



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANDA DENEYSEL UZUN DÖNEM MİYOKARDİYAL
İSKEMİ – REPERFÜZYON MODELİNDE
CDP – KOLİNİN ETKİLERİ

Dr. N. Cenk COŞKUN

UZMANLIK TEZİ

BURSA - 2010



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANDA DENEYSEL UZUN DÖNEM MİYOKARDİYAL
İSKEMİ – REPERFÜZYON MODELİNDE
CDP – KOLİNİN ETKİLERİ

Dr. N. Cenk COŞKUN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: Prof. Dr. Vahide SAVCI

BURSA - 2010

İÇİNDEKİLER

<u>İçindekiler</u>	<u>i</u>
<u>Türkçe Özet</u>	<u>ii</u>
<u>İngilizce Özet</u>	<u>iii</u>
<u>Giriş ve Amaç</u>	<u>1</u>
<u>Genel Bilgiler</u>	<u>3</u>
<u>Gereç ve Yöntem</u>	<u>13</u>
<u>Bulgular</u>	<u>17</u>
<u>Tartışma ve Sonuç</u>	<u>26</u>
<u>Kaynaklar</u>	<u>31</u>
<u>Özgeçmiş</u>	<u>42</u>
<u>Tesekkür</u>	<u>43</u>

ÖZET

Akut miyokardiyal infarktüs (AMİ) dünyada en fazla görülen ölüm nedenidir. Sitidin-5'-difosfatkolin (CDP-kolin) ise yıllardır Japonya ve pek çok Avrupa ülkesinde özellikle kafa travması, stroke tedavisinde serebral hasarı önleyici etkisi nedeniyle kullanılan ve vücutta endojen olarak sentezlenen bir mononükleotiddir. Daha önceki çalışmalarda CDP-kolin'in kısa dönem iskemi-reperfüzyon hasarında da koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmamızda, CDP-kolin'in sıçanlarda uzun dönem miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı gelişimine karşı koruyucu etkileri olup olmadığı araştırıldı.

Anestezi altındaki sıçanların sol ana koroner arterinin 30 dakika süre boyunca oklüze ve 180 dakika boyunca reperfüze edilmesi sağlanarak uzun dönem iskemi-reperfüzyon oluşturuldu. İskemi periyodunun 15. dakikasında tedaviler (tuzlu su 1 ml/kg, CDP-kolin 100, 250, 500 mg/kg, intravenöz) uygulandı. Reperfüzyon sonunda sıçanların kalpleri çıkartılıp histolojik olarak boyandıktan sonra risk alanının infarkt alanına oranı belirlendi. Deney sonunda alınan kanlarda ADMA (asimetrik dimetil arjinin), M30 ve M65 gibi apoptozis kriterlerinin yanı sıra homosistein ve lipid profili gibi kardiyak risk faktörleri de araştırıldı. CDP-kolin tedavisi, tuzlu su grubuna göre anlamlı olarak infarkt oluşmasını engelledi. Bununla birlikte toplanan kan örneklerinden yapılan ölçümlerde, endotel disfonksiyon parametrelerinden ADMA değerlerinde, apoptozis kriterlerinden M30 ve M65 değerlerinde anlamlı farklılıklar gözlenmedi.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, CDP-kolin'in uzun dönem miyokardiyal iskemi-reperfüzyon modelinde miyokard hasarında koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: CDP-kolin, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon, apoptozis, ADMA

SUMMARY

Myocardial ischemia is the leading cause of death all around the world. Cytidine diphosphocholine (CDP-choline) is in use for treatments of stroke and head trauma in Japan and several European countries for many years because of its protective effect against cerebral injury. Also, previous studies showed that CDP-choline has protective effects against short-term myocardial ischemia-reperfusion injury. In this study, we investigated that if CDP-choline has protective effects against long-term myocardial ischemia-reperfusion injury in rats.

Long term ischemia-reperfusion was produced in anaesthetized rats by ligation of the left main coronary artery for 30 minutes followed by reperfusion period for the next 180 minutes. Treatment agents (Saline 1 ml/kg, CDP-kolin 100, 250, 500 mg/kg, intravenously) were given in the middle of the ischemia. The hearts of the animals were removed and stained with a histologic dye at the end of the reperfusion and risk area/infarct area percent ratio was calculated. End of the experiments we collected blood samples for the measurement of endothelial dysfunction parameter asymmetric dimethylarginine (ADMA), apoptosis parameters M30 and M65, cardiac risk factors homocysteine and serum lipid profile.

CDP-choline treatment significantly attenuated the size of infarct area induced by long term ischemia-reperfusion versus saline group. Although, CDP-choline treatment did not significantly alter the blood levels of any parameter (ADMA, M30, M65, homocysteine, serum lipid profile).

Results of this study show that CDP-choline exerts cardioprotective effects in long term myocardial ischemia-reperfusion injury.

Key words: CDP-choline, myocardial ischemia-reperfusion, apoptosis, ADMA

GİRİŞ ve AMAÇ

Akut miyokard infarktüsü (AMİ); ana koroner arterlerin tıkanması sonucu meydana gelerek miyokarda iskemi ve nekroza sebep olan bir hastalıktır. AMİ dünyada mortalite ve morbidite sıralamasında ilk sıralardaki yerini korumaktadır (1).

AMİ'de ideal tedavinin, hastaneye gelmeden önce sağlanan erken tedavi olduğu bilinmektedir (2). Hasta ölümlerinin büyük bir kısmı hastaneye başvurmadan önce olmaktadır. Bu yüzden erken tedavi büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla pek çok tedavi protokolü kullanılmakla birlikte bu tedavi protokollerinde kullanılan ilaçlar daha çok perfüzyonun sağlanması üzerine etkili olmakta ve bu ilaçların çoğu kalıcı miyokard hasarını engelleyememektedir (3).

CDP-kolin (sitidin 5'- difosfat kolin, sitikolin), vücudumuzda endojen olarak sentezlenen mononükleotid yapıda bir bileşiktir. Hücre membran fosfolipidlerinden, fosfotidilkolin sentezinde bir ara ürün olarak ortaya çıkar. Dışarıdan verilen CDP-kolin'in bugüne kadar çok sayıda deneysel sistemde fizyolojik ve farmakolojik yararlı etkileri ortaya çıkarılmıştır. Serebral iskemik koşullarda nöron hasarını azaltıcı etkileri nedeniyle günümüzde Avrupa ve Japonya'da kafa travmaları ve stroke tedavisinde kullanımı onaylanmıştır (4,5).

Dışarıdan verilen CDP-kolin, hücre membranında yerleşik fosfodiesterazlar tarafından önce fosfokolin ve sitidinmonofosfata, ardından kolin ve sitidine hidroliz edilir. CDP-kolin verilmesi sonucu dolaşımda kolin ve sitidin düzeylerinin arttığı (6), insanlarda ise sitidin yerine üridin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (7). Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda CDP-kolin'in kardiyovasküler, endokrin etkiler sergilediği, gösterilmiştir (8-11). CDP-kolin intraserebroventriküler ve intravenöz yolla verildiğinde normal koşullarda kan basıncı artırmakta, kanatılarak şok yaratılmış koşullarda hipotansiyonu geri döndürmektedir (8,9,10,12).

Yine merkezi yolla verilen CDP-kolin plazma vazopressin, ACTH düzeylerinde artışa neden olmakta, uyarılmış koşullarda plazma TSH, LH ve GH düzeylerini artırmaktadır (11). CDP-kolin bu etkilerini merkezi kolinerjik sistem aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştirmektedir. CDP-kolin'in nöroprotektif etkisinde ise membran fosfolipid yıkımını azaltması, yapımını artırması, apoptotik süreçte rol oynayan bir çok mekanizmayı antiapoptotik etki sergileyecek şekilde etkilemesinin rol oynadığı düşünülmektedir (13). CDP-kolin'in yakın zamanda kolinerjik alfa7-nikotinik reseptör agonisti olarak da çeşitli etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Alfa7-nikotinik kolinerjik reseptörler nikotinin doku koruyucu etkilerine aracılık eden alt tiplerindendir ve CDP-kolin metaboliti kolin bu reseptörler üzerinde agonistik etki sergilemektedir (14,15).

CDP-kolin'in hem kardiyovasküler ve hem de doku koruyucu etkileri göz önüne alındığında, kardiyak iskemi reperfüzyon koşullarında hipotansiyon, aritmiler gibi kardiyovasküler ve doku hasarı üzerine koruyucu etkileri olabileceği düşünülmüştür. Laboratuvarımızda bu amaçla gerçekleştirilen kısa süreli kardiyak iskemi reperfüzyon çalışmasında intravenöz yolla verilen ilacın reperfüzyon döneminde gözlenen kardiyak aritmileri önlediği ve ortalama yaşam oranlarını artırdığı görülmüştür (16).

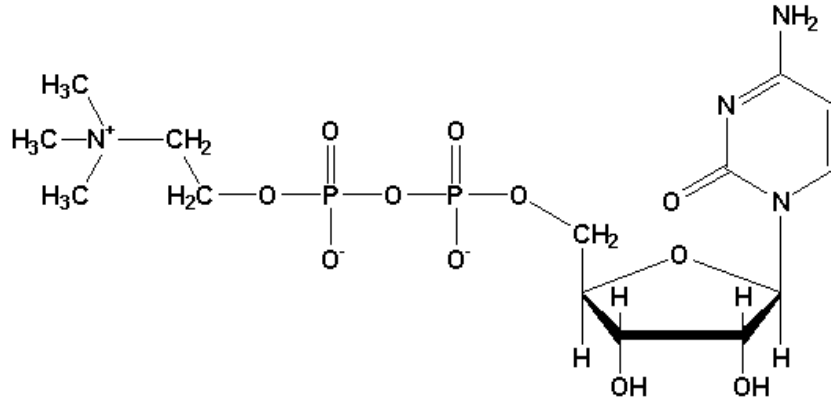
Bu çalışmada ise uzun süreli kardiyak iskemi reperfüzyon modelinde CDP-kolin' in miyokardda oluşan infarkt alanı ve dolaşımdaki apoptoz ve nekroz göstergeleri olabileceği iddia edilen M30, M65 düzeylerine etkisi araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

1.1. CDP-kolin

1.2. CDP-kolinin Yapısı

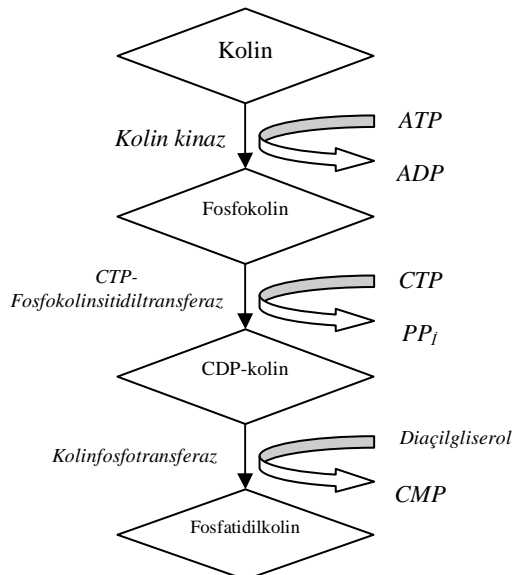
CDP-kolin vücudumuzda endojen olarak bulunan, fosfatidilkolin sentezinde ara ürün olan nükleotid yapısında bir moleküldür (Şekil-1).



Şekil-1: CDP-kolinin molekül yapısı

1.3. CDP-kolin'in Sentezi

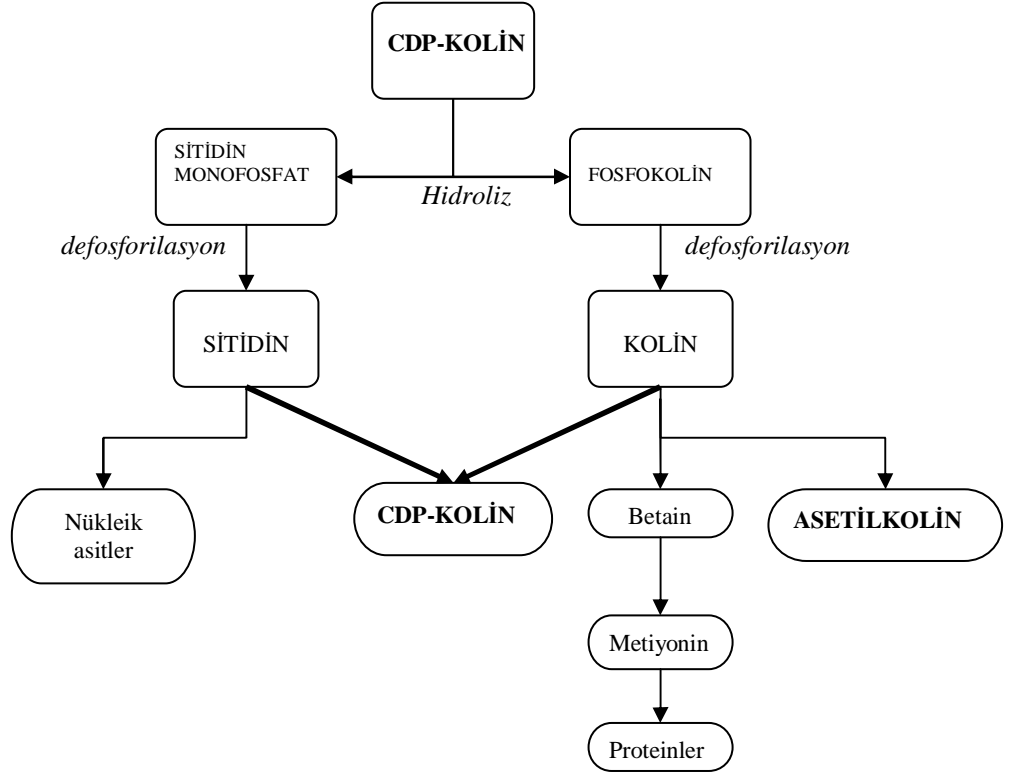
CDP-kolin; kolin'den fosfatidilkolin sentez basamaklarında yer alan moleküllerden biridir (Şekil-2). Bu yolak 1956 yılında Kennedy ve Weiss tarafından tanımlandığı için "Kennedy Yolağı" olarak bilinir. Kennedy yolağı vücuttaki fosfatidilkolin sentezinin tek yolu olmamasına rağmen büyük kısmının sentezinden sorumludur (17).



Şekil-2: CDP-kolin sentezi

1.4. CDP-kolinin Metabolizması

Vücuda alındığında hücre membranlarında bulunan fosfodiesterazlar tarafından önce sitidinmonofosfat ve fosfokoline hidroliz edilir. Daha sonraki aşamalarda son metabolitleri olan kolin ve sitidine dönüşür. İnsanlarda ise sitidin deaminaz enzimi sayesinde sitidin hızla üridine dönüşür. Son metabolitlerinden kolin, asetilkolin yapımından başka membran fosfolipidlerinin yapısına da katılır. Diğer metabolitler olan sitidin ve üridin ise başlıca nükleik asitlerin yapısına katılırlar (Şekil-3). Yapılan çalışmalar CDP-kolin'in etkilerini büyük oranda bu metabolitleri aracılığı ile meydana getirdiğini göstermiştir.

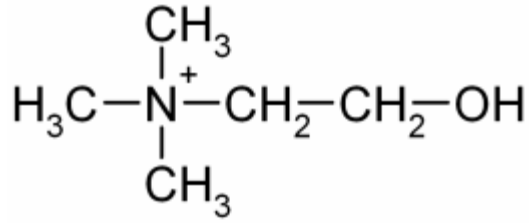


Şekil-3: CDP-kolin metabolizmasının şematik gösterimi

1.5. CDP-kolin'in Metabolitleri

1.5.1. Kolin

Parasempatik sistemin başlıca nörotransmitteri olan asetilkolinin ön maddesi olması nedeniyle önem arz etmektedir. Bunun dışında hücre membranı lipidlerinden olan fosfotidilkolin ve sfingomyelinin yapısına katılmaktadır. Molekül ağırlığı 105 g'dır (Şekil-4).



Şekil-4: Kolinin molekül yapısı

Kolin; dışarıdan gıdalarla alınabildiği gibi vücutta fosfotidilkolin'den de sentezlenebilir (18). Sentezlenen kolin vücutta kolayca dağılıma uğrar. Kan beyin bariyerinden geçişi esnasında enerjiye ve konsantrasyon gradiyentine ihtiyaç duymadan çalışan bu sistemde akım yönü beyinden sistemik dolaşıma doğrudur. Ancak kan kolin konsantrasyonunun artırılması sonucu akımın yönü tersine yani sistemik dolaşımdan beyine doğru olabilir (19).

Dolaşımdaki kolinin nöron içine alınması iki sistemle olmaktadır. Bu sistemlerden biri yüksek afiniteli transport sistemi olup, sodyum iyonuna bağlı olarak çalışan ve hemikolinium 3 ile bloke olan transport sistemidir. K_m : 0.1-10 μM olan bu transport sistemi fizyolojik koşullarda doyurulmuş durumdadır. Özellikle kolinerjik nöronlarda presinaptik yerleşimli bu transport sisteminin asetilkolin sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olduğu öne sürülmektedir (19). Diğeri ise, düşük afiniteli transport sistemidir. Yüksek afiniteli transport sisteminden farklı olarak diğer dokularda (enterositler, hepatositler vb.) bulunmaktadır. K_m değeri daha yüksek olan bu sistem (K_m 30-100 μM) fizyolojik koşullarda doyurulmamıştır ve daha çok fosfotidilkolin olmakla

birlikte diğer fosfolipidler için gerekli olan kolini sağlamaktadır. Yerleşimi ise kolinerjik nöron gövdelerindedir (19).

Kolin vücutta önemli bir parasempatik nörotransmitter olan asetilkolinin prekürsörüdür. Asetilkolin; kolin ve asetil CoA'nın kolinasetiltransferaz enzimi aracılığı ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Kolinasetiltransferaz enzimi fizyolojik koşullarda doyurulmamış durumdadır (20). Daha önce yapılan çalışmalar göstermiştir ki, sistemik kolin konsantrasyonunun artırılması sonucu beyin kolin (18) ve asetilkolin düzeylerinde artış meydana gelmektedir (21). İnvitro çalışmalarda beyin dilimlerinde ve invivo mikrodializ çalışmalarında da ortamda kolin konsantrasyonunun artırılması asetilkolin saliverilmesini artırmıştır. Sonuç olarak kolinin kolinerjik iletide ve bu iletiye bağlı fonksiyonlarda artış meydana getirdiği gösterilmiştir (22-25).

1.5.2. Sitidin ve Üridin

Sitidin ve üridin vücutta bulunan önemli nükleotidlerdir. Nükleotidler nükleozidlere fosfat grubu eklenmesi ile ortaya çıkar ve sinyal molekülü, enerji metabolizması, koenzimlerin yapısal kısımlarını oluşturmak gibi pek çok önemli görevleri vardır.

Nükleozidler, beş karbonlu bir şeker ve pürin veya pirimidin bazlarının birleşmesi ile oluşur. Pürin bazları adenin ve guanin iken, pirimidin bazları sitozin, timin ve urasili içerir.

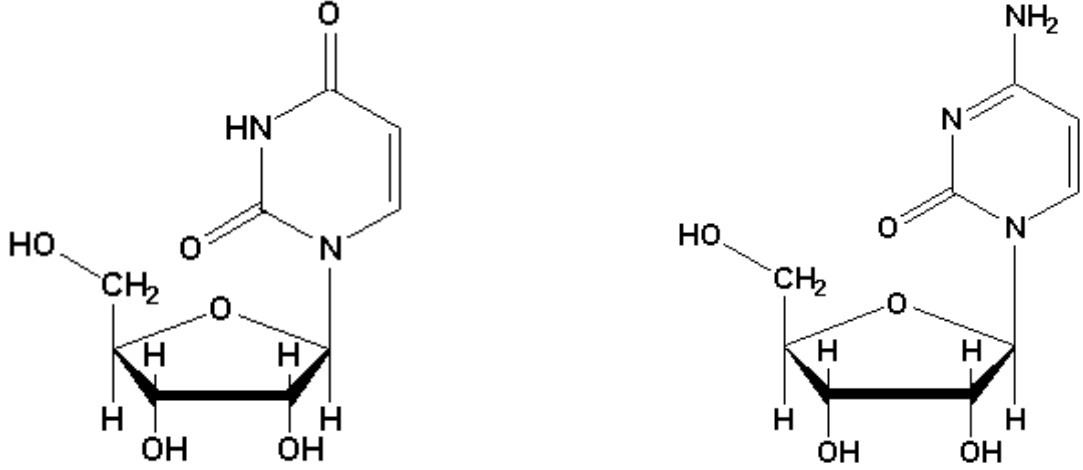
Nükleotidler başlıca iki yolak üzerinden sentezlenebilir;

1) *De Novo Yolak*: Glisin, glutamat, aspartat, tetrahidrofolat ve karbondioksit gibi prekürsörlerin pürin halkasına katılımını içerir.

2) *Kurtarma (Salvage) Yolakları*: Nükleik asit yıkımı sonrası ortaya çıkan pürin ve pirimidin bazlarının kurtarılması yada yeniden kullanılması yoluyla olmaktadır.

Sitidin; CDP-kolinin hem sentezinde kullanılan hem de metabolizması sonucu ortaya çıkan bir nükleotiddir. Daha önce yapılan çalışmalarda

sitidin'in membran fosfotidilkolinine kolin katılımını artırarak membran fosfolipid sentezini arttırdığı gösterilmiştir (26). Bunun yanısıra üridinin ise sitidine dönüşerek CDP-kolin'in yapımına katılabildiği gösterilmiştir (27).



Şekil-5: Üridin ve Sitidin

1.6. CDP-kolin'in Etkileri

1.6.1. Asetilkolin ve Kolinerjik İleti Üzerine Etkileri

CDP-kolin dışarıdan verildiğinde plazma kolin düzeylerinde artışa yol açmaktadır (9). Normal şartlar altında kan beyin bariyerindeki kolin transport sistemi doyurulmamış olduğundan plazmadaki kolin artışının beyinde de kolin artışına yol açtığı gösterilmiştir (8,18,28). İntraserebroventriküler veya intravenöz CDP-kolin verilmesi beyinde kolin düzeylerinde artış meydana getirmiştir (12). Beyin kolin düzeylerindeki bu artışların asetilkolin sentezinde ve saliverilmesinde artışa neden olduğu yapılan çalışmalara ortaya konulmuştur (12,22,29,30). CDP-kolin'in, kolin ve asetilkolin düzeylerindeki bu etkilerinin bir sonucu olarak kolinerjik ileti ve onun yol açtığı fonksiyonel işlevleri düzenlemede önemli role sahip olduğu gösterilmiştir (9,10,11,23,24,12).

1.6.2. Membran Fosfolipidleri Üzerine Etkileri

CDP-kolinin vücutta parçalanma ürünlerinden kolin membran fosfolipidlerinin yapısına katılırken, birlikte bir diğer parçalanma ürünü olan sitidin de hücre içinde sitidintrifosfata dönüşerek fosfotidilkolin yapımına katılmaktadır (26,31). Ayrıca yapılan çalışmalar CDP-kolin'in fosfotidilkolin, fosfotidilserin ve fosfotidiletanolamin düzeylerinde de artışa sebep olduğunu göstermiştir (6). CDP-kolin'in fosfolipaz A₂ enzim aktivitesini azaltması da fosfotidilkolin yıkımını azaltmakta ve membran fosfolipidlerinin kaybını önlemektedir (32).

1.6.3. CDP-kolin'in Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

CDP-kolin'in kardiyovasküler sistem üzerine etkileri anabilim dalımızın başlıca çalışma konularından birisidir. Bölümümüzde yapılan hemorajik şok deneylerinde CDP-kolinin intraserebroventriküler veya intravenöz verilmesi sonucu kan basıncını artırmıştır. Bu etkisini beyin kolin seviyelerini ve kolinerjik transmisyonunu artması ile merkezi nikotinic reseptörleri aktive etmesi yoluyla yaptığı ve dolaşımda adrenalin ve vazopresin artışının da bu etkiye aracılık ettiği gösterilmiştir (8,9). Ayrıca hemorajik şok oluşturulmuş sıçanlarda süperior mezenterik arter ile renal arter kan akımını ve hayvanların yaşam oranlarını artırdığı saptanmıştır (33). Yine bölümümüzde daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada ise CDP-kolin'in kısa dönem iskemi reperfüzyon modelinde hem aritmi insidansını azalttığı hem de sağkalım oranlarını arttırdığı gösterilmiştir (16).

1.6.4. CDP-kolin'in Endokrin Sistem Üzerine Etkileri

Hipotalamohipofizer sistemin yoğun kolinerjik innervasyona sahip olması, CDP-kolin'in endokrin etkilerinin büyük kısmının bu sistem üzerinden ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Yapılan çalışmalarda; intraserebroventriküler (i.s.v.) veya intravenöz (i.v.) yolla uygulanan CDP-kolin tedavisi plazma vazopresin ve katekolamin seviyelerini yükseltmiş (10), bazal koşullarda plazma ACTH, stimüle edilmiş koşullarda GH, TSH, LH artışına yol açmış (11) ve intraperitoneal yolla verilen CDP-kolin ise periferde plazma glukagon ve serum insülin düzeylerinde artışa yol açmıştır. (34).

Laboratuvarımızda yapılan başka bir çalışmada da intravenöz verilen CDP-kolinin vazopressin artışı yanında oksitosin artışına da neden olduğu gösterilmiştir (35).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda ise; intravenöz yoldan verilen CDP-kolin büyüme hormonu düzeylerini artırırken, prolaktin düzeylerini düşürmüs, (36), FSH seviyelerinde azalmaya neden olurken testosteron seviyelerini ise anlamlı olarak arttırmıştır (37).

1.6.5. Diğer Etkileri

CDP-kolin'in tedavide kullanılmakta olduğu veya kullanılma potansiyeli olan diğer alanlar;

a) *Ağrı ve Analjezi*: Bölümümüzde sıçanlarda yapılan deneylerde i.s.v. CDP-kolin verilmesi sonucu akut ağrı modelinde analjezik etki görülmüştür (38).

b) *Serebral İskemi ve Hipoksi*: CDP-kolin serebral iskemideki pek çok hasarı; başta fosfolipaz A₂ aktivasyonunu azaltıp, kardiolipin ve fosfotidilkolin'in membrandan yıkımını engelleyerek (39), Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesini düzelterek (40), antioksidan etki olarak glutatyon ve glutatyon redüktaz aktivitesini artırarak (41), fosfotidilkolin, kardiolipin, sfingomyelin düzeylerini artırarak (42), serebral ödemi azaltarak (43,44) ve kan beyin bariyeri disfonksiyonunu düzelterek (43) gerçekleştirdiği kanıtlanmıştır. Bu özelliklerine dayanılarak yapılan klinik çalışmalar sonucunda, stroke ve kafa travmalarında başta Japonya olmak üzere dünyada pek çok ülkede insanlarda kullanılması onaylanmıştır.

c) *Öğrenme ve hafıza geliştirme*: Klinik çalışmalarda özellikle yaşlı hastaların kognitif fonksiyonlarını artırdığı gösterilmiştir (45).

d) *Nörodejeneratif hastalıklar tedavisi*: Alzheimer's hastalığı patogenezinde rol oynayan fosfotidilkolin ve fosfotidiletanolamin kaybının CDP-kolin tedavisi ile yerine konulabileceği gösterilmiştir (45). Parkinson hastalığında Levadopa tedavisi ile birlikte kullanılan CDP-kolin'in Levadopa tedavisini güçlendirdiği ortaya konulmuştur (46).

e) *Diğer hastalıklar üzerine etkileri:* Glokom tedavisi (47) ve bağımlılık tedavisi (48) üzerine olan etkileri gösterilmiştir.

2. Akut Miyokardiyal İnfarktüs

2.1. Miyokardiyal iskemi ve Reperfüzyon Hasarı

AMİ dünyada mortalite ve morbidite sıralamasında üst sıralardaki yerini korumaktadır (1). Miyokard infarktüsü, mekanik bir etki sonucu (pıhtı vb.) koroner arterlerin tıkanması ve iskemi oluşumu ile meydana gelmektedir. Daha sonra bu iskeminin çeşitli yollarla ortadan kalkması ile miyokardın tekrar kanlanmasına reperfüzyon denilmektedir.

İskemi oluşması sonucu; miyokard dokusuna kan akımının aniden engellenmesi ile hücre içindeki aerobik glikoliz anaerobik glikolize doğru kayar (49). Anaerobik glikoliz sonrası hücre içinde biriken laktat ve protonlar anaerobik solunumun durmasına neden olur (50). Bu arada enerji üretilmediği için ATP-bağımlı iyon kanallarının bozulması ile potasyum ve magnezyum iyonları hücre dışına çıkarken kalsiyum ve sodyum iyonları hücre içine girer ve bunun sonucu sitoplazma ve mitokondride kalsiyum birikimine yol açar (51). Hücre içinde kalsiyum artışı sonrası fosfolipaz A₂, fosfolipaz C ve endonükleazlar aktive olur (52,53). Aktive olan fosfolipaz A₂'nin membran fosfolipidlerini fosforile ederek parçalaması sonucu membran hasarı oluşur (54). Bütün bu sürecin sonunda miyozit kaybı meydana gelmektedir.

2.2. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarının Potansiyel Mekanizmaları:

1) *Kalsiyum yüklenmesi:* Enerji bağımlı iyon kanallarının bozulması sonucu hücre içinde kalsiyum artışı meydana gelmekte ve fosfolipaz A₂ gibi enzimlerin bu kalsiyum artışı ile indüklenmesi sonucu hücre membranı lipidleri yıkılmakta ve hücre hasarı oluşmaktadır (55).

2) *Oksidatif stres:* Re-oksijene dokuda oluşan reaktif oksijen deriveleri reperfüzyon sağlandıktan hemen sonra kemotaktik sitokinlerin salınımına ve

endotel üzerinde hücrel adezyon moleküllerinin ekspresyonuna neden olarak miyokardiyal hasar yapar (55,56).

3) *Akut inflamatuvar cevap*: Reperfüzyondan sonra salınan kemoatraktanlar nedeniyle infarkt bölgesine nötrofil birikimi olur. Sonuçta burada biriken nötrofiller kapillerde tıkanma ve mikrovasküler basının yanı sıra yıkıcı enzimler ile reaktif oksijen deriveleri salarak hücrelerde hasara neden olurlar (57).

4) *Renin-angiotensin aracılıklı hasar*: Yapılan çalışmalar anjiyotensin 2'nin miyositler ve düz kas hücrelerinde intrasellüler kalsiyum düzeylerini artırdığı ve bunun sonucunda diastolik fonksiyon bozulması ile koroner vazokonstriksiyon oluşturarak miyokard hasarına neden olduğunu göstermiştir (58).

5) *Trombosit aracılıklı hasar*: İskemi-reperfüzyon sonrası trombosit aktivasyonu meydana gelmektedir. Bu aktivasyon sonrası oluşan mikroemboliler özellikle mikrovasküler dolaşım bozukluğuna sebep olmaktadır. Trombositlerden salınan tromboksan A₂ ve serotonin, trombozisin ile mikrovasküler konjesyona yol açarak koroner akımı bozmaktadırlar (59).

6) *Kompleman sistem aracılıklı hasar*: Kompleman sistemi, iskemi-reperfüzyon sonrasında trombosit aktive edici faktör ve histamin aracılığı ile hücre zarı permeabilitesinin artmasına ve direkt hücre hasarına neden olmaktadır (60).

7) *Apoptozis*: Programlı hücre ölümü anlamına gelen apoptozisde, ilk önce hücre membranındaki ölüm reseptörlerinin (FAS, TNFR1, DR3,4,5) uyarılması gerekmektedir. Bu uyarının sonucunda sitoplazmada bulunan faktörler (Bcl 2 ailesi, p53 v.b.) aktifleşerek mitokondriyi etkilemekte ve mitokondriden salınan sitokrom C sayesinde kaspazlar aktifleşmektedir. Sonuç olarak DNA fragmentasyonuna bağlı hücre ölümü meydana gelmektedir (61). Miyokardda ki iskemi - reperfüzyon ile apoptozis arasındaki ilişki yapılan pek çok deneyde (apoptozisin reperfüzyon periyodunda artarak devam ettiği (62), kaspazların aktivasyonu (63) ve p53' ün rolü (64) ortaya konulmuştur.

Apoptozis belirteçlerinden sitokeratin 18 (CK18), hücrede bulunan intermediate filament proteinin parçalanması sonrası ortaya çıkan bir proteindir. Bu protein hücrenin apoptozisi veya nekrozu sonucu parçalanarak oluşmaktadır. Apoptotik aktivite ölçümü için deneyimizde sitokeratin 18'in kaspazlar tarafından ortaya çıkartılan solüble formunu belirlemek için M30, hem nekroz hem apoptozis aracılığı ile ortaya çıkan total CK18 miktarını belirlemek için ise M65 elisa testleri tanımlanmıştır.

8) *Endotel Disfonksiyonu*: İskemi-reperfüzyon sonrası miyokardda oluşan ve reperfüzyona rağmen düzelmeyen bir dolaşım bozukluğu meydana gelmektedir. Buna "No reflow" fenomeni denilmektedir. Endotel disfonksiyonu bu fenomenin başta gelen nedenleri arasındadır. Endotel disfonksiyonunun en önemli parametrelerinden biri ise asimetrik dimetiltarjinin (ADMA) olduğu kabul edilmektedir. ADMA, damar endotel fonksiyonları üzerine vazodilatasyon ve antiagregan etkileri olan nitrik oksit (NO) molekülünün endojen sentezinde rol alan nitrik oksit sentazı inhibe etmektedir. NO sentezini bozarak endotel disfonksiyonu gelişmesini kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Buradan yola çıkılarak endotel disfonksiyonunun saptanmasında önemli bir parametre olarak kullanılmaya başlanılmıştır (65,66).

GEREÇ VE YÖNTEM

Genel

Çalışmada Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden sağlanan 250-300 gr ağırlığında Wistar türü erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, sıcaklığı 20-24 C° olan ve 12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırma döngüsü bulunan bir odada yem ve su alımları serbest olacak şekilde, 4-6 kadarı bir kafeste bakıldılar.

Çalışmadaki tüm cerrahi ve deneysel işlemler, Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakımı ve Kullanımı Etik Komitesi tarafından 20/11/2007 tarih ve 12 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Cerrahi İşlemler

Sıçanlar periton içine verilen üretan (1.25 g/kg) ile anestezi edildikten sonra sol juguler ven (ilaç enjeksiyonu için) ve sol karotid arter (kan basıncı ölçümü için) içleri heparinli tuzlu su (250 IU/ml) ile dolu olan PE 50 tüp ile kanüle edildi. Takiben EKG kaydı için deri altına EKG elektrotları ve vücut sıcaklığını ölçmek için rektuma prob yerleştirildi.

Hayvanlar deney süresince vücut sıcaklıkları 37 ± 0.2 C° olacak şekilde ısıtıcı bir platform üzerinde tutuldular. İskemi ya da reperfüzyon esnasında ventriküler fibrilasyon gelişen sıçanlar (kontrol grubunda iki, tedavi grubunda bir hayvan) değerlendirme dışı bırakıldılar.

Trakea kanülasyonu sonrası sol 4. ve 5. kaburgalar arasından toraks boşluğu açıldı ve hayvan hemen suni solunum pompasına (SAR-830 Küçük Hayvan Ventilatörü, PA, A.B.D.) bağlanarak pCO₂, pO₂ ve pH'ı normal düzeylerde tutacak şekilde pozitif basınçlı suni solunum (1.5 ml/100g hacim ve 70 atım/dakikalık hız) uygulanmaya başlandı. Kalp, perikardiyum sıyrıldıktan sonra, kaburgalara yapılan hafif bir basınçla göğüs kafesinden dışarı doğru çekilerek sol ana koroner arterin altından 10 mm'lik atravmatik

araştırıldı. Cerrahi işlemlerin bitiminden sonra stabilizasyon için 20 dakika beklendi. Stabilizasyon süresinin bitiminden sonra hayvanların kontrol kan basıncı, kalp hızı ve EKG'si kaydedildi. Kontrol değerlerin alınmasını takiben sol ana koroner arter kapatılarak iskemi-reperfüzyon prosedürüne başlandı. İskemi süresinin ortasında (oklüzyonun 15. dakikasında) intravenöz yol ile CDP-kolin (100; 250; 500 mg/kg) ya da tuzlu su (1 ml/kg) hayvanlara verildi. Deney sonunda, kalpler hızla yerlerinden çıkarılarak Langendorff düzeneğine asıldı ve arterlerin içinde kalan kanın uzaklaştırılması için, aortaya yerleştirilen bir kanül vasıtasıyla, % 0,9 tuzlu su ile perfüze edildiler. Daha sonra, risk alanını belirlemek amacıyla, koroner arterin çevresinde bulunan ipek sûtür yeniden bağlanarak 1mg/ml dozunda tuzlu suda çözülerek hazırlanan akridin turuncusu (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya) 1ml kadarı yaklaşık bir dakikalık süre içinde verildi (Deney sonunda, kalp dilimleri floresan mikroskop altında incelendiğinde akridin turuncusu tutmayan alan sol ana koroner arterin kanlandığı alan risk alanı olarak tanımlandı). Takiben kalpler Langendorf düzeneğinden alınarak korunaklı bir şekilde -30 °C'de donduruldu.

Nekroz Alanının Belirlenmesi

Trifenil tetrazolium klorid ile boyama tekniği kullanıldı (67). Bu amaçla tetrazolium boyası, 0.1 M NaH₂PO₄ tampon (pH:7.4) içerisinde %1'lik (1 g/100 ml) olarak çözüldü. Hazırlanan solüsyon 37 C°'ye ısıtılmış su banyosuna konuldu. Bu esnada derin dondurucudan çıkarılan donmuş kalp keskin bir jilet yardımıyla kalınlıkları yaklaşık 2 mm olacak şekilde dilimlendi. Takiben kalp dilimleri, %1'lik tetrazolium içeren, pH'sı 7.4 olan ve sıcaklığı önceden 37 C°'ye getirilmiş tampon içerisinde 20 dakika inkübe edildi. Dilimler tampon içerisine konulduktan sonraki ilk bir dakika boyunca çalkalanarak tüm yüzeylerin boya ile teması sağlandı. İnkübasyon süresi sonunda tampon içerisinden çıkarılan kalp dilimleri %10'luk formalin içerisine kondu ve 10 dakika beklendi. Bu sayede renklerin ayırımı daha iyi gözlenir hale geldi.

Dokuda, canlılığını koruyan alanlar tetrazolium ile boyanarak koyu kırmızı renk alırken nekrotik alanlar soluk sarımsı bir renkte gözlendi. Bu

işlemlerin sonrasında, kalp dilimleri aralarında 2 mm kalınlık olan iki lamel arasına konarak bir kısıkaç aracılığı ile sıkıştırıldı. Hazırlanan kalp dilimlerin Olympus BX 50 floresan araştırma mikroskopu yardımıyla x1,25 (Olympus) büyütme mercek kullanılarak fotoğrafları çekildi ve bilgisayar ortamına aktarıldı. Alanlar, bilgisayar programı (Scion Image, Maryland, A.B.D.) destekli planimetrik yöntem ile nekroz alanları ve risk alanı, sonrasında nekroz hacmi ve risk hacmi olarak hesaplandı. Bunu takiben, her bir kalp için, bütün dilimlerin hacimleri toplanarak total nekroz hacmi ve risk hacmi hesaplandı. Son olarak nekroz hacminin risk hacmine bölünüp yüz ile çarpılmasıyla nekroz hacmi/risk hacminin yüzdesi hesaplandı.

İlaçlar

CDP-kolin (Fluka Chemie GmbH, İsviçre), tuzlu su (% 0.9 NaCl) içinde hazırlandı. İntravenöz ilaç ve tuzlu su enjeksiyonları 1ml/kg volümde yapıldı.

Ölçümler

Deney sonunda alınan kan örnekleri (1.5 ml) soğuk zincire tabi olarak santrifüje edildi. Serumları ayrılarak -80 °C'de buzdolabında saklandı. M30 parametresi ölçümleri için; M30 elisa kiti (Peviva, İsveç), M65 parametresi için; M65 elisa kiti, (Peviva, İsveç) kullanıldı. Lipid profili spektrofotometrik yöntemle, ADMA (asimetrik dimetil arjinin) için; ADMA elisa kiti (İmmün Diagnostik, Almanya), homosistein ölçümleri ise immulate 2000 sisteminde kemoluminesans yöntemi ile ölçüldü.

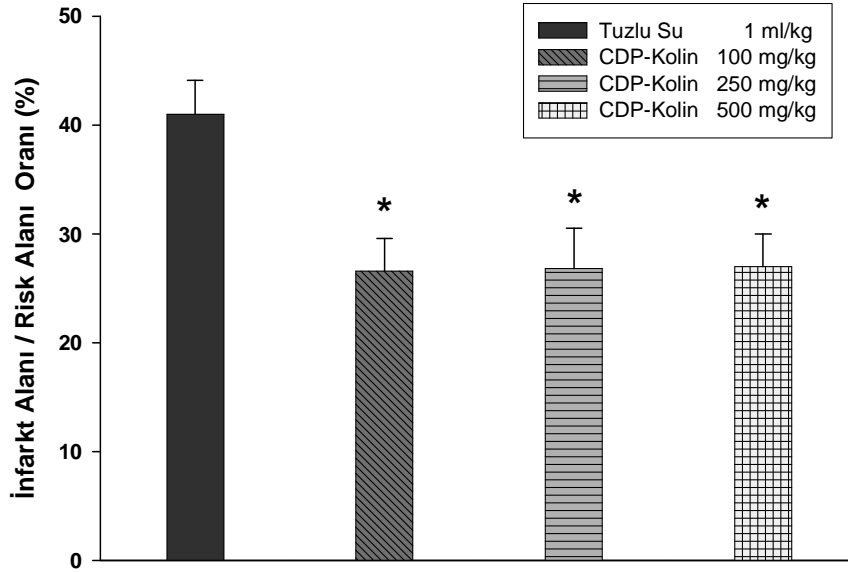
İstatistik

Kan basıncı ve kalp hızı değerleri ortalama \pm standart hata olarak verildi. Grupların karşılaştırılmasında çift yönlü *ANOVA testi* ve anlamlı farklılık olan gruplarda posterior test olarak *Tukey test* kullanıldı. Nekroz miktarı ve nekroz miktarı/risk bölgesi karşılaştırmaları, M30, M65, lipid profili, homosistein ve ADMA sonuçları için tek yönlü *ANOVA*, kan laktat değerleri *Wilcoxon* işaret testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ olan değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

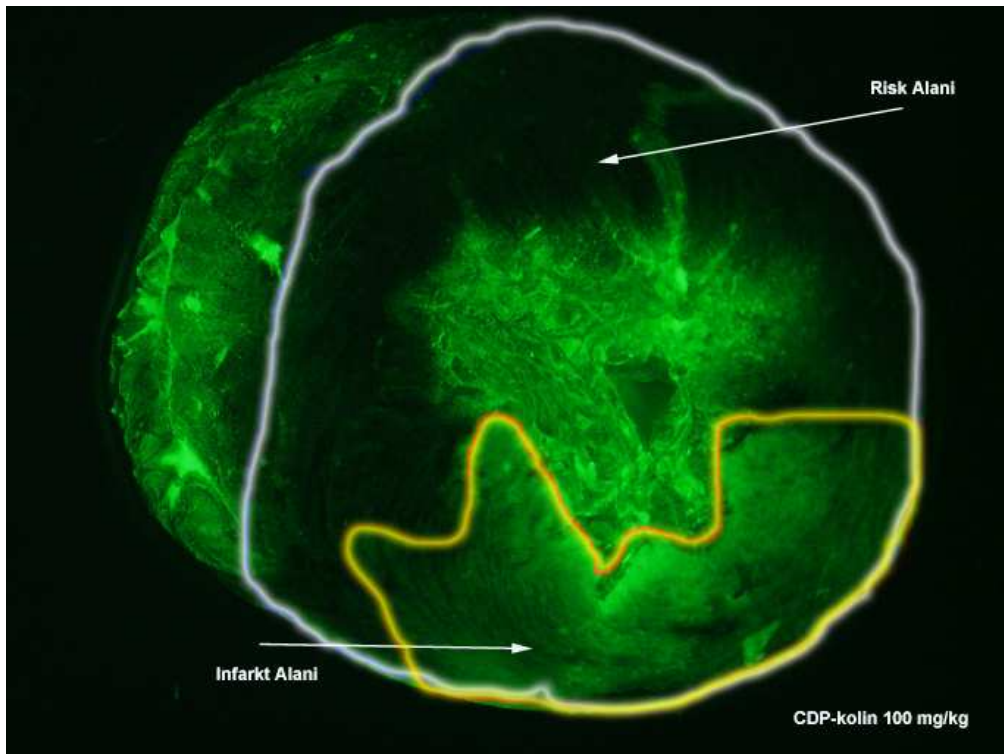
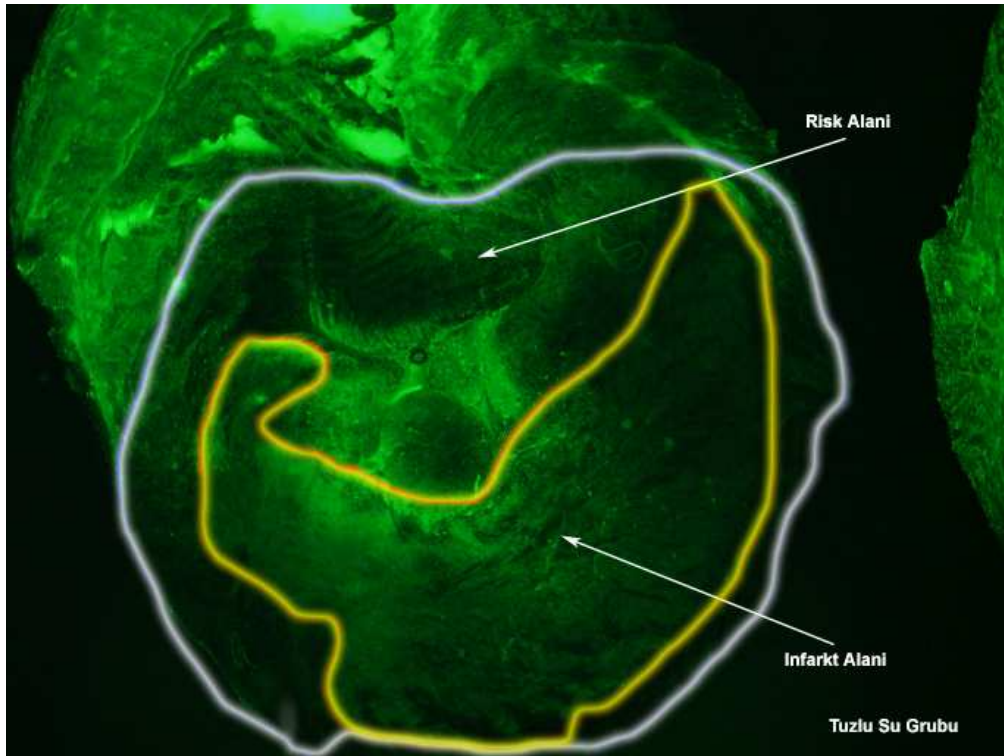
1. Uzun Dönem İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda CDP-kolin Tedavilerinin Miyokardiyal Nekroz Oluşumu Üzerine Etkileri

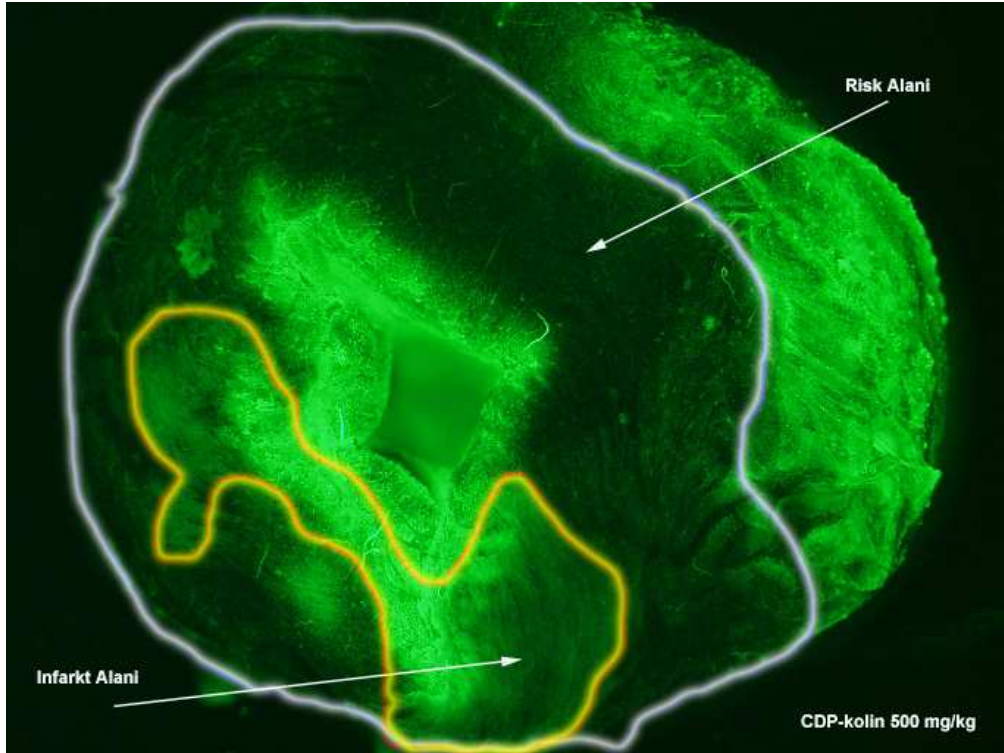
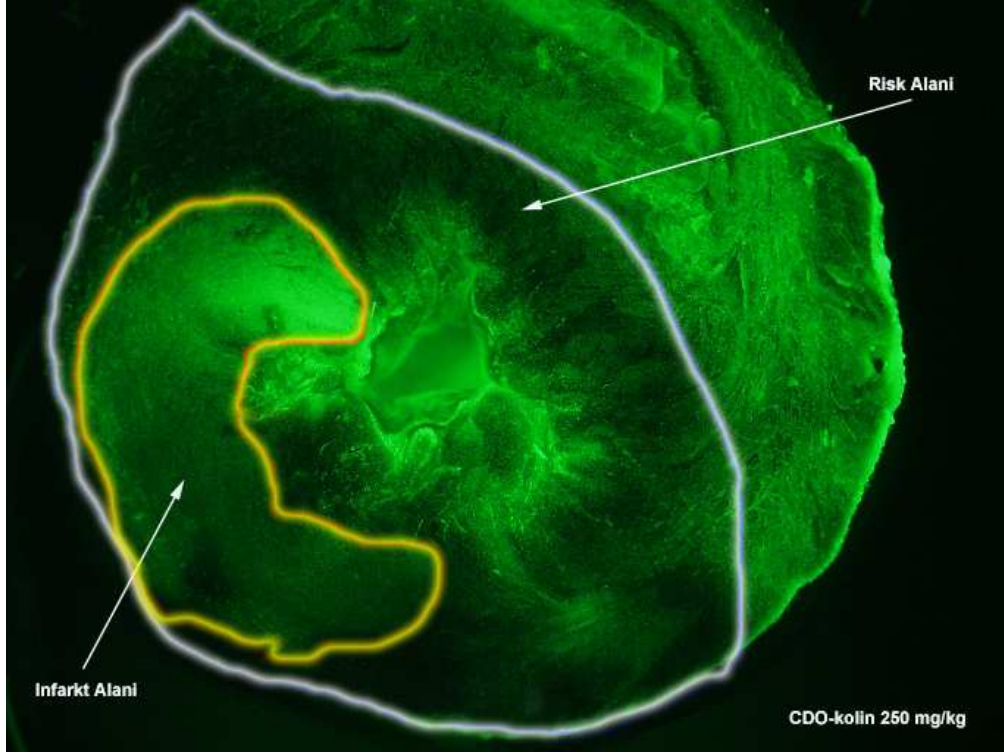
Deneyin sonunda infarkt ve risk alanları hesaplanarak tedavi sonuçları değerlendirildi. Değerlendirme amacıyla kullanılan fotoğraflar (Şekil-8)' de gösterildi. Bu değerlendirme sonucunda, her üç dozda da CDP-kolin tedavisinin (100, 250, 500 mg/kg) tuzlu su grubuna göre anlamlı olarak infarkt oluşumunu azalttığı görüldü. [dozF(3,21)= 5,079] (Şekil-7) İnfarkt alanlarının risk alanlarına oranı ile değerlendirildiğinde, bu oran tuzlu su grubunda %40 olurken tedavi gruplarında CDP-kolin 100 mg/kg %26,6, CDP-kolin 250 mg/kg %26,8, CDP-kolin 500 mg/kg %27 olduğu görüldü. CDP-kolin tedavisi verilmiş gruplarda kendi aralarında doza bağlı bir anlamlılık bulunamadı.



Şekil-7: Uzun dönem myokardiyal iskemisi ve reperfüzyon yapılan sıçanlarda CDP-kolin ve Tuzlu su tedavilerinin miyokardiyal infarkt üzerine etkisi

Sol ana koroner arter oklüzyonu yapılarak yapılan 30 dakikalık iskemisi periyodunun 15. dakikasında tedaviler intravenöz olarak uygulandı. İskemisi sonrası 180 dakika reperfüzyon periyodunda takip edilen sıçanlar, deney sonunda kalpleri çıkartılarak dilimlendi ve boyandı. Fotoğrafları çekilerek infarkt alanı ve risk bölgesi hesaplandı. Değerler 6 sıçanın ortalama \pm standart hatası olarak verildi. İstatistiki değerlendirme tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile yapıldı. (*p< 0,05)



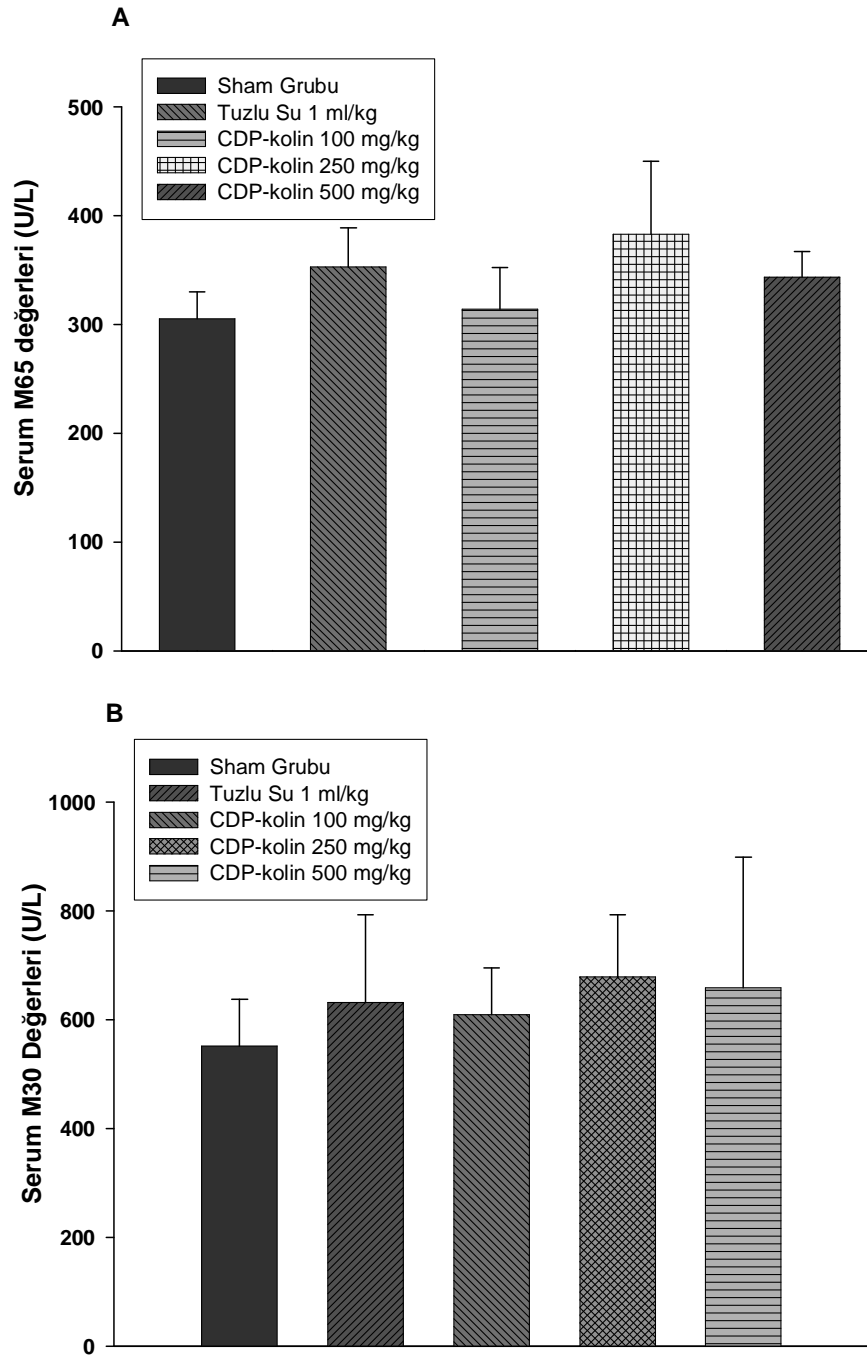


Şekil-8: Uzun dönem miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon yapılan sıçanlarda CDP-kolin ve Tuzlu su tedavilerinin miyokardiyal infarkt üzerine etkisi:

Yukarıda verilen fotoğraflarda beyaz çizgi ile sınırlanmış alanlar, sol ana koroner arter bağlanması sonucu iskemiyeye uğrayan risk alanını; sarı çizgi ile sınırlanmış ve daha yoğun gri görülen alanlar, infarkt alanını; açık ve parlak olarak görülen alanlar ise akrinin turuncusu tutan risk alanı dışındaki normal miyokardı göstermektedir.

2. Uzun Dönem Kalp İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda CDP-kolin'in Apoptozis Üzerine Etkisinin Serum M30 ve M65 Apoptotik İşaretleyiciler Aracılığı ile Doz-Yanıt İlişkisinin İncelenmesi

Deneyimizin sonunda 210. dk alınan kan örnekleri ile yapılan ölçümler sonucunda M30 ve M65 ölçümleri sonrası gruplar arasında anlamlılığa rastlanmamıştır. (Şekil-9 A-B)

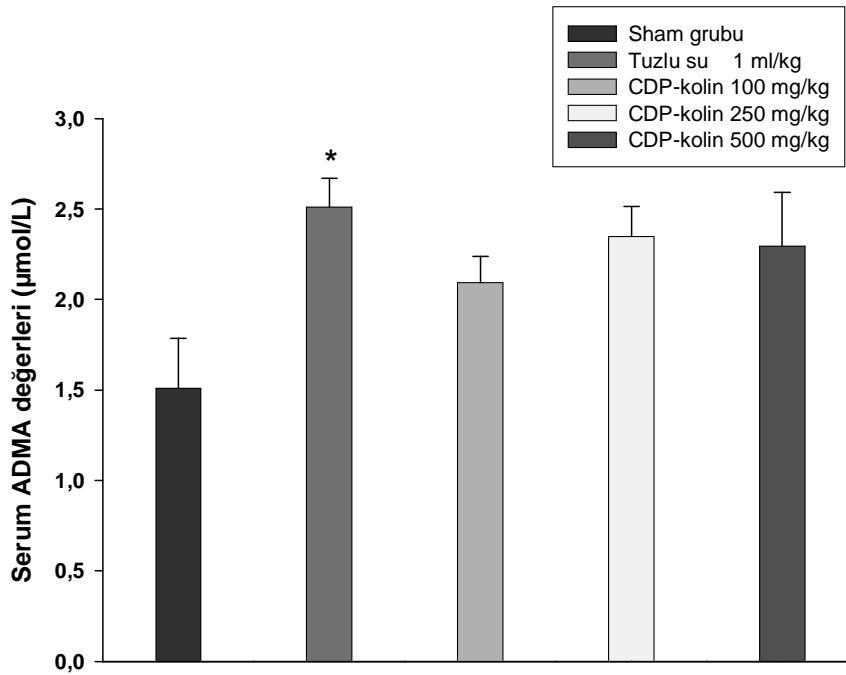


Şekil-9: İntravenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin ve Tuzlu su tedavisinin uzun dönem miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarında kan M65 ve M30 düzeylerine etkileri: doz ve zaman ilişkisi

CDP-kolin tedavisinin apoptozis üzerine doz ve zaman bağımlı etkilerini incelemek için; deney bitiminde (210. dakikada) kan örnekleri alındı ve serumları ayrılarak M65 (A) ve M30 (B) parametreleri ölçüldü. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi. İstatistiki değerlendirme tek yönlü ANOVA testi ile yapıldı.

3. Uzun Dönem Kardiyak İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda CDP-kolin'nin Kan ADMA Değerleri Üzerine Etkisi: Doz-Yanıt İlişkisinin İncelenmesi

Deney sonunda toplanan kan örneklerinden yapılan ölçümlerde; serumda bulunan ADMA (asimetrik dimetil arjinin) miktarları tuzlu su grubunda sham grubuna göre anlamlı artış bulundu. CDP-kolin tedavileri sonrası ise her üç dozda da anlamlılık saptanamadı (Sekil-10).



Şekil-10: İntravenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin ve tuzlu su tedavisinin uzun dönem miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarında kan ADMA düzeylerine etkileri : doz ve zaman ilişkisi

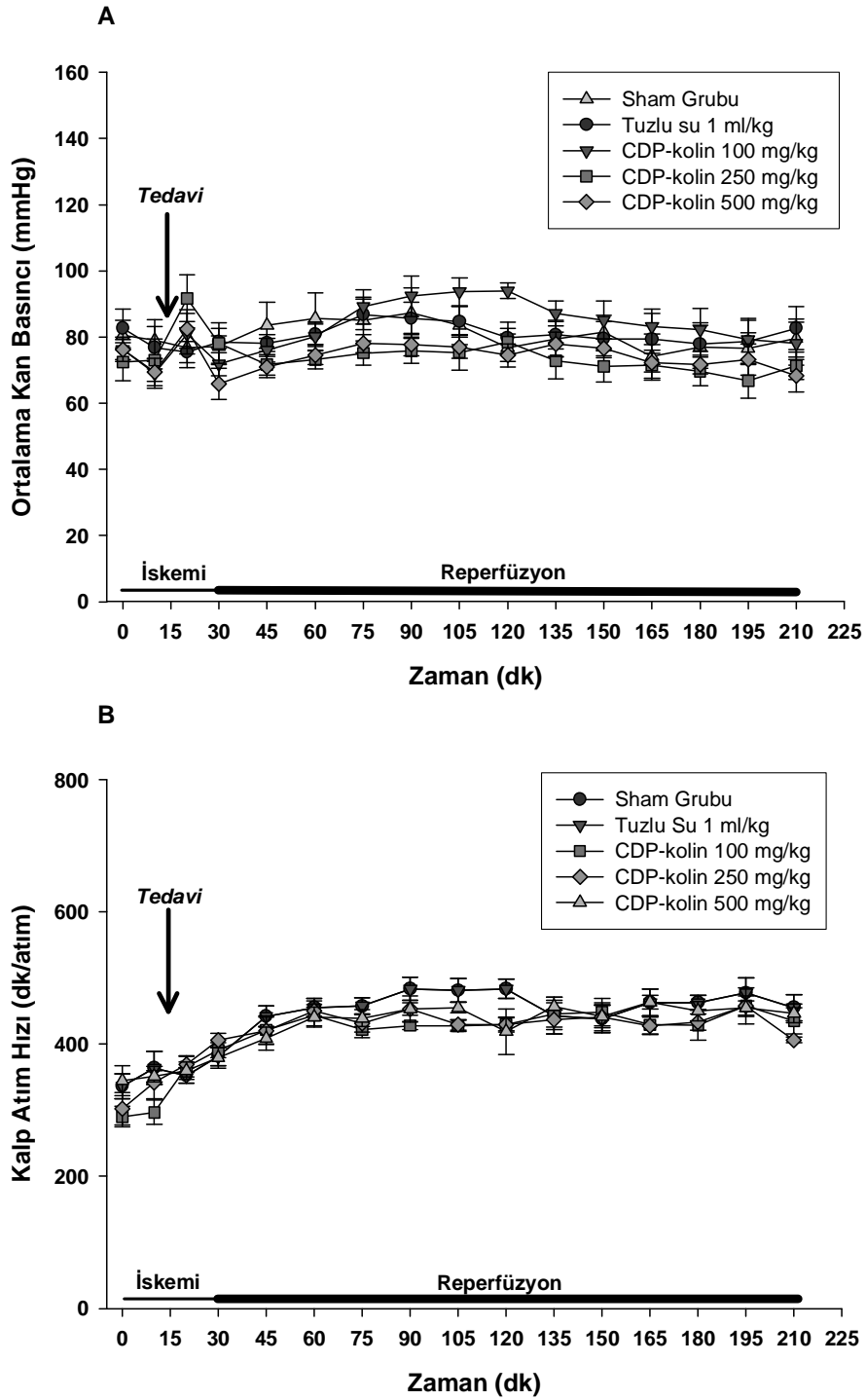
Kan ADMA ölçümü için örnekler deney sonunda 210. dakikada alındı. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi. İstatistiki değerlendirme One way ANOVA testi ile yapıldı. (* $p < 0,05$, sham grubuna göre anlamlı)

4. Uzun Dönem İskemi-Reperfüzyon Hasarının Kan Basıncı, Kalp Atım Sayısı Üzerine Etkisi

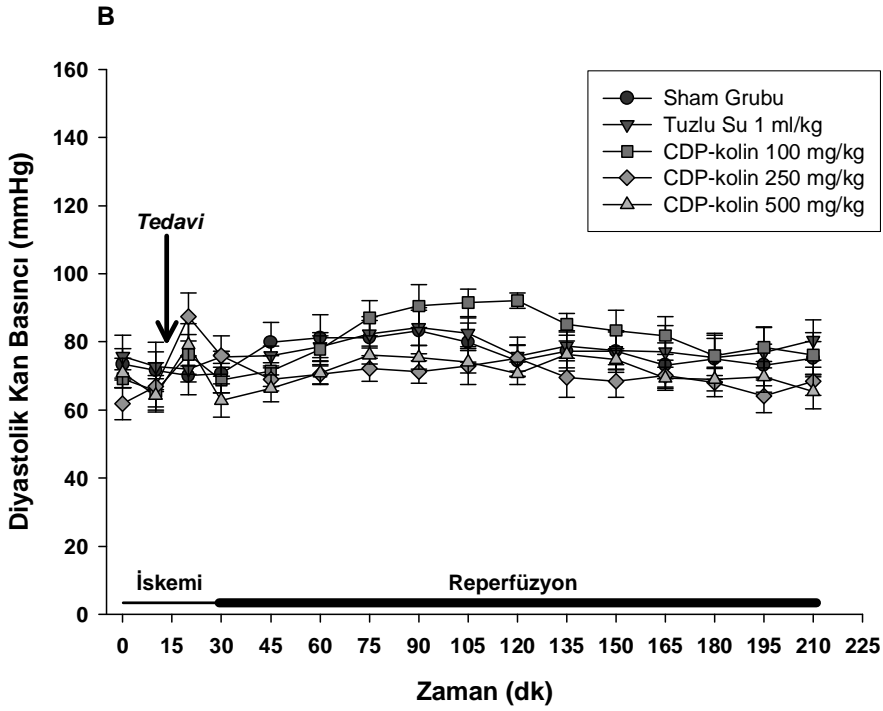
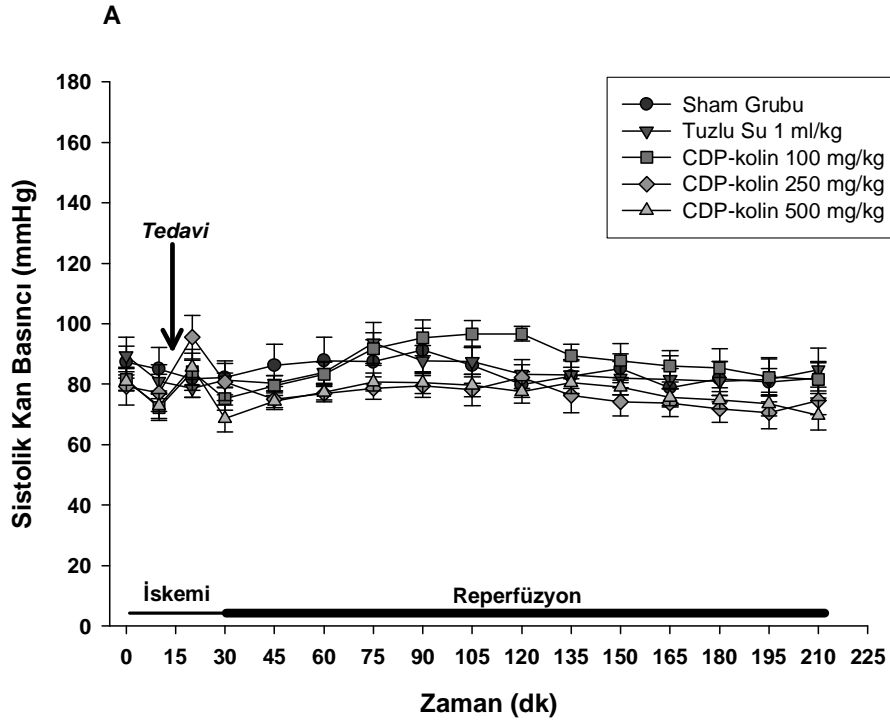
Stabilizasyon periyodunun sonunda EKG'lerinde aritmi, ventriküler taşikardi (VT) ya da ventriküler fibrilasyon (VF) tespit edilen sıçanlar ve ortalama kan basıncı 60 mmHg'nın altında olan sıçanlar deney dışında bırakıldılar. Deney başlamadan stabilizasyon sırasında grupların ortalama kan basıncı 76 ± 5 mmHg olarak ölçüldü. İskemi periyodunun başlaması ile birlikte ortalama kan basıncı (8-10) mmHg düştü (Şekil 11A) ancak kalp atım sayısında anlamlı bir değişiklik olmadı (Şekil 11B).

5. Uzun Dönem Kardiyak İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda CDP-kolin'nin Kan Basıncı, Kalp Atım Sayısı Üzerine Etkisi: Doz-Yanıt İlişkisinin İncelenmesi

CDP-kolin (100, 250, 500 mg/kg) ve tuzlu su (1ml/kg) tedavisi iskeminin başlatılmasından 15 dakika sonra hayvanlara intravenöz olarak uygulandı. CDP-kolin tedavisi sonrası ilk dakika içerisinde kan basıncında artış görüldü. CDP-kolin tedavileri sonrası 1. dakikada kan basıncı artışları; 100 mg/kg tedavisi sonrası ortalama $36,4 \pm 3,1$ mmHg, 250 mg/kg tedavisi sonrası $44,8 \pm 4,4$, 500 mg/kg tedavisi sonrası $37,7 \pm 3,5$ görüldü. (Şekil:11A) Tuzlu su grubunda ise anlamlı bir kan basıncı artışı görülmedi. Bütün gruplarda kan basıncı artışı görülmesine rağmen kalp atım hızında anlamlı bir değişim gözlenmedi. (Şekil 11B) Kan basıncında ki bu artışların tedavi sonrası 15. dakikada geri döndüğü görüldü. Sistolik ve diyastolik kan basınçlarında da bu artışlar görüldü (Şekil 12A ve 12B)



Şekil-11: İntravenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin ve Tuzlu su tedavisinin uzun dönem miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarında ortalama kan basıncına ve kalp atım hızına etkileri : doz ve zaman ilişkisi Tedaviler iskemi periyodunun 15. dakikasında tuzlu su (1 ml/kg) ve CDP-kolin (100, 250, 500 mg/kg) intravenöz olarak yapıldı. Kayıtlar 210 dakika boyunca ortalama kan basıncı (A), kalp atım hızı (B) olarak gösterildi. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi. İstatistiki değerlendirme iki yönlü RM-ANOVA'yı takiben TUKEY testi ile yapıldı.

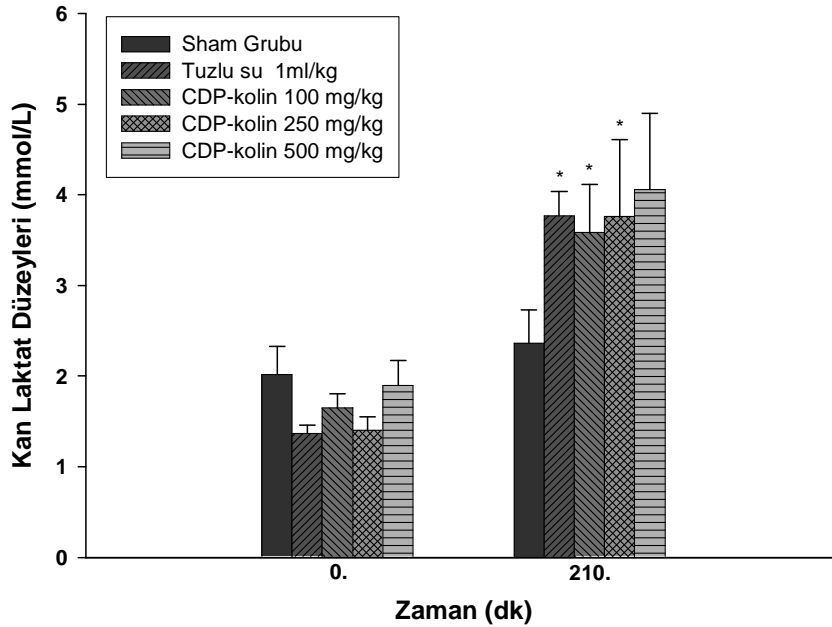


Şekil 12: İntravenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin ve tuzlu su tedavisinin uzun dönem miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarında sistolik ve diyastolik kan basıncına etkileri : doz ve zaman ilişkisi

Tedaviler iskemi periyodunun 15. dakikasında tuzlu su (1 ml/kg) ve CDP-kolin (100, 250, 500 mg/kg) intravenöz olarak yapıldı. Kayıtlar 210 dakika boyunca (A) sistolik kan basıncı, (B) diyastolik kan basıncı olarak gösterildi. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi. İstatistiksel değerlendirme iki yönlü RM-ANOVA'yı takiben TUKEY testi ile yapıldı.

6. Uzun Dönem İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda CDP-kolin'nin Kan Laktat ve Hemogram Değerleri Üzerine Etkisi: Doz-Yanıt İlişkisinin İncelenmesi

Deneyde alınan kan örneklerinden ölçülen laktat değerlerinde, CDP-kolin tedavisinin tuzlu su tedavisine göre anlamlı bir etkisi gözlenmedi. (Şekil 13) Aynı şekilde hemoglobin ve hematokrit ölçümlerinde tedavilerle veya zamanla herhangi bir anlamlılık gözlenmedi.

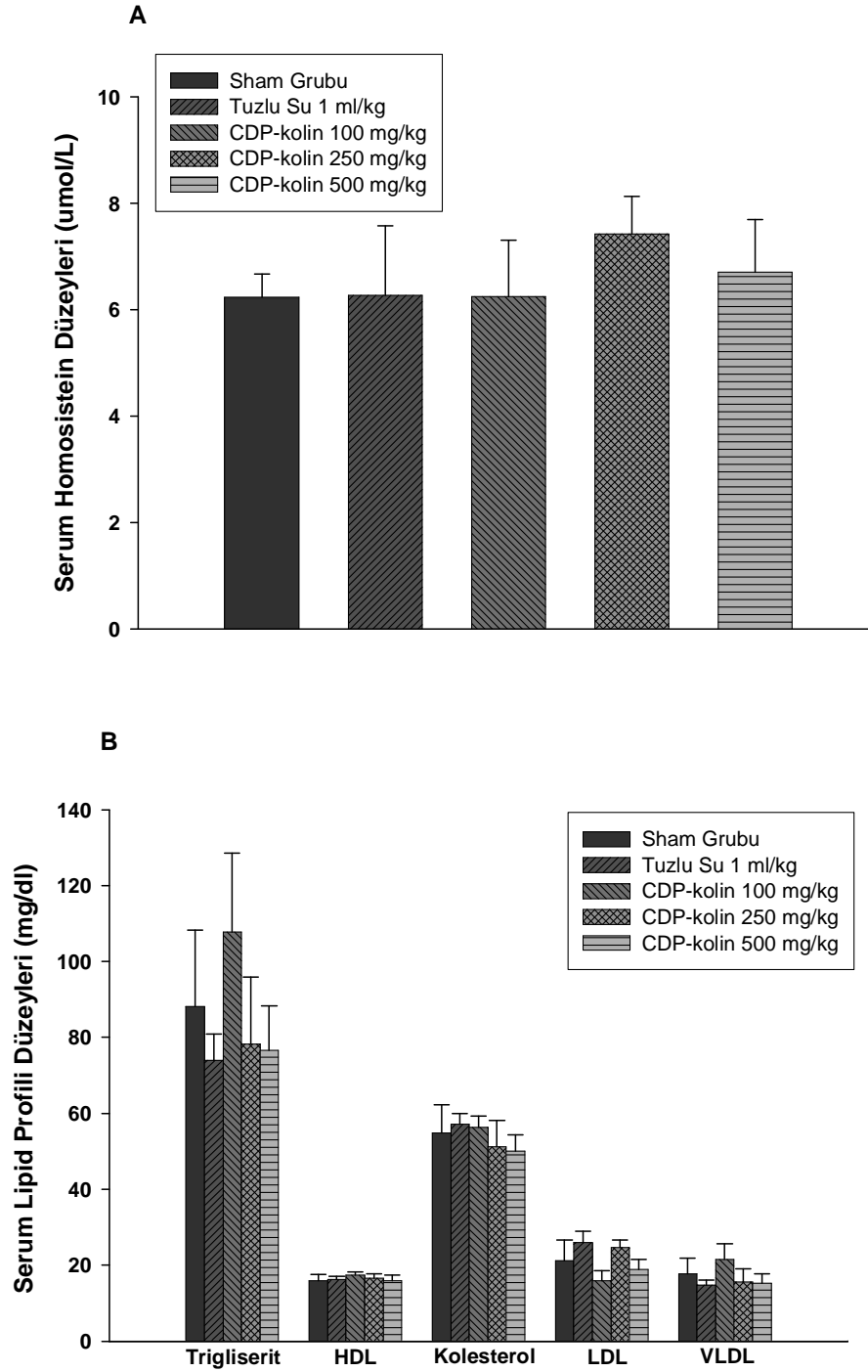


Şekil-13: İntravenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin ve tuzlu su tedavisinin uzun dönem miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarında kan laktat düzeylerine etkileri : doz ve zaman ilişkisi

Kan laktat ölçümü için örnekler 0. ve deney sonunda 210. dakikada alındı. . Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi. İstatistiki değerlendirme Wilcoxon işaret testi ile yapıldı (* $p < 0,05$, kendi gruplarının 0. dakikasına göre anlamlı).

7. Uzun Dönem İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda CDP-kolin'nin Homosistein ve Lipid Profilinine Etkisi Açısından Doz-Yanıt İlişkisinin İncelenmesi

Deney sonunda alınan kan örneklerinden yapılan homosistein (Şekil-14A) ve lipid profili (Trigliserit, HDL, Kolesterol, LDL, VLDL)(Şekil-14B) ölçümlerinde CDP-kolin tedavisinin anlamlı bir etkisi gözlenmedi.



Şekil-14: İntravenöz yol ile enjekte edilen CDP-kolin ve tuzlu su tedavisinin uzun dönem miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarında Homosistein ve Lipid profili (Trigliserit, HDL, Kolesterol, LDL, VLDL) düzeylerine etkileri : doz ve zaman ilişkisi

CDP-kolin'in doza ve zamana bağımlı olarak serum Homosistein (A) ve Lipid Profili (B) üzerine etkileri incelendi. Gruplar arasında herhangi bir anlamlılık gözlenmedi. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi. İstatistiki değerlendirme tek yönlü ANOVA testi ile yapıldı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bulgularımız, uzun süreli kardiyak iskemi reperfüzyon modelinde CDP-kolin'in oluşan miyokard hasarını azalttığını göstermektedir. Kardiyak iskemi-reperfüzyon, kanda ADMA sonuçlarını anlamlı olarak yükseltmiş, CDP-kolin verilen gruplarda ADMA düzeylerinde azalma eğilimi görülmekle birlikte bu etki anlamlı bulunmamıştır. Bu deneysel modelde CDP-kolin kan M30 ve M65 düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. İlaç tedavisi uygulanan gruplarda ortalama kan basıncı, kalp hızı, sistolik ve diyastolik kan basıncı gibi hemodinamik parametrelerde ve kan laktat, hemogram, homosistein, lipid profili değerlerinde tuzlu su grubuna göre anlamlı bir farklılık olmamıştır.

CDP-kolin'in bu deneysel modelde kan basıncını değiştirmemesi beklenen bir etki değildir. Çünkü Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda CDP-kolin'in intraserebroventriküler ve intravenöz yolla enjeksiyonunun normal koşullarda kan basıncını artırdığı gösterilmiştir (8,9,10,12). CDP-kolin, sıçanlarda kanatma ile oluşturulan hemorajik şokta hipotansiyonu düzeltmekte ve hayvanlarda ortalama yaşam sürelerini uzatmaktadır (9). Belirtilen koşullarda CDP-kolin'in kardiyovasküler etkilerinde merkezi kolinerjik sistemin uyarılması sonrası nöronal nikotinic reseptör aktivasyonunun aracılığı olduğu bilinmektedir (9,12). Yine bu koşullarda ilacın kardiyovasküler etkileri sıçanların ortalama yaşam sürelerinin uzamasında rol oynamaktadır. Diğer taraftan, servikal seviyede yapılan spinal kord kesisiyle oluşturulan spinal şok koşullarında ve kısa süreli kardiyak iskemi reperfüzyon ile oluşturulan kardiyojenik şok koşullarında da CDP-kolin tedavisi kan basıncını kısa süreli olarak artırmaktadır (68). Gerek bu çalışmalarda gerekse bu tezde CDP-kolin aynı dozlarda ve intravenöz yolla verilmiştir. Bu çalışmamızda kardiyovasküler etkisinin gözlenmemesi deneysel modelin farklı oluşuyla açıklanabilir ve kardiyak koruyucu etkisinde kardiyovasküler etkilerinin aracılığı olmadığını göstermektedir. Benzer şekilde spinal şok koşullarındaki doku koruyucu etkisinde de kan basıncını artırıcı etkisinin aracılığı olduğu düşünülmemiştir. Çünkü etki kısa sürelidir ve deneyin ikinci

gününde ortaya çıkan histopatolojik düzelmeyi açıklamaktan uzaktır. Bu çalışmada CDP-kolin tedavisinin oksidatif stres parametrelerinde anlamlı düzelme oluşturduğu da gösterilmiş ve doku koruyucu etkisinde bu antioksidan etkinin aracılığı olabileceği ileri sürülmüştür (68). Benzer etki mekanizması bu çalışmadaki CDP-kolinin gözlenen kardiyak dokuyu koruyucu etkisi için de geçerli olabilir. Çünkü iskemi sırasında fosfatidilkolin parçalanmakta ve hem hücre zarı hasarlanmakta hem de açığa çıkan serbest yağ asitleri serbest radikallere dönüşerek iskemik hasarın artmasına yardımcı olmaktadır (69). Dışarıdan CDP-kolin verilmesi sonucu fosfatidilkolin sentezinin arttığı gösterilmiştir (26). Yapılan başka çalışmalarla CDP-kolin tedavisi uygulanan hayvanlarda serbest yağ asidi oluşumu azaldığı gösterilmiştir (70). Bu bulgular ışığında CDP-kolin verilmesinin iskemi sırasında oluşan hücre membranındaki fosfatidilkolin kayıplarını önleyerek ve serbest radikal oluşumunu azaltarak miyokardı infarkta karşı koruyan etkilerini bu yollarla gösterebileceği ortaya çıkmaktadır.

Bir başka şok modeli olan kısa süreli kardiyak iskemi reperfüzyon çalışmasında da CDP-kolin kan basıncını artırmakla birlikte, bu etki reperfüzyon döneminden önce geri dönmüş ve reperfüzyon aritmilerine bağlı ölüm oranlarının azaltılmasında aracılığı olmadığı düşünülmüştür. İlginç olarak bu çalışma CDP-kolin'in kolinerjik antienflamatuvar yolağı aktive ederek koruyucu etkiler sergilediğini de ortaya çıkarmıştır (16).

Kolinerjik antienflamatuvar yolak, immün sistemin aktiflesmesi ile hem makrofajlar hemde immün veya nonimmün hücrelerden salınan sitokinlerin nervus vagusu uyarması sonucu aktive olmaktadır. Afferent nöronları aracılığı ile merkezi sinir sistemindeki ve beyin sapındaki; area postrema, nucleus tractus solitarius, dorsal motor nucleus of vagus, paraventriküler nucleus, locus ceruleus gibi merkezleri etkileyerek alınan iletiler vagal efferent nöronlar aracılığı ile periferdeki retikuloendotelial sistem ve diğer organları uyarmaktadır (71). Son dönemde yapılan çalışmalarda immün sistem hücrelerinin ve özellikle makrofajların membranlarında $\alpha 7$ nikotinik reseptörlerin varlığı büyük önem kazanmış ve uyarıldıkları durumlarda TNF-

α , İL-1 β , İL-6, İL-8 gibi sitokinlerin azaldığı ve antienflamatuar etkinin ortaya çıktığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (72-75). Bütün bu çalışmalar göstermektedir ki kolinerjik uyarılma sonucu antienflamatuar etkiler ortaya çıkmaktadır. CDP-kolinin ise etkilerini daha çok merkezi kolinerjik aktivasyon ile meydana getirdiği kısa dönem kardiyak iskemi-reperfüzyon çalışmamızda vagatomi aracılığı ile gösterilmiştir (16). Dolayısıyla çalışmamızdaki CDP-kolin'in kardiyak koruyucu etkisinde kolinerjik antienflamatuar yolun aracılığı olabilir.

CDP-kolinin tüm dozlarda aynı oranda doku koruyucu etki sergilemesi en düşük dozda bile etkisinin maksimum oranda ortaya çıktığını göstermektedir.

Akut koroner sendrom gelişmiş hastalarda ADMA düzeylerinin dört kat yükseldiği yapılan klinik çalışmalarla gösterilmiştir (66). Çalışmamızda kardiyak iskemi-reperfüzyon modelinde endotel disfonksiyonunu ve bu olayda ADMA'nın rolünü araştırmak için serumda ADMA ölçümü gerçekleştirdik. Ortaya çıkan tabloda tuzlu su grubunda sham grubuna göre anlamlı düzeyde ADMA artışı görmemize rağmen tedavi gruplarında ki artışın anlamlı olmaması, CDP-kolin tedavisinin ADMA oluşumunu kısmen de olsa engellemiş olabileceğini göstermektedir.

Miyokarda meydana gelen iskemi-reperfüzyon hasarının nedenlerinden biri de infarkt gelişimi sırasında apoptozis görülmesidir (76). Bu apoptozis sadece infarkt sınırında değil, miyokardın uzak bölgelerinde de görülebilmektedir. İskemi sonrası gelişen bu apoptozis tüm miyokardı etkilemekte ve infarkt sonrası kalp yetmezliği gibi kalbin yeniden şekillenmesinde önemli rol oynamaktadır (77). CDP-kolin tedavisinin kaspaz 3 düzeylerinde azalmaya neden olduğu ve dolayısı ile apoptozisi önlediği sıçan beyinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (78). Bizde bu çalışmamızda CDP-kolin'in apoptozise etkilerini incelemek amacıyla sitokeratin 18 ölçümüne dayanan serumda M30 ve M65 Elisa ölçümlerini gerçekleştirdik. Bu ölçümlerde gruplar arasında herhangi bir anlamlılık

gözlemlenemedi. Bunun nedenlerinden biri reperfüzyon süresinin kısa (180 dakika) olması olabilir. Çünkü daha önce akut koroner sendrom gelişmiş hastalarda yapılan bir çalışmada M30 değerlerinin 24. saatte pik yaptığı gösterilmiştir (79). Bir diğeri de belirtilen sürelerde miyokarda apoptoz ortaya çıksa bile kan parametrelerini etkileyecek bir patolojik tablo ortaya çıkmamış olabilir. Bu durumda kalp dokusunda doğrudan apoptoz görüntülenmesi ve etkinin dokuda görüntülenmesi önem kazanmaktadır. Buna yönelik çalışmalarımız başlatılmıştır.

Çalışmamız CDP-kolin'in uzun süreli miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında infarkt oluşumu üzerine etkilerini araştıran ilk araştırmadır. Sonuçlarımız anestezi altındaki sıçanlarda intravenöz olarak uygulanan CDP-kolin'in uzun dönem iskemi reperfüzyon hasarında miyokardı infarkt oluşumundan koruyabileceğini göstermektedir. İlacın bu modeldeki etki mekanizmaları ileriki çalışmalarda ortaya çıkarılacaktır.

CDP-kolin'in günümüzde çeşitli serebral iskemik olaylarda tedavi amacıyla kullanılan bir ilaç olduğu ve halen rapor edilmiş önemli bir yan etkisinin olmadığı göz önüne alınacak olursa, çalışma sonuçlarımız ilacın kardiyak iskemi reperfüzyon koşullarında da ileride tedavi amaçlı kullanılabileceğini düşündüren bulgular olması nedeniyle önem taşımaktadır.

Çalışmalarımız CDP-kolin'in doz-yanıt etkisini göstermekle birlikte bu etkinin mekanizmasına dair açıklık getirmek için projemizin devamında bu etkinin hangi yollarla gerçekleştiği ve apoptozis üzerine etkileri histolojik ve farmakolojik yöntemlerle araştırılacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- World Health Organisation . The top ten causes of death. Fact sheet 2008
- 2- Gomez M, Anderson J, Karagounis L ve ark. An emergency department-based protocol for rapidly ruling out myocardial ischemia reduces hospital time and expense: Results of a randomized study (ROMIO). Journal of the American College of Cardiology 1996;28:25-33
- 3- Perez MI, Musini VM, Wright JM. Effect of early treatment with anti-hypertensive drugs on short and long term mortality in patients with an acute cardiovascular event. Cochrane database of systematic reviews 2009; 4
- 4- Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia. J Neurosci Res. 2002;70(2):133-9.
- 5- Adibhatla RM, Hatcher JF. Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders. Neurochem Res 2005; 30(1):15-23.
- 6- Lopez-Coviella , Agut J, Savci V, Ortiz JA, Wurtman RJ. Evidence that 5'-cytidinediphosphocholine can affect brain phospholipid composition by increasing choline and cytidine plasma levels. J Neurochem 1995; 65(2):889-94.
- 7- Wurtman RJ, Regan M, Ulus I, Yu L. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. Biochem. Pharmacol 2000;1:60(7):989-92.

- 8- Savcı V, Goktalay G, Ulus IH. Intracerebroventricular choline increases plasma vasopressin and augments plasma vasopressin response to osmotic stimulation and hemorrhage. *Brain Res* 2002;942(1-2):58-70.
- 9- Savcı V, Goktalay G, Cansev M, Cavun S, Yilmaz MS, Ulus IH. Intravenously injected CDP-choline increases blood pressure and reverses hypotension in haemorrhagic shock: effect is mediated by central cholinergic activation. *Eur J Pharmacol* 2003;468(2):129-39
- 10- Cavun S, Savcı V, Ulus IH. Centrally injected CDP-choline increases plasma vasopressin levels by central cholinergic activation. *Fundam Clin Pharmacol* 2004; 18(1):71-7.
- 11- Cavun S, Savcı V. CDP-choline increases plasma ACTH and potentiates the stimulated release of GH, TSH and LH: the cholinergic involvement. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18(5):513-23.
- 12-Savcı V, Cavun S, Goktalay G, Ulus IH. Cardiovascular effects of intracerebroventricularly injected CDP-choline in normotensive and hypotensive animals: the involvement of cholinergic system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002;365(5):388-98.
- 13-Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Citicoline: Neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. *J Neurochem* 2002;80(1):12-23.
- 14- Gurun MS, Parker R, Eisenach JC, Vincler M. The effect of peripherally administered CDP-choline in an acute inflammatory pain model: The role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Anesthesia and Analgesia* 2009;108:1680-1687

- 15- Deutsch S, Rosse RB, Schwartz BL ve ark. Effect of CDP-choline and the combination of CDP-choline and galantamine differ in an animal model of schizophrenia: Development of a selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist strategy. *European Neuropsychopharmacology* 2008;18:147-151
- 16-Yilmaz MS, Coskun C, Yalcin M, Savci V. CDP-choline prevents cardiac arrhythmias and lethality induced by short-term myocardial ischemia-reperfusion injury in the rat: involvement of central muscarinic cholinergic mechanisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008;378(3):293-301.
- 17- Weiss GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci* 1995; 56:637-660
- 18- Cohen EL, Wurtman RJ. Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. *Life Sci* 1975;16(7):1095-102
- 19- Lockman PR, Allen DD. The transport of choline. *Drug Dev Ind Pharm* 2002;28(7):749-71.
- 20- Blusztajn JK, Wurtman RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science* 1983;221(4611):614-20.
- 21- Cohen EL, Wurtman RJ. Brain acetylcholine: control by dietary choline. *Science* 1976;191(4227):561-2.
- 22- Ulus IH, Hirsch MJ, Wurtman RJ. Trans-synaptic induction of adrenomedullary tyrosine hydroxylase activity by choline: evidence that choline administration can increase cholinergic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74(2):798-800

- 23- Arslan BY, Ulus IH, Savci V, Kiran BK. Effects of intracerebroventricular injected choline on cardiovascular functions and sympathoadrenal activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17(5):814-21.
- 24- Savci V, Gurun S, Ulus IH, Kiran BK. Intracerebroventricular injection of choline increases plasma oxytocin levels in conscious rats. *Brain Res* 1996;709(1):97-102.
- 25- Savci V, Ulus IH. Central choline reverses hypotension caused by alpha-adrenoceptor or ganglion blockade in rats: the role of vasopressin. *Eur J Pharmacol* 1996;311(2-3):153-61
- 26- Savci V, Wurtman RJ. Effect of cytidine on membrane phospholipid synthesis in rat striatal slices. *J Neurochem* 1995;64(1):378-84.
- 27- Richardson UI, Watkins CJ, Pierre C, Ulus IH, Wurtman RJ. Stimulation of CDP-choline synthesis by uridine or cytidine in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Brain Res* 2003;971:161-167
- 28- Buyukuysal RL, Ulus IH; Aydın S, Kiran BK. 3,4-Diaminopyridine and choline increase in vivo acetylcholine release in rat striatum. *Eur J Pharmacol* 1995;281(2):179-85
- 29- Maire JC, Wurtman RJ. Effects of electrical stimulation and choline availability on the release and contents of acetylcholine and choline in superfused slices from rat striatum. *J Physiol (Paris)*1985;80(3):189-95.

- 30- Koppen A, Klein J, Erb C, Loffelholz K. Acetylcholine release and choline availability in rat hippocampus: effects of exogenous choline and nicotinamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1997;282(3):1139-1145
- 31- Lopez G-Coviella I, Wurtman RJ. Enhancement by cytidine of membrane phospholipids synthesis. *J. Neurochem* 1992;59:338-343
- 32- Arrigoni E, Averet N, Cohadon F. Effects of CDP-choline on phospholipase A2 and cholinephosphotransferase activities following a cryogenic brain injury in the rabbit. *Biochem Pharmacol* 1987; 36(21):3697-700.
- 33- Yilmaz MS, Yalcin M, Savci V. Cytidine 5'-diphosphocholine restores blood flow of superior mesenteric and renal arteries and prolongs survival time in haemorrhaged anaesthetized rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33(5-6):415-20.
- 34- Ilcol YO, Cansev M, Yilmaz MS, Hamurtekin E, Ulus IH. Intraperitoneal administration of CDP-choline and its cholinergic and pyrimidinergic metabolites induce hyperglycemia in rats: involvement of the sympathoadrenal system. *Arch Physiol Biochem* 2007;113(4-5):186-201.
- 35- Coskun C, Eyigor O, Cavun S, Savci V. Effect of CDP-choline on C-FOS expression in vasopressinergic and oxytocinergic neurons in supraoptic nucleus. *Neuroscience* 2008, poster presentation; 780.18/QQ44
- 36- Matsuoka T, Kawanaka M, Nagai K. Effect of cytidine diphosphate choline on growth hormone and prolactin secretion in man. *Endocrinol Jpn* 1978;25(1):55-7.

- 37-De Rosa G, Gulino A, de Rosa E, Satta MA, Aiello A, Makhoul O, Pasargiklian E. Effects of citicholine on pituitary gland function in normal subjects and in cases of idiopathic galactorrhea Clin Ter 1980; 94(4):407-14.
- 38-Hamurtekin E, Gurun MS. The antinociceptive effects of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: the involvement of cholinergic system. Brain Res 2006;1117(1):92-100.
- 39-Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Does CDP-choline modulate phospholipase activities after transient forebrain ischemia? Brain Res 2001;893(1-2):268-72.
- 40-Rigoulet M, Guerin B, Cohadon F, Vandendreissche M. Unilateral brain injury in the rabbit: reversible and irreversible damage of the membranal ATPases. J Neurochem 1979;32(2):535-41
- 41-Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia. Stroke 2001; 32(10):2376-81.
- 42-Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Lipid alterations in transient forebrain ischemia: possible new mechanisms of CDP-choline neuroprotection. J Neurochem 2000;75(6):2528-35.
- 43-Başkaya MK, Doğan A, Rao AM, Dempsey RJ. Neuroprotective effects of citicoline on brain edema and blood-brain barrier breakdown after traumatic brain injury. J Neurosurg 2000; 92(3):448-52
- 44-Schäbitz WR, Weber J, Takano K, Sandage BW, Locke KW, Fisher M. The effects of prolonged treatment with citicoline in temporary experimental focal ischemia. J Neurol Sci 1996;138(1-2):21-5.

- 45-Alvarez XA, Mouzo R, Pichel V, Pérez P, Laredo M, Fernández-Novoa L ve ark. Double-blind placebo-controlled study with citicoline in APOE genotyped Alzheimer's disease patients. Effects on cognitive performance, brain bioelectrical activity and cerebral perfusion. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999;21(9):633-44.
- 46-Secades JJ, Lorenzo JL. Citicoline: Pharmacological and clinical review, *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006;28 Suppl B:1-56.
- 47-Grieb P, Rejdak R. Pharmacodynamics of citicoline relevant to the treatment of glaucoma. *J. Neurosci Res* 2002;67(2):143-8.
- 48-Renshaw PF, Daniels S, Lundahl LH, Rogers V, Lukas SE. Short-term treatment with citicoline (CDP-choline) attenuates some measures of craving in cocaine-dependent subjects: a preliminary report. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;142(2):132-8.
- 49-Jennings RB, Murry C, Reimer KA. Myocardial effects of brief periods of ischemia followed by reperfusion. *Adv Cardiol* 1990;37:7-31.
- 50-Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res* 1997;33(2):243-57.
- 51-Buja LM, Hagler HK, Willerson JT. Altered calcium homeostasis in the pathogenesis of myocardial ischemic and hypoxic injury. *Cell Calcium* 1988;9(5-6):205-17.
- 52-Prasad KN. New opportunities with neuronal cultures to study the mechanisms of neurotoxic injuries. *Neurotoxicology* 1991;12(3):493-503.

- 53-Trump BF, Berezesky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995;9(2):219-28.
- 54-Van Kuijk FJ, Dratz EA. Detection of phospholipid peroxides in biological samples. *Free Radic Biol Med* 1987;3(5):349-354
- 55-Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J. Biol. Chem* 1988;263(3):1353-7.
- 56-Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res* 2000;86(2):117-8.
- 57-Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004;61(3):481-97.
- 58-Linz W, Schölkens BA, Albus U, Petry P, Breipohl G, Knolle J. Atrial natriuretic factor protects the isolated working ischaemic rat heart against the action of angiotensin II. *J Hypertens Suppl* 1988; 6(4):S339-41.
- 59-Xiao CY, Hara A, Yuhki K, Fujino T, Ma H, Okada Y, Takahata O, Yamada T, Murata T, Narumiya S, Ushikubi F. Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation* 2001;104(18):2210-5.
- 60-Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 2005;100(2):179-90.

- 61-Abbate A, Biondi-Zoccai G, Petrolini A, Biasucci LM, Baldi A. Clinical relevance of apoptosis in early and late post-infarction left ventricular remodeling. *Ital Heart J* 2002;3(12):699-705.
- 62-Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996;79(5):949-56.
- 63-Black SC, Huang JQ, Rezaiefar P, Radinovic S, Eberhart A, Nicholson DW, Rodger IW. Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30(4):733-42.
- 64-Long X, Boluyt MO, Hipolito ML, Lundberg MS, Zheng JS, O'Neill L, Cirielli C, Lakatta EG, Crow MT. p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1997;99(11):2635-43.
- 65- Endemann DH, Schiffrin E. Endothelial dysfunction. *Journal American Society of Nephrology* 2004;15:1983-1992
- 66- Rainer H Böger. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: Insights from prospective clinical trials. *Vascular medicine* 2005;10:19-25.
- 67- Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV, Downey JM. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol* 1994;267(6 Pt 2):H2383-90.

- 68- Coskun C, Avci B, Ocak N, Yalcin M, Dirican M, Savci V. Effect of repeatedly given CDP-choline on cardiovascular and tissue injury in spinal shock conditions: investigation of the acute phase. *J Pharm Pharmacol* 2010;62(4):497-506
- 69-Zweifler RM. Membrane stabilizer: citicoline. *Curr Med Res Opin* 2002;18 Suppl 2:14-7.
- 70- Dorman RV, Dabrowiecki Z, Horrocks LA. Effects of CDP-choline and CDP-ethanolamine on the alterations in rat brain lipid metabolism induced by global ischemia. *J Neurochem* 1983;40(1):276-9.
- 71-Pavlov VA, Wang H, Czura J, Friedman SG, Tracey KJ. The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A missing link in neuroimmunomodulation. *Molecular Medicine* 2003;9:5-8,125-134
- 72-Bernik T., Friedman SG, Ochani M., DiRaimo R., Susarla S., Czura CJ., Tracey KJ. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vascular Surgery* 2002;36:1231-1236.
- 73- Ando M, Katare RG, Kakinuma Y, Zhang D, Yamasaki F, Muramoto K, Sato T. Efferent vagal nerve stimulation protects heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin 43 protein. *Circulation* 2005;112:164-170.
- 74- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M ve ark. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458-61

- 75- Kawashima K. ve Fujij T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sciences* 2003;74: 675-696.
- 76- Bazzani C, Guarini S, Botticelli AR ve ark. Protective effect of melanocortin peptides in rat myocardial ischemia. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2001;297:3;1082-87
- 77- Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis* 2009;14(4):536-48.
- 78- Fiedorowicz M, Makarewicz D, Stańczak-Mrozek KI, Grieb P. CDP-choline (citicoline) attenuates brain damage in a rat model of birth asphyxia. *Acta Neurobiol Exp* 2008;68(3):389-97.
- 79- Senturk T, Aydinlar A, Yilmaz Y, Oral AY, Ozdabakoglu O, Ulukaya E. Serial changes in circulating M30 antigen, a biomarker of apoptosis, in patients with acute coronary syndromes: relationship with the severity of coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2009;20(8):494-8.

ÖZGEÇMİŞ

26 Temmuz 1974 yılında Kütahya'da doğdum. İlkokulu Kütahya Gazi Kemal İlköğretim okulunda okudum. Ortaokul öğrenimimi Kütahya Lisesi'nde, lise öğrenimimi ise Ankara Yüce Fen Lisesi'nde 1991 yılında tamamlayarak mezun oldum. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazanarak tıp eğitimime başladım. 2001 yılında tıp doktoru ünvanı alarak bu fakülteden mezun oldum. 2005 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım ve halen bu eğitime devam ediyorum. Bu eğitim boyunca çeşitli bilimsel projelerde görev aldım. Yabancı dil olarak İngilizce biliyorum. Evliyim

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim başından sonuna kadar bana büyük emek harcayan ve uzmanlık tezimi hazırlamamda katkıları olan başta tez danışmanım Prof. Dr. Vahide SAVCI olmak üzere tüm Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. Levent R. BÜYÜKUYSAL'a, Prof. Dr. M. Sibel GÜRÜN'e, Doç. Dr. Sinan ÇAVUN'a, Doç. Dr. Gökhan GÖKTALAY'a, Doç. Dr. Mehmet CANSEV'e, uzmanlık eğitimimin başlangıcından itibaren beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uzm. Dr. Emre HAMURTEKİN ve Uzm. Dr. Murat GÜRSOY'a, , çalışmalarım esnasında bana her zaman yardımcı olan Doç. Vet.Dr. Murat YALÇIN'a ve diğer araştırma görevlisi arkadaşlarıma , essiz kimya bilgisi ve tecrübelerini daima benimle paylaşan Kimyager Sami AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu günlere gelebilmemde her zaman, her konuda, her türlü fedakarlığı yaparak yanımda bulunan anneme, babama, kardeşlerim Funda ve Sedef'e, bütün varlığıyla bana destek olan sevgili esim Sinem'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2008 /43).