



L-NAME İLE HİPERTANSİF YAPILAN SIÇANLARDA KALPTE İSKEMİ-REPERFÜZYON SONRASI KALP DOKUSU KSANTİN OKSİDAZ AKTİVİTESİ VE MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ*

XHANTHINE OXIDASE ACTIVITIES AND MALONDIALDEHYDE LEVELS IN HEART TISSUE AFTER MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION ON RATS WITH HYPERTENSION INDUCED BY L-NAME

Ersin FADİLOĞLU¹

Hüseyin ÖZYURT²

Hasan ERDOĞAN¹

Mehmet Hanifi EMRE¹

¹ inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Malatya

² inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya

Anahtar Sözcükler: iskemi - reperfüzyon, kalp, hipertansiyon, L-NAME, ksantin oksidaz, malondialdehit, lipit peroksidasyonu

Key Words: ischemia - reperfusion, heart, hypertension, L-NAME, xanthine oxidase, malondialdehyde, lipid peroxidation

ÖZET

Su çalışmanın amacı erkek ve dişi hipertansif sıçanlarda kalpte iskemi-reperfüzyon hasarından sonra ksantin oksidaz (XO) aktivitesinin ve malondialdehit (MDA) düzeyinin tespit saptanmasıdır. L-NAME ile kronik nitrik oksit sentetaz (NOS) inhibisyonu hipertansiyon modeli oluşturmak için uygulandı. Erkek ve dişi sıçanlar üçer gruba ayrıldı. L-NAME çeşme suyu içinde 15 gün süre ile 100 mg/L ya da 500 mg/L olacak şekilde verildi. Kontrol grubuna sadece çeşme suyu verildi. iskemi-reperfüzyon (I/R) hasan oluşturmak için sol ana koroner artere 7 dakika oklüzyon ve 7 dakika reperfüzyon uygulandı. Sonra kalp çıkarıldı ve -85°C'de çalışma gününe kadar saklandı. Dişi kontrol grubu XO aktivitesi erkek gruba göre anlamlı olarak artmış bulundu. Dişi sıçanlarda 100 mg L-NAME grubu XO aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Erkek 100 mg L-NAME grubu MDA düzeyi diğer erkek gruplarına göre anlamlı artış gösterdi. Diş i kontrol grubu MDA düzeyi diğer dişi çalışma gruplarına göre ve ayrıca 500 mg L-NAME grubu MDA düzeyi 100 mg L-NAME grubuna göre anlamlı olarak azalmış olarak saptandı. Düşük doz L-NAME ile hipertansiyon oluşturulan erkek sıçanlarda kalpte I/R sonrası lipit peroksidasyonda artış görülürken, diğer taraftan L-NAME ile hipertansiyon oluşturulan dişi sıçanlarda kalpte I/R sonrası lipit peroksidasyonda azalma görüldü. L-NAME ile hipertansiyon oluşturulan dişi sıçanlarda I/R sonrası XO enzim aktivitesi anlamlı bir şekilde azalmıştır.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate xanthine oxidase (OX) enzyme activity and level of malondialdehyde (MDA) following heart ischemia-reperfusion injury in male and female hypertensive rats. Chronic nitric oxide synthetase inhibition by L-NAME was performed to induce hypertension. Male and female rats were divided into three groups. L-NAME was given as 100 mg/L or 500 mg/L in tap water for 15 days. Only tap water was given to rats in control group. To produce ischemia-reperfusion (I/R) injury, the left main coronary artery was occluded for 7 mm, followed by 7 min of reperfusion. Then heart was excised and had been stored at -85°C up to study day. XO activity of female control group was higher than male one. It was found that XO activity of female 100 mg L-NAME group was lower than control one. MDA level of male 100 mg L-NAME group showed remarkable increase compared to other male group. It was found that

Yazışma adresi: Ersin Fadiloğlu, inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi

Fizyoloji Anabilim Dalı, Malatya , Türkiye

Makalenin geliş tarihi: 16. 02. 2001; kabul tarihi: 23. 07. 2001

MDA level of female control group was higher than those of other female groups. On the other hand, MDA level of female 500 mg L-NAME group was significantly lower than 100 mg L-NAME one. Increased lipid peroxidation was seen after myocardial I-R injury in male rats with hypertension induced by low dose L-NAME, whereas decreased lipid peroxidation was seen after myocardial I-R injury in female rats with hypertension induced by L-NAME. Hypertension induced by low dose L-NAME caused remarkable decrease in XO enzyme activity of female rats after I/R.

GİRİŞ

Hipertansiyon patofizyolojisinde yer alan periferik arteriyel direncin artışı ile nitrik oksit (NO) arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir (1,2). Nitrik oksit sentetaz (NOS) enziminin kronik olarak inhibisyonu ile periferik arteriyel direncin artışı ve dolayısıyla sistemik hipertansiyon oluşumu saptanmıştır (2,3). NO'nin vasküler tonus ve myokardiyal kontraktilite ile ilişkisi bilinmektedir (1,5). Bu bakımdan, deneysel sistemik hipertansiyon modeli olarak NOS'ı inhibe eden N^l-nitro-L-arginin metil esterinin (L-NAME) kronik uygulanması sıçanlarda tercih edilmiş metodlar arasında yer almıştır (2,4).

Hipertansiyon ve koroner arter hastalıkları sıklıkla birlikte görülmektedir (4). NO, ateroskleroz oluş mekanizmasında da rol oynadığı için (1) hipertansiyon ile koroner arter hastalıkları arasında direkt veya indirekt bir olabileceği akla gelmektedir. Kalp iskemi-reperfüzyon çalışmaları ve koroner arter hastalıkları ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan fizyolojik - biyokimyasal-patolojik değişikliklerin büyük kısmı açığa çıkarılmıştır (6,7). Ancak etki mekanizmalarının büyük kısmı tam olarak açıklanmış değildir.

Dhalla ve ark. kalp iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarında serbest oksijen radikallerinin rolünü ve lipid peroksidasyonunun oluşumu ile doku hasarına yol açma mekanizmasını açıklamışlardır (8). Birçok organın iskemi-reperfüzyon hasarının oluşum mekanizmasında ksantin oksidaz (XO) enziminin aktivitesinin artması önemli yer tutmaktadır. Bunun doğal bir sonucu olarak pürin bazlarının yıkımı artmaktadır (9,10). Uzun süreli iskemi ile kısa süreli iskeminin kalp dokusu üzerine olan hasarlarının patofizyolojileri farklılık gösterebilmektedir (7,11). Kısa süreli kalp iskemi-reperfüzyonu sonrası ölümler sıklıkla aritmiler ile olmaktadır (11,12). Bu aritmilerin oluşum mekanizmalarında pürin yıkımının etkinliğinin farklı cinslerde farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (13). iskemi sonrası XO enziminin katalizi ile serbest oksijen radikallerinin hızlı bir şekilde üretilmesi ve bunun sonucu ortaya çıkan reaksiyonlar zincirinin ilk basamağının göstergesi sayılabilen ATP yıkımı bir çok organ ve dokuda saptanmıştır (14). Ayrıca XO, NOS enziminin substratı olarak NO üretiminde yer alan L-argininin kullanabildiğini azaltabilmektedir (15).

Hücre zarı hasarı ve sonucunda lipid peroksidasyon ürünlerinin açığa çıkması için uzun süreli bir iskemi gerekmektedir.

Oksidatif stresin membran üzerine olan etkisinin iskeminin süresi ile ilgili olduğu bilinmektedir (13,16,17). Ancak hipertansif olgularda kısa süreli iskemi-reperfüzyon sonrası kalp dokusunda görülen hasarda lipid peroksidasyonunun etkinliği, araştırılması gerekli olan konulardan biridir.

Hipertansiyon ve koroner arter hastalıklarının birlikte görülmesi I/R hasarında yer alan mekanizmaların farklılıklarının detaylı olarak incelenmesini gerekli kılmaktadır. Bu çalışmada L-NAME ile hipertansiyon modeli oluşturulan sıçanlarda kalp iskemi-reperfüzyon hasarında XO enzim aktivitesinde ve lipid peroksidasyon indeksi olan malondialdehit (MDA) seviyesinde meydana gelen değişiklikler ile bu değişikliklerin cinsiyetlerle olan ilişkisinin incelenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel Grupları

Deneysel 58 erkek (200-260 g) ve 63 dişi (180-240 g) Wistar albino sıçan kullanıldı. Denekler inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarlarından sağlandı. Sıçanlar standart şartlar altında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, havalandırılmı, sabit ısı odalarda özel kafeslerde bakıldı. Beslenmeleri için standart sıçan pellet yem kullanıldı.

Sıçanlar 180 g üzerinde ağırlığa ulaştıklarında gruplar oluşturulmak üzere rastgele ayrıldılar Tablo 1 de gösterildiği gibi her cinsiyet için üçer grup olmak üzere toplam altı grup oluşturuldu.

Tablo 1. Çalışma grupları

Cinsiyet	Gruplar (n)	Uygulama
Erkek (n=58)	I Kontrol (n=20)	İçme sularına herhangi bir ajan katılmadan 15 gün süreyle çeşme suyu verilip. 15 gün sonunda kalpte iskemi-reperfüzyon (I/R) uygulandı.
	II 100 mg/L L-NAME (n=15)	15 gün süreyle içme sularına 100 mg/L L-NAME katılarak, 15 gün sonunda I/R uygulandı.
	III 500 mg/L L-NAME (n=16)	15 gün süreyle içme sularına 500 mg/L L-NAME katılarak, 15 gün sonunda I/R uygulandı.
Dişi (n=63)	I Kontrol (n=19)	İçme sularına herhangi bir ajan katılmadan 15 gün süreyle çeşme suyu verilip. 15 gün sonunda I/R uygulandı.
	II 100 mg/L L-NAME (n=20)	15 gün süreyle içme sularına 100 mg/L L-NAME katılarak, 15 gün sonunda I/R uygulandı.
	III 500 mg/L L-NAME (n=17)	15 gün süreyle içme sularına 500 mg/L L-NAME katılarak, 15 gün sonunda I/R uygulandı.

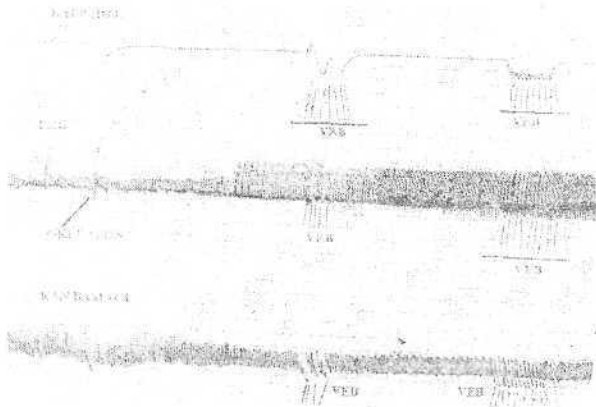
L-NAME SIGMA dan temin edildi. Sıçanların günlük içtikleri sular kayıt edildi, suları günlük olarak değiştirildi ve günlük L-NAME miktarı hesaplandı. 100 ve 500 mg L-NAME uygulanan grupların 15 gün süresince sırasıyla ortalama 2 ve 10 mg/gün L-NAME aldıkları saptandı. Khalil ve ark. sıçanların içme sularına 50 mg/L L-NAME katarak ortalama 1 mg/gün L-NAME ile dişi sıçanlarda hipertansiyon oluşturmuşlardır (18).

Cerrahi uygulama

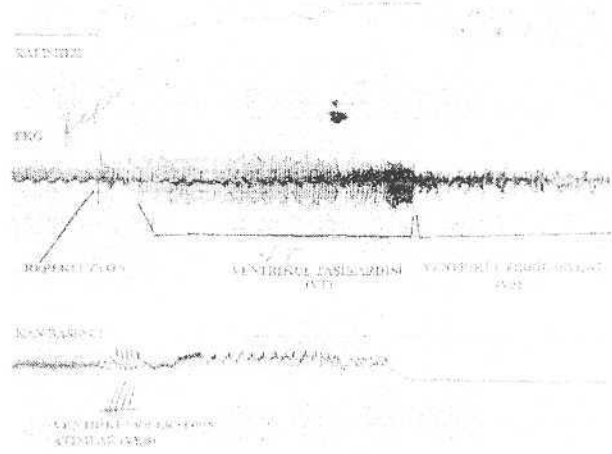
Sıçanlar 1,2-1,4 g/kg üreanın (SIGMA) intraperitoneal uygulanması ile anesteziye edildi. Trakea kanüle edilerek operasyon süresince yapay solunum sağlandı. Kan basıncının ölçümü amacıyla sağ karotid artere basınç transdüserine (Harvard, 50-8952) bağlı bir kanül yerleştirildi. Yerleştirilen EKG elektrodları ve basınç transdüseri yardımıyla EKG, kan basıncı ve kalp hızı Harvard osilografıya kayıt edildi (Resim 1,2).

Göğsün sol tarafına 1.2 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldı. Cilt altı dokuları geçilerek göğüs kaslarına ulaşıldı. Göğüs kasları ayrıldıktan sonra sternumun 2 mm solunda dördüncü inter kosta kesilerek sol torakotomi yapıldı. Toraks açılınca oluşan negatif basıncı engellemek, normal CO₂, O₂ parsiyel basınçları ile pH'nın temini ve solunumun devamlılığını sağlamak için denekler Harvard Animal Rodent ventilasyon cihazına bağlandı. Yaklaşık 1,5 mL/100 g'lık hacim ve 60 atım/dakikalık bir hızda oda havası ventilatör ile verilerek pozitif basınçlı solunum temin edildi.

Kalp perikardın yavaşça sıyrılması ile serbestleştirildi. Göğsün sağ tarafına hafifçe basılarak kalbin dışarı çıkarılması sağlandı. Sol ana koroner arterin altından 6/0 10 mm'lik ipek ile myokard dokusunda hafifçe içine alacak şekilde hızlıca geçildi. Kalp göğüs içerisine yerleştirildikten sonra stabilizasyon için 20 dakika beklendi. "Lambeth Conventions" ile belirlenen kriterlere göre bu işlemlere bağlı herhangi bir aritmi görülmesi ya da ortalama kan basıncının oklüzyon öncesi 70 mmHg'nin altına düşmesi halinde denek çalışma dışı bırakıldı (19).



Resim 1. Oklüzyonun başlarında R dalgalarının büyümeye başlaması.



Resim 2. Reperfüzyon ve sonrası görülen aritmi bulguları. Kan basıncı ve kalp hızı değişiklikleri.

Sol ana koronerin altından geçilmiş olan ipek sütürün iplikleri 1 mm çapında ve 1 cm boyunda plastik bir tüp içinden geçirildi. Beklenen 20 dakikalık stabilizasyon sonunda bu iplik plastik tüp vasıtasıyla bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak sol ana koroner arterin oklüzyonu sağlandı. Oklüzyon süresi olan 7 dakikanın sonunda klemp açılarak ip gevşetildi ve böylece reperfüzyon (yeniden kanlanma) sağlandı. Reperfüzyon süresi 7 dakika olarak uygulandı. "Lambeth Conventions" kriterlerine göre EKG bulgusuyla iskemi ve reperfüzyon dönemleri belirlendi ve iskemi oluşmayan sıçanlar çalışma dışı bırakıldı (Resim 2). Bu sürelerin sonunda deneye son verildi. Hayvan karotid arterden kanatılarak sakrifiye edildi.

Biyokimyasal analizler

Dokuların çıkarılması ve hazırlanması

Tüm gruplara yapılan işlemlerden sonra sıçanlar koroner arterden kanatılarak sakrifiye edildikten sonra kalp dokuları çıkarıldı, serum fizyolojik ile yıkanarak enzim çalışmaları için ayrıldı. Çıkarılan kalp dokuları analiz gününe kadar -85 C'de saklandı. Analiz gününde, dokular bekletilmeden tartıldı ve -M C lik soğuk deiyonize su ile yıkandı. Makas ile küçük parçalara ayrılarak homojenize etmek üzere cam tüplere konuldu. Tüpün içine doku ağırlığının 3 katı +4 C lik soğuk deiyonize su ilave edildi. Dokular bir buz kabının içinde 16000 rpm'de 2 dakika homojenize edildi (IKA ultra-Tumax Type 25 Basic, Staifen, Germany). XO aktivitesi ve MDA seviyeleri elde edilen bu homojenatta ölçüldü. Doku homojenatlarında protein tayini Lowry yöntemine göre yapıldı (26).

Ksantin oksidaz (XO) Aktivitesi Tayini

Ksantin oksidaz (XO, EC 1.2.3.2) aktivitesi Prajda ve Weber'in metoduna göre ksantinden ürik asit oluşumu esnasında 293 nm'de absorbans artışının spektrofotometrik olarak ölçümü ile tayin edildi (21).

Doku homojenatı (50µL), fosfat tamponu (pH 7,5 ve 50 m M) ve ksantin (hep tüpte 0,067 mmol final konsantrasyonu olmak üzere) içeren 2,85 mL'lik deney ortamında 37 C'de 30 dak. inkübe edildi. Tepkime 0,1 ml %100'lük TCA çözeltisi eklenmesi ile durduruldu ve 5000 x g'de 15 dak. santrifüj edildi. Elde edilen berrak kısmın absorbansı köre karşı ölçüldü. 1 ünite XO, 37°C'de pH 7,5'ta 1 dakika oluşan umol ürik asit olarak tanımlandı ve U/g protein spesifik aktivite olarak hesaplandı.

Malondialdehit (MDA) Miktarı Tayini:

Malondialdehit tayini Wasowicz ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (22). Yöntem, MDA'nın tiyobarbitürik asit ile 95 C'de tepkimeye girmesi sonucu oluşan pembe renkli kromofonun ölçümüne dayanmaktadır. N-butano! fazında ekstrakte edilerek oluşan rengin şiddeti, bir spektrofotometre ile (eksitasyon 525 nm ve emisyon 547 nm) ölçüldü. 1,1,3,3 tetrametoksiopropan ile hazırlanan değişik konsantrasyonlarda standartlar ile çizilen standart grafiği ile sonuçlar değerlendirildi. Sonuçlar nmol/g protein olarak ifade edildi.

Biyostatistiksel Metodlar

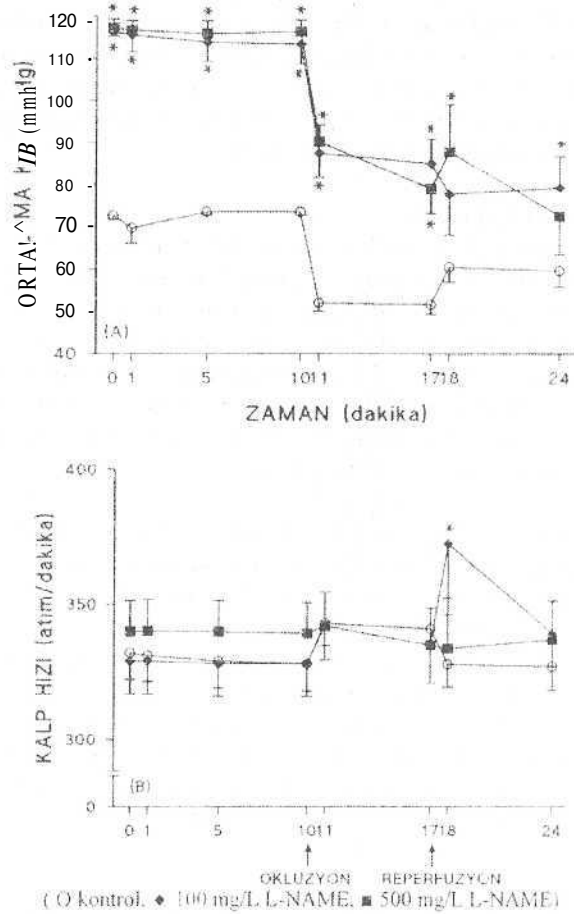
İstatistiksel Windows 95-98 uyumlu "SPSS" 7,5 ile yapıldı. Grupların dağılımları non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Test ile değerlendirildi. Her cinsiyetin kendi içinde karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren gruplarda one-way ANOVA testi ve Post Hoc testlerden LSD uygulandı. Normal dağılım göstermeyen gruplara non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi uygulanıp, gruplar arası anlamlılık gösterenlerde ayrıca Mann-Whitney U testi uygulandı. Cinsiyetler arası anlamlılık araştırma konusu olan parametrelerde normal dağılım gösteren gruplar için student t-testi ve normal dağılım göstermeyenlerde ise Mann-Whitney U testi ile saptandı. Grup içi korrelasyon analizleri için Pearson testi kullanıldı. Değerler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verildi, istatistiksel anlamlılık için p<0,05 olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Erkek ve dişi sıçanların oluşturduğu gruplarda ortalama kan basıncının her iki cinstede L-NAME verilmesi ile arttığı istatistiksel olarak gözlemlendi (p<0,05) (Şekil 1).

Erkek ve dişi sıçanların oluşturduğu grupların kalp dokusu XO aktiviteleri ve MDA düzeyleri Tablo 2'de verilmiştir. Erkek sıçanlar arasında XO aktivitesi açısından anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (p>0,05). Dişi kontrol grubu XO aktivitesi 100 mg L-NAME uygulanan gruba göre artmış olarak tespit edilirken (p<0,05), diğer gruplar ile kontrol arasında fark yoktur (p>0,05). Erkek kontrol grubu XO aktivitesi dişi gruba göre istatistiksel olarak azalmış

olarak bulunurken (p<0,05), diğer gruplar arasında fark saptanmamıştır (p>0,05).



Şekil 1. Erkek sıçanların iskemi-reperfüzyon sırasında kalp hızları ve kan basınçları (*p<0,05).

MDA düzeyleri erkek sıçanların oluşturduğu gruplar göz önüne alındığında 100 mg L-NAME verilen grubun MDA düzeyinin kontrol ve 500 mg L-NAME verilen gruplara göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (p<0,05). Erkek sıçanlarda kontrol grubu ile 500 mg L-NAME verilen grup arasında ise MDA düzeyi açısından fark bulunmamıştır (p>0,05). Dişi sıçanlar MDA düzeyleri açısından istatistiksel analize tabi tutulduğunda; kontrol grubu 100 mg ve 500 mg L-NAME uygulanan gruplara göre, 100 mg L-NAME verilen grup ise 500 mg L-NAME verilen gruba göre daha yüksek MDA değerine sahipti (p<0,05). Erkek ve dişi gruplar karşılaştırıldığında iMDA düzeyleri erkek kontrol ve 100 mg L-NAME erkek gruplarında dişi gruplara göre anlamlı olarak azalma saptanmıştır (p<0,05). Diğer gruplar cinsiyete göre karşılaştırıldığında ise MDA düzeyleri bakımından istatistiksel fark yoktu (p>0,05). Erkek kontrol grubunda XO aktivitesi ile MDA düzeyleri arasında pozitif bir korrelasyon tespit edilirken, dişi 500 mg L-NAME verilen grupta ise negatif korrelasyon mevcuttu (p<0,05).

Tablo 2. Kalp iskemi-reperfüzyonu uygulanan sıçanlarda kalp dokusu ksantin oksidaz (XO) enzim aktiviteeri ve malondialdehit (MDA) düzeyleri.

Gruplar		Erkek		Dişi	
		Ksantin oksidaz (U/g protein)	Malondialdehit (nmol/gr protein)	Ksantin oksidaz (U/g protein)	Malondialdehit (nmol/gr protein)
I	Kontrol	0.262±0.055 *	15.47±1.46 **	0.540±0.121 "	56.81 >.7 80'
II	100 mg/L L-NAME	0.340±0.009	24.52±2.64 ***'	0.302±0.037 "	39.00±4.77 ' "
III	500 mg/L L-NAME	0.423±0.091	14.57±1.77 ^b	0.304±0.057	19.85±2.41 ' "

* erkek ve dişi gruplar arası anlamlı farklı (p<0.05).

Erkek gruplarda:

Dişi gruplarda:

" kontrole göre,

kontrole göre.

' 100 mg L-NAME grubuna göre.

' 100 mg L-NAME grubuna göre,

^b 500 mg L-NAME grubuna göre.

^b 500 mg L-NAME grubuna göre, anlamlı olarak farklı, (p<0.05)

TARTIŞMA

Değişik *in vivo* modellerde kronik NOS inhibisyonu yapmak için [5T- nitro-Larginin metil ester (L-NAME) kullanılmaktadır (18). Khalil ve ark. Sıçanların içme sularına 50 mg/L L-NAME uygulayarak NOS inhibisyonunu kronik olarak sağlamışlardır. Bizim çalışmamızda ise bu dozların üzerinde bir uygulama ile inhibisyon saptanmıştır. L-NAME'in kronik olarak uygulandığı deneysel çalışmalarda kan basınçlarında belirgin artış saptanmıştır (4,18). Bu çalışmada hem erkek hem de dişi L-NAME verilen gruplarda ortaama arteryel kan basınçlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı (p<0,05). Bu bulgumuz literatürdeki bilgilerle uyumluluk göstermektedir. Deneysel hipertansiyon modelleri arasında sayılan L-NAME uygulamasının bizim çalışmamızda da hem erkek hem dişi gruplarda beklenen sonucu verdiği saptandı. Dogrel ve Brown çeşitli araştırmacılara dayanarak sıçanlarda sistemik hipertansiyon modelleri arasında NOS inhibisyonunu sıralamış ve L-NAME'in kronik olarak uygulanması ile uygun hipertansiyon modelinin oluşturulabileceğini bildirmişlerdir (4). Bizim deneylerimizde aynı şekilde hem erkek hem dişi gruplarda L-NAME'nin kronik uygulanmasının hipertansiyona yol açtığı görüldü.

iskemik koşullarda harekete geçen bazı proteolitik süreçlerle ksantin dehidrogenaz (XD) protein kısmının bir parçasını kaybederek XO haline dönüşür (9,12,23). XD ve XO aynı tepkimeyi katalizlemekle beraber XD kataliz sonucu süperoksit anyonu (O₂⁻) üretmez, ama XO üretir. Bu proteolitik parçalanmadan sonra oksijen kaynağı yeterli olmadığı için iskemik ortamda OV üretimi azdır. Ancak reperfüzyon ile birlikte aşırı ATP harcanması sonucu biriken pürin nükleotidlerinin XO enzimiyle ürik aside çevrilmesi aşamasında patlama tarzında aşırı bir O₂ üretimi olur. Bu olay reperfüzyonun neden ilgili organda iskemik şartlardan daha ağır hasar oluşturabildiğinin bir kanıtı olabilir (23). İR hasarında diğer bir mekanizma da iskemik miyokardiyuma aniden oksijen sağlanmasına bağlı oksijen radikal üretimi olarak gösterilmiştir

(24). Diğer taraftan allopürinol gibi XO inhibitörleri köpek kalbinde iskemi ya da reperfüzyon aritmilerinin sıklığını azaltmadığı gibi, domuz kalbinde süperoksit dismutazın intrakoronar uygulanması da reperfüzyon aritmelerini engellemiştir (25). Bu çalışmalarda görüldüğü gibi İR hasarında farklı cinslerde değişik mekanizmalar ortaya çıkabilmektedir. Hipertansiyon oluşturulan sıçanlarda elde ettiğimiz sonuçlar bize XO enzim aktivitesinin kalp İR mekanizmasında asıl mekanizma olarak yer almadığını düşündürmüştür. Bu deneylerde 7 dakika iskemi ve 7 dakika reperfüzyon uygulandıktan sonra İR hasarının önemli sonuçlarından olan aritminin oluşumunda kalp dokusunda olan enzimatik ve non-enzimatik değişimleri saptandı. Hipertansiyonlu deneklerde 7 dakika iskemi ve 7 dakika reperfüzyon ile kalpte olan hasarlarda XO enziminin aktivitesi erkek gruplarda artmasına rağmen bu artış kontrole göre anlamlı değildi. Hipertansiyonlu deneklerde nekroza yol açan uzun süreli İR uygulamalarında XO enziminin hasar mekanizmasında etkili olup olmadığı incelenmesi gereken konulardan bilisidir

İR sonrası doku hasarında lipit peroksidasyonunun rolü bir çok organa ait çalışmada bildirilmiştir (16,17). Kalp İR hasarında bu mekanizma ile ilgili değişik spekülasyonlar mevcuttur. Bu spekülasyonların temelinde serbest oksijen radikallerinin yer aldığı görülmektedir (8). Serbest radikal süpürücüleri reperfüzyon süresince hidroksil iyonu ile indüklenen elektrofizyolojik değişiklikleri geciktirirler. Reperfüzyon uygulanan sıçan kalbinde reperfüzyonu takiben 20 saniye içinde serbest oksijen radikalleri oluşurken, lipit peroksidasyonunun 10 dakika içinde oluştuğu rapor edilmiştir. Serbest radikallerin açığa çıkmasından çok uzun süre sonra membran hasarı ortaya çıkar (8,25). Bizim çalışmamızda iskemi periyodu 7 dakika ve takibinde reperfüzyon periyodu 7 dakika olarak uygulanmıştır. 100 mg ile inhibisyon yapılan erkek sıçan grubunda MDA düzeyinin artması; bu doz ile sağlanan NOS inhibisyonunun hipertansiyona yol açması, bununla bağlantılı olarak da İR sonrası lipit peroksidasyonunun artmasına kanıt olabilir. Artan L-NAME dozu ile sağlanan

hipertansiyon modelinde I/R hasarında lipit peroksidasyonunun kontrol değerlerine yaklaştırmıştır. Bu sonuçlar L-NAME dozunun artması ile lipit peroksidasyonunun kontrol düzeyine gerilediğini düşündürmektedir. Burada artan inhibisyon dozu ile I/R ile oluşan peroksidlerin oluşumunun engellenmesi sonucu koruyucu bir etkinin sağlanmış olabileceği söylenebilir. Serbest radikallerin yavaş etki oluşturduğuna yönelik diğer bulgular ise hipoksantin ve XO uygulanmasından en erken 10 dakika sonra sadece ultrastrüktürel miyokardiyal değişikliklerin olmasıdır. Köpek myokardiyumunda, koroner arterin 15 dakika oklüzyonunda serbest oksijen radikallerinin oluştuğu, ancak iskeminin 45. dakikasına kadar lipit peroksidasyonunun görülmediği bildirilmiştir (25). Ayrıca süperoksit yapımı izole sıçan kalbinde koroner akımda kısmi erken artışa (2-3 dak), 10 dakika sonra kontraktif performansında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (25). Dişi gruplarda NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyon sonrası kalp dokusunda I/R ile lipit peroksidasyonunda belirgin azalma meydana gelmiştir. Bu azalma NOS inhibisyonun dişilerde koruyucu bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Erkek ve dişi gruplar karşılaştırıldığında gözlemlenen farklılıklar olasılıkla cinsiyetler arası metabolizma farklılıklarına ve salgılanan hormonların etkisine bağlı olabilir. Cinsiyetler arası farklılıkların daha belirgin olarak gösterilebilmesi için overektomize dişi sıçanlarda farklı hormonlar verilerek bu deneylerin yapılmasının gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

Koroner kalp hastalıkları toplumda önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Koroner arter oklüzyonları sonrası kan akımının tekrar sağlanması ile genelde reperfüzyonun zararlı etkileri ile karşılaşmak kaçınılmaz olabilmektedir. Deneysel olarak oluşturulan hipertansiyon modellerinden NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyonu sıçanlarda uzun süreli iskemi sonrası reperfüzyon hasarının incelenmesi hipertansiyonlarda I/R mekanizmasının açıklanması açısından yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Loscalzo J, Welch G Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Progr Cardiovas Dis* 1995; 38: 87-104.
2. Sander M, Hansen J, Victor RG The sympathetic system is involved in the maintenance but not initiation of the hypertension induced by N sup omega-Nitro-L-Arginine Methyl Ester. *Hypertension* 1997; 30: 64-70.
3. Hropot M, Grotsch H, Klaus E, Langer KH, Linz W, Wlemer G, Scholkens BA Ramipril prevents the detrimental sequels of chronic NO synthase inhibition in rats: hypertension, cardiac hypertrophy and renal insufficiency. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994 Dec; 350 (6): 646-52.
4. Doggrel SA, Brown L Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 89-105.
5. Moncada S, Higs A The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Eng J Med* 1993; 329: 2002-2012.
6. Birincioğlu M, Aksoy T, Ölmez E, Acet A. Protective effect of ACE inhibitors on ischemia-reperfusion-induced arrhythmias in rats: is this effect related to the free radical scavenging action of these drugs? *Free Radic Res* 1997; 27 (4): 389-96.
7. Kramer JH, Misik V, Weglicki WB. Lipid peroxidation-derived free radical production and postischemic myocardial reperfusion injury. *Ann NY Acad Sci* 1994; 723: 180-196.
8. Dhalla NJ, Elmoselhi AF3, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 446-456.
9. Packer L, Glazer AN. *Methods in Enzymology, Volume 186 Oxygen Radicals in Biological Systems Part B, Oxygen Radicals and Antioxidants*, Academic Press, 1990; 651-656.
10. Laycock SK, McMurray J, Kane KA and Parratt JR Effect of xanthine oxidase system on cardiac function in anaesthetised rats. *Free Radic Bio! Med* 1993; 15: 249-255.
11. Ostadal B, Ostadalova i. And Dhalla NS. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev* 1999; 79: 635-659.
12. Manning A, Bernier M, Crome R, Little S. and Hearse D. Reperfusion-induced arrhythmias: a study of the role of xanthine oxidase-derived free radicals in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20: 35-45.
13. Downey JM, Miura T, Eddy LJ, et al. Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 1053-1060.
14. Park DA and Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Açta Physiol Scand* 1986; 548: 87-99.
15. Terada LS, Radisavljevic Z, Mahr NN, Jacobson ED. Xanthine oxidase decreases production of gut wall nitric oxide. *Proc Soc Exp Bio! Med* 1997; 216 (3): 410-413.
16. Carmeliet E Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev* 1999; 79: 917-1017.
17. Konotos HA, Wei EP, Povlishock JJ, et al. Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin G2. *Science* 1984; 209: 1242-1245.
18. Khaül RA, Crews JK, Novak J, Kassab S and Granger JP, Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. *Hypertension* 1998; 31; (065-1069).
19. Walker M.J.A, Curtis M.J., Campbell R.W.F, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischemia, infarction, and reperfusion *Cardiovasc Res* 1988; 22: 447-455.

20. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent J Biol Chem 1957; 193: 265-175.
21. Prajda N and Weber G. Malign transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. FEBS lett 1975; 59: 245-249.
22. Wasowicz W, Neve J and Pretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. Clin Chem 1993; 39: 2522-2556.
23. Xia Y and Zweier JL. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. JBC 1995. 270: 18797-18803.
24. Netticadan T, Temsah R, Osada M and Dhalla NS. Status of Ca²⁺/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. Am J Physiol (Cell physiol) 1999; 277: C384-C391.
25. Coetzee WA, Owen P, Dennis SC, Saman S and Opie LH. Reperfusion damage: free radicals mediate delayed membrane changes rather than early ventricular arrhythmias. Cardiovasc Res 1990; 24: 156-164.

*inönü Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 99/21 nolu proje olarak desteklenmiştir.