyokardda oluşturduğu lipid peroksidasyonunun melatonin ile önlenbildiğini ve yapısal değişikliklerin de azaldığını göstermişlerdir (99).

Melatoninin koruyuculuğunu gösteren yukardaki çalışmalarda melatonin (verilen dozlarda) hemodinamik parametreleri değiştirmeden İ/R hasarını azaltmıştır (96,97,100,102,108). Bu çalışmaların birinde tek doz melatonin (10 mg/kg) kan basıncı ve kalp hızını değiştirmeden İ/R hasarına karşı koruyucu olmuştur (100). Biz bu çalışmamızda hipertansiyon oluşturduğumuz ratlara 10 mg/kg dozunda 5 gün melatonin uygulaması yaptık. Melatonin verilen grubun kan basıncı, İ/R deneylerine başlarken L-NAME grubuna göre anlamlı olarak düşüktü. Melatonin uygulaması L-NAME ile karşılaştırıldığında infarkt alanını da anlamlı azaltmıştı, bu değerler istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da kontrol grubu

değerlerinin de altında idi. Kan basıncının azalması gibi hemodinamiklerin değişmesi melatoninin I/R hasarına karşı koruyuculuğunda önemli olabilir. Ancak melatoninin sadece hemodinamikleri değiştirmesi bu koruyuculuğu tek başına açıklamakta yetersiz kalabilir. Hipertansiyona ilişkin komplikasyonlar doğrudan yüksek kan basıncı değerlerine bağlı olabileceği gibi, hipertansiyonun zemin hazırladığı ateroskleroz gibi patolojilerde bağlı olabilir. Hem hipertansiyon, hemde I/R hasarında özellikle artmış ROS önemli rol oynayabilmektedir. Melatonin güçlü bir radikal süpürücü ve antioksidandır (90).  $Ca^{+2}$  düzeyini regüle edebilir ve artmış sempatik aktiviteyi baskılayabilir (77,102). Ayrıca miyokardiyal iskemiye bağlı olarak artan nötrofil migrasyonunu ve adezyonunu inhibe edebilir (80). Biz melatonin tedavisinin hipertansif sıçanlardaki hem kan basıncını azaltışını hemde buna paralel olarak kan basıncı azalmış aynı bireylerdeki infarkt alanına koruyuculuğunu gösterdik.

Melatonin hem yağda hem de suda çözünebildiğinden vücudun her hücresine ve hücre içindeki diğer yapılara kolaylıkla girebilir. Bu nedenle de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha fazla etkili olabileceği düşünülmektedir. Sahip olduğu bu özelliklere bağlı olarak dejeneratif değişikliklere neden olan hastalıklara karşı nükleer DNA, membran lipitleri ve sitozolik proteinleri koruyabilir (91). Sıçanlarda reperfüzyonun hemen başında melatonin uygulamasının reperfüzyonun indüklediği VF ve mortalitedeki koruyuculuğu, melatoninin hücre içine hızlıca girebilme özelliği ile açıklanabilir ve klinik acillerde oldukça önemli olabilir. Benzer şekilde melatonin, doksorubisinin kalpteki toksisitesini azaltırken; doksorubisin uygulamasından hem önce hem de sonra verildiğinde etkili olduğu gösterilmiştir (99).

Melatonin kardiyovasküler sistemde hiçbir yan etkisi olmayan, son derece güvenli, koruyucu bir ilaçtır (90). Melatoninin insandaki rolü, son dönemlerde giderek daha iyi belirlenmeye başlamıştır. Vücut ısı ve uyku regülasyonundaki açık etkileriyle birlikte,

puberte ve üreme sistemi üzerinde de etkinliği muhtemel olan melatoninin, insan sirkadiyan ritmi için de önemli olduğu ortaya konulmaktadır. Jet lag' de normal fizyolojik ritim için olumlu etkilerinin olduğu; klinik çalışmalarda, uyku problemi olan şahıslarda, uyku süresi ve kalitesinde başarı ile kullanıldığı bildirilmiştir (77). Sabah saatlerinde kan basıncı, kalp hızı, kan vizkositesi, trombosit kümeleşmesi, plazma kortizolü, sempatik aktivitede artış söz konusu olduğu için ani kardiyak ölüm, geçici miyokard iskemisi gibi olaylar bu saatlerde daha fazla olmaktadır. Brugger ve arkadaşları (17); koroner kalp hastalığında (KKH) gece 02.00 melatonin düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu bulmuştur. Sakotnik ve arkadaşları (101); KKH da gece idrarında melatonin metaboliti olan 6-sülfatoksimelatonin düzeyinin daha az olduğunu saptamışlardır. Bu bulgular melatoninin kardiyovasküler patolojilerde önemli rol oynayabileceğini fikrini desteklemektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada;

15 gün kronik uygulanan NOS inhibitörü L NAME kan basıncının anlamlı olarak yükselmesine neden olmuştur. L NAME uygulamasının son 5 günü melatonin verilmesi ise kan basıncındaki bu artışı anlamlı olarak azaltmıştır.

L-NAME ile kan basıncı yükselmiş sıçanlarda miyokardiyal İ/R sonucu meydana gelen infarkt alanının kontrol grubundan daha fazla olduğu ve melatonin uygulanan sıçanlarda infarkt alanının anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir.

Yine kronik L-NAME uygulanan grupta ölüm oranının kontrol grubundan fazla olduğu ve melatoninin İ/R'a bağlı meydana gelen ölümleri istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da azaltma eğiliminde olduğu gösterilmiştir.

Düşük toksisiteli endojen bir madde olan melatoninin I/R hasarında koruyuculuğunu ve kardiyak olayların patolojilerinde önemli rolü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır (90,96,97,99,100,101,102,108). Bizim bulgularımız ve bu çalışmaların sonuçları, melatoninin miyokardiyal İ/R hasarının önlenmesinde önemli ve yararlı etkilerinin olabileceğini ve

melatoninin iskemik kalp hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde, by-pass, koroner arter spazmı, angioplasti ve trombolitik süreçler sonrası gelişen reperfüzyon hasarının ve özellikle ilerdeki yaşam kalitesini belirleyen infarkt alanının önlenmesi gibi durumlarda klinik olarak test edilebileceğini ve hipertansif bireylerde de koruyucu olabileceğini düşündürmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Aksulu HE, Ercan ZS, Türker RK. (1985). Further studies on the antiarrhythmic effects of iloprost. Arch Int Pharmacodyn Ther. 277: 223-234.
- 2- Altun A, Yaprak M, Vardar A, Aktoz M, Özbay G. (2001). Decreased nocturnal melatonin secretion in coronary artery disease. J Coronary Artery Dis. 4: 108.
- 3- Amann K, Gharehbaghi H, Stephen S, Mall G. (1995). Hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells of small intramyocardial arteries in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 25: 124-31.
- 4- Ando J, Kamiya A. (1993). Blood flow and vascular endothelial cell function. Front Med Biol Eng. 5: 245-264.
- 5- Anton-Tay F, Martinez I, Tovar R, Benitez-King G. (1998). Modulation of the subcellular distribution of calmodulin by melatonin in MDCK cells. J Pineal Res. 24:35-42.
- 6- Babal P, Pechanova O, Bernatova I, Stvrtina S. (1997). Chronic inhibition of NO synthesis produces myocardial fibrosis and arterial media hyperplasia. Histol Histopathol. 12: 623-9.
- 7- Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Runge MS. (2000). Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. Circ Res. 86: 960-966.
- 8- Banos G, Elhafidi M, Franco M. (2000). Oxidative stress and cardiovascular physiopathology. Curr Topics Pharmacol. 5: 1-17.
- 9- Battistini B, D'Orleans Juste P, Sirois P. (1993). Endothelins: Circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. Lab Invest. 68: 600-628.

- 10- Baylis C, Mitruka B, Deng A. (1992). Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest.* 90: 278-81.
- 11- Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem.* 269: 28531-4.
- 12- Beckman JS, Koppenol WH. (1996). Nitric Oxide, Superoxide And Peroxynitrite: The Good, The Bad And The Ugly. *Am J Physiol.* 271: 1424-1437.
- 13- Berges A, Van Nassauw L, Bosmans J, Timmermans JP, Vrints C. (2003). Role Of Nitric Oxide And Oxidative Stress In Ischaemic Myocardial Injury And Preconditioning. *Acta Cardiol.* 58: 119-132.
- 14- Birincioğlu M. (1996). İ/R aritmilerine ACE inhibitörleri, Glutathion ve İndometazin etkileri. *Uzmanlık Tezi.* 1-30.
- 15- Boulanger CM. (1999). Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 31: 39-49.
- 16- Braunwald E, Kloner RA. (1985). Myocardial reperfusion: A double-edged sword. *J Clin Invest.* 76: 1713-19.
- 17- Brugger P, Marktl W, Herold M. (1995). Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet* 345: 1408.
- 18- Carden DL, Granger DN. (2000). Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 190: 255-266.
- 19- Ceconi C, Bernocchi P, Boraso A, Cargnoni A, Pepi P, Curello S, Ferrari R. (2000). New insights on myocardial pyridine nucleotides and thiol redox state in ischemia and reperfusion damage. *Cardiovasc Res.* 47: 586-94.
- 20- Chen Z, Chua CC, Gao J, Hamdy RC, Chua BH. (2003). Protective effect of melatonin on myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284: 1618-24.
- 21- Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. (1992). Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin.* 90: 1116-21.

- 22- Cleland JG. (1999). Progression from hypertension to heart failure, mechanisms and management. *Cardiology*. 92: 10-9.
- 23- Cooke JP, Dzau VJ. (1997). Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular diseases. *Annu Rev Med*. 48: 489-509.
- 24- Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. (1994). Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Amer J Physiol*. 276: 1405-1413.
- 25- Cuzzocrea S, Reiter RJ. (2001). Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 426: 1-10.
- 26- Dave RH, Hole SL, Kloner RA. (1998). The effect of melatonin on hemodynamics, blood flow and myocardial infarct size in a rabbit model of ischemia–reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 3: 153–160.
- 27- Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. (2000). Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 47: 446–456.
- 28- Del Zar MM, Martinuzzo C, Falcon C, Cardinali DP, Carreras LO, Vacas MI. (1990). Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane-B2 production by melatonin: evidence for a diurnal variation. *J Clin Endocrinol*. 70: 246-51.
- 29- Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia MJ, Sanchez J, Manero F, de Armas-Trujillo D. (2002). Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction. *J Pineal Res*. 33: 248-52.
- 30- Elgebaly SA, Hashmi FH, Houser SL, Allam ME, Doyle K. (1992). Cardiac-derived neutrophil chemotactic factors: detection in coronary sinus effluents of patients undergoing myocardial revascularisation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 103: 952–9.
- 31- Fadl YY, Zareba W, Moss AJ, Marder VJ, Sparks CS, Miller Watelet LF, Carroll ER. (2003). History of hypertension and enhanced thrombogenic activity in postinfarction patients. *Hypertension*. 41: 943-98.
- 32- Fontana L, Giagulli C, Minuz P, Lechi A, Laudanna C. (2001). 8-iso-PGF(2 $\alpha$ ) induces beta(2)-integrin-mediated rapid adhesion of human polymorphonuclear neutrophils: a link between oxidative stress and ischemia /reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21: 55–60.
- 33- Förstermann U, Closs EI, Pollock J, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. (1994). Nitric oxide synthase isoenzymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension*. 23: 1121-1131.

- 34- Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. (1998). Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- $\alpha$ , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial/ reperfusion. *Circulation*. 98: 699–710.
- 35- Fujihara CK, Michellazzo SM, De-Nucci G, Zatz R. (1994). Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. *Am J Physiol*. 266: F697–F705.
- 36- Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RMJ, Moncada S. (1990). Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension*. 15: 486-492.
- 37- Gerova M. (2000). Nitric Oxide Compromised Hypertension: Facts And Enigmas. *Physiol Res*. 49: 27-35.
- 38- Girouard H, Chulak C, Lejossec M, Lamontagne D, de Champlain J. (2001). Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 19: 1369-1377.
- 39- Gomes Pessanha M, Mandarin-de-Lacerda CA, Dumas Hahn M. (1999). Stereology and immunohistochemistry of the myocardium in experimental hypertension: long-term and low-dosage administration of inhibitor of the nitric oxide synthesis. *Pathobiology*. 67: 26-33.
- 40- Greenberg SG, He XR, Schnermann JB, Briggs JP. (1995). Effect of nitric oxide on renin secretion. I. Studies in isolated juxtaglomerular granular cells. *Am J Physiol*. 268: 948–952.
- 41- Griendling KK, Ushio-Fukai M. (1998). Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med*. 132: 9-15.
- 42- Gross GJ, Kersten JR, Warltier DC. (1999). Mechanisms of postischemic contractile dysfunction. *Ann Thorac Surg*. 68: 1898-1904.
- 43- Guyton AC. (1990). Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *Am J Physiol*. 259: R865–R877.
- 44- Harman AW, Maxwell MJ. (1995). An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 35: 129-144.

- 45- Heinzl B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B. (1992).  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J.* 281: 627–630.
- 46- Higashi Y, Yoshizumi M. (2004). Oxidative stress, reactive oxygen species. *Nippon Rinsho.* 62: 49-55.
- 47- Hobbs AJ, Fukuto JM and Ignarro LJ. (1994). Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: Direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 10992-6.
- 48- Husain K. (2003). Interaction of exercise training and chronic NOS inhibition on blood pressure, heart rate, NO and antioxidants in plasma of rats. *Pathophysiology.* 10: 47-56.
- 49- Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF. (1995). Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries *in vivo*. *Circulation.* 91: 1314-9.
- 50- Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. (1999). The role of neutrophils in myocardial ischemia- reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 43: 860-878.
- 51- Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, Haynes WG. (1999). Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation.* 100: 1161-8.
- 52- Kaneko S, Okumura K, Numaguchi Y, Matsui H, Murase K, Mokuno S, Morishima I, Hira K, Toki Y, Ito T, Hayakawa T. (2000). Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Life Sci.* 67: 101–112.
- 53- Karppanen H, Airaksinen MM, Sarkimaki I. (1973). Effects in rats of pinealectomy and oxyperline on spontaneous locomotor activity and blood pressure during various light schedule. *Ann Med Exp Biol Fenn* 51: 93–103.
- 54- Kilic E, Ozdemir YG, Bolay H, Kelestimur H, Dalkara T. (1999). Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19: 511-16.
- 55- Kojda G, Harrison D. (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 43: 562-71.

- 56- Kowaltowski AJ, Vercesi AE. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 26: 463–71.
- 57- Kristek F, Gerová M, Devát L, Varga I. (1996). Remodelling of septal branch of coronary artery and carotid artery in L-NAME treated rats. *Physiol Res.* 45: 329–333.
- 58- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. (1991). Nitric Oxide: An Endogenous Modulator Of Leukocyte Adhesion. *Proc Natl Acad Sci.* 88: 4651-4655.
- 59- K-Laflamme A, Wu L, Foucart S, de Champlain J. (1998). Impaired basal sympathetic tone and alpha-1 adrenergic responses in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 11: 219-29.
- 60- Lagneux C, Joyeux M, Demende P, Ribant C, Godin-Ribuot D. (2000). Protective effect of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Life Sci.* 66: 503-509.
- 61- Lastra DL, Cabeza CAJ, Montilla V, Martin MJ. (1997). Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pineal Res.* 23: 47-52.
- 62- Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Sheu JR, Wang JJ, Yen MH. (2002). Protective effects of melatonin on myocardial ischemia / reperfusion injury *in vivo*. *J Pineal Res.* 33: 72–80.
- 63- Lefer DJ, Granger DN. (2000). Oxidative Stress and Cardiac Disease. *Am J Med.* 109: 315–323.
- 64- Lucchesi BR. (1990). Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol.* 52: 61-576.
- 65- Lucchesi BR. (1994). Reperfusion injuries and clinical capillary leak syndrome. Armonk NY, Future Publishing Company. 171-202.
- 66- Mandarim-de-Lacerda CA, Pereira LMM. (1997). Stereology of the myocardium in hypertensive rats under chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Biomed Res.* 8: 153–160.
- 67- McFarlane R, McCredie RJ, Bonney MA, Molyneaux L, Zilkens R, Celermajer DS, Yue DK. (1999). Angiotensin converting enzyme inhibition and arterial endothelial function in adults with Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 16: 62-66.

- 68- Mei YA, Lee PP, Wei H, Zhang ZH, Pang SF. (2001). Melatonin and its analogs potentiate the nifedipine-sensitive high-voltage-activated calcium current in the chick embryonic heart cells. *J Pineal Res.* 30: 13-21.
- 69- Moncada S, Higgs EA. (1993). The L-Arginin –nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329: 2002-2012.
- 70- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43: 109-142.
- 71- Moreno H Jr, Nathan LP, Costa SKP, Metze K, Antunes E, Zatz R, De-Nucci G. (1995). Enalapril does not prevent the myocardial ischemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Eur J Pharmacol.* 287: 93-96.
- 72- Moro MA, Darley-USmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radomski MW, Moncada S. (1994). Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 6702–6706.
- 73- Morton Jj, Beattie Ec, Speirs A, Gulliver F. (1993). Persistent Hypertension Following Inhibition Of Nitric Oxide Formation In The Young Wistar Rat: Role Of Renin And Vascular Hypertrophy. *J Hypertens.* 11: 1083-1088 .
- 74- Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. (1991). Does Superoxide Underline The Pathogenesis Of Hypertension?. *Proc Nad Acad Sci.* 88: 10045-10048.
- 75- Nishiyama K, Yasue H, Moriyama Y, Tsunoda R, Ogawa H, Yoshimura M, Kugiyama K. (2001). Acute effects of melatonin administration on cardiovascular autonomic regulation in healthy men. *Am Heart J.* 141: E9.
- 76- Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. (1993). Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 191: 89-94.
- 77- Ölmez E, Sahna E, Ağkadir M, Acet A. (2000). Melatonin: Emeklilik Yaşı 80 olur mu ? *Turgut Özal Tıp M Derg.* 7: 177-187.
- 78- Parlakpınar H, Ozer M.K., Sahna E, Vardi N, Cigremis Y, Acet A. (2003). Amikasin-induced acute renal injury in rats: protective role of melatonin. *J Pineal Res.* 35: 85-90.
- 79- Parlakpınar H, Sahna E, Ozgen U, Mızrak B, Acet A. (2003). Protective role of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion-triggered apoptosis. *Turkish Pharmacological Society, 17<sup>th</sup> National Congress of*

Pharmacology, 1<sup>st</sup> Clinical Pharmacology Symposium, Joint Meeting of the Turkish & Dutch. Pharmacological Societies. Oct 17-21; Belek Antalya/TURKEY.

80- Parslow RA, Sachdev P, Salonikas C, Lux O, Jorm AF, Naidoo D. (2004). Associations between plasma antioxidants and hypertension in a community-based sample of 415 Australians aged 60-64. *J Hum Hypertens*.(Basimda)

81- Pechanova O, Bernatova I, Pelouch V, Babal P. (1999). L-NAME-induced protein remodeling and fibrosis in the rat heart. *Physiol Res*. 48:353-62.

82- Peotta VA, Vasquez EC, Meyrelles SS. (2001). Cardiovascular Neural Reflexes In L-Name-Induced Hypertension In Mice. *Hypertension*. 38: 555.

83- Pincard RN, O'Rourke RA, Crawford MH. (1980). Complement localization and mediation of ischemic injury in baboon myocardium. *J Clin Invest*. 66: 1050-56.

84. Portaluppi F, Boari B, Manfredini R. (2004). Oxidative stress in essential hypertension. *Curr Pharm Des*. 10:1695-8.

85- Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. (1992). Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 267: 24173-24176.

86- Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A. (2000). Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol*. 55: 221-232.

87- Radomski MW, Moncada S. (1993). Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost*. 70: 36-41.

88- Reiter RJ. (1998). Cytoprotective properties of melatonin: presumed association with oxidative damage and aging. *Nutrition*. 14: 691-6.

89- Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. (2001). Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci*. 939: 200-215.

90- Reiter RJ, Tan DX. (2003). Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. *Cardiovascular Research*. 58: 10-19.

91- Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Wenbo QI. (1998). Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc West Pharmacol Soc*. 41: 229-36.

- 92- Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. (2000). Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress *in vivo*. Biol Signals Recept. 9: 160-71.
- 93- Riado Sr, Zanesco A, Barker La, De Luca Im, Antunes E, De Nucci G. (1999). Long-Term Nitric Oxide Inhibition And Chronotropic Responses In Rat Isolated Right Artia. Hypertension. 34: 802-807.
- 94- Ribeiro MO, Antunes E, De-Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. (1992). Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. Hypertension. 20: 298–303.
- 95- Russo G, Leopold JA, Loscalzo J. (2002) Vasoactive substances: Nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. Vascular Pharmacology 38:259-269.
- 96- Sahna E, Acet A, Ozer MK, Olmez E. (2002). Myocardial ischemia–reperfusion in rats: Reduction of infarct size by either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin. J Pineal Res. 33: 234-8.
- 97- Sahna E, Olmez E, Acet A. (2002). Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia–reperfusion arrhythmias in rats: can the incidence of sudden cardiac death be reduced? J Pineal Res. 32: 194–198.
- 98- Sahna E, Parlakpınar H, Ozturk F, Cigremis Y, Acet A. (2003). The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Urol Res. 31: 188-93.
- 99- Sahna E, Parlakpınar H, Ozturk F, Ozer M.K., Ozugurlu F, Acet A. (2003). Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: Role of physiological concentrations. J Pineal Res. 35: 257-61.
- 100- Sahna E, Parlakpınar H, Türköz Y, Acet A. (2003). Effects of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion-induced infarct size and oxidative stress. In press (Physiological Res)
- 101- Sakotnik A, Liebmann PM, Stoschitzky K, Lercher P, Schauenstein K, Klein W, Eber B. (1999). Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. Eur Heart J. 20: 1314-7.
- 102- Salie R, Harper I, Cillie C, Genade S, Huisamen B, Moolman J, Lochner A. (2001). Melatonin protects against ischemic-reperfusion myocardial damage. J Mol Cell Cardiol. 33: 343-57.
- 103- Schulz R, Wambolt R. (1995). Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. Cardiovasc Res. 30: 432-9.

- 104- Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A. (1996). Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatology*. 43: 898-905.
- 105- Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tanimoto A, Horiuchi M, Tasaki H, Huang PL, Sasaguri Y, Yanagihara N, Nakashima Y. (2002). Long-term treatment with N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester causes arteriosclerotic coronary lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Circulation*. 106: 1729-35.
- 106- Sumeray MS, Rees DD, Yellon DM. (2000). Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 32: 35-42.
- 107- Sewerynek E. Melatonin and the cardiovascular system. *Neuroendocrinol Lett*. 2002;23 Suppl 1:79-83.
- 108- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El-Sokkary GH. (1998). Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: Prevention by melatonin. *J Pineal Res*. 25: 184-91.
- 109- Tharaux PL, Dussaule JC, Pauti MD, Vassitch Y, Ardaillou R, Chatziantoniou C. (1997). Activation of renin synthesis is dependent on intact nitric oxide production. *Kidney Int*. 51: 1780-1787.
- 110- Theroux P. (1999). Protection of the myocardial cell during ischemia *Am J Cardiol*. 83: 3-9.
111. Touyz RM, Schiffrin EL. (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension *Histochem Cell Biol*. 122: 339-52.
- 112- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griending KK. (1998). p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 273: 15022-9.
- 113- Vallance P, Chan N. (2001). Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*. 85: 342-50.
- 114- Vanecek J. (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev*. 78: 687-721.
- 115- Verma S, Fedak PWM, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li RK, MD, Dhillon B, Yau TM. (2002). Fundamentals of Reperfusion Injury for the Clinical Cardiologist *Circulation*. 105: 2332-2336.
- 116- Von der Leyen HE, Gibsons GH, Morishita R. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: *in vivo* transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 1137-1141.

- 117- Wang Q-D, Pernow J, Sjöquist P-O, Ryden L. (2002). Pharmacological possibilities for protection against myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 55:25-37.
- 118- Weinberg JM. (1991). The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int*. 39: 476.
- 119- White CR, Brock TA, Chang L-Y, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, Tarpey MM. (1994). Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci*. 91: 1044–1048.
- 120- Wildhirt SM, Weismueller S, Schulze C, Conrad N. (1999). Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia / reperfusion contributes to disorders to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 43: 698–711.
- 121- Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. (1996). Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci*. 93: 6770-4.
- 122- Xu KY, Zweier JL, Becker LC. (1997). Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res*. 80: 76–81.
- 123- Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros DM, De Nucci G, Zatz R. (1996). Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension*. 27: 1165–1172.
- 124- Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2000). Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*. 45: 651–60.
- 125- Zicha J, Pechanova O, Dobesova Z, Kunes J. (2003). Hypertensive response to chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) treatment is similar in immature and adult Wistar rats. *Clin Sci (Lond)*. 105: 483-9.
- 126- Zoghi M, Nalbantgil İ. (2002). Hipertansiyon ve endotel fonksiyon bozukluğu. *Ana Kar Der*. 2: 142-147.

## **8. ÖZGEÇMİŞ**

1979 yılında Trabzon da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Trabzon da tamamladım. 1996 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandım ve 2001 yılında mezun oldum. 1 yıl Bursa da özel bir veteriner klinikte çalıştım. 2002 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım ve halen aynı bölümde yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim ve aynı zamanda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.