

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI



İZOPRENALİN İLE MİYOKARD İNFARKTÜSÜ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
HEMOKSİJENAZ-1 İNDÜKSİYONUNUN ETKİSİ

Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi

Dr. Leyla BULUT

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Gül Özdemirler ERATA

İSTANBUL

2013

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım ve uzmanlık eğitimim süresince bana yol gösteren ve destek olan, gerek akademik kimliği ve çalışma prensipleri, gerekse kişiliği nedeniyle ömür boyu örnek alacağım ve birlikte çalışmaktan çok büyük mutluluk duyduğum güzel hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Gül Özdemirler Erata'ya, tüm uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım da bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her zaman desteğini hissettiğim, çok değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Müjdat Uysal'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında tecrübelerinden faydalandığım hocalarım Prof. Dr. Semra Doğru Abbasoğlu ve Prof. Dr. Seldağ Bekpınar'a ve Kardiyoloji Enstitüsündeki çalışmalarım için benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Evin Ademoğlu'na, uzmanlık eğitimim boyunca bana emek veren başta Doç. Dr. Ayşegül Telci'ye ve Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki diğer tüm hocalarıma,

Tez çalışmalarım a emeği ve tecrübesi ile katkısı olan arkadaşım Dr. Murat Giriş'e, tecrübesi ve pratikliğiyle çalışmalarımın hızlı ilerlemesini sağlayan Dr. Canan Küçükgergin'e, hem tez çalışmalarım hem de hayata dair her konuda desteğini esirgemeyen, uzmanım Uz. Dr. A. Fatih Aydın'a, tez çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Coşkun Umut Oruç'a,

Tez çalışmalarım ve uzmanlık eğitimim boyunca her türlü desteğini gördüğüm, kişiliği ve iş ahlakı ile örnek aldığım çok sevdiğim arkadaşım Dr. Zeynep Küskü Kiraz'a, tez ve uzmanlık eğitimim süresince her türlü desteğiyle hep yanımda olan laborant Sevilay Tahmisoğlu'na, tez çalışmalarım ve tüm tıp eğitimim boyunca desteğini gördüğüm sevgili ablam Uz. Dr. Gülsüm Bulut'a,

Tezimin önemli aşamalarında emeklerinden dolayı Gökhan Oruç'a ve Esra İlyas'a,

Uzmanlık eğitimimin ilk dönemlerinde birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve bana her konuda destek olan arkadaşım Dr. Esra Aycan Üstüol'a ve uzmanlığım süresince birlikte çalışmaktan keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

Bu tez İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 22240

İÇİNDEKİLER

ÖzetV
AbstractVI
I. GİRİŞ VE AMAÇ 1
II. GENEL BİLGİLER 3
A. Akut miyokard infarktüsü 3
1. Tanım	
2. Sınıflandırma	
3. Fizyopatoloji	
4. Klinik	
5. Kardiyak biyobelirteçler	
B. Deneysel miyokard infarktüsü 9
C. Oksidatif süreç, antioksidan denge ve AMİ10
1. Oksidatif süreç	
2. Antioksidan sistem	
3. AMİ' de oksidatif stresin rolü	
D. Hem oksijenaz enzim sistemi13
E. Hem oksijenazın reaksiyon ürünleri ve fonksiyonları15
1. Demir ve ferritin	
2. Biliverdin ve bilirubin	
3. Karbonmonoksit	

III. GEREÇ VE YÖNTEM	21
A. Gereçler	21
B. Deney grupları	22
C. Serumda yapılan incelemeler	22
D. Kalp dokusunda yapılan incelemeler	23
1. Kalp dokusunda western blot analizi	
2. Kalp dokusunda lipit peroksidasyonunun incelenmesi	
a. Protein karbonil grupları tayini	
b. Dien konjugat düzeylerinin ölçümü	
3. Kalp dokusunda antioksidan sistemin incelenmesi	
a. Glutasyon düzeylerinin ölçülmesi	
b. Süperoksit dismutaz aktivitesinin ölçülmesi	
c. Glutasyon peroksidaz aktivitesinin ölçülmesi	
d. Glutasyon-S transferaz aktivitesinin ölçülmesi	
4. Kalp dokusunda protein tayini	
E. İstatistik incelemeler	29
IV. BULGULAR	29
V. TARTIŞMA	36
VI. KAYNAKLAR	40
VII. ÖZGEÇMİŞ	50

KISALTMALAR LİSTESİ

AMİ: Akut miyokard infarktüsü

CoPP: Kobalt protoporfirin IX

CO: Karbonmonoksit

CK: Kreatin kinaz

DK: Dien konjugatı

DRP: Demir regülatör protein

GSH: Glutatyon

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

GST: Glutatyon S-transferaz

HO: Hem oksijenaz

Hsp: Heat shock protein

İP: İzoprenalin / izoproterenol

NFkB: Nükleer faktör kappa B

NO: Nitrik oksit

NSTEMI: ST elevasyonsuz miyokard infarktüsü

PK: Protein karbonil

SOD: Süperoksit dismutaz

STEMI: ST elevasyonlu miyokard infarktüsü

TnT: Troponin-T

ZnPP: Çinko protoporfirin IX

ÖZET

Akut miyokard infarktüsü (AMİ) gelişmiş ülkelerde birinci sıradaki ölüm nedenidir. Serbest radikallerin ve bunların neden olduğu oksidatif hasar, kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Diğer yandan, hem oksijenaz-1 (HO-1)'in oksidatif stresin uyarıldığı koşullarda kardiyovasküler hastalıklar dahil diabet, hipoksik akciğer hastalığı gibi birçok hastalıkta, bu hasara karşı koruyucu olarak rol oynayabileceği bildirilmektedir. Ancak, literatürde AMİ'da HO-1'in etkilerine ait çalışmalar sınırlıdır.

Bu çalışmadaki amacımız, sıçanlarda izoprenalin (İP) uygulaması ile oluşturulan AMİ'de HO-1'in *in vivo* koruyucu bir etkisi olup olmadığını araştırmaktır. Bunun için sıçanlara, 12 saat ara ile 2 kez olacak şekilde, HO-1 mRNA indükleyicileri olarak kobalt protoporfirin (CoPP, 20 mg/kg; i.p) veya çinko protoporfirin (ZnPP, 5 mg/kg; i.p) verildi. Son metalloporfirin uygulamasından 30 dakika sonra İP (200 mg/kg; s.c) uygulandı. Sıçanlar İP uygulandıktan 4 saat sonra öldürüldü. Serumda troponin-T (TnT) düzeyleri, kalp dokusunda HO-1 protein ekspresyonu, protein karbonil (PK) ve dien konjugat (DK) düzeyleri ile antioksidan sistem elemanları ölçüldü.

Bulgularımıza göre, İP uygulaması serumda TnT düzeylerini, kalpte HO-1 ekspresyonunu ve PK düzeylerini arttırırken, DK düzeyleri ve antioksidan sistemde bir değişiklik bulunmadı. CoPP+İP grubundan elde edilen sonuçlar İP grubu ile karşılaştırıldığında, kalpte HO-1 ekspresyonunun daha fazla arttığı, serum TnT düzeylerinin ise anlamlı olarak azaldığı bulundu. Buna karşılık, kalpte PK ve DK düzeyleri ile antioksidan sistem elemanlarında bir değişiklik saptanmadı. ZnPP+İP grubunda ise, belirtilen göstergelerin İP grubuna göre bir farklılık göstermediği bulundu.

Sonuç olarak, ekzojen CoPP ön uygulaması ile oluşan HO-1 aşırı ekspresyonunun, sıçanlarda İP ile indüklenen AMİ'ne bağlı miyosit kaybını azaltmada koruyucu bir etkiye sahip olduğu ileri sürülebilir.

ABSTRACT

Acute myocard infarction (AMI) is the main reason of death in developed countries. Oxidative damage caused by free radicals has been accepted to play an important role in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Recently, it has been shown that heme oxygenase-1 (HO-1) is induced by oxidative stress and this induction may be protective in oxidative stress-related diseases such as diabetes mellitus, hipoxic lung disease including cardiovascular diseases. However, there are limited studies investigating the effect of HO-1 induction on AMI.

In this study, our aim was to investigate whether HO-1 has a protective effect on isoprenaline (IP)-induced AMI in rats *in vivo* conditions. For this purpose, rats were pretreated with HO-1 mRNA inducitors such as cobalt protoporphyrine (CoPP) and zinc protoporphyrine (ZnPP). CoPP (20 mg/kg; i.p) and ZnPP (5 mg/kg; i.p) were given two times with a 12-h interval. IP (200 mg/kg; s.c) was injected to rats 30 minutes after the last metalloporphyrine administrations. Rats were killed after 4 hours of IP administration. Serum troponin-T (TnT) levels and cardiac HO-1 protein expression, protein carbonyl (PC) and dien conjugate (DC) levels and antioxidant system parameters were assayed.

According to our findings, serum TnT levels, cardiac HO-1 expression and PC levels were increased, but cardiac DC levels and antioxidant system were not changed by IP treatment. However, HO-1 expression was higher in CoPP+IP group, while serum TnT levels was found to decrease as compared to IP group. On the other hand, PC, DC levels and antioxidant system remained unchanged in heart tissue. Furthermore, it was also observed that examined parameters were not changed in ZnPP+IP group.

As a result, we may suggest that HO-1 overexpression by exogenous CoPP pretreatment may have a cardioprotective effect on myocyte loss in the IP-induced AMI model in rats.

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklar birinci sıradaki ölüm nedenidir ve en belirgin belirtisi akut miyokard infarktüsü (AMİ) dır. AMİ, kalbi besleyen koroner arterlerdeki kan akımının çeşitli nedenlerle genellikle de bir trombüs nedeniyle azalması ya da kesilmesine bağlı olarak gelişmektedir. Kan akımında azalma arterlerin beslediği kalp kasında nekroz ile sonuçlanmakta ve halk arasında kalp krizi olarak da bilinen bu klinik tabloya neden olmaktadır (8). Türk Kardiyoloji Derneği tarafından yürütülen Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri (TEKHARF) verilerine göre ülkemizde ani ölümler hariç yılda yaklaşık 80 bin kişi AMİ geçirmektedir. Amerikan Kalp Birliği (AHA) verilerine göre ise Amerikan toplumunda AMİ görülme sıklığı % 1.9-5.2'dir (115). Günümüzde AMİ belirtilerinin daha iyi tanınması, tedavi kalitesinin yükseltilmesi ve tedavi seçeneklerinin artırılması için önem taşımaktadır.

Serbest radikallerin ve bunların neden olduğu oksidatif hasarın kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (5,27). Fizyolojik koşullarda, reaktif oksijen türleri (ROS), hücrelerin normal bir fonksiyonu olarak oluşmaktadır. Ancak antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan kontrolsüz ve aşırı ROS üretiminin, LDL oksidasyonu, endotel disfonksiyonu, vasküler düz kas proliferasyonu ve migrasyonu gibi birçok proaterojenik olayı tetikleyerek kardiyomiyosit hasarına yol açtığı ileri sürülmektedir (5). Gerek in vitro, gerekse hayvan modellerinde yapılan çalışmalar ile iskemi/reperfüzyon hasarı, miyokard infarktüsü ve kronik basınç yüklenmesi (hipertansiyon) gibi durumların oksidatif stres oluşturarak apoptozis yoluyla miyosit kaybına neden olduğu gösterilmiştir (11,27,47). Diğer yandan, organizma, çeşitli stress uyarılarına bir cevap olarak hücre ve dokuları hasardan korumak üzere birçok savunma mekanizması geliştirmiştir. ROS'ların zararlı etkilerine karşı korunmada süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve daha etkili olarak da glutatyon peroksidaz/redüktaz (GSH-Px/GR) sistem gibi antioksidan sistemler önemli rol oynamaktadır (100). Bunun yanısıra toksik uyarılara karşı hücrelerin geliştirdiği bir diğer savunma sistemi, çeşitli stress proteinlerinin indüksiyonudur. Stres cevabı olarak indüklenen proteinlerden biri hem oksijenaz (HO)' dır. Üç izoform (HO-1, HO-2, HO-3) içeren HO protein ailesine ait olan HO-1, aynı zamanda heat shock protein (hsp) 32 olarak da bilinmektedir. Diğer hsp'lerden farklı olarak, bilinen bir şaperon aktivitesine sahip değildir. Ancak, prooksidan bir molekül olan hem'in yıkılımlında hız sınırlayıcı basamağı katalizler. HO-1'in katalizlediği bu basamakta, karbonmonoksit

(CO), biliverdin ve Fe meydana gelir. Biliverdin daha sonra hızla bilirubine indirgenmektedir. HO sistemi ile ortaya çıkan yan ürünlerden olan bilirubinin antioksidan etkisinin yanısıra, CO'in de antiproliferatif, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (2,40,76,84). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile, HO-1'in oksidatif stress ile indüklendiği ve kardiyovasküler hastalıklar dahil diabet, hipoksik akciğer hastalığı gibi birçok hastalıkta ortaya çıkan oksidatif hasara karşı koruyucu olarak önemli rol oynayabileceği bildirilmektedir (59, 76). Bununla birlikte, yapılan literatür araştırmasına göre, AMİ sırasında gerçekleşen kardiyomiyosit hasarının korunmasında, HO-1 in etkilerine ait çalışmalar oldukça sınırlı bulunmaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız, sıçanlarda izoprenalin (İP) uygulaması ile oluşturulan AMİ modelinde kardiyomiyosit nekrozunun önlenmesinde antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkilere sahip HO-1'in koruyucu etkilerinin olup olmadığını araştırmaktır. Bunun için, HO-1 mRNA indükleyicileri olan kobalt protoporfirin (CoPP) veya çinko protoporfirin (ZnPP) kullanılarak, İP ile oluşturulan deneysel AMİ modelinde HO-1'in etkileri invivo koşullarda incelendi. Deneysel AMİ oluşturmak için sıklıkla kullanılan maddelerden biri olan İP'nin toksik dozlarının, deney hayvanlarında, insanlarda görülen AMİ'ne benzer metabolik ve morfolojik değişiklikler oluşturduğu bilinmektedir (86,90,127). Çalışmamızda, 12 saat ara ile 2 kez olacak şekilde, CoPP (20 mg/kg;i.p) veya ZnPP (5 mg/kg; i.p) verilen sıçanlara son metalloporfirin uygulamasından 30 dakika sonra İP (200 mg/kg; s.c) verildi. İP uygulandıktan 4 saat sonra öldürülen sıçanların kanları ve kalpleri alındı. Serum AMİ göstergesi olarak troponin-T (TnT) düzeyleri tayin edildi. Kalp dokusunda HO-1 ekspresyonu, oksidatif stres parametrelerinden protein karbonil (PK) ve dien konjugat (DK) düzeyleri ile antioksidan sistem ölçüldü. Sonuçlar, kontrol olarak kullanılan sıçanlardan elde edilen değerler ile ve gruplar arası olarak karşılaştırıldı.

II- GENEL BİLGİLER

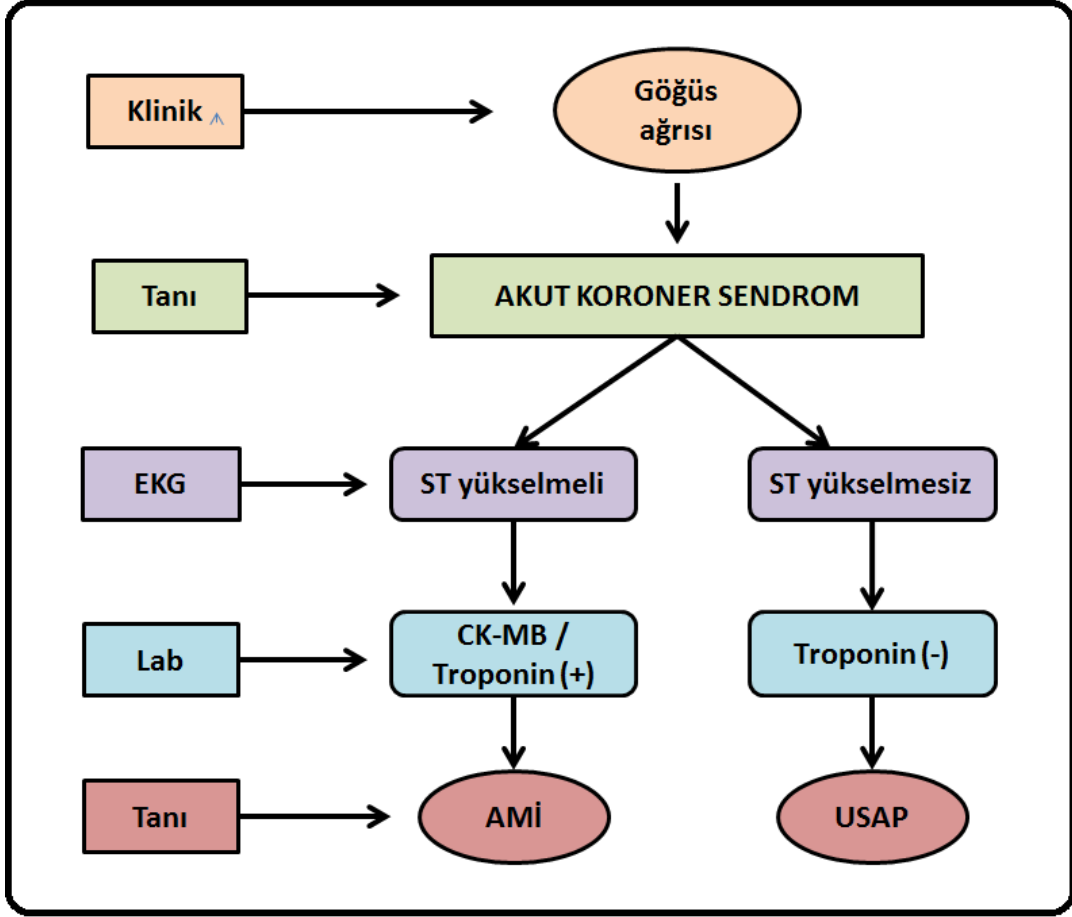
A. AKUT MİYOKARD İNFARKTÜSÜ

1. Tanım

Akut miyokard infarktüsü (AMİ) tanımı, oksijen sunumu ve ihtiyacı arasında dengesizlik oluşturan iskeminin yol açtığı kardiyak miyosit ölümünü yansıtır. Miyokard iskemisi ile uyumlu bir klinik durumda, miyokard nekrozu kanıtı olduğunda AMİ terimi kullanılmalıdır (111). Dünya Sağlık Ögütü (WHO)'nün yaptığı tanıma göre, AMİ; 1-tipik göğüs ağrısı, 2-serumda artmış kreatinin kinaz-MB (CK-MB) konsantrasyonu, 3-patolojik Q dalgalarını içeren tipik elektrokardiyografi (EKG) bulguları kriterlerinden en az ikisinin olması durumudur (91). CK-MB'nin miyokardiyal nekroz için duyarlı olmaması klinik uygulamada birçok hastada eksik ve gecikmiş tanıya neden olmuştur. Miyokardiyal hasar için çok spesifik olan troponin- T (TnT) ve troponin-I (TnI) belirteçlerinin ve yeni görüntüleme tekniklerinin önem kazanması ile European Society of Cardiology (ESC) ve American College Cardiology (ACC), AMİ tanısı için, 2000 yılında duyarlılık ve özgüllüğü arttırmaya yönelik yeni bir tanımlamaya gitmiştir. Bu tanımlama 2007 yılında tekrar gözden geçirilmiş olup Tablo 1'de gösterilmiştir (111). Şekil 1'de ise AMİ terminolojisi şematize edilmiştir.

Tablo 1: AMİ tanımlaması

AMİ Kriterleri
<p>Aşağıdakilerden herhangi biri;</p> <ul style="list-style-type: none">• Kardiyak biyobelirteçlerin, tercihen troponinin, normal üst referans limitinin 99. persentilini geçen en az bir değeri ile birlikte aşağıdaki iskemi bulgularından en az biri<ul style="list-style-type: none">➤ İskemi semptomları➤ Yeni iskemi ile uyumlu EKG bulguları (yeni ST-T değişiklikleri ya da LBBB)➤ EKG’de patolojik Q dalgalarının gelişimi➤ Canlı miyokard dokusunda yeni bir kaybı gösteren görüntüleme tetkiki, ya da yeni bölgesel duvar hareket bozukluğu• Kardiyat arresti de içeren ani, beklenmedik kardiyak ölüm; sıklıkla miyokard iskemi ile uyumlu semptomlarla birlikte olan, yeni ST yükselmesi ya da LBBB’nin eşlik ettiği, koroner anjiyografi ya da otopside taze trombus kanıtı mevcut olan<ul style="list-style-type: none">• Perkutan koroner girişim sonrası kardiyak biyobelirteçlerin üst referans limiti 99. persentilinin 3 katını geçmesi• CABG operasyonu sonrası kardiyak biyobelirteçlerin üst referans limitinin 99. persentilinin 5 katını geçmesi• AMİ’nin patolojik bulguları



Şekil 1: AMİ terminolojisi

2. Sınıflandırma

Miyokard infarktüslerinin en yeni klinik sınıflaması 2007 yılında ACC/AHA ve ESC ortak çalışma grubu tarafından yapılmıştır. Bu sınıflamada plak rüptürü, erozyonu ya da fissürü gibi birincil koroner olaylara bağlı gelişen miyokard infarktüsleri Tip 1 olarak isimlendirilmiştir. Artmış oksijen ihtiyacı ya da azalmış oksijen sunumu sonucu oluşanlar Tip 2 AMİ olarak isimlendirilmiş olup koroner arter spazmı, koroner embolizm, anemi, aritmiler, hipertansiyon ve hipotansiyon bu tipe dahildir. Tip 3 AMİ, miyokard iskemisine ait semptom, EKG değişikliği, koroner anjiyografi (KAG) ya da otopsi bulguları olan hastalarda ani kardiyak ölüm olarak tanımlanmıştır. Tip 4 AMİ ikiye ayrılmış olup, perkütan koroner girişimlerle (PKG) ilgili olanlar AMİ Tip 4a, stent trombozu sonucu oluşanlar Tip4b AMİ olarak isimlendirilmiştir. Koroner by-pass (CABG) operasyonu ile ilişkili miyokard infarktüsleri Tip 5 AMİ olarak isimlendirilmiştir (111).

2. Fizyopatoloji

Akut koroner sendrom (AKS)' ların patogenezi ortaktır (41) ve büyük kısmı, koroner aterosklerotik plakta meydana gelen değişiklikler sonucunda plak üzerinde trombüs oluşmasıyla gerçekleşmektedir. Yani, ST segment elevasyonu olsun (STEMI) veya olmasın (NSTEMI), AKS'da temel patoloji aterotrombozdur. Akut STEMI uzun süreli iskeminin yarattığı miyokardiyal nekroz ile oluşur, koroner arterde tam tıkanma olması gerekmektedir.

Akut STEMI patofizyolojisi, bir dizi birbiri ile yakın ilişkili biyolojik reaksiyon sonucunda meydana gelir. Koroner aterosklerotik plak rüptürü veya erozyonu ile tetiklenen bu süreç, trombotik tıkanma ile birlikte, ilgili koroner damarda dolaşımın durması ve sonuçta bu damarın beslediği miyokardiyal alanda iskemiden başlayarak nekroza kadar ulaşan hasar olarak özetlenebilir.

Güncel bilgiler ışığında, rüptür veya erozyonu tetikleyen faktörler tam olarak açıklanmış değildir. Tetikleyici faktör olarak; artmış duvar stresi, artmış shear stres ve koroner tonus değişikliği teorik düzeyde ileri sürülen hipotezlerdir. Parçalanma ile birlikte direkt olarak subendotelial tabaka ile temas eden trombositlerin aktivasyonu ve agregasyonunun yanında, plaktan salınan doku faktörünün dolaşıma katılması sonucu koagülasyon kaskadı tetiklenmiş olur. Doku faktörü (TF), faktör VIIa ile etkileşerek hem intrinsek hem de ekstrinsek yolun ortak bileşenleri olan faktör IX ve faktör X' u aktifler. Bu aktivasyon sonucu protrombin trombine dönüşür. Trombin fibrinojenden fibrin oluşumunu sağlar. Trombosit aktivasyonu ile birlikte trombüs oluşur. Trombosit aktivasyonu ile ortama salınan tromboksan A2 (TXA2) ve adenosin difosfat (ADP) primer hemostazda görev alırken, trombin etkisiyle oluşan fibrin molekülü sekonder hemostaz sağlar. Lipid çekirdek, düz kas hücresi, makrofaj ve kollajenin kompleks etkileşimi sonucu oluşan trombüs, tıkaçıcı veya tıkanmak üzere (suboklüziv) olma durumuna göre AKS tablolarından birine yani unstabil anjina pektoris (USAP), NSTEMI, STEMI veya ani kardiyak ölüme neden olur.

STEMI'de transmural infarkt, NSTEMI'de subendokardiyal infarkt bulguları mevcuttur. Şüphesiz ki, trombüsün özellikleri yanında koroner aterosklerozun lokalizasyonu, yaygınlığı, kollateral damar durumu, sol ventrikül rezervi ve eşlik eden kardiyovasküler risk faktörleri klinik tablonun önemli belirleyicileridir.

3. Klinik

En önemli semptom iskemik göğüs ağrısıdır. Miyokard infarktüsünün teşhisi genellikle 20 dakika veya daha uzun süren, nitrogliserine cevap vermeyen ciddi göğüs ağrısına dayanır. Ağrı göğsün merkezinde veya sternumun sol tarafında lokalizedir. Alt çene, omuz, boyun ve kola yayılabilir.

4. Kardiyak biyobelirteçler

Miyoglobin: Miyoglobin, kaslarda bulunan düşük molekül ağırlıklı bir proteindir. Hasarlı miyokard hücrelerinden dolaşıma salınır. STEMI başlamasından yarım ile iki saat sonra kanda tespit edilebilir. Kalbe spesifik değildir, iskelet kasında da yüksek miktarda bulunduğundan AMİ tanısında sınırlı payı vardır. Göğüs ağrısının ilk 4–8 saati içerisinde miyoglobin yüksekliği diğer belirteçlerle kombine edilmedikçe AMİ lehine yorumlanmamalıdır.

Kreatinin Kinaz ve izoformları: Kreatinin kinaz (CK) kas metabolizmasının temel bir enzimi olup, ATP aracılı kreatinin fosforilasyonunu geri dönüşümlü olarak katalize eder. Kreatinin kinaz izoenzimleri B ve M zincirlerinin bileşimi ile meydana gelen dimerik moleküllerdir. CK'nın CK-MM, CK-MB, CK-BB şeklinde 3 izoenzimi vardır. Beyin ve böbreklerde BB formu bulunur. İskelet kasları esas olarak MM formu içermekle beraber %1–2 oranında MB formunu da bulundurur. Kalp kasında ise hem MB hem de MM formu bulunur. CK-MB, miyokard total CK aktivitesinin % 20'sini oluşturur. CK-MB, STEMI sonrası yaklaşık 2–4 saatte salınmaya başlar, 24. saatte pik yapar ve 36–72 saat sonra normale döner. CK-MB reinfarkt ve girişimsel olmayan reperfüzyon için çok sık kullanılan bir enzimdir. Fibrinolitik tedavi sonrası erken CK-MB (12–18 saat) piki başarılı reperfüzyonu gösterir. Miyokard infarktüsünde, CK-MB'si yüksek olanların normal olanlara göre prognozu daha kötüdür.

Kardiyak Troponinler (Tn): Troponin kompleksleri, kardiyak miyofibril ince filamentlerinin ana düzenleyici proteini olup, aktin-miyozin etkileşimini düzenler. Troponin kompleksi içinde üç alt grup vardır.

Troponin I (TnI): Aktine bağlanarak aktin-miyozin etkileşimini inhibe eder.

Troponin T (TnT): Troponin kompleksinde tropomiyozine bağlanır.

Troponin C (TnC): Troponin kompleksinde kalsiyuma bağlanır.

TnT ve TnI renal disfonksiyon dışında, miyokardiyal hasarı tespit etmede eşit duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. TnI böbrek hastalarında daha spesifiktir. Son dönem böbrek yetmezliği hastalarında yapılan çalışmalarda, AKS olarak klinik bulgusu olmayan %15–53 hastada TnT yükselirken, TnI %10'dan daha az hastada yükselmiştir. Literatür bilgilerine göre, göğüs ağrısı başladıktan 3–4 saat sonra plazmada troponin seviyesi artışı izlenmektedir. Bu seviyenin, yaklaşık 12–16 saat sonra pik yaptığı ve STEMI sonrası 8-12 gün yüksek kalabildiği belirtilmektedir (26) .

Tablo 2: Kardiyak biyobelirteçlerin kan seviye zamanları (7).

Kardiyak biyobelirteçler	İlk yükselme	Pik zamanı	Normal seviye
Myoglobin	1-4 saat	6-7 saat	24 saat
Troponin I	3-12 saat	24-48 saat	7-10 gün
Troponin T	3-12 saat	12-48 saat	10-14 gün
CK-MB	3-12 saat	24 saat	48-72 saat
CK-MB izoformu	2-6 saat	18 saat	

**ACC/AHA STEMI kılavuzundan alınmıştır.*

B. DENEYSEL AKUT MİYOKARD İNFARKTÜSÜ

Deneysel olarak AMİ oluşturabilmek için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bunlar içerisinde koroner arter ligasyonu sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bunun yanı sıra bazı kimyasal bileşikler uygulanarak da AMİ oluşturulabilmektedir (53).

İzoprenalin (İP) deneysel AMİ oluşturmak için en sık kullanılan maddedir (6, 86, 88,90, 126). Sentetik bir katekolamin ve beta adrenerjik agonist olan İP, inotropik (β_1 reseptör), kronotropik (β_1 reseptör), vazodilatör (β_2 reseptör), bronkodilatör (β_2 reseptör) etkilere sahiptir ve özellikle sağ ventrikül disfonksiyonunda (hem pulmoner dilatasyon, hem de inotropik desteğe ihtiyaç olduğunda), bronkokonstrüksiyon, bradikardi, pulmoner hipertansiyon durumlarında kullanılabilir (53,50). İP toksik dozlarda, taşikardi, ritm bozuklukları (β_1 etkisine bağlı), diyastolde koronerlerin beslenmesinin azalması ve miyokardın oksijen ihtiyacının artması gibi olaylara neden olur (53).

İP toksik dozlarda uygulandığında, deney hayvanlarında insanlarda görülen miyokard infarktüsüne benzer metabolik ve morfolojik değişiklikler oluşturmaktadır (6,86,88,90). İP'nin toksik dozlarının kalp hücrelerinde yaygın nekroza neden olduğu iyi bilinmektedir (86,90,126). İP nedenli kardiyotoksisitenin patolojik mekanizmasını açıklayan çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Arteriyal hipotansiyona bağlı olarak relatif bir iskeminin oluşması, aşırı oksijen tüketimi, kalbin hiperkontraksiyonu, intraselüler kalsiyum birikimi, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin tükenmesi bunlardan bazılarıdır (53,77). Ayrıca İP'nin lipitleri, özellikle düşük dansiteli lipitleri (LDL) yükselterek infarktüse zemin hazırladığı düşünülmektedir (6,88,125). Bazı araştırmacılar, İP uygulaması ile oluşan AMİ'de serbest oksijen radikallerinin önemli bir rol oynadığını ileri sürmektedir (53,77,125).

C. OKSİDATİF SÜREÇ, ANTİOKSİDAN SİSTEM VE AMİ

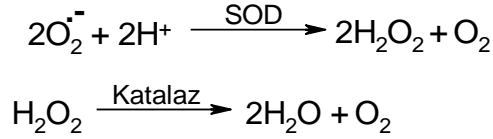
1. Oksidatif süreç

Aerobik organizmada, çeşitli ilaçların ve kimyasalların zehirsizleştirilmesi sırasında serbest radikaller oluştuğu gibi, organizmanın yaşamı için gereken oksijenin kullanılması sırasında da bu molekülden çeşitli radikaller türer. Hücre mitokondrisinde oksidatif fosforillenme ile ATP üretilirken, moleküler oksijenin suya indirgenmesi sırasında da radikaller oluşur. Bunların tümüne oksijenden türeyen radikaller veya aktif oksijen türleri (ROS) denir. Moleküler oksijenin elektronik yapısı nedeniyle indirgenmek için elektronları teker teker alması gerekmektedir. Bir elektron alması ile süperoksit anyonu (O_2^-), iki elektron alması ile hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana gelir. H_2O_2 ayrışması, özellikle demir (Fe^{+2}) veya bakır (Cu^+) iyonlarının bulunduğu ortamda yarı ömrü çok kısa ve çok aktif olan hidroksil radikalının oluşmasına yol açar (32,51).

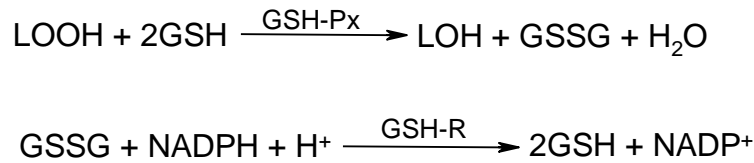
Serbest radikaller, mitokondrinin yanı sıra başka organellerde serbest veya zara bağlı halde bulunan çeşitli enzimlerin reaksiyonu sırasında da oluşur. Oluşan ROS'lar tüm hücre bileşenleri ile etkileşip onların yapı ve fonksiyonlarını bozabilecek özelliğe sahiptir. DNA'da bazların parçalanması, DNA kollarının kırılması ve denatürasyon gibi yapısal değişiklikler olurken, proteinler de oksidasyona uğrayarak yapı ve fonksiyonları bozular (32,51). Serbest radikaller hücre zar yapısında bulunan lipitlerle de etkileşerek lipit peroksidasyonunun başlamasına sebep olurlar. Lipit peroksidasyonu, hücre zarlarındaki çok doymamış yağ asitlerinde başlayıp zincirleme uzayan bir süreçtir. Bu sürecin sonucunda zardaki taşıma sistemleri zarar gördüğü gibi, hücre içi ve dışı iyon dengeleri de bozular (32,51). Hücre içi kalsiyum düzeylerinin artması da proteazları aktifler. Bu olayların hücre hasarında etkin rol oynadığı iyi bilinmektedir (32,51,75,116). Çok doymamış yağ asitlerindeki çift bağların peroksidasyon etkisi ile yer değiştirmesi sonucu dien konjugatı (DK) oluşması, meydana gelen peroksitlerin son ürünler olan aldehit ve karbonilli bileşiklere dönüşmesi, hasar tespitinde oksidatif sürecin rolünü tayin ederken kullanılan bazı ölçümlerin temelini oluşturmuştur (32,116,103).

2. Antioksidan sistem

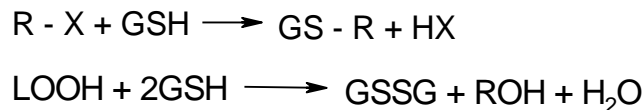
Radikal yapılu türlerin organizmaya zarar vermesini engelleyen güçlü bir savunma sistemi vardır. Bu sistem sayesinde radikal oluşum hızı ile etkisizleştirme hızı dengede tutularak sağlıklı koşullar sağlanabilir. Antioksidan sistem denilen bu savunma sistemi, gerek radikal tutucu denilen bileşiklerle gerekse özel enzimlerle radikal oluşumunu sınırlama, tetiklenen reaksiyonların kırılmasını sağlama, oluşan radikalleri yok etme ve hasarlanmış molekülleri tamir etme ve ortadan kaldırma gibi mekanizmalarla etkili olmaktadır. Hücrenin temel indirgen gücünün bir elemanı olan glutatyon (GSH), C vitamini, ürik asit suda çözünen, E vitamini, β -karoten, bilirubin, flavonoidler ise yağda çözünen radikal tutuculardan bazılarıdır. Oksidasyona sebep olacak metal iyonlarını bağlayabilen ferritin, transferrin, haptoglobin, seruloplazmin ve albümin de radikal tutucusu olarak fonksiyon yaparlar (32,75,103). Antioksidan enzimlerden biri olan süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit anyonunun H_2O_2 ve moleküler O_2 'ne dönüşümünü katalizler. H_2O_2 'nin su ve moleküler oksijene parçalanmasını sağlayan da katalazdır.



Gerek H_2O_2 , gerekse çeşitli peroksitleri parçalayan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) selenyuma bağımlı çalışan ve hidrojen vericisi olarak GSH kullanan bir antioksidan enzimdir. Bu sistemde oksitlenmiş glutatyonun yenilenmesi de nikotinamid adenin dinükleotit (NADPH)'e bağlı çalışan glutatyon redüktaz tarafından (GR) gerçekleştirilir.

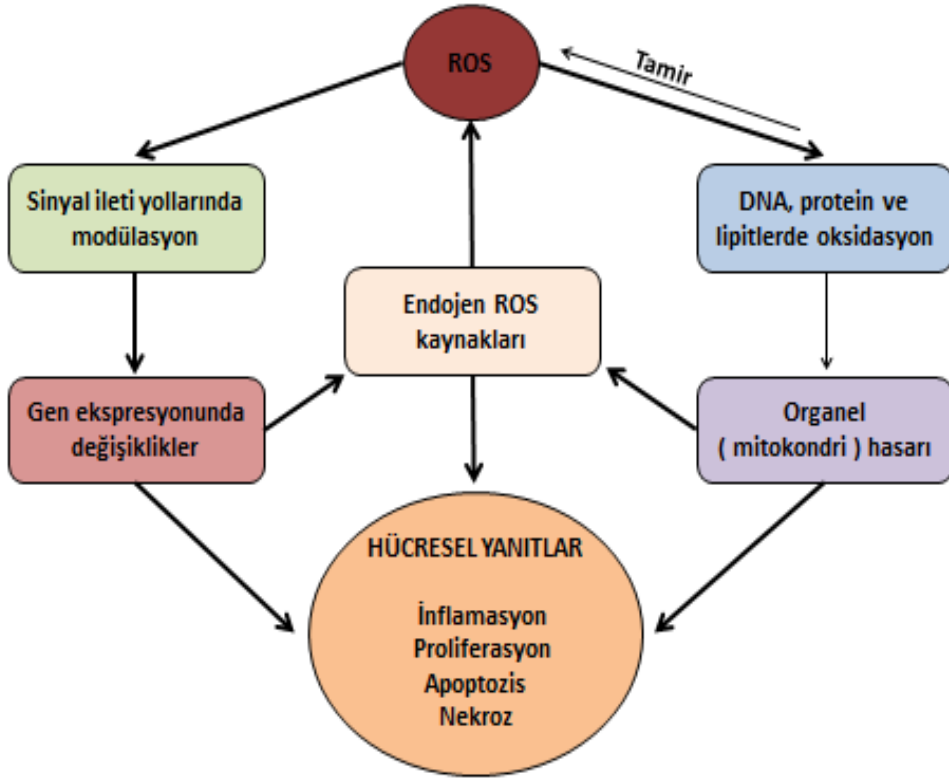


GSH ile konjugasyon yaparak çeşitli bileşikleri uzaklaştıran glutatyon S-tranferaz (GST) hem antioksidan özelliği olan hem de detoksifikasyon yapan bir enzim ailesidir. Bazı GST izoenzimleri GSH-Px aktivitesi göstererek hidroperoksitleri de parçalar (103).



3. AMİ'de oksidatif stresin rolü

Son yıllardaki çalışmalar, ROS'ların iskemiye bağlı olarak miyokard dokusunda gelişen nekrotik ve apoptotik değişimlerde önemli bir rolü olabileceğini ortaya koymaktadır (25,83,111,125). Serbest radikaller, lipit, protein, DNA gibi makromoleküllerde hasar oluştururken, sinyal ileti yollarını da etkileyerek gen ekspresyonunda değişikliklere yol açarlar (32,53,54). Bilindiği gibi, hücre ölümü iki farklı olayla gelişmektedir. Bunlar apoptozis ve nekrozdur. Apoptozisten nekroza geçiş apoptozisin oluşum hızı ile fagositoz hızı arasında bir dengesizlik meydana geldiği zaman görülür. Apoptozise uğrayan hücreler parçalanmadan ve inflamasyonu uyarmadan önce fagosite ediliği için inflamasyon gelişmemektedir. Dokudaki apoptotik hücrelerin sayısı dokunun fagositoz kapasitesini aştığı zaman apoptotik hücreler parçalanmakta inflamasyon ve nekroz gelişmektedir (53,54). Mitokondri, hem apoptozis, hem de nekroz gelişiminde anahtar rol oynayan bir organeldir (53,54). ROS oluşumundaki artışın yarattığı oksidatif stres mitokondri zar bütünlüğünü etkileyerek apoptozise ve nekroza yol açan olayları tetiklemektedir (53,54) (Şekil 2).



Şekil 2: Serbest radikallerin hücre hasarına yol açmasında etkili mekanizmalar.

D. HEM OKSİJENAZ ENZİM SİSTEMİ

Merkezinde demir içeren bir tetrapireol olan hem, oksijen transportu/depolanması, enerji üretimi, detoksifikasyon gibi olaylarda görev alan proteinlerin yapısında bulunur. Hemoprotein, yapısında hem molekülü içeren proteinler için kullanılan bir terimdir. Hem molekülü proteinlere kovalent veya kovalent olmayan bağ ile bağlanır ve hemoproteinlerin aktif merkezini oluşturur.

Hem molekülünün yıkılmasını katalizleyen enzim HO'dır (110). Hem oksijenaz prostetik gruba ihtiyaç duymadan hem ile kompleks oluşturarak aktiflenen mikrozomal bir enzimdir. Yani hem molekülü HO enzimi için hem substrat hem de prostetik grup görevi görür (87) (Şekil 3).

Günümüze kadar hem oksijenazın genetik olarak farklı üç izoformu tanımlanmıştır; indüklenbilir formu HO-1, yapısal formu HO-2 ve son zamanlarda klonlanmış form olan HO-3 (64,67). Bu üç izoform da aynı reaksiyonu katalizler ancak HO-3'ün, HO-2 ile kıyaslandığı zaman daha az fonksiyon gördüğü söylenebilir (67). Kataliz ettikleri reaksiyonda kullandıkları substrat, kofaktör ve koenzim bakımından HO-1 ve HO-2 arasında fark yoktur. Ancak enzim kinetikleri, K_m değerleri, termostabiliteleri ve immünoaktiviteleri farklıdır (64). Bu enzimler farklı gen ürünleri olmalarına rağmen aminoasit veya nükleotit dizileri, amino asit kompozisyonları ve transkript numaraları benzerlik gösterir. HO-1 aynı zamanda stres proteini hsp 32 olarak da bilinir. HO-1'in moleküler ağırlığı yaklaşık 32 kDa, HO-2'nin ise yaklaşık 36 kDa'dur (94,99).

HO-1, en çok dalak olmak üzere karaciğer retikuloendotelial hücrelerinde ve kemik iliğinde eksprese edilir (109). Kemik iliğinin hematopoietik kök hücrelerinde HO-1'in varlığını gösteren birçok çalışma vardır (3,4). Bu hücrelerde hem farklılaşma faktörü olduğu için, HO-1 intrasellüler hem konsantrasyonunu azaltarak bu hücrelerin farklılaşmasına engel olur (3,4). Hemoliz gibi kan hemoglobin düzeyinin aşırı derecede arttığı durumlarda HO-1 enzimi, böbrek, makrofaj ve karaciğer parankim hücrelerinde ciddi bir artış gösterir. Bunun dışında eritrosit veya hemoglobin metabolizması ile direkt ilgisi olmayan dokularda HO-1 bazal düzeyde bulunur. Ancak kimyasal veya fiziksel bir uyarıya karşı hızlı transkripsiyonel aktivasyon gösterir (85).

HO-2 ise en fazla testis ve beyinde bulunur. Ayrıca damarlar, merkezi sinir sistemi, gastrointestinal sistem, karaciğer ve böbrekler de yüksek miktarda HO-2 içermektedir.

Çevresel stres ile aktiflenmeyen HO-2 ancak beyinde adrenal glukokortikoidlere cevap verebilir (64).

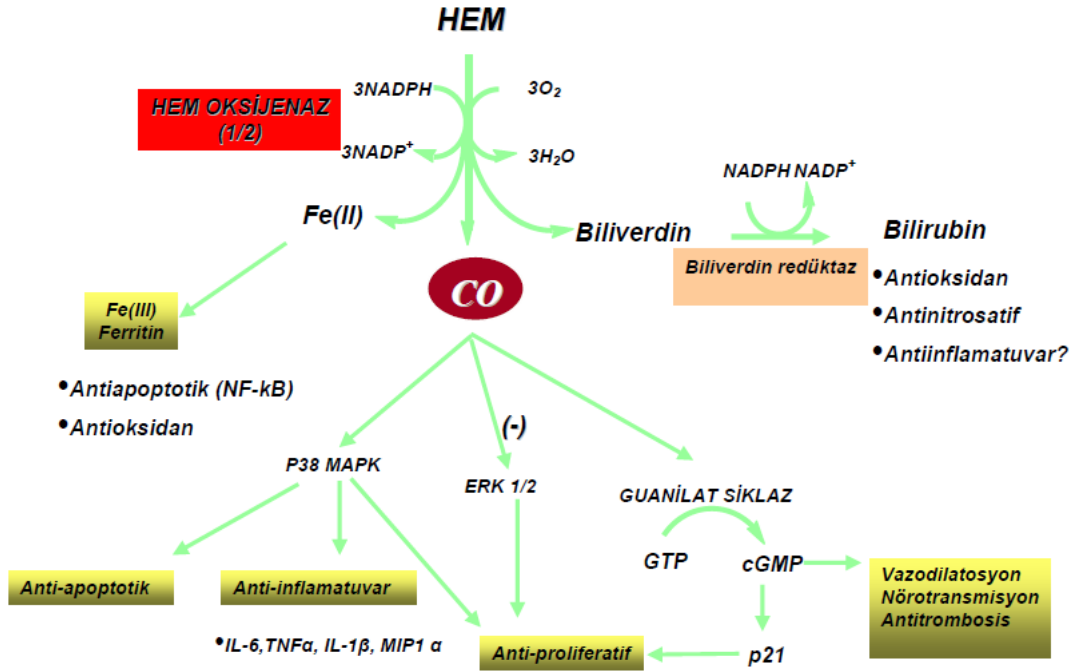
Mikrozom yüksek oranda HO aktivitesine sahip olduğu için hem oksijenaz endoplazmik retikulum ile ilişkili protein olarak kabul edilir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar HO enziminin hücrenin diğer kompartmanlarında da bulunduğunu göstermektedir (18,44).

Yapısal hem oksijenaz formu olan HO-2 sadece adrenal glukokortikoidlere yanıt verirken, HO-1 kimyasal ve fiziksel bir çok uyarıdan etkilenir. HO-1 ve HO-2 arasındaki bu farklılık enzimlerin promotör bölgelerinde regülatör elementlerin olup olmaması ile ilgilidir. HO-1 geni reaktif oksijen türlerinin de dahil olduğu hücresel oksidatif stres oluşturan ajanlar ve kimyasallar tarafından güçlü bir şekilde indüklenir. Bu nedenle strese yanıt veren gen olarak bilinir. H₂O₂, kinonlar, menadion bu şekilde etki gösteren indükleyiciler arasındadır (28).

HO'nun substratı hem'in yapısında bulunan protoporfirin IX ile metallerin kompleks oluşturması sonucunda metalloporfirinler oluşur. Kobalt protoporfirin (CoPP), çinko protoporfirin (ZnPP), kalay protoporfirin (SnPP) gibi metalloporfirinler *in vivo* koşullarda güçlü HO-1 mRNA indükleyicilerindedir. Bununla birlikte, CoPP'nin *in vivo* koşullarda HO-1 aktivitesinin güçlü bir indükleyicisi, ZnPP'nin ise inhibitörü olduğu gösterilmiştir (20,68) Bunun dışında, sitokinler, anjiogenez, ağır metaller (CoCl₂, SnCl₂), hipoksi, hiperoksi, nitrikoksit (NO) ve NO donörleri, UVA, hem, prostaglandinler, H₂O₂, forbol esterleri, sodyum arsenit, kurkumin ve anjiotensin II de HO-1 aktivitesinin indükleyicilerinden bazılarıdır (39).

E. HEM OKSİJENAZIN REAKSİYON ÜRÜNLERİ VE FONKSİYONLARI

HO, hem molekülünün katalizi ile gelişen eritrosit döngüsü, hücre farklılaşması ve demir konsantrasyonunu dengede tutmak gibi bilinen etkilerinin yanısıra reaksiyon ürünleri üzerinden gelişen önemli sitoprotektif etkilere de sahiptir (Şekil 3) .



Şekil 3: Hem molekülünün parçalanma ürünleri ve fonksiyonları.

1. Demir ve ferritin

Biyolojik sistemlerde demir, hem ve metalloporfirin havuzundan bağımsız olarak düşük molekül ağırlıklı organik bileşiklerle kompleks halde bulunur. Çok sıkı bağı olmayan bu form metal şelatörler ile reaksiyona hazır durumdadır (92,93). Hem molekülünün parçalanması ile salıverilen demir labil ve şelat oluşturabilen demir havuzunu oluşturur (95). Bu reaksiyon sonunda serbestleşen demir, demir regülatör proteinlerine (DRP) bağlanarak ve böylece demir döngüsü ile ilgili kritik proteinlerin mRNA stabiliteelerini değiştirerek intrasellüler demir homeostazını sağlar (22). Demir-DRP kompleksi mRNA stabiliteeleri üzerinde pozitif veya negatif etki gösterebilir. Örneğin düşük demir konsantrasyonunda DRP aktif halde kalarak ferritin mRNA translasyonunu inhibe eder. Yüksek demir konsantrasyonu ferritin sentezini belirgin şekilde artırır (21). Serbest demir intrasellüler reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur. Bunun dışında, lipit peroksidasyonunda, nitrik oksite (NO) bağlı tiyol gruplarının nitrozilasyonunda ve hidrojen peroksitten reaktif hidroksil radikalinin oluştuğu Haber-Weiss reaksiyonunda önemli görevleri vardır (33).

Ferritin, demire bağlanan bir proteindir ve temel olarak karaciğerde üretilir, Ferritin, demiri ayırarak dolaylı bir antioksidan gibi davranabilir. İntrasellüler ferritinin HO-1 yoluyla arttırılması, vasküler endotelial hücrelerdeki hem ve hidrojen peroksitin sitotoksik etkilerini azaltır (10). Ayrıca, ferritin, endotelialdaki sitoprotektif etkileri ile serbest demir düzeylerini düşük tutma özelliği sayesinde, iskemi-reperfüzyon hasarından koruma gibi mekanizmaların temelini oluşturur (97). Ancak, bu ilişkilerin nedenselliğe dayanıp dayanmadığı kesin değildir. Yine de, yayınlanmış bilimsel verilerin ağırlığından anlaşıldığına göre, HO-1'in 3 ürününden, bilirubinin ve/veya CO'in potansiyel koruyucu etkilerinin, demirin potansiyel zararlı etkilerini aştığı anlaşılmaktadır.

Demir ve ferritinin antiapoptotik etkisi: Ferritin, sitoprotektif etkili bir moleküldür (9) ve HO aktivitesine bağlı olarak artan sentezi HO aracılı sitoprotektif etkiyi arttırarak hücrelerin daha dirençli hale gelmesini sağlar (117). Hem oksijenaz enziminin antiapoptotik etkisi büyük oranda CO ile ilişkilidir. Ancak yapılan bazı çalışmalar bu etkinin belirli oranda demire bağlı olduğunu göstermektedir. Örneğin HO-1 “upregülasyon”unun, jurkat-T hücrelerini fas-antikorlu ile oluşturulan apoptozise karşı dirençli kıldığını gösteren bir çalışma mevcuttur (16). Bu etki demire bağlı nükleer faktör kapa B (NF-Kb) aktivasyonu ile ilişkilidir. Aktif NFkB'nin, c-flip gibi antiapoptotik yolları aktiflediği, bu etkinin de demir şelatörleri varlığında bloke edildiği bildirilmiştir (16).

2. Biliverdin ve bilirubin

HO enzim reaksiyonu ile ortaya çıkan ilk ürün yeşil renkli, çözünür bir pigment olan biliverdindir. Biliverdinin biliverdin redüktaz ile enzimatik reaksiyonla indirgenmesi sarı renkli hidrofobik özellik gösteren bilirubini oluşturur (36). Bilirubin, memeli hücrelerinde en fazla bulunan endojen antioksidandır ve insan serumundaki antioksidan aktivite büyük oranda bilirubin kaynaklıdır (29). Serumda albümine bağlı bilirubin karaciğere transfer olur. Daha sonra karaciğer hücrelerinde albüminden ayrılarak fosfolipit membranlardan hepatositlere diffüze olur. Hepatositlerde mikrozomal “bilirubin üridin difosfat glukroniltransferaz” enzimi ile suda çözünür bilirubin monoglukronid ve diglukronide dönüşerek safraya salıverilir. Glukronidasyon bilirubini çözünür hale getirir ve gastrointestinal sistemden absorblanmasına engel olur (45). Metabolik atık olarak kabul edilen bilirubin normal koşullarda hızlı bir şekilde vücuttan uzaklaştırılır. Konjuge olmamış bilirubin yeni doğanlarda plazmada birikerek neonatal sarılığa neden olur ve nörotoksik etkiler gelişir. HO’ın kalay mezoporfirin ile farmakolojik inhibisyonu klinikte sarılık tedavisinde kullanıma girmiştir (46).

Bilirubinin antioksidan etkisi: Serbest, albümine bağlı veya konjuge bilirubin, konjuge çifte bağ ve bir çift reaktif hidrojen atomu içerir. Antioksidan aktivitesini H atomunu radikale aktararak gösterdiği düşünülmektedir. Örneğin lipit peroksil radikali (LOO[•]) bilirubin ile etkileşerek lipit hidroperoksit (LOOH) ve bilirubin radikalini (bilirubin[•]) oluşturur. Buna karşın biliverdin sadece konjuge çifte bağ taşır ve muhtemelen antioksidan aktivitesi rezonans stabilize edici etkisiyle ilgilidir. Konjuge/konjuge olmayan bilirubin ve biliverdin direkt olarak peroksil radikalini yakalama özelliği gösterir (104).

Ayrıca bilirubin ve biliverdin α -tokoferol ile sinerjik etki göstermektedir (105) ve S-nitrozotiyol, nitroksil iyonu, peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türlerini de etkili bir şekilde yakalar (48,65). Aynı zamanda NADPH oksidaz enzimini bloke ederek süperoksit oluşumunu bloke ettiği bildirilmiştir (56).

Bilirubinin normalden yüksek serum seviyeleri, muhtemelen LDL oksidasyonunu azaltması ve reaktif oksijen türlerini zararsız hale getirmesi nedeniyle aterojenik risk ile ters orantılıdır (70). Buna ek olarak, protein kinaz C ve protein fosforilasyon aktiviteleri üzerine inhibitör etki ile proaterojenik faktörlerin inhibisyonuna yol açtıkları da gösterilmiştir (34). Bilirubin aynı zamanda lipit membranların oksidasyonunu baskılaması yoluyla iskemi-

reperfüzyon hasarına karşı koruma sağlar (17). İskemik miyokardiyumda bilirubin koruma sağladığı hipotezi klinik bakımdan önemlidir. Bu hipotez, plazma bilirubin düzeyleri ile koroner arter hastalığı (KAH) arasındaki ters orantı ve aterosklerotik lezyonlarda bilirubin antioksidan aktivitesinin azalmış olması durumu ile desteklenir (37, 49,113).

Bilirubin antiinflamatuvar etkisi: Bilirubin son yıllarda tanımlanan antiinflamatuvar etkisi büyük olasılıkla reaktif oksijen türlerini yakalamasına bağlı olarak gelişir. Bilirubin endoteldeki antiinflamatuvar etkilerinden biri, ilk olarak mikrodamar modelinde gösterilmiş ve bu çalışmada bilirubin lökosit göçünü azalttığı belirtilmiştir (35). Bir çalışmada, *in vitro* ortamda bilirubin lökosit migrasyonunu bloke edip vasküler hücre adezyonmolekülü-1 (VCAM-1) ile ilişkili havayolu inflamasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (52). Bir diğer çalışmada da, HO-1'den türeyen bilirubin endotel hücrelerindeki proinflamatuvar olayları azalttığı gösterilmiş ve bilirubin engellediği endotel hücre disfonksiyonunun, anti-aterojenik koruma mekanizmalarıyla ilgili olabileceği öne sürülmüştür (49).

3. Karbonmonoksit

Karbon monoksit (CO) hemoglobine bağlanarak oksijenin dokulara dağılımını bloke etme özelliği gösteren, biyolojik sistemlerde genelde stabil, ortaklanmamış elektronu olmayan bir gazdır. CO, hemoglobinin yapısında bulunan demire reversibl olarak oksijenden 240 kat daha fazla afinite ile bağlanır. Bu nedenle yüksek konsantrasyonlarda CO gazına maruz kalarak meydana gelen CO zehirlenmelerinde antidot olarak hiperbarik oksijen terapisi uygulanabilir (30). CO önemli bir sinyal molekülüdür ve hücre fonksiyonlarını düzenleyici etkiler gösterir. CO üzerinden gelişen bu etkiler aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

CO'in vazodilatör etkisi: CO ile gelişen vazodilatör etkiyi bir kaç mekanizma ile açıklamak mümkündür. Molekülün dilatör etkisi büyük oranda guanilat siklaz (GC) aktivasyonuna bağlı olarak artan cGMP düzeylerine bağlıdır. CO'ya bağlı olarak gelişen dilatasyonun spesifik GC inhibitörleri varlığında bloke edilmesi, bu etkinin belirli oranda bu mekanizma ile geliştiğini doğrulamaktadır (38). Buna ek olarak, düz kas hücrelerinde oluşan CO, indirekt olarak endotel hücrelerindeki parakrin etkileri ile vazoregülatör etki gösterebilir. Endotel hücrelerinde cGMP'ye bağlı mitojen endotelin-1 (ET-1) "downregülasyon"u ile oluşan antiproliferatif etki, CO molekülünün indirekt vazoregülatör etkisine bir örnektir (69). CO, direkt olarak kalsiyuma bağlı potasyum (Kca) kanallarını aktifler (43). Kca kanal inhibitörleri varlığında vazodilatör etkinin belirli oranda azalması, bu etkinin cGMP ve Kca kanal ile birlikte oluşturulduğunu göstermektedir. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda CO uygulamasının internal depolardan NO salınımına neden olarak vazodilatör etki gösterebileceği bildirilmiştir (120).

CO'nun antiapoptotik ve antiproliferatif etkisi: CO'nun antiapoptotik etkisi ilk kez *in vitro* ortamda tanımlanmıştır. Hücre kültürü ortamında fare endotel hücre ve fibroblastlarında tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ile indüklenen apoptozisin ekzojen CO uygulaması ile inhibe olduğu gösterilmiştir (13). Bu etkinin p38 mitojen aktive eden protein kinaz (p38 MAPK) inhibitörleri varlığında ortadan kalkması, p38MAPK'nin bu etkideki önemini vurgulamaktadır (13). CO molekülünün sitoprotektif etkilerinden büyük oranda cGMP sorumludur ve antiproliferatif etkisinde de aynı yolağın sorumlu olduğunu ileri süren birçok çalışma mevcuttur (13). Vasküler düz kas hücre proliferasyonunun CO ile inhibisyonunda, cGMP'ye bağımlı endotel kaynaklı mitojenlerin downregülasyonunun da katkısı vardır (69).

Düz kas hücre proliferasyonu, hücre büyüme siklusunda görev alan kinazlar ve siklin kompleksleri ile düzenlenir. Hücre büyümesinde görev alan bu faktörler p21waf1/cip1 hücre siklus inhibitörünün kontrolü altındadır (82). CO, p21waf1/cip1 üzerinden antiproliferatif etki gösterir ve bu etkiye p38 MAPK'nın aracılık ettiği düşünülmektedir. Ayrıca, CO'in ekstrasellüler sinyal-regüle kinaz 1/2 (ERK1/2) üzerinde baskılayıcı etki göstermesi de antiproliferatif etkisine katkıda bulunabilir (107).

CO'in antiinflamatuvar etkisi: Hücre kültürü ve hayvan modelleri çalışmaları, HO-1 kaynaklı veya ekzojen CO'in antiinflamatuvar etkili olduğunu göstermiştir (80). CO, antiinflamatuvar sitokinlerin sentezini artırarak veya inflamatuvar etkili sitokinler üzerinde inhibitör etki göstererek inflamasyonu düzenler. Bu etkilere p38MAPK'nın aracılık ettiğini destekleyen bulgular bulunmaktadır (89).

III. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda ortalama 180-220 g ağırlığında Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. Tezde kullanılan tüm kimyasal malzemeler Sigma-Aldrich (San Diego, USA)'dan sağlandı. Sprague Dawley türü erkek sıçanlarda deneysel AMİ oluşturmak için İP modeli uygulandı. Bu model için hayvanlar 6 gruba ayrıldı. Sıçanlar normal sıçan yemi ile beslendi, su ya da yem kısıtlaması yapılmadı. Oniki saat ara ile 2 kez olacak şekilde CoPP (20 mg/kg) veya ZnPP (5 mg/kg) verilen sıçanlara son metalloporfirin uygulamasından 30 dakika sonra İP (200 mg/kg) verildi. İP verildikten 4 saat sonra tüm gruplara sodyum fenobarbital anestezisi (50 mg/kg) uygulandı, vena kava inferiordan (v.c.i) kan örnekleri elde edildi, kalp dokuları alındı. Sarı kapaklı jelli-kuru tüplere alınan kanlar 1500xg'de santrifüj edilerek serumlar ayrıldı. Hızla çıkarılan kalp dokuları, % 0.9 NaCl çözeltisi ile yıkandı ve sıvı azot içinde dondurularak -80° C'de saklandı.

A. GEREÇLER

1. Mini jel elektroforez ve blotting sistemi (BioRa)
2. Güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation)
3. UV tranilluminatör ve görüntüleme sistemi (Vilber Lourmatt & Sony)
4. Mikrosantrifüj (Biofuge/Heraeus Instruments)
5. Masaüstü soğutmalı santrifüj (Megefuge 1.0R/Heraeus)
6. pH metre (HI 9321 micropressor pH meter)
7. Su banyosu (Electromag)
8. Vorteks (Ika MS2 Minishaker)
9. Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı Ika Labortechnik)
10. Hassas terazi (Scaltec)
11. Elisa Reader (Bio-tek Elx-800)
12. Pipet takımı (Eppendorf)

B. DENEY GRUPLARI

- 1. Kontrol grubu** (n=7): 12 saat ara ile % 0.9 NaCl (i.p) 2 kez uygulandı. Son % 0.9 NaCl uygulamasından 30 dakika sonra % 0.9 NaCl (s.c) uygulandı.
- 2. CoPP grubu** (n=4): 12 saat ara ile CoPP (5 mg/kg; ip) 2 kez uygulandı. Son CoPP (5 mg/kg; ip) dozundan 30 dakika sonra % 0.9 NaCl (s.c) uygulandı.
- 3. ZnPP grubu** (n=4): 12 saat ara ile ZnPP (20 mg/kg; ip) 2 kez uygulandı. Son ZnPP (20 mg/kg; ip) dozundan 30 dakika sonra % 0.9 NaCl (s.c.) uygulandı.
- 4. İP grubu** (n=8): 12 saat ara ile % 0.9 NaCl (i.p) 2 kez uygulandı. Son % 0.9 NaCl (i.p) dozundan 30 dakika sonra İP (200 mg/kg; s.c) uygulandı.
- 5. CoPP+İP grubu** (n=7): 12 saat ara ile CoPP (5 mg/kg; i.p) 2 kez uygulandı. Son CoPP (5 mg/kg; i.p) dozundan 30 dakika sonra İP (200 mg/kg, s.c) uygulandı.
- 6. ZnPP+İP grubu** (n=10): 12 saat ara ile ZnPP (20 mg/kg; i.p) 2 kez uygulandı. Son ZnPP (20 mg/kg; i.p) dozundan 30 dakika sonra İP (200 mg/kg, s.c) uygulandı.

C. SERUMDA YAPILAN İNCELEMELER

Serum AMİ göstergesi olarak TnT düzeyleri tayin edildi. Serum TnT ölçümü İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü laboratuvarında immunokemiluminometrik yöntemle yapıldı.

D. KALP DOKUSUNDA YAPILAN İNCELEMELER

Kalp dokusunda HO-1 ekspresyonu doku homojenatlarında Western blot yöntemiyle tayin edildi. Ayrıca protein karbonil (PK), dien konjugat (DK) ve GSH düzeyleri ile SOD, GSH-Px ve GST aktiviteleri ölçüldü. PK ve GSH düzeyleri dokuların 0.15 M KCl'de hazırlanan % 10'luk (w/v) doku homojenatlarında tayin edildi. DK düzeylerinin tayini için % 10'luk doku homojenatlarından hazırlanan lipid ekstraktları kullanıldı. SOD, GSH-Px, GST aktiviteleri % 10'luk doku homojenatlarından kademeli santrifüj yapılarak elde edilen postmitokondri fraksiyonunda belirlendi.

1. Kalp dokusunda Western blot analizi ile HO-1

ekspresyonunun ölçümü:

Doku örnekleri 50 mM Tris-HCl, % 1 Ipegal 630, 150 mM NaCl, % 0.5 sodyum deoksikolat, % 0.1 sodyum dodesil sülfat (SDS), fenil metil sülfonil florür (PMSF), aprotinin ve soya tripsin inhibitörü (SBTI) içeren tamponda el homojenizatörü (Tissue Ruptor-Qiagen Sample and Assay Technologies) ile homojenize edilerek % 10'luk doku homojenatları hazırlandı (19). Homojenatlar +4° C'de 13000xg'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı. Süpernatantlar alınarak bişinkonik asit yöntemi ile protein tayini yapıldı. % 12'lik SDS poliakrilamid jeller hazırlandı ve süpernatantlar sulandırıldıktan sonra Laemmli tamponu ile karıştırılarak kuyucuk başına 50 µg protein olacak şekilde yüklendi (57). Jeller, 100 voltta (30 mA) yaklaşık 1.5 saat elektroforeze tabi tutulduktan sonra, proteinler, polivinylidene fluoride (PVDF) membranlara (Millipore Corporation) transfer edildi (112). PVDF membranlar, % 3 yağsız süt tozu, % 0.05 Tween 20 içeren fosfat tamponu (PBS-T) ile 1 saat bloke edildikten sonra primer antikor (anti-HO-1 rabbit poliklonal, 1:3000; sc-10789) ile tüm gece +4 °C'de inkübe edildi. Membranlar, yıkandıktan sonra sekonder antikor (goat anti rabbit-HRP-conjugated IgG, 1:30000; sc-2004) ile 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar 3 kez 10'ar dakika PBS-T ile yıkandı. Daha sonra ECL kit (sc-2048) ile muamele edilerek, floresans sinyalleri X-ray filme aktarıldı. Protein bantları Vilber-Lourmart jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenerek aynı sisteme ait olan "Bio-1D image analysis software" bilgisayar programı ile kantitatif olarak tayin edildi. İnternal standart olarak aktin kullanıldı. Membranlar daha sonra, aktin bantlarının tayini için

soyularak ikinci bir blot işlemine tabi tutuldu. Bunun için, membranlar, % 2.5 SDS içeren 25 mM glisin tamponu (pH:2.0) ile 2 kez 15'er dakika inkübe edildi. Proteinler aktin antikoru (anti-actin rabbit poliklonal, 1:1000; sc-1616-R) ile işaretlendi. Her bir örneğin aktin miktarı tayin edilerek, HO-1'e ait protein değerleri aktin ile standardize edildi.

2. Protein karbonil (PK) grupları tayini (96) :

2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)'in PK grupları ile reaksiyona girerek oluşturduğu protein hidrazonları spektrofotometrik olarak ölçüldü.

İşlem: 150-200 mg doku bistüri ile ince ince kıyılıp 3 mL homojenizasyon sıvısına alındı ve 15 dakika karanlıkta oda ısısında beklendi. Daha sonra 6000xg'de 10 dakika oda ısısında santrifüj edildi ve süpernatant alındı. Süpernatantın absorbansı ultraviyole spektrofotometrede 280 ve 260 nm'de okundu. Kontrol ve deney için 10-12 mL'lik dibi sivri 2 tüp alındı. Bu tüplere 1'er mL homojenat kondu. Kontrol tübüne 4 mL 2.5 M HCl, deney tübüne ise 4 mL 2.5 M HCl'de eritilmiş 10 mM DNPH eklendi. Tüpler karanlıkta 1 saat bekletildi. Bu süre zarfında tüpler her 15 dakikada bir karıştırıldı. Süre bitiminde tüplere 5 mL % 20'lik triklorasetik asit (TCA) eklendi. 10 dakika buz içinde bekletildikten sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pelletler alındı ve bir cam baget kullanılarak % 10'luk TCA ile yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Daha sonra pelletler 3 kez 4 mL etanol etilasetat karışımı ile yıkandı, santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı. Pelletler üzerine 2 mL 6 M guanidin.HCl eklendi ve çalkalayıcılı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletildi. Kontrol ve deney tüplerinin absorbansları guanidin.HCl'e karşı 355-390 nm arası taranarak okundu. Ayrıca kontrol tüplerinin absorbansı 280 nm'de okunarak protein içeriği saptandı.

Ayırıcılar:

- Homojenizasyon tamponu (50 mM fosfat tamponu, pH:7.4, % 0.1 digitonin, 40 µg/mL fenilmetil sülfonil florid (PMSF), 5 µg/mL aprotonin, 1 mM EDTA)
- 2.5 M HCl
- 10 mM DNPH: 198 mg 2,4-DNPH 100mL 2.5 M HCl'de eritildi.
- % 20 ve % 10'luk triklorasetik asit (TCA)
- Absolü etanol/etil asetat (1:1, v/v)

- 6 M Guanidin-HCl: 57.3 g guanidin.HCl, 100 mL 20 mM potasyum fosfat; pH:7.4 tamponunda çözüldü ve derişik HCl ile pH:2.3'e ayarlandı.

Hesap: PK düzeyleri ekstinsiyon katsayısı $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ doku olarak ifade edildi.

3. Dien konjugat (DK) düzeylerinin ölçümü (14) :

İşlem: Lipit ekstraları için kloroform /metanol (2/1) karışımından 3,75 ml alındı, üzerine 0,25 ml % 10'luk doku homojenatı eklendi. Hazırlanan lipit ekstralarından 1mL alınarak azot gazı altında uçuruldu. Kuru kalıntı 2 mL sikloheksana alındı. Absorbanslar, spektrofotometrede 233 nm'de sikloheksan içeren köre karşı okundu.

Hesap: DK düzeyleri 233 nm'de ekstinsiyon katsayısından ($2.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ doku olarak ifade edildi.

4. Kalp dokusunda antioksidan sistemin incelenmesi

a. Glutasyon düzeylerinin ölçülmesi (12) :

Glutasyon (GSH) düzeyleri, Ellman ayıracı (5,5'-ditiyobis-2-nitro benzoik asit) kullanılarak tayin edildi. Bu ayıracın dokulardaki serbest sülfidril (-SH) grupları tarafından indirgenmesi sonucunda, 1 mol SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5-tiyobenzoik (TNB) asit oluşmaktadır. Sarı renkli bu ürün spektrofotometrik olarak 412 nm'de absorbans vermektedir.

İşlem: 0.15 M KCl'deki %10'luk kalp homojenatlarından 0.5 mL alındı. Hacimler 0.15M KCl ile 2 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 3 mL proteinsizleştirme çözeltisi eklendi ve bu karışım 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. 0.5 mL supernatant alınarak üzerine 2 mL 0.3 M Na_2HPO_4 ve 0.5 mL Ellman ayıracı ilave edildi. Oluşan renk 412 nm'de ayıraç körüne karşı okundu.

Ayıracılar:

- Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 200 mg Na-EDTA ve 30 g NaCl 100 ml distile suda çözüldü.
- 0.3 M Na₂HPO₄: 42.6 g Na₂HPO₄ 1000 ml distile suda çözüldü.
- Ellman Renk Ayıracı: 4 mg 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit 10 ml % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.

Hesap: GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı kullanılarak ($13.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) hesaplandı ve sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ doku olarak verildi.

b. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçülmesi (72):

SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını arttırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksite dönüşür. Hidrojen peroksit ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürün 460 nm'de spektrofotometrik olarak saptanır.

İşlem: Kör, standart ve deney tüplerine sırası ile 2.6 mL 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.8), 0.1 mL o-dianisidin eklendi. Kör tüpüne 0.1 mL distile su, standart tüpüne 0.1 mL standart, deney tüpüne 0.05 mL postmitokondri fraksiyonu kondu ve her tüpe 30 saniye ara ile 0.2 mL riboflavin ilave edildi, karıştırıldı ve 460 nm'deki absorbans değerleri okundu. Tüpler 20W floresans lamba içeren 37° C'ye ayarlanmış özel bir kutuya yerleştirildi ve tam 8 dakika süre ile floresans ışığa maruz bırakıldı. Sürenin bitiminde tüplerin absorbansı tekrar 460 nm'de okundu ve iki absorbans arasındaki fark alındı. Kör ve standart için de aynı işlemler yapıldı.

Ayrıçlar :

- 0.1 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8)
- 0.2 mM riboflavin: 7.3 mg riboflavin 100 mL 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) çözüldü.
- 6 mM o-dianisidin: 19 mg o-dianisidin 10 mL distile suda çözüldü.
- SOD (100 U/mL) standardı: Sigma firmasından sağlanan SOD standardı 100 IU/mL olacak şekilde soğuk distile su ile sulandırıldı. Ortamda 10 ve 5 U SOD standardı oluşturmak için bu ana standarttan 0.1 ve 0.05 mL alındı.

Hesap: Sonuçlar standart kullanılarak hesaplandı ve U/mg protein olarak ifade edildi.

c. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin ölçülmesi (62):

GSH-Px aktivite tayini iki reaksiyon ile gerçekleşir. Birinci reaksiyonda H₂O₂ veya organik hidroperoksitler (ROOH), GSH-Px etkisi ile indirgenirken, ortamdaki GSH, oksitlenmiş GSH'a (GSSG) dönüşür. İkinci reaksiyonda GSSG, GSH-redüktaz (GR) etkisi ile tekrar GSH'a indirgenirken, NADPH ise NADP⁺ye oksitlenmektedir. Bu dönüşüm 340 nm'de absorbansta azalma olarak izlenir, çünkü NADPH 340 nm'de absorban verdiği halde, NADP⁺ bu dalga boyunda absorban vermemektedir.

İşlem: GSH-Px aktivitesi, 1 mL'lik hacimde 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM sodyum azid, 0.2 mM NADPH, 1 mM GSH, 0.5 IU/mL glutasyon redüktaz, 1.2 mM kumen hidroperoksit ve değişik oranlarda sulandırılmış post mitokondri fraksiyonu içerecek şekilde hazırlanmış ortamda tayin edildi. Bu amaçla karaciğer post mitokondri fraksiyonu 50 kez sulandırıldı ve ortama 0.05 mL kondu. Küvetler 37° C'ye ayarlanmış termostatlı spektrofotometreye yerleştirildi ve 1'er dakika arayla spektrofotometrede 340 nm'de absorban değişimi izlendi. Ayrıca post mitokondri fraksiyonu içermeyen ortamda da reaksiyon izlenerek enzimatik olmayan değişim kaydedildi (kör deney).

Hesap: Sonuçlar NADPH'in ekstinksiyon katsayısından ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) yararlanılarak hesaplandı ve nmol NADPH/dk/mg protein olarak belirtildi.

d. Glutatyon-S transferaz aktivitesi tayini (31):

Glutatyon-S transferaz (GST) aktivitesi tayini, GSH ve 1-klor-2,4- dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu sonucu oluşan ürünün, 340 nm'de spektrofotometrik olarak saptanması esasına dayanır.

Ayırıcılar:

- 0,2 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.5)
- 60 mM 1-klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB)
- 60 mM GSH

İşlem: Termostatlı spektrofotometrede 25° C' lik deney ortamına 1,5 ml 0,2 M potasyum fosfat tamponu, 0,9 ml distile su, 0,05 ml 60 mM GSH, 0,5 ml örnek konuldu. Daha sonra 0,05 ml 60 mM CDNB konuldu ve 5 dakika süreyle her dakikadaki absorbans değişimi spektrofotometrik olarak izlendi.

Hesap: Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı ($9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve nmol/dk/ mg protein olarak ifade edildi.

5. Kalp dokusunda protein tayini (101):

Doku homojenatlarında ve postmitokondri fraksiyonlarında protein miktarı bişinkoninik asit metodu ile belirlendi.

İşlem: 200 µL protein renklendirici ayırıcı üzerine 50 kez sulandırılmış kalp postmitokondri fraksiyonlarından 10 µL ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika beklendi. Oda ısısında soğutuldu ve oluşan rengin absorbansı 562 nm'de ELİSA cihazında okundu.

Ayırıcılar:

- Bişinkoninik asit (Bicinchoninic acid solution; Sigma B 9643)
- % 4 CuSO₄
- Protein renklendirme ayırıcı: 10 mL bişinkoninik asit çözeltisi üzerine 0.2 mL % 4 CuSO₄ eklenerek hazırlandı.

E. İSTATİSTİK İNCELEMELER

Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verildi. Tüm parametrelerin istatistik değerlendirmeleri için Kruskal- Wallis, post hoc analizleri için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

IV. BULGULAR

AMİ kanıtı olarak değerlendirilen serum TnT ölçümlerinde,

1. İP uygulanan tüm gruplarda (İP, CoPP+İP, ZnPP+İP) kontrol grubuna göre anlamlı artışlar saptandı (Şekil 4, Tablo 3).
2. CoPP+İP ve ZnPP+İP grupları İP grubu ile karşılaştırıldığında ise sadece CoPP+İP grubunda anlamlı bir azalma tespit edildi (Şekil 4, Tablo 3).

Kalp dokusunda HO-1 ekspresyonu için yapılan western blot analizinde;

1. Gerek sadece CoPP ve ZnPP uygulanan gruplarda, gerekse İP, CoPP+İP ve ZnPP+İP uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı artışlar olduğu saptandı (Şekil 5, Tablo 3)
2. İP grubu ile karşılaştırıldığında ise, CoPP ve CoPP+İP gruplarında anlamlı artışlar olduğu görüldü (Şekil 5, Tablo 3).

Kalp dokusunda oksidatif stres ile ilgili ölçümlerde,

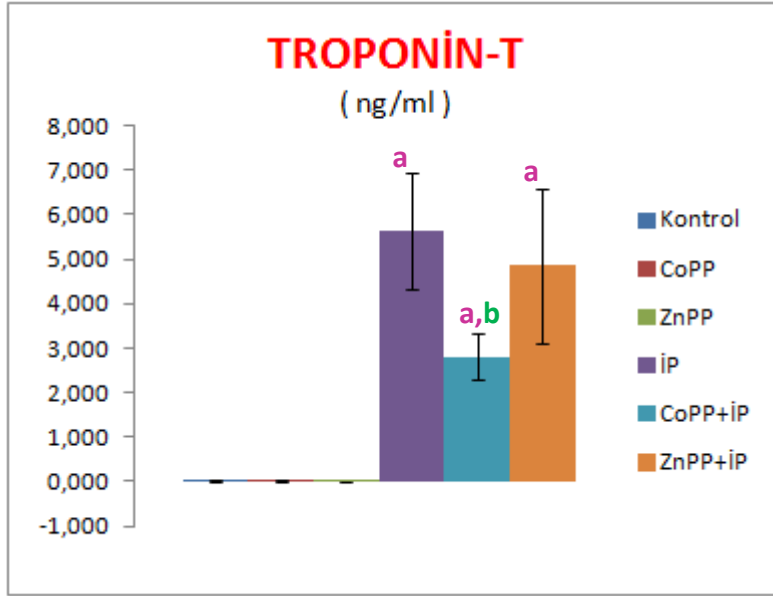
1. İP, CoPP+İP ve ZnPP+İP gruplarında protein karbonil düzeylerinin kontrol gruplarına göre anlamlı olarak arttığı bulundu (Şekil 6, Tablo3). Ancak gruplar arasında anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
2. Dien konjugat düzeylerinde ise herhangi bir değişiklik bulunmadı (Şekil 6, Tablo3).

Kalp dokusunda antioksidan sistem ile ilgili ölçümlerde,

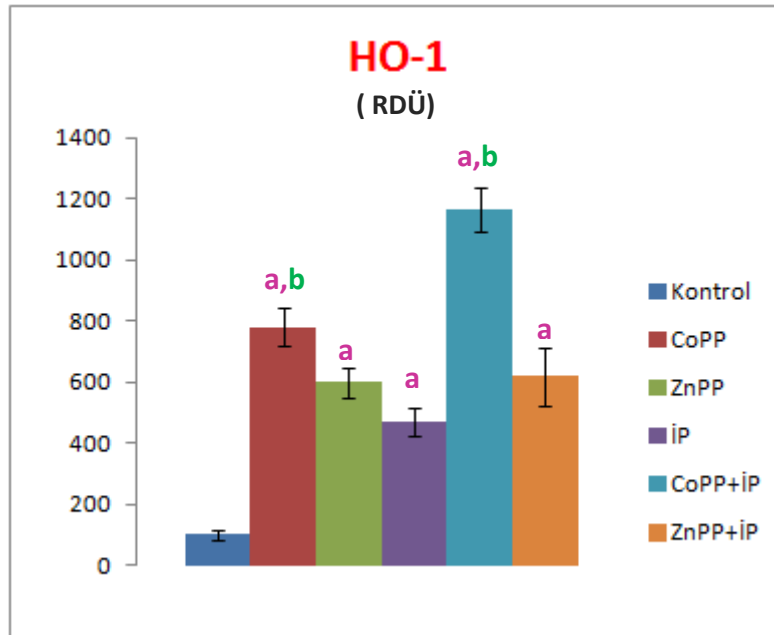
1. GSH düzeyleri ve SOD, GSH-Px, GST enzim aktivitelerinde gerek kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gerekse gruplar arasında anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü (Şekil 7 ve 8, Tablo 3).

Tablo 3: Serumda ve kalp dokusunda ölçülen biyokimyasal parametrelere ait değerler (Ortalama \pm SD); ^a p< 0.05 kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında; ^b p < 0.05 İP grubuna göre karşılaştırıldığında. (* Rölatif dansitometrik ünite)

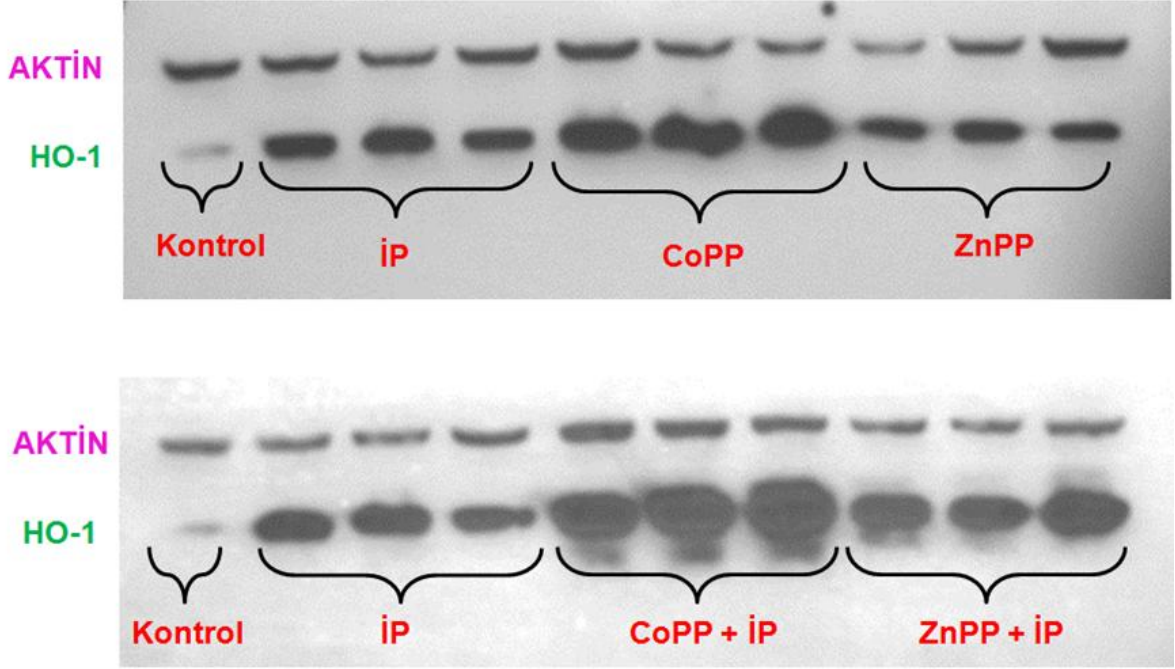
	Kontrol (n:7)	CoPP (n:4)	ZnPP (n:4)	İP (n:8)	CoPP+İP (n:7)	ZnPP+İP (n:10)
HO-1 (RDÜ)*	100.0 ± 16.7	780.5 ± 61.2 ^{a,b}	597.8 ± 49.4 ^a	469.6 ± 43.2 ^a	1165.2 ± 69.9 ^{a,b}	617.4 ± 93.1 ^a
TnT (ng/ml)	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	5.63 ± 1.31 ^a	2.81 ± 0.52 ^{a,b}	4.86 ± 1.73 ^a
PK (μ mol/g doku)	1.65 ± 0.44	1.84 ± 0.14	1.56 ± 0.35	5.37 ± 1.54 ^a	4.90 ± 0.71 ^a	3.96 ± 1.41 ^a
DK (μ mol/g doku)	1.42 ± 0.33	1.29 ± 0.26	1.38 ± 0.06	1.37 ± 0.17	1.24 ± 0.29	1.37 ± 0.24
GSH (μ mol/g doku)	2.36 ± 0.40	2.18 ± 0.07	2.12 ± 0.12	2.55 ± 0.31	2.58 ± 0.56	2.40 ± 0.26
SOD (U/mg protein)	10.7 ± 1.1	10.6 ± 1.4	10.9 ± 1.6	11.9 ± 1.7	11.0 ± 1.3	12.0 ± 2.7
GSH-Px (nmol NADPH/dk/mg protein)	247.0 ± 45.8	272.0 ± 16.8	267.8 ± 58.1	214.0 ± 49.8	216.3 ± 40.1	212.6 ± 45.0
GST (nmol/dk/mg protein)	53.6 ± 6.4	45.2 ± 5.4	54.1 ± 7.3	54.7 ± 7.6	46.4 ± 10.8	58.8 ± 7.9



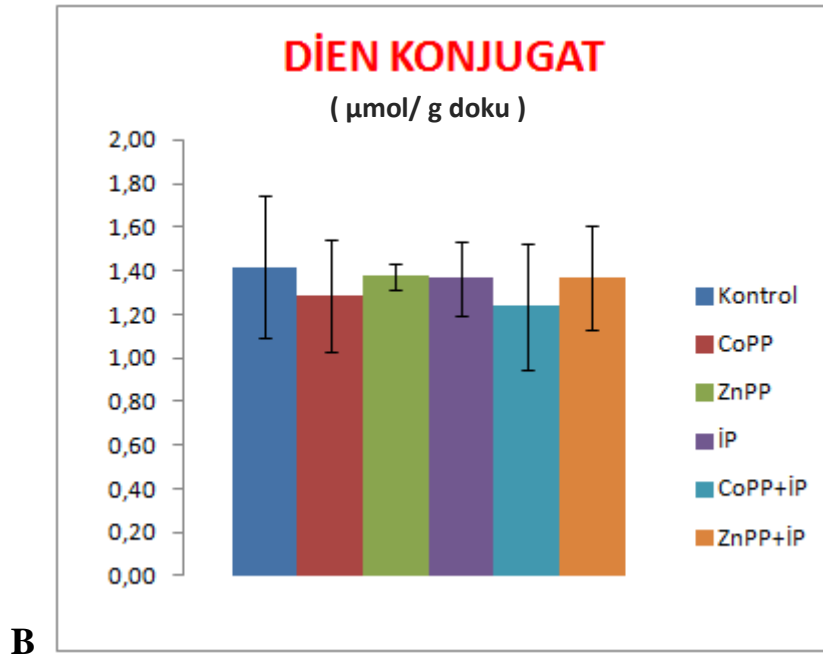
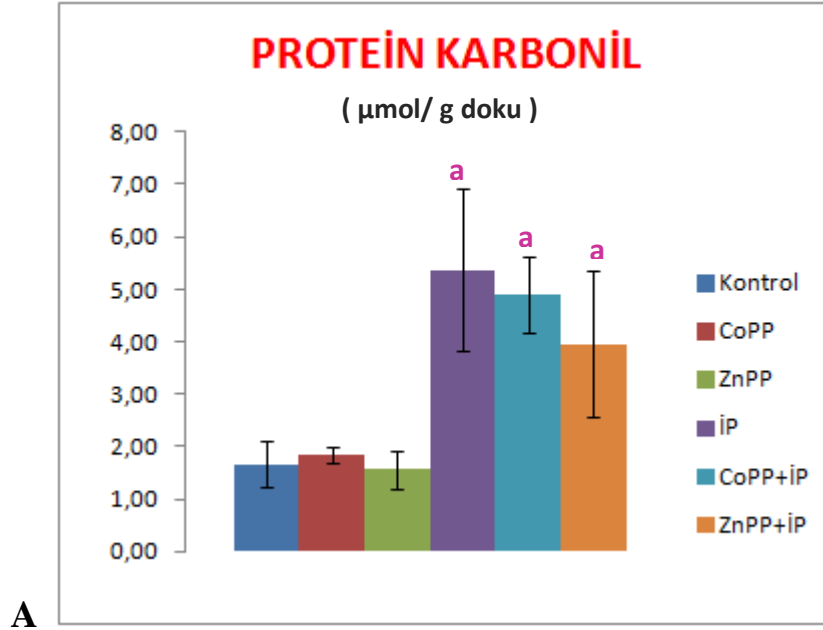
Şekil 4: CoPP ve ZnPP uygulaması ile HO-1 indüksiyonu yapılan sıçanlarda İP uygulamasından 4 saat sonra serum TnT düzeyleri (Ortalama \pm SD); ^a $p < 0.05$ kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında; ^b $p < 0.05$ İP grubuna göre karşılaştırıldığında.



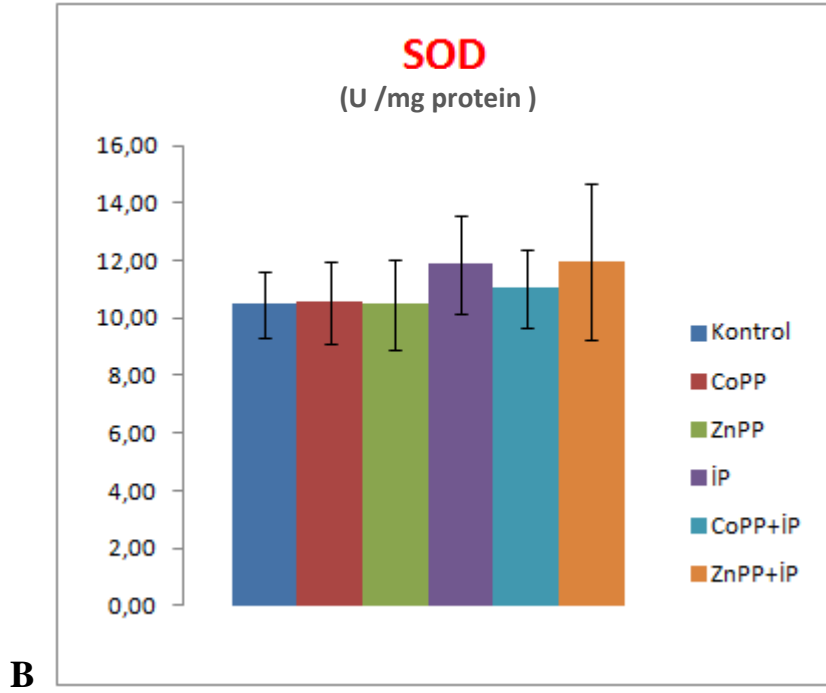
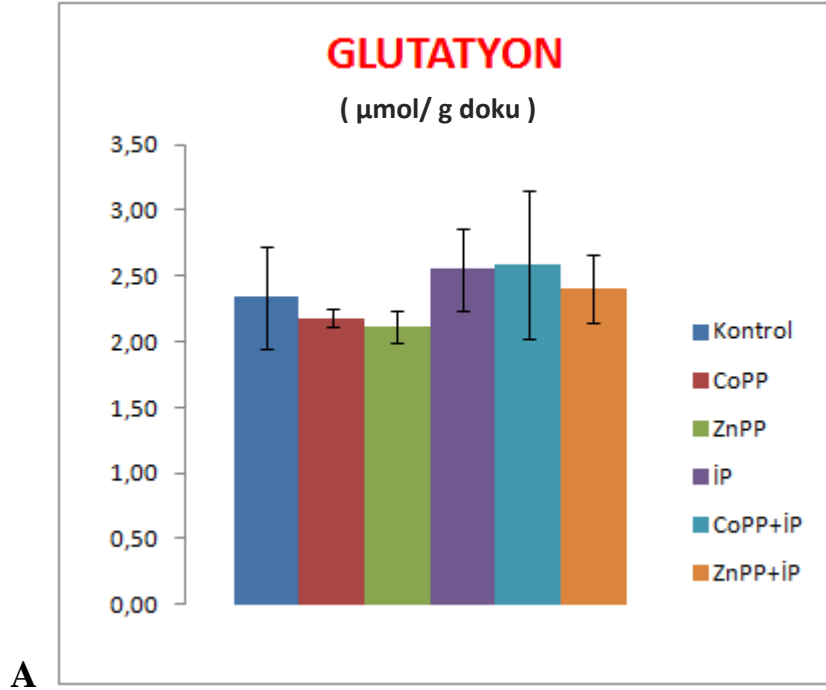
Şekil 5: CoPP ve ZnPP uygulaması ile HO-1 indüksiyonu yapılan sıçanlarda İP uygulamasından 4 saat sonra kalp dokusunda HO-1 düzeyleri (Ortalama \pm SD); ^a $p < 0.05$ kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında; ^b $p < 0.05$ İP grubuna göre karşılaştırıldığında (RDÜ: Rölatif dansitometrik ünite)



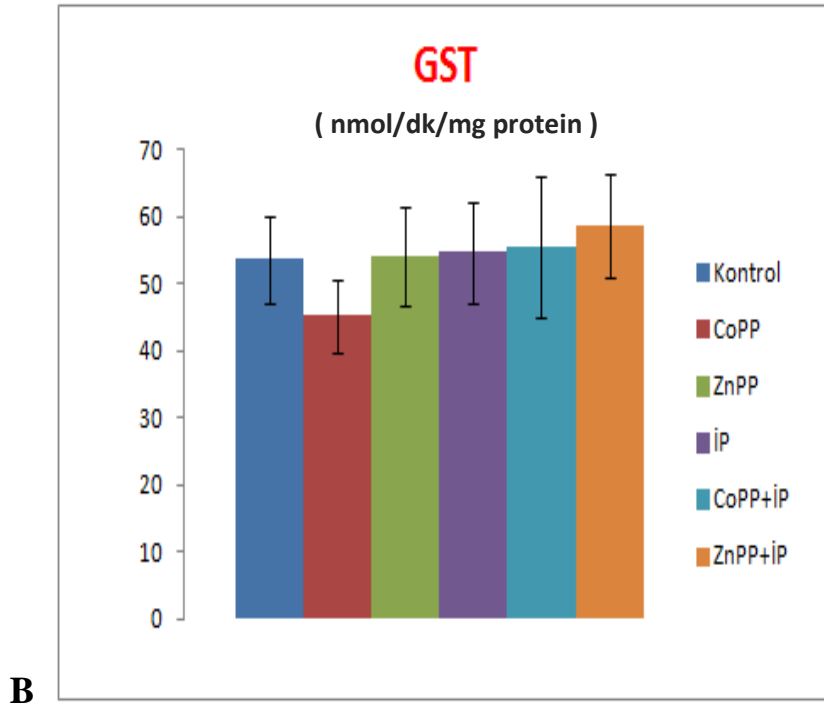
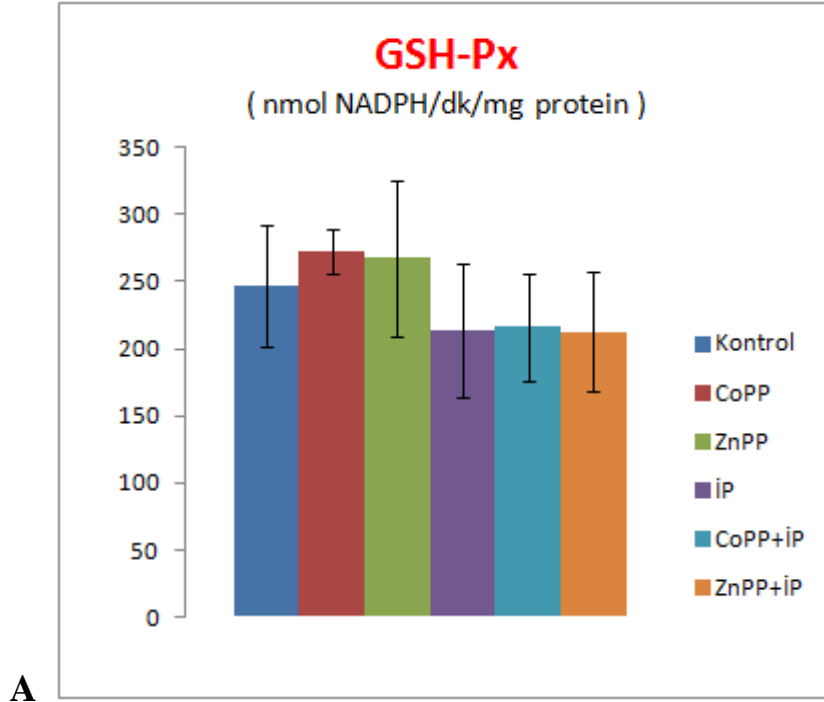
Şekil 5: CoPP ve ZnPP uygulaması ile HO-1 indüksiyonu yapılan sıçanlarda İP uygulamasından 4 saat sonra kalp dokusunda western blot analizi sonucu oluşan HO-1 ve aktin bantlarının görünümü.



Şekil 6: CoPP ve ZnPP uygulaması ile HO-1indüksiyonu yapılan sıçanlarda İP uygulamasından 4 saat sonra kalp dokusunda protein karbonil (A) ve dien konjugat (B) düzeyleri (Ortalama \pm SD); ^a $p < 0.05$ kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında.



Şekil 7: CoPP ve ZnPP uygulaması ile HO-1indüksiyonu yapılan sıçanlarda İP uygulamasından 4 saat sonra kalp dokusunda GSH düzeyleri (A) ile SOD aktivitesi (B) (Ortalama \pm SD).



Şekil 8: CoPP ve ZnPP uygulaması ile HO-1indüksiyonu yapılan sıçanlarda İP uygulamasından 4 saat sonra kalp dokusunda GSH-Px (A) ve GST (B) aktiviteleri (Ortalama \pm SD).

V. TARTIŞMA

Hem oksijenaz-1 (HO-1) indüksiyonunun çeşitli organlarda doku hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu ve bu etkisinin antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özelliklerinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (2,40,84). Hem molekülünün katabolizmasında hız sınırlayıcı basamağı katalizleyen HO-1'in bu özelliklerinin toksik etkili substratı olan hem'in oksidatif parçalanması ile ilgili olduğu bilinmektedir (40). HO-1, hem halkasını biyolojik olarak aktif olan biliverdin, Fe ve karbonmonoksit (CO)'e dönüştürmektedir. Hem molekülünden HO-1'in katalitik etkisiyle Fe'in açığa çıkması ve/veya Fenton reaksiyonlarının başlaması ve bunu takiben reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile hücre hasarı oluşabilmektedir. Ancak Fe'in, ferritine bağlanması ile bu zararlı etki ortadan kalkar. Karbonmonoksit, cGMP'nin "upregulasyonu" üzerinden vazodilatör etki gösterir. Biliverdin ise güçlü bir antioksidan olan bilirubine dönüşür (2,40,71,84).

Yapılan çalışmalar, kimyasal indükleyiciler ile HO-1 indüksiyonunun birçok organ hasarına karşı koruyucu olabileceğini göstermiştir. Örneğin, HO-1'in, *invivo* ekspresyonunun, kardiyak transplantları rejeksiyondan (102), karaciğeri (15) ve intestinal sistemi (121) akut iskemik yetersizlik veya I/R hasarından koruduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, gen transferi ile HO-1'in aşırı ekspresyonunun hiperoksiye bağlı akciğer hastalıklarına (71,81) karşı da koruma oluşturduğu bildirilmiştir. Bunun dışında, HO-1'in, etanol- (63) ve CCl₄- (73) ile indüklenen karaciğer hasarında, pankreatitte (74) ve diabetde (24,55) sitoprotektif etkilerinin varlığı gösterilmiştir.

HO-1'in kardiyak homeostazdaki rolü ilk kez 1994 yılında kalpte HO-1 ekspresyonunun hipertermiye cevap olarak arttığını gösteren bir çalışma ile ortaya çıkmıştır (23). Domuz kalbinde yapılan bir çalışmada, iskemi/reperfüzyon (I/R) sonrası HO-1 ekspresyonunun arttığı gösterilmiş, HO-1'in temel görevinin patofizyolojik strese karşı savunma olduğu düşünülmüştür (98). HO-1 gen eksikliği (HO-1^{-/-}) olan farelerde, hipoksik koşullarda ciddi sağ ventrikül dilatasyonunun geliştiği ve infarkt alanının arttığı gösterilmiştir (123). Buna karşılık, kardiyak-spesifik HO-1 transgenik farelerde, HO-1'in aşırı ekspresyonunun I/R hasarını takiben infarkt boyutunu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (124). Kardiyak-spesifik HO-1 transgenik fare kullanan kalp yetmezliği modelinde de, HO-1'in aşırı ekspresyonunun infarktüs sonrası hayatta kalma şansını arttırdığı ve infarktüs sonrası sol ventrikül patolojik "remodelling"ini azalttığı saptanmıştır (119). Ayrıca, bu çalışmada, HO-1'in yeniden damarlanmayı arttırarak apoptozisi de azalttığı

bulunmuştur. Lakkisto ve arkadaşları, koroner ligasyon ile AMİ oluşturulan sıçanlarda, HO-1'in kardiyomiyositler üzerindeki koruyucu etkilerinin hipoksiyle indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1 α), stromal hücre kaynaklı faktör-1alfa (SDF-1 α) ve vasküler endotelial büyüme faktörü beta (VEGF- β) ekspresyonlarının düzenlenmesi üzerinden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Aynı araştırmacılar, HO-1'in miyositlerde antiapoptotik ve antiproliferatif etkilerinin de olduğunu göstermişler ve HO-1 indüksiyonunun kardiyomiyositlerde anjiogenezi attırarak hücrelerin yaşam süresini arttırabileceğini öne sürmüşlerdir (58,59,60).

İnsanlarda yapılan bir çalışmada ise, 40 AMİ hastasının tıkanan damar sayıları ile, serum HO-1 düzeyleri arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, ciddi koroner arter hastalığı olan kişilerde serum HO-1 düzeylerinin düşük olduğu bildirilmiştir (76). Ayrıca, yakın zamanda yapılmış olan bir başka çalışmada, İP ile AMİ yapılan sıçanlarda, luteolinin miyokard hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve bu olayda HO-1 indüksiyonunun bir katkısı olabileceği bildirilmiştir (106).

Biz bu çalışmamızda, farklı bir yaklaşımla, HO-1'in AMİ'deki koruyucu etkilerini, ekzojen HO-1 mRNA indükleyicileri (CoPP ve ZnPP) kullanarak, deneysel AMİ modeli üzerinde *invivo* koşullarda araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, sıçanlarda deneysel AMİ oluşturmak için yaygın olarak kullanılan, sentetik bir katekolamin ve beta adrenerjik agonist olan İP kullandık. İP'nin toksik dozlarının kalp hücrelerinde yaygın nekroza neden olduğu daha önce birçok çalışma ile gösterilmiştir (86,90,127). Bu çalışmalarda bazı araştırmacılar 110 mg/kg İP dozunu (6,25), bazıları 150 mg/kg dozunu (88,125), diğerleri de 200 mg/kg dozunu (1,118) kullanmışlar ve farklı saatlerde yaptıkları incelemelerde AMİ oluşumunu serum troponin, CK, CK-MB, AST ve LDH enzimlerinin artışıyla göstermişlerdir. Biz çalışmamızda, sıçanlara 200 mg /kg İP uyguladıktan 4 saat sonra TnT düzeylerindeki anlamlı artışlar ile AMİ oluştuğunu gösterdik. Bunun yanı sıra, İP uygulamasından 12 saat önce CoPP ve ZnPP verilen grupların (CoPP+İP ve ZnPP+İP) serum TnT düzeylerinde de kontrol gruplarına (kontrol, CoPP, ZnPP) göre saptadığımız artışlar ile bu gruplarda da kardiyomiyosit nekrozu olduğunu kanıtladık. Buna ek olarak, CoPP+İP grubunda İP grubuna göre anlamlı bir azalma saptadık. Bu azalmadan, koruyucu etkileri olduğu bilinen HO-1'in indükleyicisi olan CoPP'in sorumlu olabileceğini düşündük. Bunun yanı sıra, ZnPP+İP grubuna ait TnT değerlerinde İP grubuna göre bir değişiklik saptanmadı.

Kalp dokusunda, HO-1 protein düzeyleri incelendiğinde ise, HO-1 ekspresyonunun, gerek sadece metalloporfirin verilen gruplarda (CoPP, ZnPP) gerekse AMİ oluşturulan

gruplarda (İP, ZnPP+İP, CoPP+ İP) kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu bulundu.

Bilindiği gibi, metalloporfirinler HO-1 indüksiyonu veya inhibisyonu için sıklıkla kullanılan bileşiklerdir. CoPP, HO-1 gen indüksiyonu için kullanılırken, ZnPP genellikle HO-1 enzim inhibitörü olarak kullanılmaktadır (42,114,122) Bununla birlikte, ZnPP'nin HO-1'in gen düzeyinde indüksiyonuna da neden olduğu bildirilmiştir (68). Biz çalışmamızda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ZnPP verilen gruplarda da (ZnPP, ZnPP+İP) CoPP verilen gruplara (CoPP, CoPP+İP) oranla, daha az olmak üzere HO-1 ekspresyonunun arttığını bulduk. Sadece CoPP verilen ve CoPP ile birlikte İP verilen (CoPP+İP) gruplara ait HO-1 düzeylerindeki artışlar İP grubu ile karşılaştırıldığında, HO-1 düzeylerinin yine anlamlı olarak artmış olduğu saptandı. CoPP ve CoPP+İP gruplarında görülen bu artışlar, CoPP'in HO-1'i önemli oranda indüklediğinin bir göstergesidir. HO-1 ekspresyonunun anlamlı arttığı CoPP+İP grubunda, eş zamanlı olarak TnT değerlerinde görülen anlamlı azalma ise, HO-1 indüksiyonunun AMİ sonrası miyosit kaybı üzerine kardiyoprotektif etkilerinin olduğunu göstermektedir. Bunun yanısıra, İP grubuna göre HO-1 ekspresyonunun değişmediği ZnPP+İP grubunda, eş zamanlı troponin ölçümlerinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Bu sonuç bize, ZnPP'nin HO-1 enziminde indüksiyon yaptığı halde, miyokard üzerine AMİ sonrası koruyucu etkisinin olmadığını gösterdi. Kontrol grubuna göre, ZnPP+İP grubunda HO-1 düzeylerinde görülen bu artışlar, ZnPP'nin HO-1 üzerine etkisinin gen düzeyinde olabileceğini, enzim aktivitesi üzerine ise inhibitör etkisinin olabileceğini düşündürdü.

Diğer yandan, İP uygulamasından sonra serum (6,90,127) ve kalp dokusunda (6,90,127) lipit peroksit düzeylerinin arttığı ve İP ile indüklenen AMİ etiyolojisinde lipit peroksidasyonunun önemli bir rolü olduğu ileri sürülmektedir. Bazı çalışmalarda gerek serumda (90), gerekse kalp dokusunda (6,90) antioksidan enzim aktivitelerinde ve antioksidan bileşiklerin düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir. Biz bu çalışmamızda, kalp dokusunda lipit peroksidasyonunun belirlenmesinde kullanılan parametrelerden DK düzeylerinde ve antioksidan sistem parametrelerinde herhangi bir değişiklik saptamadık. Bununla birlikte, PK düzeylerinin ise, AMİ oluşturulan gruplarda (İP, ZnPP+İP, CoPP+ İP) tüm kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu bulundu. PK düzeylerinde görülen bu artışın yanı sıra, aynı zamanda stres ile indüklenen bir protein olan HO-1 ekspresyonunda görülen artışların, İP ile AMİ oluşturulan kalp dokusundaki oksidatif stresi yansıttığı ileri sürülebilir. Gerçekten de, HO-1 mRNA ekspresyonundaki artışların hücresel oksidatif stresin bir göstergesi olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (61). Ancak, AMİ oluşturulan grupların PK

düzeylerinde gruplararası anlamlı bir farklılık bulunmaması, HO-1'in koruyucu etkilerini antioksidan etkisi dışında başka mekanizmalar üzerinden gösterebileceğini düşündürmektedir.

TnT ile HO-1 protein düzeyleri arasındaki bu ilişki bize HO-1 indükleyicilerinin AMİ tedavisinde umut vaad eden bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Gerçekten, son zamanlarda farmakolojik modülasyon veya gen transferi yoluyla HO-1 aşırı ekspresyonunun, gelecekte, terapötik planlama ve yeni tedavi stratejilerinin oluşturulmasında önemli olabileceği ileri sürülmektedir (66,78,79,96). Örneğin, bu konuyla ilgili çalışmalardan birinde, mezenkimal kök hücrelerinin hipoksi ile regüle edilen HO-1 vektör modifikasyonunun, implantasyon sonrası hücreleri apoptozisten koruyarak, nakledilen mezenkimal kök hücrelerinin yaşam süresini arttırdığı, iskemik kalbin daha az proinflamatuvar sitokin ürettiği, daha az inflamatuvar hücre infiltrasyonuna sahip olduğu ve en önemlisi daha iyi kardiyak fonksiyona sahip olduğu bildirilmiştir (108).

Özetle, HO-1'in aşırı ekspresyonu ile birlikte, kök hücre terapisinin kombinasyonu, kalp hastalıklarının tedavisinde yeni stratejiler sağlayabilir. Bu çalışma, bu yönde yapılacak araştırmalara destek niteliğinde olabilir.

VI. KAYNAKLAR

1. Abhilash PA, Nisha P, Prathapan A, Nampoothiri SV, Lijo Cherian O, Sunitha TK ve ark. Cardioprotective effects of aqueous extract of *Oxalis corniculata* in experimental myocardial infarction. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63: 535-40.
2. Abraham NG, Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1-25.
3. Abraham NG, Nelson JC, Ahmed T, Konwalinka G, Levere RD. Erythropoietin controls heme metabolic enzymes in normal human bone marrow culture. *Exp Hematol* 1989; 17: 908-913.
4. Abraham NG. Molecular regulation--biological role of heme in hematopoiesis. *Blood Rev* 1991; 5: 19-28.
5. Alamdari DH, Ghayour-Mobarhan M, Tavallaie S, Parizadeh MR, Moohebbati M, Ghafoori F ve ark. Prooxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008; 41: 375-380.
6. Anandan R, Mathew S, Sankar TV, Nair PGV. Protective effect of n-3 polyunsaturated fatty acids concentrate on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007; 76: 153 -158.
7. Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: A report of the American Collage of Cardiology American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: E1-E211.
8. Apple FS, Jaffe AS. Cardiovascular Disease, In: Tietz Fundamental of Clinical Chemistry, Eds: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri. 2008; 614 -630.
9. Balla J, Jacob HS, Balla G Nath K, Vercellotti GM. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction by heme proteins: a possible mechanism limiting shock damage. *Trans Assoc Am Physicians* 1992; 105: 1- 6.
10. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Jeney V, Yachie A, Varga Z ve ark. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 2119 –2137.
11. Benjamin IJ, Schneider MD. Learning from failure: congestive heart failure in the postgenomic age. *J Clin Invest* 2005; 115: 495-499.

12. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882–888.
13. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM ve ark. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192: 1015-1026.
14. Buege JA, Aust JD. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 1978; 52: 302-310.
15. Chen YC, Gines P, Yang JH, Summer SN, Falk S, Russell NS ve ark. Increased vascular heme oxygenase-1 expression contributes to arterial vasodilation in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 2004; 39: 1075–1087.
16. Choi BM, Pae HO, Jeong YR, Oh GS, Jun CD, Kim BR ve ark. Overexpression of heme oxygenase (HO)-1 renders Jurkat T cells resistant to fas-mediated apoptosis: involvement of iron released by HO-1. *Free Radic Bio Med* 2004; 36: 858-871.
17. Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1 derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol* 2000; 278: 643–651.
18. Converso DP, Taille C, Carreras MC, Jaitovich A, Poderoso JJ, Boczkowski J. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB J* 2006; 20: 1236-1238.
19. Dambach DM, Durham SK, Laskin JD, Laskin DL. Distinct roles of NF-kappaB p50 in the regulation of acetaminophen-induced inflammatory mediator production and hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 211: 157-165.
20. Drummond GS, Kappas A. Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6466-6470.
21. Eisenstein RS, Munro HN. Translational regulation of ferritin synthesis by iron. *Enzyme* 1990; 44: 42-58.
22. Eisenstein RS. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 627-662.
23. Ewing JF, Raju VS, Maines MD. Induction of heart heme oxygenase-1 (HSP32) by hyperthermia: possible role in stress-mediated elevation of cyclic 3':5'-guanosine monophosphate. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271: 408- 414.
24. Farhangkhoe H, Khan ZA, Mukherjee S, Cukiernik M, Barbin YP, Karmazyn M, et al. Heme oxygenase in diabetes-induced oxidative stress in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 1439-1448.

25. Farvin KHS, Anandan R, Kumar SHS, Shiny KS, Sankar TV, Thankappan TK. Effect of squalene on tissue defense system in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Pharmacol Res* 2004; 50: 231- 236.
26. Fibrinolytic Therapy Trialists'(FTT) Collaborative Group. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1994; 343: 311–312.
27. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115: 500-508.
28. Gomer CJ, Luna M, Ferrario A, Rucker N. Increased transcription and translation of heme oxygenase in Chinese hamster fibroblasts following photodynamic stress or Photofrin II incubation. *Photochem Photobiol* 1991; 53: 275-279
29. Gopinathan V, Miller NJ, Milner AD, Rice-Evans CA. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett* 1994; 349: 197- 200.
30. Gorman D, Drewry A, Huang YL, Sames C. The clinical toxicology of carbon monoxide. *Toxicology* 2003; 187: 25-38.
31. Habig HW, Tacoby WB. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J Biol Chem* 1974; 3: 7130-7139.
32. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, 1999.
33. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999; 31: 261-272.
34. Hansen TW, Mathiesen SB, Walaas SI. Bilirubin has widespread inhibitory effects on protein phosphorylation. *Pediatr Res* 1996; 39: 1072–1077.
35. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 1999; 85: 663-671.
36. Heirwegh KP, Fevery J, Blanckaert N. Chromatographic analysis and structure determination of biliverdins and bilirubins. *J Chromatogr* 1989; 496: 1-26.
37. Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, James BC, Vincent GM, Williams RR. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 250 –5.
38. Hussain AS, Marks GS, Brien JF, Nakatsu K. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ) inhibits relaxation of rabbit aortic rings induced by carbonmonoxide, nitric oxide, and glyceryl trinitrate. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 1034-1037.

39. Idriss NK, Blann AD, Lip GY. Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 971-978.
40. Immenschuh S, Schröder H. Heme oxygenase-1 and cardiovascular disease. *Histol Histopathol* 2006; 21: 679-685.
41. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17187 cases of suspected acute myocardial infarctions. ISIS-2 *Lancet* 1988; 2: 349-360.
42. Iwasashi H, Suzuki M, Unno M, Utiyama T, Oikawa M, Kondo N ve ark. Inhibition of heme oxygenase ameliorates sepsis-induced liver dysfunction in rats. *Surg Today* 2003; 33: 30-8.
43. Jaggar JH, Leffler CW, Cheranov SY, Tcheranova D, E S, Cheng X. Carbonmonoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca^{+2} sparks to Ca^{+2} -activated K^{+} channels. *Circ Res* 2002; 91: 610-617.
44. Jung NH, Kim HP, Kim BR, Cha SH, Kim GA, Ha H ve ark. Evidence for heme oxygenase-1 association with caveolin-1 and -2 in mouse mesangial cells. *IUBMB Life* 2003; 55: 525-532.
45. Kapitulnik J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 773-779.
46. Kappas A. A method for interdicting the development of severe jaundice in newborns by inhibiting the production of bilirubin. *Pediatrics* 2004; 113: 119-123.
47. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Slezak J, Singal P. Free radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993; 30: 55-67.
48. Kaur H, Hughes MN, Green CJ, Naughton P, Foresti R, Motterlini R. Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Lett* 2003; 543: 113-119.
49. Kawamura K, Ishikawa K, Wada Y, Kimura S, Matsumoto H, Kohro T ve ark. Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:155– 60.
50. Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji*, Cilt 2, Hacettepe-Tas, 2005; s 972 -994.
51. Kehrer JP, Smith CV. Free Radicals in Biology: Sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases. In Frei B (ed). *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. Academic Press, San Diego, s.25-62,1994.
52. Keshavan P, Deem TL, Schwemberger SJ, Babcock GF, Cook-Mills JM, Zucker SD. Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration. *J Immunol* 2005; 174: 3709-3718.

53. Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons. 6th Edition. McGraw –Hill Med Publ Div, New York, 2001.
54. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: Basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R18-R36.
55. Kruger AL, Peterson SJ, Schwartzman ML, Fusco H, McClung JA, Weiss M ve ark. Up regulation of heme oxygenase provides vascular protection in an animal model of diabetes through its antioxidant and antiapoptotic effects. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 1144-1152.
56. Kwak JY, Takeshige K, Cheung BS, Minakami S. Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1076: 369-373.
57. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
58. Lakkisto P, Kytö V, Forsten H, Siren JM, Segersvärd H, Voipio-Pulkki LM ve ark. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide promote neovascularization after myocardial infarction by modulating the expression of HIF-1alpha, SDF-1alpha and VEGF-B. *Eur J Pharmacol* 2010; 635: 156-164.
59. Lakkisto P, Siren JM, Kytö V, Forsten H, Laine M, Pulkki K ve ark. Heme oxygenase-1 induction protects the heart and modulates cellular and extracellular remodelling after myocardial infarction in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011; 236: 1437-1448.
60. Lakkisto P, Palojoki E, Bäcklund T, Saraste A, Tikkanen I, Voipio-Pulkki LM ve ark. Expression of heme oxygenase-1 in response to myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 1357-1365.
61. Lavrovsky Y, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Age-dependent increase of heme oxygenase-1 gene expression in the liver mediated by NFkappaB. *Mech Ageing Dev* 2000; 114: 49-60.
62. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952–958.
63. Liu LG, Yan H, Zhang W, Yao P, Zhang XP, Sun XF ve ark. Induction of heme oxygenase-1 in human hepatocytes to protect them from ethanol-induced cytotoxicity. *Biomed Environ Sci* 2004; 17: 315-326.

64. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986; 261: 411- 419.
65. Mancuso C, Bonsignore A, Di Stasio E, Mordente A, Motterlini R. Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 2355-2363.
66. Mathur A and Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004; 364: 183-192.
67. McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997; 247: 725-732.
68. Mitani K, Fujita H, Fukuda Y, Kappas A, Sassa S. The role of inorganic metals and metalloporphyrins in the induction of haem oxygenase and heat-shock protein 70 in human hepatoma cells. *Biochem J* 1993; 290: 819-825.
69. Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell derived carbon monoxide. *J Clin Invest* 1995; 96: 2676-2682.
70. Morita T. Hemeoxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1786– 1795.
71. Morse D, Choi AM. Heme oxygenase-1: from bench to bedside. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 660-70.
72. Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 82: 512-520.
73. Nakahira K, Takahashi T, Shimizu H, Maeshima K, Uehara K, Fujii H ve ark. Protective role of heme oxygenase-1 induction in carbontetrachloride induced hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1091-105.
74. Nakamichi I, Habtezion A, Zhong B, Contag CH, Butcher EC, Omary MB. Hemin activated macrophages home to the pancreas and protect from acute pancreatitis via heme oxygenase-1 induction. *J Clin Invest* 2005; 115: 3007-3014.
75. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15-32.
76. Novo G, Cappello F, Rizzo M, Fazio G, Zambuto S, Tortorici E ve ark. Hsp60 and heme oxygenase-1 (Hsp32) in acute myocardial infarction. *Transl Res* 2011; 157: 285-292.

77. Ohta H, Azuma J, Awata N, Hamaguchi T, Tanaka Y, Sawamura A ve ark. Mechanism of the protective action of taurine against isoprenaline induced myocardial damage. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 407- 413.
78. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B ve ark. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
79. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F ve ark. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-10349.
80. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M ve ark. Carbon monoxide has anti inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000; 6: 422-428.
81. Otterbein LE, Kolls JK, Mantell LL, Cook JL, Alam J, Choi AM. Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia induced lung injury. *J Clin Invest* 1999; 103: 1047–1054.
82. Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, Liu F, Song R, Usheva A ve ark. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med* 2003; 9: 183-190.
83. Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabo C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 302- 310.
84. Peterson SJ, Frishman WH, Abraham NG. Targeting heme oxygenase: therapeutic implications for diseases of the cardiovascular system. *Cardiol Rev* 2009; 17: 99-111.
85. Pimstone NR, Tenhunen R, Seitz PT, Marver HS, Schmid R. The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages. *J Exp Med* 1971; 133: 1264-1281.
86. Pinelli A, Trivulzio S, Tomasoni L, Bertolini B, Brenna S, Bonacina E ve ark. Myocardial infarction non-invasively induced in rabbits by administering isoproterenol and vasopressin: protective effects exerted by verapamil. *Fund Clin Pharmacol* 2008; 18: 657-667.
87. Ponka P. Cell biology of heme. *Am J Med Sci* 1999; 318: 241–256.
88. Prince PSM, Karthick M. Preventive effect of rutin on lipid, lipoproteins and ATPases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2007; 22: 1- 6.

89. Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Dérillard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1247-1255.
90. Rajadurai M, Prince PSM. Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: Biochemical and histopathological evidences. *Toxicology* 2006; 228: 259-268.
91. Rauch U, Osende JJ, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001; 134: 224–38.
92. Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1331: 1-40.
93. Richardson DR, Baker E. Intermediate steps in cellular iron uptake from transferrin. Detection of a cytoplasmic pool of iron, free of transferrin. *J Biol Chem* 1992; 267: 21384-21389.
94. Rotenberg MO, Maines MD. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding rat heme oxygenase- 2. *J Biol Chem* 1990; 265, 7501-7506.
95. Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 289-309.
96. Saji K, Fukumoto Y, Suzuki J, Fukui S, Nawata J, Shimokawa H. Colchicine, a microtubule depolymerizing agent, inhibits myocardial apoptosis in rats. *Tohoku J Exp Med* 2007; 213: 139 -148.
97. Selmeçi L, Antal M, Horkay F, Merkely B, Szokodi I, Bíró L. Enhanced accumulation of pericardial fluid ferritin in patients with coronary artery disease. *Cor Artery Dis* 2000; 11:53– 6.
98. Sharma HS, Maulik N, Gho BC, Das DK, Verdouw PD. Coordinated expression of heme oxygenase-1 and ubiquitin in the porcine heart subjected to ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1996; 157: 111-116.
99. Shibahara S, Müller R, Taguchi H, Yoshida T. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7865-7869.
100. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001; 8: 851-862.
101. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD ve ark. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.

102. Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K ve ark. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 1998; 4: 91-98.
103. Southorn PA. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.
104. Stocker R, Ames BN. Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 8130-8134.
105. Stocker R, Peterhans E. Synergistic interaction between vitamin E and the bile pigments bilirubin and biliverdin. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1002: 238-244.
106. Sun GB, Sun X, Wang M, Ye JX, Si JY, Xu HB ve ark. Oxidative stress suppression by luteolin-induced heme oxygenase-1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 265: 229-240.
107. Taillé C, El-Benna J, Lanone S, Boczkowski J, Motterlini R. Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *J Biol Chem* 2005; 280: 25350-25360.
108. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase 1 vector. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1339-1350.
109. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med* 1970; 75: 410-421.
110. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61: 748-755.
111. Thygesen K, Alpert JS, White HD on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Euro Heart J* 2007; 28: 2525-2538.
112. Towbin H, Stashelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354.
113. Turfan M, Duran M, Poyraz F, Yayla C, Akboga MK, Sahinarslan A ve ark. Inverse relationship between serum total bilirubin levels and severity of disease in patients with stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2013; 24: 29-32.
114. Tüzüner E, Liu L, Shimada M, Yilmaz E, Glanemann M, Settmacher U ve ark. Heme oxygenase-1 protects human hepatocytes in vitro against warm and cold hypoxia. *J Hepatol* 2004; 41: 764-72.

115. Uysal H, Özcan Ş, Enç N. Adaptation of Myocardial Infarction Dimensional Assessment Scale to Turkish: a validity and reliability study. *Arch Turk Soc Cardiol* 2009; 37: 543-550.
116. Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 336-341.
117. Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM. Heme oxygenase-1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2607-2610.
118. Vivek B, Wilson E, Nithya Devi SV, Velmurugan C, Kannan M. Cardioprotective activity of shilajit in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: A biochemical and histopathological evaluation. *Int J Res Phytochem Pharmacol* 2011; 1: 28-32.
119. Wang G, Hamid T, Keith RJ, Zhou G, Partridge CR, Xiang X ve ark. Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. *Circulation* 2010; 121: 1912-1925.
120. Wang R, Wang Z, Wu L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 927-934.
121. Wasserberg N, Pileggi A, Salgar SK, Ruiz P, Ricordi C, Inverardi L ve ark. Heme oxygenase-1 upregulation protects against intestinal ischemia/reperfusion injury: a laboratory based study. *Int J Surg* 2007; 5: 216-224.
122. Wen T, Wu ZM, Liu Y, Tan YF, Ren F, Wu H. Upregulation of heme oxygenase-1 with hemin prevents D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute hepatic injury in rats. *Toxicology* 2007; 237: 184-193.
123. Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L ve ark. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest* 1999; 103: R23-R29.
124. Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M ve ark. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res* 2001; 89: 168-173.
125. Yogeeta SK, Hanumantra RBR, Gnanapragasam A, Senthilkumar S, Subhashini R, Devaki T. Attenuation of abnormalities in the lipid metabolism during experimental myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98: 467-472.
126. Zhou R, Xu Q, Zheng P, Yan L, Zheng J, Dai G. Cardioprotective effect of fluvastatin on isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. *Eur J Pharmacol* 2008; 586: 244-250.

VII. ÖZGEÇMİŞ

Dr. Leyla Bulut

Merkezefendi mah.Mevlana cd. Aktaş sitesi. No 108/28 Cevizlibağ/ İstanbul

Cep telefonu: 05534227890

Ev telefonu: 02124154937

e-posta: leylabulut_83@hotmail.com

Doğum tarihi: 1983

Doğum yeri: Batman

AKADEMİK DENEYİM

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı,

Tıpta Uzmanlık Öğrencisi (1 Aralık 2008- Görevine halen devam etmektedir).

EĞİTİM

Lisans: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Lise öğrenimi: Diyarbakır Cumhuriyet Fen Lisesi.

Orta öğrenim: Batman Anadolu Lisesi.

İlkokul: Batman Fatih ilköğretim okulu.