

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



**MİYOKARDİYAL İSKEMİ-REPERFÜZYON
HASARINDA FLUVASTATİN'İN ADMA, HSP
90, RHO KİNAZ VE NADPH OKSİDAZ
DÜZEYLERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

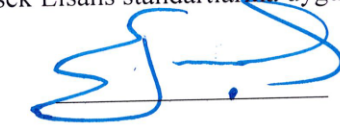
Ecz. MERYEM ALTUNBAŞ

2016

ONAY SAYFASI


Prof. Dr. Muhsin Kızılcı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Ergin ŞAHİN

..... Anabilim Dalı Başkanı

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

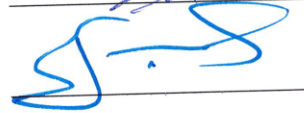

Prof. Dr. Ergin ŞAHİN

Danışman

Yüksek Lisans Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Seda TAŞDEMİR

Prof. Dr. Ergin ŞAHİN

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez hazırlığım süresince bilgi ve deneyimlerinden her zaman desteğini gördüğüm saygıdeğer hocam, Prof. Dr. Engin Şahna'ya katkılarından dolayı Uzman Dr. Elif Onat'a, bu deneylerin gerçekleştirilmesinde yardımları olan Doç. Dr. Selçuk İlhan ve Yrd.Doç.Dr. Deniz Erol'a, Çalışmamıza katkılarından dolayı FÜBAP'a, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan anneme, babama, kardeşimlere ve değerli eşime teşekkür ederim.

Ecz. Meryem ALTUNBAŞ

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	1
3.1. Genel Bilgiler	4
3.1.1. Miyokardiyal I/R hasarının fizyopatofizyoloji	4
3.1.2. Nitrik Oksit Üretimi	4
3.1.3. Kaveolin- 1	6
3.1.4. HSP90	7
3.1.5. Asimetrik Dimetil Arginin	8
3.1.6. NADPH oksidaz	9
3.1.7. Rho kinaz	9
3.2. Statinler	10
3.2.1. Statinler ve etki mekanizmaları	11
3.2.2. Statinlerin pleotropik etkileri	11
3.2.3. Statinlerin endotel fonksiyonları üzerine etkileri	12
3.2.4. Fluvastatin	14
3.2.5. Kardiyovasküler sistem ve fluvastatin	14
3.2.6. İskemi ve reperfüzyon hasarı ve fluvastatin	15
4.2.7. Çalışmanın Gerekçesi ve Amacı	15
4. GEREÇ VE YÖNTEM	17
4.1. Deney Hayvanları	17
4.2. Deney Planı ve İlaç Uygulamaları	17
4.3. Cerrahi uygulama: İskemi-reperfüzyon	18
4.3.1. RNA İzolasyonu	19
4.3.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	20
4.3.3. cDNA Sentezi	20

4.3.4. Real Time-PCR	20
4.4.ELISA	20
5. BULGULAR	21
5.1. Fluvastatin uygulamasının kaveolin-1 düzeylerine etkileri	21
5.2. Fluvastatin uygulamasının HSP90 düzeylerine etkileri	21
5.3. Fluvastatin uygulamasının ADMA düzeylerine etkileri	22
5.5. Fluvastatin uygulamasının Rhokinaz düzeylerine etkileri	24
6. TARTIŞMA	25
7. KAYNAKLAR	30
8. ÖZGEÇMİŞ	36



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Endotel hücreleri tarafından NO üretimi.	5
Şekil 2. eNOS aktivitesinin düzenlenmesi.	5
Şekil 3. Fluvastatinin kimyasal yapısı	14
Şekil 4. Fluvastatin uygulamasının kaveolin-1 düzeylerine etkileri	21
Şekil 5. Fluvastatin uygulamasının HSP90 düzeylerine etkileri	22
Şekil 6. Fluvastatin uygulamasının ADMA düzeylerine etkileri	22
Şekil 7. Fluvastatin uygulamasının NADPH oksidaz düzeylerine etkileri	23
Şekil 8. Fluvastatin uygulamasının Rhokinaz düzeylerine etkileri	24



KISALTMALAR LİSTESİ

AKS	:	Akut Koroner Sendrom
ATP	:	Adenozin trifosfat
ADMA	:	Asimetrik dimetil arginin
BH4	:	Tetrahidrobioprotein
CaM	:	Kalmodulin
Cav-1	:	Kaveolin-1
Cl-	:	Klor
CC	:	Korpus kavernozum
cGMP	:	Siklik Guanozin Monofosfat
COX	:	Siklooksijenaz
DDAH	:	Dimetil arginin aminohidrolaz
EPH	:	Endotel Progenitör Hücreler
eNOS	:	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GC	:	Guanilat Siklaz
GMP	:	Guanin Mono Fosfat
HmG CoA	:	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A
HSP	:	Isı Şok Proteini
H2O2	:	Hidrojen Peroksit
LDL	:	Düşük Dansiteli Lipoprotein
I/R	:	İskemi Reperfüzyon
MI	:	Miyokard İnfarktüsü
Na⁺	:	Sodyum
NADpH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NO	:	Nitrik Oksit
nNOS	:	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
PKC	:	Fosfokinaz C
ROCK	:	Rho Kinaz
ROS	:	Reaktif oksijen ürünleri
TxA2	:	Tromboksan A2

1.ÖZET

İskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı; miyokard infarktüsü, serebral iskemi, inme, hemorajik şok ve organ transplantasyonu gibi cerrahi girişimler ve trombolitik tedaviye bağlı oluşan patofizyolojinin temelidir. Fluvastatin, HMG-KoA redüktaz inhibitörü olup, kolesterol düşürücü etkileri yanında endotel disfonksiyonunu iyileştirici, antioksidan, antitrombotik, antiaterosklerotik ve antienflamatuvar gibi pleotropik etkilerinin de bulunduğunu bilinmektedir. Caveolin-1, HSP90, NADPH oksidase, rho kinaz ve ADMA, endotelial nitrik oksit ve oksidatif stres yolağı ile I/R hasarında önemli moleküllerdir.

Bu çalışmada, fluvastatinin miyokardiyal I/R hasarında rho kinaz (ROCK), NADPH oksidaz, HSP90, caveolin-1 (Cav-1) aktiviteleri ve asimetrik dimetil arginin (ADMA) düzeylerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

27 rat kontrol, I/R ve 15 gün boyunca Fluvastatin (10 mg/kg) uygulaması ardından I/R olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Anestezi altında sol koroner arter ligatüre edilerek, 30 dk iskemi 120 dk reperfüzyon uygulandı. ADMA ve Rhokinaz düzeyleri ELİSA, HSP90, NADPH oksidaz ve Cav-1 düzeyleri ise RT-PCR ile ölçüldü

I/R ile kalp dokusunda HSP90, Rhokinaz ve ADMA düzeyleri artarken fluvastatin uygulaması ile azaldı. Cav-1 düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. NADPH oksidaz fluvastatin grubunda anlamlı olarak azaldı.

Çalışmamızın bulguları ile I/R hasarında ADMA ve rho kinaz düzeylerinin önemli rol oynadığı, statinlerin nitrik oksit biyoyararlanımı ve oksidatif stres üzerine olan etkileri ile koruyucu rolünün olabileceği düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: İskemi/reperfüzyon, fluvastatin

2.ABSTRACT

Effects of Fluvastatin on Caveolin-1, HSP90, NADPH Oksidaz, Rho-kinase and ADMA Levels in Myocardial Ischaemia-Reperfusion Injury

Ischemia-reperfusion (I / R) injury is the basic pathophysiology of myocardial infarction, cerebral ischemia, stroke, hemorrhagic shock, organ transplantation and thrombolytic therapy. Fluvastatin is a HMG-CoA reductase inhibitor. In addition, endothelial dysfunction healing, antioxidant, antithrombotic, antiatherosclerotic and anti-inflammatory effects of fluvastatin are known. Caveolin-1, HSP90, NADPH oxidase, rho kinase and ADMA are effective molecules in I/R injury by oxidative stress and endothelial nitric oxide pathway.

The aim of this study is to investigate the effects of fluvastatin on caveolin-1, HSP90, NADPH Oksidaz, rho-kinase and ADMA levels after myocardial ischaemia-reperfusion injury

For this aim, 27 rats were divided into 3 groups (control, I/R, fluvastatin (10 mg/kg) were administered for 15 days before ischaemia). The left coronary artery was ligated under anesthesia. After this, ischaemia was applied for 30 minute, reperfusion for 120 minute. ADMA and rho-kinase levels were evaluated with ELISA and HSP90, NADPH oksidaz and caveolin-1 levels evaluated with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

HSP90, rho-kinase and ADMA levels increased with ischaemia-reperfusion in heart tissue. HSP90, rho-kinase and ADMA levels were decreased with fluvastatin. No difference was observed between the groups for caveolin-1 levels. NADPH oxidase levels were decreased significantly in the fluvastatin group.

The findings of our study are I/R injury play an important role in the level of ADMA and rho-kinase. The protective effects of statins occur with NO bioavailability and oxidative stress.

Key Words: Ischemia / reperfusion, fluvastatin, ADMA



3. GİRİŞ

İskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı trombolitik tedavi, organ nakli, koroner anjioplasti ve kardiyopulmoner bypass gibi çeşitli tıbbi ve cerrahi girişimler sırasında görülen potansiyel olarak önemli bir sorundur (1). Arteriyel kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokuların oksijenden yoksun kalması iskemi olarak tanımlanır. Perfüzyon yeterli olmadığında, hücresel enerji depolarının boşalır ve toksik metabolitlerin birikerek hücre ölümüne neden olur. Hücrenin rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenmesi için iskemik dokuya yeniden kan akımı olması gerekir. Fakat iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha önemli bir hasara yol açar (2). Hücresel yapılar, zar lipidleri, proteinler ve nükleik asit molekülleri reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan yapılardır (3).

Kalbin normal fonksiyonunu sürdürebilmesi için her daim oksijene ihtiyacı vardır. Koroner arter kanının miyokarddan her geçişinde kalbe sunulan oksijenin %75'i harcanır. Kalbin bu yüksek talebinden ötürü, oksijen sağlanmasında meydana gelecek kısıtlamalara karşı duyarlılığı çok daha fazladır. Damar içinde bulunan ve miyoglobine bağlı haldeki oksijen yalnız 2 ile 6 kalp vurumu için yeterli olabilir. İnsanlarda koroner oklüzyonundan sonraki 10. Vurumda kalbin kontraktıl fonksiyonunda azalma oluşur (4). Bundan dolayı iskeminin başlangıcından itibaren birkaç saniye içinde miyokardın oksijen rezervi tüketilir ve doku oksijen basıncının düşmesiyle oksidatif fosforilasyon, elektron transportu ve mitokondriyal adenosin trifosfat (ATP) yapımı durur. Böylece mitokondriyal aktivite azalır ve sonuç olarak aerobik metabolizma yerine anaerobik glikolizis temel enerji kaynağı haline geçer. Glikolizis, glikolitik ara maddelerin birikmesi ve nikotinamid adenin dinükleotid

(NADH)'in azalmasına yol açar. Glikolitik aktivitenin devam edebilmesi için piruvat laktata indirgenerek NAD⁺ oluşturur. Bundan dolayı miyokard hücrelerinde laktik asit birikerek dolaşıma geçer. Laktik asitin miyokardda birikmesi, glikolitik zincirin anahtar enzimlerinin inhibe olmasına ve doku pH'nın düşmesine ve hücre içi asidozisin yoğun bir şekilde meydana gelmesine neden olur. Membran bütünlüğü bozulmasıyla hücrede potasyum (K⁺) kaybı ve hücre içinde aşırı miktarda sodyum (Na⁺), klor (Cl⁻), kalsiyum (Ca²⁺) ve su birikimi oluşur (5). Hücre içi Ca²⁺ miktarının artması ikinci mesajcılara ve çeşitli enzimlere etki eder. Böylece öncü inflamatuvar mediatörler artar, membranların işlev ve bütünlüğünü olumsuz etkilenir, ayrıca hücre iskeletinin organizasyonunun bozulur. Oluşan bu değişimler esnasında, dokuların enerji depoları tükenirken prostasiklin (PGI₂), nitrik oksit (NO) gibi biyolojik aktif ajanların üretimi azalır, doku için toksik yeni bileşiklerin oluşum hızında yükselme meydana gelir. Ayrıca, bu süreçte adhezyon molekülleri, sitokinlere ilişkin bazı genlerin sentez hızı azalırken, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve trombomodulinin iskemik hücrelerde sentezi artar (6). Reperfüzyon iskemik organları daha fazla hücrel nekroz riskine sokarak fonksiyonun geri dönmesini kısıtlayabilir. I/R döneminde aktive olan trombositler hasarlı bölgeye doğru göç ederek orada yoğunlaşırlar. Trombositler ve trombosit ürünleri olan tromboksan A₂ (TxA₂) ve serotonin mikrosirkülatuar spazm, mikrovasküler konjesyon, trombozis ve koroner akımda yavaşlama gibi etkileriyle oluşturdukları vasküler disfonksiyonla I/R hasarını daha da arttırabilirler (7). Oksijenden uzun vadede yoksun kalınması ile membran potansiyelinin değiştiği, iyonların dağılımını bozduğu, hücre içi volumün arttığı, membran akışkanlığının azaldığı ve endotel hücrelerin hücre iskeleti organizasyonunun bozulduğu bilinmektedir (1).

Reperfüzyon hasarının başlangıç döneminde ağır endotel hücre disfonksiyonu çok hızlı bir şekilde meydana gelmektedir. I/R sonrası arteriyollerde endotel bağımlı, NO aracılı düz kas gevşemesinde bozulma meydana gelir (8). Vasküler yataktaki endotel hücreleri süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olan ksantin oksidaz enzimi oldukça fazladır. İskemi sırasındaki hipoksantin birikimi reperfüzyon esnasında kan damarına tekrar oksijen girdiğinde bu enzim tarafından O_2^- ve H_2O_2 üretiminde ciddi bir yükselme meydana getirir.

Kalpde, I/R hasarına bağlı olarak miyokardiyal sersemleme, reperfüzyon aritmileri, miyositlerde nekroz, koroner endotelial ve mikrovasküler disfonksiyon gözlenebilir. Miyokardiyal sersemleme, I/R'a bağlı olarak geri dönüşümsüz hasar olmamasına ve reperfüzyonun tam veya tama yakın bir şekilde sürmesine rağmen kalpte oluşan uzamış mekanik fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanır ve genellikle global iskemik ataklardan sonra gözlenir (9). Fakat bazen kısa süreli iskeminin sonrasında bile miyokardiyal sersemleme beklenmedik derecede uzun sürebilir. İskemik periyodu takip eden reperfüzyon dönemi ölümcül aritmilere zemin hazırlayabilir. Meydana gelen aritmiler genellikle idioventrikülerdir ve en fazla ventriküler taşikardi ile fibrilasyon gözlenir (10). Miyokardiyal hücrelerinde nekroz gelişimi I/R döneminde ortaya çıkan mekanizmaların ortak sonucudur (11). I/R sonrasında meydana gelen endotelial disfonksiyon, trombositlerin yol açtığı mikrovasküler tıkanıklık, ödem ve oksidatif hasar mikrovasküler disfonksiyona neden olur (12).

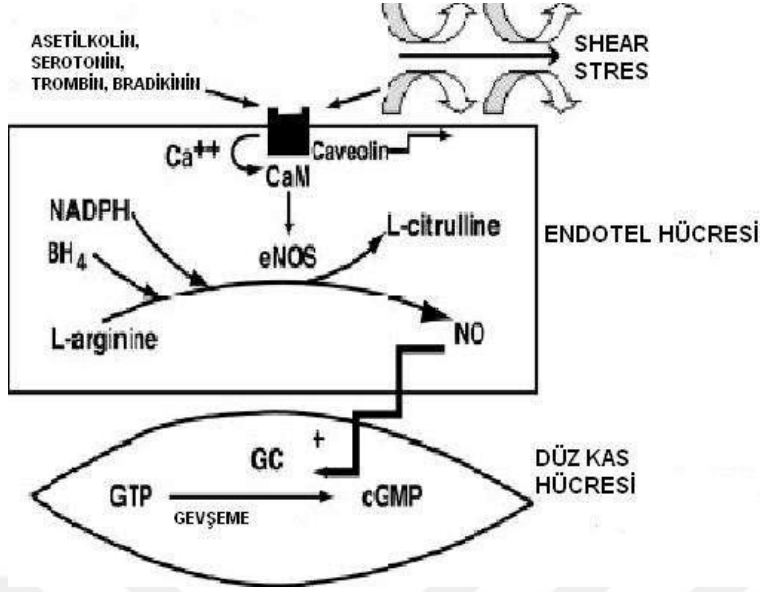
3.1. Genel Bilgiler

3.1.1. Miyokardiyal I/R hasarının fizyopatofizyoloji

Reperfüzyon hasarı geçici bir iskemi döneminden sonra reperfüzyon esnasında oluşan fonksiyonel, metabolik ve yapısal değişiklikleri içerir. İskemi periyodunda meydana gelen zararlı değişimlerin reperfüzyonla daha yoğun hale gelmesi ile oluşan bu tablo, hücre içinde Ca^{+2} birikmesi, irreversibl hasar görmüş miyositlerin nekrozunun hızlanması, miyokardiyal ödem artışı, intramiyokardiyal kanama, no-reflow fenomeni, aritmiler, sitotoksik serbest oksijen radikali (ROS) oluşumu, kan akımı ve oksijen miktarı normale dönmesine rağmen oksijeni etkili kullanamama ile kendini gösterir (13). İskemik dönemde meydana gelen hasar ile reperfüzyon döneminde oluşan hasarın tam ayrımının yapılamaması, reperfüzyon hasarının patofizyolojisini belirlemedeki en önemli zorluktur. Reperfüzyon hasarının ölümcül olduğunu gösteren en önemli kriter, reperfüzyon sürecini modifiye etmeye yönelik girişimler ile hücre ölümünü engellediğinin orataya çıkarılması yani sonuçtan sebebe gidilmesidir (14).

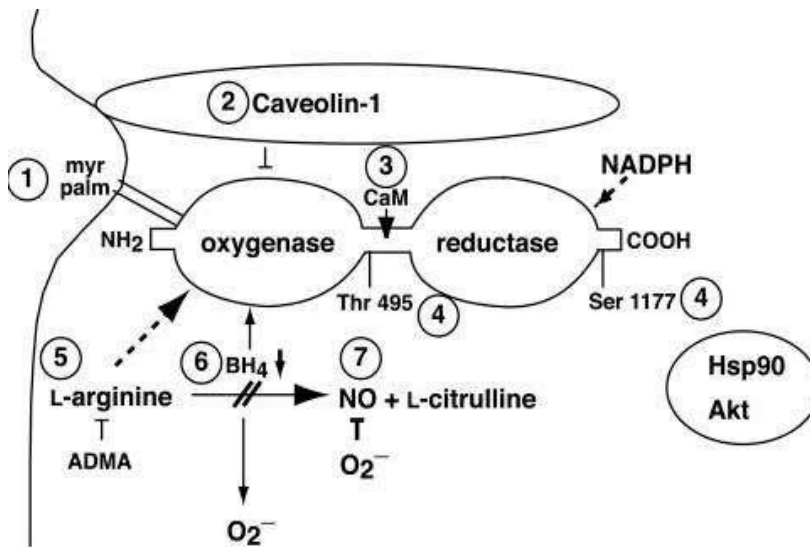
3.1.2. Nitrik Oksit Üretimi

NO, endotelial hücrelerde eNOS aktivitesi ile prekürsörü olan L-Arjinin'den üretilir. eNOS hücre membranında caveola içine yerleşmiştir. Kaveolin 1 (Cav-1) isimli protein kalmoduline (CaM) bağlanarak eNOS aktivitesini inhibe eder. Kalsiyumun kalmoduline bağlanması Cav-1'in ayrılmasına sebep olur; bundan dolayı eNOS aktive olur ve NO üretimi artar. Ayrıca kofaktör olan tetrahidrobiopterin (BH₄) ve NADPH, NO üretimde etkili olurlar (Şekil 1 ve 2) (15).



Şekil 1. Endotel hücreleri tarafından NO üretimi.

Yukarıdaki reaksiyonda BH₄ ve NADPH gibi kofaktorler kullanılarak NO üretimi sağlanır. Vazodilatator agonist veya shear strese yanıt olarak artan intraselluler kalsiyum (Ca²⁺), Cav-1'i CaM'den ayırır; böylece eNOS uyarılmış olur. NO vasküler düz kas hücrelerine difüze olur ve guanilat siklaz (GC) enzimini aktive eder. Guanosin trifosfat (GTP) guanosin monofosfata (GMP) dönüşür ve gevşeme gerçekleşir (Şekil 1).



Şekil 2. eNOS aktivitesinin düzenlenmesi.

eNOS enzimi 2 adet globuler protein modülünden oluşur (oksijenaz ve reduktaz). Reduktaz bölgesi, NO üretimi için gereken elektronları redükte olmuş NADPH'ı dehidrojenize ederek üretir. Elektronlar daha sonra oksijenaz bölgesine geçerler. Bu elektron transferi Ca^{2+} bağımlı CaM bağlanması ile aktive olur. Oksijenaz bölgesi NO üretim yeridir ve hem, L-Arjinin, BH4 bağlar. eNOS'un kaveola'ra yerleşimi düzgün NO üretimi için gereklidir. Kaveoların yüzeyinde bol miktarda bulunan Cav-1 proteini eNOS ile etkileşime girerek inhibe eder. CaM eNOS'un allosterik aktivatorüdür. CaM'in özgül yerine bağlanması, eNOS'un reduktaz bölümünden elektron transferini hızlandırır. eNOS aktivitesi serin artığı 1177'nin fosforillenmesi ile kontrol edilir (Ser 1177). Bu aktive edici fosforilasyon Akt kinaza ve ısı şok proteini 90 (Heat Shock Protein 90=HSP90)'a ihtiyaç gösterir. Threonin 495'deki fosforilasyon ise eNOS'u inaktive eder. L-Arjininin eNOS'un katalitik merkezine bağlanması ADMA tarafından inhibe edilebilir. BH4, NO sentezi için kofaktör olarak gereklidir. BH4 eksikliğinde eNOS'da ayrışma gerçekleşir ve O_2^- oluşur (Şekil 2) (15).

3.1.3. Kaveolin- 1

Kaveoller lipid yığınlarının bir alt kümesi olarak plazma membranlarında çeşitli hücrelerin içerdiği endotelial, düz kas, epitel hücreler ve fibroblastlarda bulunmuştur. Kaveoller, transitoz, endositoz, hücre çoğalmasının düzenlenmesi, diferansiyon ve apoptozis de önemli rol oynamaktadır (16).

Kaveol proteinin yapı taşı olan kaveolinler 3 izoformda bulunmaktadır. Kaveolin-1 (Cav-1) birçok kas olmayan hücre tiplerinde kaveol oluşumu için, Cav-2 membran lokalizasyonuna için gereklidir. Cav-3 ise çizgili (iskelet ve kardiyak) düz kas hücreleri içinde kaveol oluşumu için gereklidir (17).

Cav-1'in endotelial hücrelerde en fazla seviyede olduğu düşünülmektedir (18).

Cav-1, NH₂ içeren iskele bölgesi, fosfokinaz C (PKC) ve eNOS gibi proteinlerle etkileşime girer. PKC, eNOS u inhibe eder böylece endotel hücrelerden salınan NO miktarı azalır. Bundan dolayı Cav-1 gibi PKC yi inhibe eden maddeler süperoksit üretimi inhibe etmek ve endotel hücrelerinden NO salınımını artırmak eğilimindedir (18).

3.1.4. HSP90

Fizyolojik koşullarda; HSP, proteinlerin çökmesini engellemek, yeni sentezlenen proteinlerin üçüncül yapılarını kazanmasını sağlamak, yanlış katlanmış ve çökmüş proteinleri birbirinden ayırmak ve doğru katlanmasını sağlamak, ribozomdan görev alacağı yerlere taşımak görevi ile bilinirler. Hücre farklılaşmasında önemli rol oynadığı ve stres koşullarında sentezinin hızlandığı bilinmektedir. Hücre içinde sitoplazma ve organellerde, hücre dışında ve hücre membranlarında bile bulunabilirler.

eNOS aktivasyonunda, HSP önemli rol oynayan moleküler bir şaperon olup kardiyovasküler hastalıklarda eNOS'u regüle edici olması, önemini göstermektedir (19).

HSP90'nın kardiyoprotektif olduğu bilinmektedir (20). Yapılan çalışmalar kronik hipoksinin, NO üretimini arttıran NOS ile ilgili HSP90 miktarını ve tavşan miyokardında oluşan NOS bağımlı süperoksit üretimini sınırlandırarak I/R hasarını azalttığı saptanılmıştır (21,22).

3.1.5. Asimetrik Dimetil Arginin

ADMA, arginine benzeyen ayrıca plazmada, idrarda ve dokularda bulunan bir aminoasittir. Proteinlerdeki arginin kalıntılarının metillenmesiyle doğal bir şekilde oluşabilmektedir. Aterosklerozun fizyopatolojisinde, damarlardaki baskın NOS izoformu olan eNOS'un kompetitif inhibisyonu ile önemli olan endotelial disfonksiyona neden olduğu bilinmektedir (23). ADMA, daha çok nukleusta bulunan, metilenmiş arginin rezidüleri içeren polipeptidlerin veya proteinlerin katabolizmasına bağlı olarak meydana gelir ve proteinlerin hidrolizi neticesinde serbestleşir (24).

Plazma ADMA düzeyleri sağlıklı bireylerde 0.2-1.2 mmol/L arasındadır (25). Kardiyovasküler hastalıklar önde olmak üzere, yüksek plazma ADMA düzeyleri diğer pek çok hastalıkta saptanmıştır. ADMA idrar ile günlük ortalama 60 mmol atılabilmektedir (25). İdrarla ADMA atılımının tamamen bozulması, plazma ADMA düzeylerinde yükselmeye neden olur. Proteoliz artışı sebebiyle, dokulardan plazmaya ani ADMA geçişi veya ADMA serbestleşmesinin hızlı artışı, plazma ADMA düzeylerinde ani değişikliklere neden olabilmektedir (26).

ADMA'nın genetik olarak elimine edildiği fareler ve ekzojen larginin verilerek ADMA'nın kısmen ortadan kaldırılması ile yapılan bir çalışmada inflamasyon belirteçleri ve I/R hasarı üzerine etkileri görülmüştür. Bu çalışmada farelerde I/R hasarından sonra ADMA düzeylerinin anlamlı arttığı gözlenmiştir (27). Benzer başka bir çalışmada I/R hasarından sonra ADMA düzeylerinin anlamlı arttığı gözlenmiştir (28).

3.1.6. NADPH oksidaz

Kardiyovasküler hastalıkların çoğunun patofizyolojisiyle alakalı ROS'un önemli kaynağı NADPH oksidaz enzimleridir. Bu enzimlerin hücrenin büyüme, diferansiyasyon, migrasyon ve proliferasyon gibi işlevi ile ilişkili redoks duyarlı sinyal yolunun modülasyonunda önemi bilinmektedir. Redoks sinyali ve oksidatif stres; ateroskleroz, hipertansiyon ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler durumlarda önemlidir (29).

I/R hasarında ve serbest radikallerin meydana gelmesinde önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini ihtiva ederler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli rollerde görev alır; aktive nötrofillerde ksantin-oksidad'ın artması ile ROS'un salınması "solunum patlaması" olayını oluşturur. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu zaman doğal bir şekilde dismutasyonla hidrojen perokside dönüşür. Hidrojen peroksit ise miyeloperoksidaz enzimi ile klorür iyonlarının varlığında, hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilen kuvvetli bir oksidandır (30). NADPH oksidazı baskılayan durumlar ve ilaçlar raktif oksijen radikallerinin oluşmasını azaltıp, I/R hasarından dokuların korunmasını sağlar (31).

3.1.7. Rho kinaz

Rho proteinleri, öncelikle hücre iskeleti kontrolünden, stres liflerinin yapılanmasından, fibroblastların yapışmasından ve düz kas kasılmasında kalsiyuma

duyarlılığın düzenlenmesinden sorumludur (32). Rho izoformları arasında vücutta çeşitli hücrelerde varlığı gösterilen ve üzerinde en fazla çalışılan Rho A'dır (33).

Rho kinaz, düz kas kasılması, aktin hücre iskeleti oluşumu, hücre yapışması ve hareketliliği, çoğalması, sitokinaz ve genetik bilginin genden proteine aktarılması gibi kardiyovasküler hastalıkların patojenezinde rol oynayan çeşitli hücre işlevlerine aracılık etmektedir (32). Rho kinazın damar düz kas hücrelerinin kasılmasında önemi daha önceki çalışmalarda bulunmuştur. Bundan dolayı, Rho kinaz inhibitörlerinin koroner ve serebral vazospazm, hipertansiyon ve pulmoner hipertansiyon ile miyokardial iskemi reperfüzyon hasarı gibi damar düz kas hücresi aşırı kasılmasının oluşturduğu kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceklerini göstermektedir (33).

NO ve Rho kinaz yolları özellikle kardiyovasküler (KVS) sistemde birbirine zıt çalışan iki mekanizma olarak görülmektedir. Rho kinazın hipertansiyon, koroner arter spazmı, anjina, ateroskleroz, miyokardial iskemi ve reperfüzyonun neden olduğu zedelenme ve restenoz gibi düz kas hücrelerinin aşırı kasılmasının eşlik ettiği çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patojenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir.

3.2. Statinler

Statinler, koroner olay (stabil angina ve akut koroner sendromlar gibi) ve diğer aterosklerotik damar hastalıkları riski taşıyan kişilerde koroner ve diğer kardiyovasküler olayların gelişmesini önlemek için primer profilaksi amacıyla kullanıldığı gibi miyokard infarktusu, geçici iskemik nöbet veya hemorajik-olmayan inme geçirmiş hastalarda sekonder profilaksi için yararlıdırlar. Ayrıca diğer

kardiyovasküler hastalıklar için başta gelen risk faktörleri olması nedeniyle hipertansiyon tedavisinde antihipertansif ilaçlarla birlikte sık kullanılırlar.

3.2.1. Statinler ve etki mekanizmaları

Statinler HMG CoA redüktaz enzimini reversibl olarak inhibe ederek mevalonat yolu denilen kolesterol biyosentezini inhibe etmekte, bunun neticesinde plazma total kolesterol düzeyi ve LDL kolesterol düzeyi azalmakta, ayrıca hepatik LDL reseptör aktivitesindeki artışla birlikte LDL'nin karaciğer tutulumu da artmaktadır (35). Statinler yapı ve tip olarak farklı özellikler gösterirler. Elde edilişlerine göre doğal ve sentetik olarak, metabolizmalarına göre de lipofilik ve hidrofilik olmak üzere gruplandırılırlar (35). Oral yoldan alınırlar. Lipofilik statinler daha çok prodrug olarak, hidrofilik statinler aktif şekilde barsak mukozasından emilerek enterohepatik sıklusa girerler. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanırlar. Statinlerin karaciğerden ilk-geçiş temizlenmeleri yüksek olup yarı ömürleri kısadır. Emilen miktarın %80-85'i safra ile geri kalan kısmı renal sistemden atılır (36).

3.2.2. Statinlerin pleotropik etkileri

Statinlerin, birçok primer ve sekonder korunma çalışmasında kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi azaltıcı etkileri gösterilmiştir. Genellikle bu etkileri lipid düşürücü etkiyle ilişkilendirilse de, yapılmış olan bu çalışmaların alt grup analizlerinde lipid düşürücü etkilerinden bağımsız olan direkt kardiyoprotektif etkileri olduğu düşünülmektedir. Statinlerin lipid düşürücü etkisi dışındaki etkilerine genel olarak pleotropik etki denilmektedir. Özetle bu etkiler; endotel fonksiyonu üzerine olan olumlu etkileri, nitrik oksitin biyoyararlanımında artma ve antioksidan

özellik, trombosit fonksiyonları üzerine pozitif etkiler, aterosklerotik plak stabilizasyonu ve vasküler inflamasyonu azaltma şeklinde sıralanabilir (37,38)

3.2.3. Statinlerin endotel fonksiyonları üzerine etkileri

Vasküler tonusun belirlenmesi, hemostazın aktif olarak kontrol edilmesi, endotel geçirgenliğinin kontrolü, vasküler düz kas büyümesinin kontrolü, antiinflamatuvar ve anti trombotik etki endotelin temel fonksiyonel özelliklerindendir. Endotelin fonksiyonel özelliklerinin bozulması endotel disfonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu genel ifadenin yanında endotel disfonksiyonu, daha çok endotel kaynaklı dilatasyondaki bozulmayı tasvir etmek için kullanılmaktadır. Endotel kaynaklı nitrik oksit (NO), vasküler relaksasyon sağlayan önemli bir moleküldür. Platelet agregasyonu, vasküler düz kas proliferasyonu ve endotel-lökosit ilişkisinde aterojenitenin engellenmesi gibi çeşitli görevlerde rol alır. Disfonksiyone endotelde NO salınımı bozulduğu için, NO'nun endotel üzerindeki etki ve kontrolü kaybolmaktadır. Bu molekül aynı zamanda damardaki inflamatuvar aktivitenin önemli düzenleyicisidir (38,39) Endotel disfonksiyonunun aterosklerozdaki önemi ise, aterosklerotik sürecin başlangıç evresinde meydana gelen ilk bozukluk olmasından kaynaklanmaktadır (40). Hiperkolesterolemi; NO biyoaktivitesini azaltır, süperoksit üretimini ve endotelin reaktivitesini artırarak vasküler homeostazda birçok değişikliğe neden olur. Ayrıca adezyon moleküllerinde artışa ve endotel bağımlı vazodilatasyonda azalmaya neden olduğu da gösterilmiştir . Kolesterol yüksekliğinin sebep olduğu endotel fonksiyon bozukluğunda sadece LDL konsantrasyonuna bağlı olmadığı, LDL oksidasyonu da alakalı olduğu düşünülmektedir . Statin tedavisi ise kardiyovasküler riski azaltmakla birlikte endotel fonksiyonlarını düzelttiği pleotropik etkileri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Statinler, HMG CoA redüktaz inhibisyonu ile kolesterol sentezini engellediği gibi önemli izoprenoid intermediatörlerin de sentezini inhibe etmektedir. Bu intermediatörler hücre içi çeşitli proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonunu engelleyerek NO sentazın endotel izoformunun aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir . Bu şekilde statinler endotelden NO salınımını arttırarak endotel fonksiyonları üzerine olumlu etki yapmaktadır.(39,40)

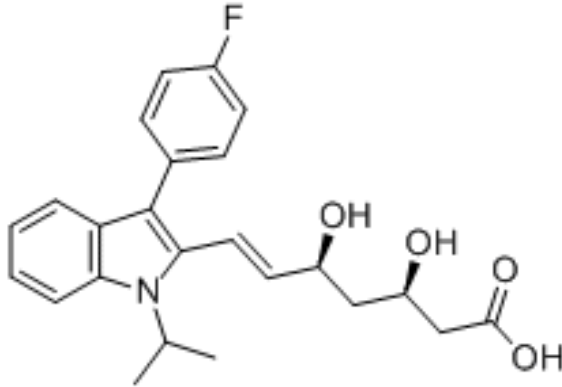
Ayrıca endotelin-1 seviyesini sentezini de azaltarak endotel fonksiyonlarını iyileştirmektedir. Yapılan bir çalışmada stabil hastalarda statin alımından üç saat gibi kısa bir süre sonra akım bağımlı vazodilatasyonda artış olduğu saptanmıştır. Statinler, ayrıca kemik iliğinden endotel progenitör hücrelerin (EPH) hareketini, dolaşımdaki sayılarını ve dolaşımdaki kalış sürelerini artırarak endotelizasyonu hızlandırdığı belirtilmektedir.

Statinlerin endotel fonksiyonunu düzeltici etkilerinde olası bir diğer mekanizma, antioksidan etkileridir. Statinler, endotel-kaynaklı vazodilatasyonu, süperoksit ve hidroksil radikallerini inhibe ederek arttırmıştır . Ayrıca, lipid düşürücü etkileriyle de vasküler oksidatif stresi azaltmaktadırlar. Statinlerin, Rac-1 aracılı NADH oksidaz aktivitesini inhibe ederek ve anjiotensin tip-1 reseptör ekspresyonunu azaltarak vasküler düz kasta anjiotensin 2 ile indüklenen serbest radikal üretimini azalttığı gösterilmiştir.

Ayrıca statinler C-reaktif protein seviyelerini düşürerek endotele bağımlı vazodilatasyonu artırıp endotel disfonksiyonunun iyileşmesine dolaylı olarak etki edebilmektedirler (38).

3.2.4. Fluvastatin

Fluvastatin tamamen sentetik bir kolesterol düşürücü ajan olup, 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA)'yı kolesterol dahil sterollerin ön maddesi olan mevalonata dönüştürmekten sorumlu HMG-CoA redüktazın kompetitif inhibitörüdür. Fluvastatin başlıca etkisini karaciğer üzerinde gösterir ve biri farmakolojik aktiviteye sahip 2 eritro enantiomerden oluşur. Düşük yoğunluktaki lipoprotein (LDL) reseptörlerinin biyosentezini uyaran ve böylelikle LDL partiküllerinin tutulumunu arttıran kolesterol sentezinin inhibisyonu karaciğer hücrelerindeki kolesterolü azaltır. Bu mekanizmaların nihai sonucu ise plazma kolesterol düzeyinin azalmasıdır.



Şekil 3. Fluvastatinin kimyasal yapısı

3.2.5. Kardiyovasküler sistem ve fluvastatin

Fluvastatin primer hiperkolesterolemili ve karma dislipidemili (Fredrickson Tip IIa ve IIb) hastalarda, yükselmiş olan total kolesterol, LDL-kolesterol, apo-B ve trigliserit (TG) düzeylerinin düşürülmesinde ve HDL-kolesterolün artırılmasında diyetle destek olarak endikedir. Ayrıca, koroner kalp hastalığı ve hafif formları da dahil primer hiperkolesterolemili hastalarda, koroner aterosklerozun ilerlemesini yavaşlatmakta endikedir.

3.2.6. İskemi ve reperfüzyon hasarı ve fluvastatin

Fluvastatin güçlü bir antioksidan olup farklı kimyasal yapısı nedeniyle serbest radikal süpürücü özelliği olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Reperfüzyon boyunca oksijen kaynaklı radikallerin çoğu mitokondri hücre duvarı ve lökositlerden salınır ve fluvastatinin antioksidan özelliği ile I/R hasarından miyokard dokusunu korur (43)

Major karaciğer rezeksiyonlarından sonra I/R hasarı olduğu bilinmektedir. Karaciğer rezeksiyonundan önce preoperatif atorvastatin verilmesi ile hepatik hasarın azaldığı ve karaciğer enzim düzeylerinin düşük seyrettiği görülmektedir (44).

Fluvastatin TLR4 sinyal yolunu engelleyerek ve inflamatuvar yanıtı baskılayarak I/R hasarından dokuları korur (45). Ayrıca fluvastatin kemik iliğinden progenitör hücrelerin migrasyonunu artırarak angiogenezi artırır. Angiogenezin artması I/R hasarının azalmasını sağlar (46).

Lipofilik statinler (atorvastatin, fluvastatin ve serivastatin) hidrofilik statinlere (pravastatin) göre I/R'de kalpte ATP düzeyini düşürerek dokuların I/R hasarından korunmasını sağlamaktadırlar (47).

3.2.7. Çalışmanın Gerekçesi ve Amacı

MI patofizyolojisinde oksidatif stres ve endotelial işlev bozukluğunun önemli rol oynadığı görülmektedir. Statinlerin kolesterol düşürücü etkilerine ek olarak antiinflamatuvar, antiproliferatif, antitrombotik, antiaterojenik ve antihipertansif etkileri olduğu bilinmektedir. Statinlerin reaktif oksijen üretimini azaltarak endotelial disfonksiyonu iyileştirdiği ve eNOS ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Vasküler disfonksiyonun önlenmesinde, ROS'ların oluşturduğu oksidatif stres ve inflamasyonda fluvastatinin yararlı etkileri bilinmektedir.

Fluvastatinin I/R hasarını endotelial disfonksiyon ve oksidatif stres ile ilişkili ADMA, NADPH oksidaz, rhokinaz, kaveolin-1 ve HSP90'nı etkileyerek azalttığı görülmüştür. Vazospastik anginası olan hastalarda ADMA düzeylerinin yükseldiği ve nitrik oksit seviyelerinin düştüğü görülmüştür. Ayrıca, I/R hasarında nötrofillerin plazma zarında pro-oksidatif NADPH oksidazın arttığı saptanılmıştır. eNOS ile Cav-1 ve HSP90'nın etkileşimi bulunmaktadır, HSP90 NO üretiminin artmasını sağlamaktadır. Rhokinaz vasküler düz kas tonusunun düzenlenmesinde etkilidir ve I/R de rhokinaz yolağının inhibisyonunu hedefleyen ilaçlar I/R'nin sınırlandırılmasını sağlayacaktır. Fluvastatinin kardiyak I/R hasarında Cav-1, HSP90, ADMA, NADPH oksidaz ve rho kinaz seviyelerine etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada; MI'dan korunmada rol alan endojen moleküler mekanizmaların koruyucu etkilerinde fluvastatinin rolü olup olmadığının saptanılması amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanları

Deneylerde Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde üretilen Sprague Dawley cinsi, 200-250 gr ağırlığında 27 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlara 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık siklusta, havalandırılmalı, sabit ısı (21±1 C°) odalarda ve özel kafeslerde standartlara uygun olarak bakıldı. Beslenmeleri 8mm'lik standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile ad libidum olarak sağlandı.

4.2. Deney Planı ve İlaç Uygulamaları

Çalışma kontrol, iskemi-reperfüzyon, fluvastatin ve iskemi-reperfüzyon olmak üzere 3 grup üzerinden planlandı.

Deney grupları:

Kontrol grubu (n=7): Her hayvana anestezi altında juguler vene yerleştirilen kanül yardımı ile infüzyon pompası kullanılarak %0.9 izotonik NaCl 2ml/dk olarak uygulandı.

İskemi/reperfüzyon grubu (I/R grubu) (n=10): Anestezi altında her hayvana miyokardiyal I/R yapıldı. İskemiden önce üretan (i.p) olarak % 0.9 izotonik NaCl ve iskemi sırasında juguler vene yerleştirilen kanül yardımı ile infüzyon pompası kullanılarak % 0.9 izotonik NaCl 2ml/dk olarak uygulandı..

İskemi/reperfüzyon+ Fluvastatin (I/R+Fluvastatin grubu) (n=10): Anestezi altında her hayvana miyokardiyal I/R yapıldı. . İskemiden önce 15 gün boyunca, i.p. olarak 10 mg/kg/gün fluvastatin ve iskemi sırasında juguler vene yerleştirilen kanül yardımı ile infüzyon pompası kullanılarak 10 mg/kg dozda Fluvastatin uygulandı.

4.3. Cerrahi uygulama: İskemi-reperfüzyon

Sıçanlar üreteran (i.p.) ile genel anesteziye alındı. Yapay solunum için trakea kanülasyonu yapıldı ve sıçanlar solunum pompasına bağlandı. Karotid artere yerleştirilen bir kanülden, transdüser ve bir kaydedici yardımı ile kan basıncı, kalp hızı ve EKG yazdırıldı. İlaç uygulamaları için juguler ven kanüle edilerek kanülün diğer ucu infüzyon pompasına bağlandı. 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 pCO₂, pO₂ ve pH değerlerini korumak amacı ile ventilasyon cihazı (Harvard Animal Rodent Ventilator) ile 1.5 ml/100gr'lık hacim ve 60 atım/dakika'lık hızla oda havası verilerek pozitif basınçlı solunum uygulandı. Perikardiyumun sıyrılmasının ardından göğsün sağ tarafına hafifçe basılarak kalp dışarı çıkarılıp ve 10 mm'lik yuvarlak uçlu iğne ile 6/0 ipek iplik sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızla geçildi. Daha sonra kalp yeniden göğüs içine yerleştirilerek stabilizasyon için 20 dakika beklendi. Stabilizasyon dönemi başlangıcında infüzyon pompası kullanılarak gruplara ilaç uygulamasına başlandı ve iskemi süresince de ilaç uygulamasına devam edildi. Konulmuş olan ipliğin uçları 1 mm çap ve 1 cm boyda ufak bir plastik tüp içinden geçirilerek ve 20 dakikalık stabilizasyon periyodu sonunda damarın altından geçirilmiş olan ip plastik tüp ve bir klemp yardımı ile sıkıştırılarak damarın 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 hayvan karotid arterden kanatılarak sakrifiye edildi.

Genetik analizler

Deneyler sonunda hızlıca çıkarılıp serum fizyolojik ile yıkanan kalplerden 2 mm kalınlığında alınan dokular RNA later solüsyonu içeren 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. +4°C'de 1 gece bekletildikten sonra RNA izolasyonu yapılınca kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

4.3.1. RNA İzolasyonu

1. Yaklaşık olarak 50-100 mg olan dokular RNA later solüsyonu içerisinden çıkartılarak kurutma kağıdı arasına alınıp hafifçe bastırılarak RNA later solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml Trizol reaktifi içeren 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı ve steril çelik bilyeler kullanılarak homojenizasyon cihazında homojenize edildi.

2. Homojenize edilmiş örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Santrifüjde 12000x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım yeni tüpe transfer edildi.

3. Üzerine 0.2 ml kloroform ilave edilerek vortekslendi ve 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Örnekler, 15 dakika ve +4°C'de 12000xg'de santrifüj edildi.

5. Üst faz, yeni bir tüpe transfer edildi ve üzerine 0.5 ml izopropil alkol eklendi. Örnekler, 10 dakika 15-30°C'de inkübe edildi ve +4°C'de 10 dakika 12000xg'de santrifüj edildi.

6. Süpernatant kısım tamamen uzaklaştırıldı. RNA pelleti, ilk olarak 1 ml %75'lik etanol ile yıkandı. +4°C'de 5 dakika için 7500xg'de santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi tekrarlandı ve kalan tüm etanol uzaklaştırıldı.

7. RNA pelleti 5-10 dakika havada kurutma işlemine tabi tutuldu.

8. DNase/RNase içermeyen su ile sulandırıldı ve cDNA elde edilinceye kadar -80°C’de saklandı.

4.3.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

İzolasyonu yapılan RNA’ların miktarı Qubit cihazı (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanılarak ölçüldü. K, IR, IRF ve olmak üzere oluşturulan 3 grup için Qubit ile ölçülen değerlere göre eşitleme yapılarak 3 RNA havuzu oluşturuldu.

4.3.3. cDNA Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi High Capacity cDNA sentez kiti kullanılarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde gerçekleştirildi.

4.3.4. Real Time-PCR

Elde edilen cDNA’lar, GAPDH (Housekeeping gen) HSP90 ve CAV-1 gen ekspresyonlarını araştırmak için Tag Man Ekspresyon Assay’leri(Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanılarak, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR(Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazında çalışıldı. 3 gruptaki ilgili 4 genin ekspresyonları $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri kullanılarak karşılaştırıldı.

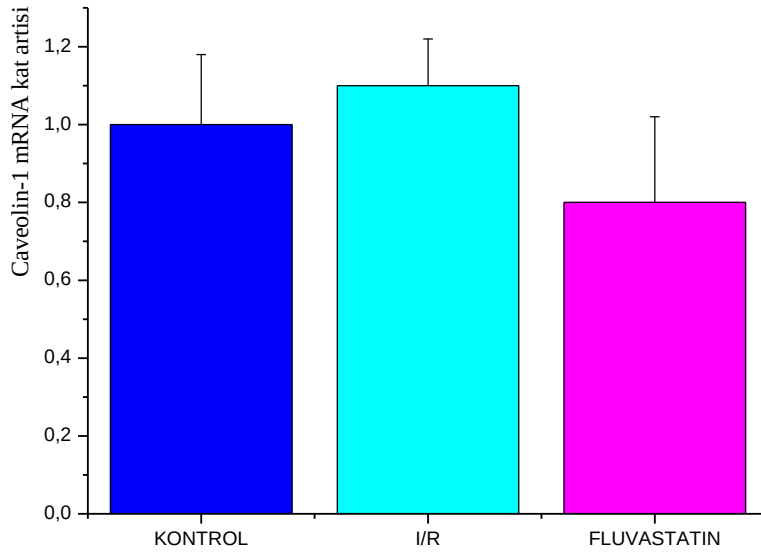
4.4.ELISA

Doku ADMA, Rhokinaz ve NADPH oksidaz düzeylerine ELISA yöntemi ile bakıldı. Sıçanlardan elde edilen doku örneklerinde ADMA, Rhokinaz ve NADPH oksidaz ELISA kitleri ile ticari firmaca (Eastbiopharma, Cat No: CK-E90206- Ref: E20121120049- Lot: 20121120; Sunred, Cat No:45 201110081-

5. BULGULAR

5.1. Fluvastatin uygulamasının kaveolin-1 düzeylerine etkileri

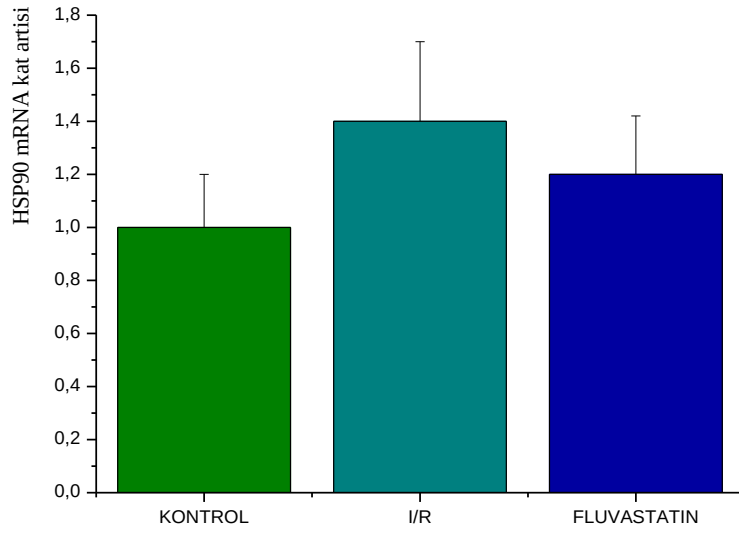
Kaveolin-1 mRNA düzeyi I/R hasarında 1.1 kat artarken fluvastatin ile 0.8'e düştü. Kaveolin-1 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4).



Şekil 4. Fluvastatin uygulamasının kaveolin-1 düzeylerine etkileri

5.2. Fluvastatin uygulamasının HSP90 düzeylerine etkileri

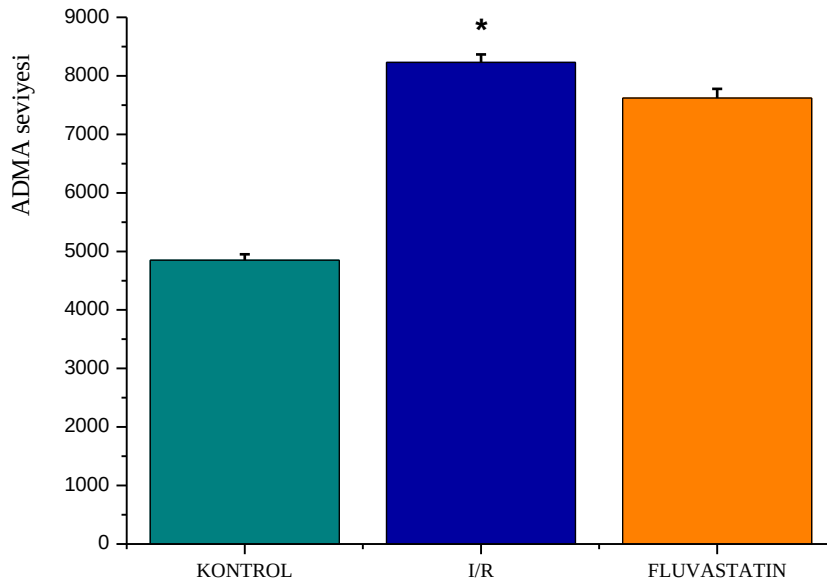
HSP90 düzeyi IR ile 1.4 kat yükselirken fluvastatin ile 1.2'e düştü (% 66). Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadı (Şekil 5).



Şekil 5. Fluvastatin uygulamasının HSP90 düzeylerine etkileri

5.3. Fluvastatin uygulamasının ADMA düzeylerine etkileri

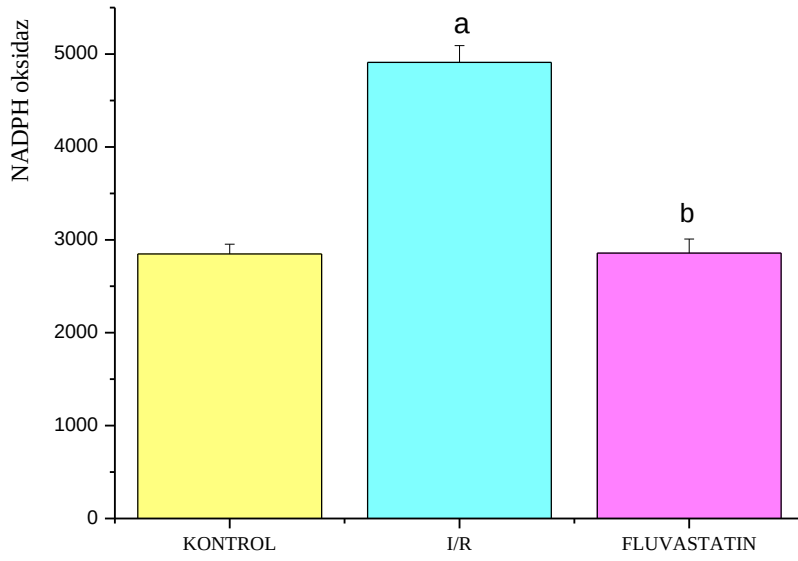
ADMA düzeyi IR ile 8200'e yükselirken fluvastatin ile 7600'e düştü. I/R hasarı ADMA düzeylerini anlamlı artırdı. Fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 6).



Şekil 6. Fluvastatin uygulamasının ADMA düzeylerine etkileri

5.4. Fluvastatin uygulamasının NADPH oksidaz düzeylerine etkileri

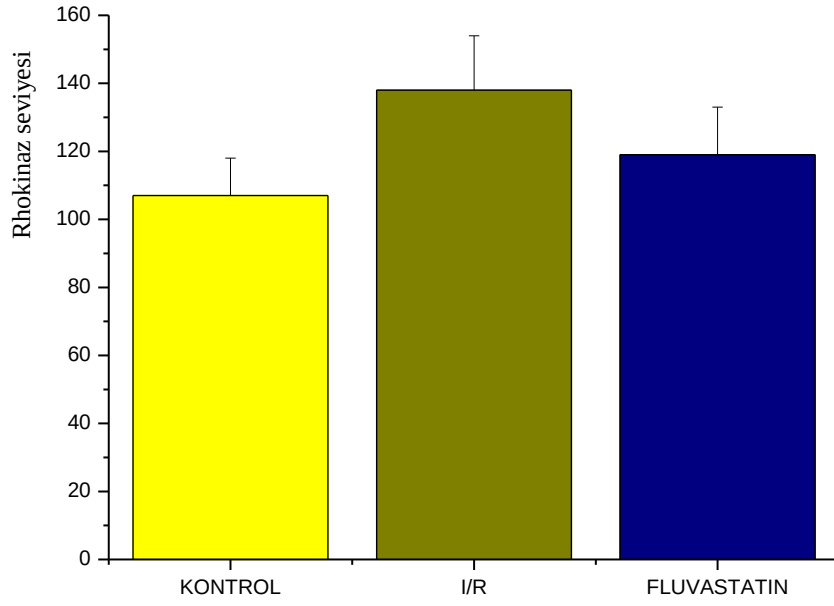
NADPH oksidaz düzeyi I/R hasarında 4911'e yükselirken fluvastatin ile 2858'e düştü. I/R grubunda NADPH oksidaz düzeyleri anlamlı arttı. Fluvastatin grubu I/R ile kıyaslandığında NADPH oksidaz düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı azaldı (Şekil 7).



Şekil 7. Fluvastatin uygulamasının NADPH oksidaz düzeylerine etkileri

5.5. Fluvastatin uygulamasının Rhokinaz düzeylerine etkileri

Rho-kinaz düzeyi I/R hasarında 138'e yükselirken fluvastatin ile 119'a düştü. Rhokinaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 8).



Şekil 8. Fluvastatin uygulamasının Rhokinaz düzeylerine etkileri

6. TARTIŞMA

Çalışmamızda I/R ile düzeyleri artan Cav-1, HSP90, ADMA, NADPH oksidaz ve rhokinazın, fluvastatin uygulaması ile düzeylerinin düştüğü görüldü. Fakat fluvastatinin Cav-1 ve ADMA düzeylerini düşürmesine rağmen, bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Cav-1 düzeyi I/R hasarında dokuları korumak için artmaktadır (48). Pelat ve ark. (49) tarafından kardiyak hasar oluşturulmuş farelerde Cav-1 düzeylerinin düştüğünü fakat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını saptamışlardır. Sığır aortuyla yapılan bir çalışmada; atorvastatinin Cav-1 düzeyini düşürdüğünü, eNOS aktivitesini de azalttığını saptamışlardır (50). Başka bir çalışmada in vivo simvastatin uygulamasının endotelial Cav-1 düzeyini düşürdüğü gözlenmiştir (51). Çalışmamızda da diğer literatür çalışmalarına benzer şekilde I/R hasarı sonucu Cav-1 düzeyi arttı. Fluvastatin uygulanan grupta Cav-1 düzeyi kontrol grubuna göre azalmıştır.

HSP90'nın ateroskleroz ve diğer kalp damar hastalıkları patogeneğinde korucuyu rol aldığı tahmin ediliyor. Statinlerin çeşitli literatür çalışmalarında endotel ve diğer hücrelerde özellikle HSP70 ve HSP90 düzeylerini düşürdüğü bilinmektedir (52,53). Fu ve ark. (52) tarafından insan umbilikal ven endotel ve koroner arter endotel hücreleriyle yapılan bir çalışmada; statinlerin (atorvastatin, pravastatin, simvastatin) HSP90 düzeylerini düşürdüğü saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, böbrek I/R hasarında HSP90 inhibitörlerinin kullanılmasının donör böbrekleri koruduğu düşünülmektedir (53). Bizim çalışmamızda da HSP90'nın I/R hasarında arttığı, fluvastatin kullanımıyla HSP90'nın düştüğü saptandı.

ADMA endotelin vasküler ton ve yapısının sürdürülmesinde çok önemli bir rolü olduğuna dair çok fazla sayıda kanıt mevcuttur (54,55). eNOS inaktivatörü onun endojen inhibitörü olan ADMA'nın yüksek plazma değerleri ile ilişkilidir (56). Sung Won Bae ve ark. (57-59) yaptığı çalışmalarda plazma ADMA konsantrasyonunun akut koroner sendromlar(AKS)'da yüksek bulmuşlardır . Başka bir çalışmada ise metabolik sendrom tanısı konan hastalara fluvastatin tedavisi verilmiş ve bu hastalarda serum ADMA düzeylerinde azalma olduğu saptanmıştır (60). Diğer bir çalışmada da statinlerin genel olarak ADMA düzeylerini anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır (61). Bizim çalışmamızda da diğer literatür çalışmalarına benzer şekilde I/R hasarında ADMA düzeyinin arttığı saptandı. Statinlerin endotel koruyucu etkisi nedeniyle fluvastatin alan ratlarda ADMA düzeyinin düştüğü saptandı.

Birçok çalışmada kalp dokusunun I/R hasarına bağlı zedelenmesinde nötrofillerin doku düzeyinde ve sistemik olarak arttığı gösterilmiştir (62,63). Statinlerin NADPH oksidaz düzeylerini düşürerek endotelial disfonksiyonu azalttığı bilinmektedir (64). Ihori ve ark. (65) hipertansif ratlarda süperoksit radikallerinin miyokardiyal fibrozise etkilerini araştırmış. Fluvastatinin NADPH oksidaz düzeyini düşürerek süperoksit oluşumunu azalttığını ve bunun miyokardiyal fibrozisi azaltabileceğini saptamışlar. Bizim çalışmamızda I/R hasarında NADPH oksidaz enziminin ROS artışı nedeniyle arttığı düşünüldü.

Fluvastatin inflamasyonu baskılayıcı etkisi nedeniyle de verilen ratlarda NADPH oksidaz enziminin I/R hasarına göre daha düşük olduğu düşünülmektedir.

Statinler pleiotropik etkilerini ROCK enzim aracılığı ile göstermektedir (66). Kaplan ve ark. (67) yaptığı bir çalışmada, rosuvastatinin farelerin torasik aortasında potasyum klorüre verilen kasılma yanıtlarında bir azalmaya neden olduğunu ve bu

uygulamanın dokudaki ROCK enziminin selektif inhibitörü olan Y-27632'ye verilen gevşeme yanıtlarını arttırdığını göstermiştir. ROCK enzimini hedefleyen tedavilerin miyokard fibrozisini ve hipertrofisini azaltabileceği literatür çalışmalarında belirtilmektedir (68). Bizim çalışmamızda da rhokinazın diğer literatür çalışmalarına benzer şekilde iskemi reperfüzyon hasarında düzeyi arttığı saptandı. Statin uygulanmasıyla rhokinaz düzeyinin düştüğü görülmektedir ve bu yolla inflamasyonun azalmasına katkıda bulunup kalbi korudukları anlaşılabılır.

I/R hasarında lipofilik (fluvastatin, simvastatin, atorvastatin, serivastatin) ve hidrofilik (pravastatin) HMG CoA redüktaz enzim inhibitörlerini karşılaştıran bir çalışmada, fluvastatinin köpek kalbinde kontraktıl disfonksiyonu azalttığı görülmüştür. Fakat aynı etki pravastatinde görülmemiştir. Fluvastatinin kalpte ATP düzeyini düşürerek bu etkiyi sağladığı saptanmıştır (69).

Koroner arter hastalığı olan hastalara fluvastatin verilmesiyle miyokardiyal kan akımında artış olup olmadığının Talyum-201 SPECT ile incelendiği bir çalışmada, fluvastatinin egzersiz ile beraber 12 ve 24'üncü haftalarda kalpte kan akışını artırdığı görülmüştür (70). Anti-iskemik terapi (statin, hastalık modifiye edici ilaç) miyokard perfüzyonunu etkilemesi sonucu son günlerde yeni tedavi yaklaşımları arasındadır (71).

Statinlerin akut etkileri arasında I/R hasarını azaltma vardır. Bunu miyokardiyal dokuda patogenetik süreçleri etkileyerek yaparlar. Sol koroner arteri ligate edilen farelere fluvastatin verilmesiyle NO üretiminin arttığı ve nötrofil aktivitesinin de baskılandığı görülmektedir (72). Benzer bir çalışmada, fluvastatinin NO yolağı aracılığıyla I/R hasarını azalttığı görülmüştür (73). I/R hasarı sonrası düzeyleri artan TLR4, TNF- α ve NF- κ B'nin fluvastatin verilmesiyle düzeylerinin

azaldığı saptanmıştır (74). Kolesterol düzeyi normal farelere I/R hasarı sonrası akut gelişen ventriküler taşikardiler fluvastatin uygulanmasıyla azaldığı görülmektedir (75). Ventriküler fibrilasyonlar da statin uygulanmasıyla azalmaktadır (76).

Statinlerin kısa dönem etkileri arasında I/R hasarını azalttığı bilinmektedir. Uzun dönem etkilerinden olan sol ventrikül remodeling ve kalp yetmezliği ise pek bilinmemektedir. Sol koroner arteri ligate edilen farelere 4 hafta boyunca fluvastatin verilmesiyle miyokardiyal hipertrofi ve fibrozisin azaldığı görülmüştür. Ayrıca I/R hasarında düzeyleri artan matrix metalloproteinaz-2 ve 13'ün fluvastatin uygulanan farelerde azaldığı saptanılmıştır. Fluvastatinin yukarıdaki etkileri sonucunda I/R hasarı sonrası gelişen kalp yetmezliği oranını azaltmaktadır (77).

Böbrek transplant hastalarında I/R hasarı sonucu böbrek reddi gelişebilmektedir. Siklosporin ile birlikte fluvastatin verilmesiyle böbrekteki serbest kolesterol içeriği azaltmaktadır. Bunun I/R hasarını önleyip red reaksiyon oranını azalttığı kanısına varılmıştır (78).

Statinler stromal hücre derive faktör 1 (SDF-1) ile birlikte iskemik dokuda progenitör hücre migrasyonunu artırıp, endotelial progenitör hücre (EPC) apoptozisini azaltır. Ayrıca NO yolağı aktive eder ve MMP-2, MMP-9 düzeylerini arttırırlar. Tüm bunların sonucunda iskemik dokuda anjiogenezis artar ve I/R hasarı azalır (79).

Sonuç olarak,

Rhokinaz, NADPH oksidaz, ADMA, kaveolin-1 ve HSP90 I/R hasarında etkilidirler ve bu moleküller hedef alınarak I/R hasarına karşı yeni tedavi yaklaşımları belirlenebilir.

Fluvastatin I/R hasarını endotelial disfonksiyon ve oksidatif stres ile ilgili parametreleri etkileyerek azaltabilir. Daha yüksek doz yada uzun süre kullanım ile anlamlı sonuçlara ulaşılabileceği düşünülebilir. Çalışmamızın eksik yönü, nekroz düzeylerinin ölçülmemiş olması ve daha yüksek doz ve uzun süre kullanımının yapılmamış olmasıdır. İleri çalışmalarda değerlendirilebilir.

Bu sonuçlar ile

Fluvastatin HSP90 düzeylerini etkileyerek eNOS aktivasyonu yapabileceğini ve bu yolla damar gevşetici etkisinin olabileceği,

Fluvastatinin rhokinaz ekspresyonunu azaltması, vasküler düz kas kasılmasında etkili olan bu yolağın inhibisyonu ile damar gevşetici yönde etkiler gösterebileceği,

Reaktif oksijen üretiminde etkili bir enzim olan NADPH oksidaz'ın fluvastatin tedavisi sonucunda azalması, fluvastatinin endotelde ROS kaynaklı oksidatif stresi önleyerek kardiovasküler hastalıklarda koruyucu rol alabileceği,

eNOS inhibitörü olan ve oksidatif stres ile artan ADMA'nın fluvastatin ile azalması, fluvastatinin oksidatif strese karşı korunmada ve endotelial disfonksiyonunu iyileştirici etkilere katkı sağlayabileceği düşünülebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Grace PA, Mathie RT. Ischemia-reperfusion Injury. London, Blackwell Science, 1999.
2. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am 1992; 72: 65-83.
3. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. Acta Univ Carol Med Monogr 1990; 137:1-53.
4. Brover RW, Meij S, Serruys PW. A model of asynchronous left ventricular relaxation predicting the bi-experimental pressure decay. Cardia- vasc Res 1983; 17:482.
5. Katz A M, Reuter H: Cellular calcium and cardi- ac cell death. Am J Cardiol 1979; 44:188.
6. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. J Pathol, 2000; 190: 255–266.
7. Xiao CY, Hara A, Yuhki K, et al. Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia–reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. Circulation 2001; 104: 2210-2215.
8. Banda MA, Lefer DJ, Granger DN. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule deficient mice. Am J Physiol 1997; 273: 2721-5.
9. Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, et al. Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. Coron Artery Dis 2001; 12: 349- 356.
10. Kaeffer N, Richard V, Francois A, et al. Preconditioning prevents chronic perfusion-induced coronary endothelial dysfunction in rats. Am J Physiol 1996; 271: H842–H849.
11. Piper HM, Meuter K, MD, Schafer C. Cellular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury. Ann Thorac Surg 2003; 75: 644-648.
12. Kloner RA, Rude RE, Carlson N, et al. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? Circulation 1980; 62: 945-952.
13. Patel B, Seroudi OM, Bolli R: Pathogenesis of is- chemic myocardial injury and methods for myo- cardiac protection. The science and practice of pediatric cardiology. Ed, Gerson A, Bricker TS, McNamara DG. Lca & Febiger, Philadelphia/London 1990; 226-279.
14. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. Am Heart J 1999; 138: 69-75.
15. Davignon J, Ganz P. Role of Endothelial Dysfuction in Atherosclerosis. Circulation. 2004;109[suppl III]:III-27–III-32.

16. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene- disrupted mice. *Science* 2001; 293: 2449-2452.
17. Zager RA, Johnson A, Hanson S, et al. Altered cholesterol localization and caveolin expression during the evolution of acute renal failure. *Kidney Int* 2002; 61:1674–1683.
18. Young LH, Ikeda Y, Lefer A Department of Physiology, Jefferson Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107 Received 10 October 2000; accepted in final form 23 January 2001.
19. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821-824.
20. Zhong G, Tu R, Zeng Z, Li Q, He Y, Li S, He Y, Xiao F. Novel functional role of heat shock protein 90 in protein kinase C-mediated ischemic postconditioning. *J Surg Res.* 2014 Jun 15;189(2):198-206.
21. Shi Y, Pritchard Jr. K, Holman P, Rafiee P, Griffith O, Kalyanaraman B, et al. Chronic myocardial hypoxia increases nitric oxide synthase and decreases caveolin-3. *Free Radic Biol Med* 2000;29: 695–703.
22. ShiY, Baker JE, Zhang C, Tweddell JS, Su J, Pritchard Jr. KA. Chronic hypoxia increases endothelial nitric oxide synthase generation of nitric oxide by increasing heat shock protein 90 association and serine phosphorylation. *Circ Res* 2002;91(4):300–6.
23. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 33-40.
24. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004; 134: 2842-28.
25. Boger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* 2005; 10: 14-23.
26. Erbil KK, Y. Yaman, H. Cakır, E. Akgul, O. Caycı, T. Metabolism of asymmetric dimethylarginine and its clinical significance. *Turk J Biochem* 2012; 37: 99-105.
27. Markus C. Stühlinger, Elisabetta Conci , Bernhard J. Haubner , Eva-Maria Stocker , Julia Schwaighofer , Asymmetric Dimethyl L-Arginine (ADMA) is a critical regulator of myocardial reperfusion injury. 2007.
28. Coskun C, Avcı B, Yalçın M, Yermeszler A, Yılmaz M, Savcı V. Protective effect of CDP-choline on ischemia-reperfusion-induced myocardial tissue injury in rats. *Ir J Med Sci.* 2014 Dec;183(4):539-48.

29. Lee MY, Griending KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1045-1059.
30. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol*. 1993; 16(4 Suppl 1): I19-26.
31. Matsushima S, Tsutsui H, Sadoshima J. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends Cardiovasc Med*. 2014 Jul;24(5):202-5.
32. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007; 55: 61-75.
33. Rikitake Y, Liao JK. ROCKs as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3: 441-51.
34. Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med (Berl)* 2002; 80: 629-638.
35. Corsini A, Maggi FM, Catapano AL. Pharmacology of competitive inhibitors of Hmg coA reductase. *Pharmacological research* 31;(1):9-27, 1995.
36. Jones P, Kafonek S, Laurora I. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia. The curves study. *Am J Cardiol* 81:582-7, 1998.
37. Wu N, Li W, Lv Y, Shu W, Jia D. Cardioprotective effects of low-dose combination therapy with rosuvastatin and fasudil in the isolated rat heart. *Pharmazie*. 2014 Sep;69(9):704-8.
38. Demirtas S, Vatan MB, Cakar MA, Edis L, Gündüz H. Sakarya Egitim ve Arastırma Hastanesi, Kardiyoloji Klinigi, 54100 Sakarya-2010.
39. Khrbanda RK, Deanfield J. Functions of the healthy endothelium. *Coron Arter Disease* 2001; 12: 485–91.
40. Perticone F, Ceravolo R, Maio R, et al. Effects of atorvastatin and vitamin C on endothelial function of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 2000; 152:511-8.
41. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins. *Basic Research and Clinical Perspectives* . *Circ J* 2010; 74: 818–826.
42. Matsuki A, Igawa A, Nozawa T, Nakadate T, Igarashi N. Early Administration of Fluvastatin, but not at the Onset of Ischemia or Reperfusion, Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Through the Nitric Oxide Pathway Rather Than Its Antioxidant Property. *Circ J* 2006; 70: 1643–1649.
43. Tinkel J, Hassanain H, Khouri SJ. Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies, and mechanisms. *Cardiol Rev*. 2012 Mar-Apr;20(2):77-83.

44. Sarin S, Kaman L, Dahiya D, Behera A, Medhi B, Chawla Y. Effects of preoperative statin on liver reperfusion injury in major hepatic resection. *Updates Surg.* 2016 May 10.
45. Yang J, Zhang X, Yang J, Ding J, Liu ZQ, Li S et al. The cardioprotective effect of fluvastatin on ischemic injury via down-regulation of toll-like receptor 4. *Mol Biol Rep.* 2011 Jun;38(5):3037-44.
46. Shao H, Tan Y, Eton D, Yang Z, Uberti M, Li S et al. Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels. *Stem Cells.* 2008 May;26(5):1376-84.
47. Satoh K, Ichihara K. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors increase myocardial stunning in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000 Feb;35(2):256-62.
48. Chaudhary K, Cho W, Yang F, Samokhvalov V, El-Sikhry H, Daniel E, Seubert J. Effect of ischemia reperfusion injury and epoxyeicosatrienoic acids on caveolin expression in mouse myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2013 Mar;61(3):258-63.
49. Pelat M , Dessy C, Massion P, Desager J, Feron O, Balligand J. Rosuvastatin Decreases Caveolin-1 and Improves Nitric Oxide–Dependent Heart Rate and Blood Pressure Variability in Apolipoprotein E₀/– Mice In Vivo. *Circulation.* 2003;107:2480-2486.
50. Feron O, Dessy C, Desager J, Balligand J. Hydroxy-Methylglutaryl–Coenzyme A Reductase Inhibition Promotes Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation Through a Decrease in Caveolin Abundance. *Circulation.* 2001;103:113-118.
51. Arora R, Hare D, Zulli A. Simvastatin reduces endothelial NOS: caveolin-1 ratio but not the phosphorylation status of eNOS in vivo. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(8):705-11.
52. Fu Q, Wang J, Boerma M, Berbée M, Qiu X, Fink L, Hauer-Jensen M. *Circulation Research.* 2008 August 15; 103(4): 369–377.
53. Neill S, Ross J, Wigmore S, Harrison E. *Expert Opinion Investigational Drugs.* 2012 Oct;21(10):1535-48.
54. Hsu C, Zhao J, Lin S, Shyue S, Guo B, Lu T et al. Asymmetric Dimethylarginine Limits the Efficacy of Simvastatin Activating Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J Am Heart Assoc.* 2016 Apr 18;5(4).
55. Staniszewska A, Rajagopalan S, Al-Shaheen A, Thies F, Brittenden J. Increased levels of symmetric dimethyl-arginine are associated with all-cause mortality in patients with symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2015 May;61(5):1292-8.
56. Kurowska EM. Nitric Oxide Therapies in Vascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design.* 2002;8:155- 156.
57. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT. Risk of coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358:2127-28.

58. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor. A novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1141-1146.
59. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2032-2037.
60. Oguz A, Uzunlulu M. Short term fluvastatin treatment lowers serum asymmetric dimethylarginine levels in patients with metabolic syndrome. *Int Heart J*. 2008;49:303-31.
61. Serban C, Sahebkar A, Ursoniu S, Mikhailidis D, Rizzo M, Lip GY et al. A systematic review and meta-analysis of the effect of statins on plasma asymmetric dimethylarginine concentrations. *Sci Rep*. 2015 May 13;5:9902.
62. Hansson RO, Jonsson O, Lundstam S, Pettersson S, Schersten T, Waldenström J. Effects of free radical scavengers on renal circulation after ischemia in the rabbit. *Clin Sci* 1983;65:605-10. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003;167, 490-511.
63. Serracino-Inglott F, Habib NA, and Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160–6.
64. Margaritis M, Channon K, Antoniadou C. Statins as regulators of redox state in the vascular endothelium: beyond lipid lowering. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Mar 10;20(8):1198-215.
65. Sarı A. (2010). Seçici Rho-Kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Periferik İskemi/Reperfüzyona Bağlı Hedef Organ İskelet Kası ve Uzak organ Böbrek Hasarı Üzerine Etkisi. (Yüksek lisans tezi). Mersin Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin. apbs.mersin.edu.tr/files/a.nihalsari/Theses_001.pdf.
66. Bedi O, Dhawan V, Sharma P, Kumar P. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2016 Jul;389(7):695-712.
67. Kaplan H. (2007). Statin Uygulanan Farelerin Aorta ve Korpus Kavernozum Dokularında Rho-Kinaz Enziminin Ekspresyonu ve Aktivitesinin İncelenmesi. (Yüksek lisans tezi). Çukurova Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana. library.cu.edu.tr/tezler/6567.pdf.
68. Shimizu T, Liao J. Rho Kinases and Cardiac Remodeling. *Circ J*. 2016 Jun 1.
69. Ichihara K, Satoh K, et al. Are all HMG-CoA reductase inhibitors protective against ischemic heart disease? *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1999 Oct;114 Suppl 1:142P-149P.
70. Eichstädt H, Abletshauser C, Störk T, Weidinger G. Beneficial effects of fluvastatin on myocardial blood flow at two time-points in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000 May;35(5):735-40.
71. Svistov A, Sukhov V, Makiev R, Alanichev A. *Voen Med Zh*. 2012 Oct;333(10):27-36.

72. Tiefenbacher C, Kapitzka J, Dietz V, Lee CH, Niroomand F. Reduction of myocardial infarct size by fluvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Jul;285(1):H59-64. Epub 2003 Mar 6.
73. Matsuki A, Igawa A, Nozawa T, Nakadate T, Igarashi N, Nonomura M, Inoue H. Early administration of fluvastatin, but not at the onset of ischemia or reperfusion, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury through the nitric oxide pathway rather than its antioxidant property. *Circ J*. 2006 Dec;70(12):1643-9.
74. Yang J, Zhang X, Yang J, Ding J, Liu Z, Li S, Yang R. The cardioprotective effect of fluvastatin on ischemic injury via down-regulation of toll-like receptor 4. *Mol Biol Rep*. 2011 Jun;38(5):3037-44. doi: 10.1007/s11033-010-9970-z.
75. Chen J, Nagasawa Y, Zhu B, Ohmori M, Harada K, Fujimura A, Hashimoto K. Pravastatin prevents arrhythmias induced by coronary artery ischemia/reperfusion in anesthetized normocholesterolemic rats. *J Pharmacol Sci*. 2003 Sep;93(1):87-94.
76. Chen J, Shen H, Nagasawa Y, Mitsui K, Tsurugi K, Hashimoto K. Pravastatin inhibits arrhythmias induced by coronary artery ischemia in anesthetized rats. *J Pharmacol Sci*. 2007 Mar;103(3):317-22. Epub 2007 Mar 7.
77. Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, et al. Fluvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2002 Feb 19;105(7):868-73.
78. Shihab F, Bennett W, Andoh T. Role of cellular cholesterol in pharmacologic preconditioning with cyclosporine in experimental kidney transplantation. *Am J Nephrol*. 2010;31(2):134-40.
79. Shao H, Tan Y, et al. Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels. *Stem Cells*. 2008 May;26(5):1376-84.

8.ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Batman’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ’da tamamladım. 2008 yılında İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden mezun oldum. 2008 yılında Siirt’te İl Sağlık Müdürlüğü’nde bir yıl görev yaptım ve 2009 yılında istifa edip Elazığ’da serbest eczacılığa başladım.

