

Prof. Dr. Şahin AKMAN'ın özgeçmiş

Dr. Süleyman ŞENER

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji Ab.D., İstanbul



Şahin Akman

1911 (1327) yılında Filibe'de doğdu. İlkokulu Filibe'de (1927), ortaokul ve liseyi Edirne'de okudu. 1937 yılında Yüksek Ziraat Enstitüsü Veteriner Fakültesi'nden mezun oldu. Aynı yıl, Gebze'de Stajyer Veteriner Hekim olarak göreve başladı. Askerlik hizmetini tamamlayarak Ankara Veteriner Müdürlüğü'nde görev aldı.

31 Aralık 1939 tarihinde Yüksek Ziraat Enstitüsü Veteriner Fakültesi'nde aday asistan olarak Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü'nde göreve başladı.

5 Mart 1941-1 Haziran 1942 tarihleri arasında birinci, 11 Nisan 1946 ve 7 Mart 1947 tarihleri arasında da ikinci ihtiyat askerlik görevini yerine getirdi.

21 Şubat 1945 tarihinde "Tek tırnaklıların askarilerine karşı en müessir ilacın araştırılması" başlıklı teziyle doktora çalışmasını tamamladı ve 29 Mart 1945 tarihinde baş asistan oldu.

1948 yılında "Aydın ve Muğla illerinde yetişen tıbbi ve zehirli bitkilerden en önemlilerinin farmakolojik ve toksikolojik etkileri ile bunlardan hazırlanan galenik preparatların yabancı müstahzarlarla karşılaştırılması" konulu habilitasyon (doçentlik tezi) çalışmasına başladı.

29 Ocak 1951 tarihinde doçentlik prosedürünün son aşaması olan deneme dersini (*Strikininin farmakolojik ve toksikolojik etkileri*) başarı ile vererek eylemsiz doçent, 30 Mart 1951'de eylemli doçent ve 27 Ağustos 1957 tarihinde de profesörlüğe yükseltildi.

Doçentlik yabancı dili Almanca, profesörlük yabancı dili ise Fransızca olan Prof. Dr. Şahin Akman'ın Farmakoloji ve Toksikoloji alanında yayınlanmış birçok ders kitabı ve bilimsel makalesi vardır. Özel ilgi alanları kardiyovasküler sistem farmakolojisi ve antibakteriyel kemoterapi olan Dr. Akman emekliliğine kadar A. Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsü Başkanlığı görevini sürdürmüş ve dalında pek çok bilim adamının yetişmesine önderlik etmiştir.

Dr. Akman, 1950'li yıllarda çevre toksikolojisi ile ilgilenmiş ve Murgul Bakır İşletmeleri'nin çevre ve yörede beslenen hayvanlar üzerindeki toksik etkilerini araştırmış ve çevre toksikolojisi konusunda belki de ilk denebilecek çalışmasını yayınlamıştır.

Bir Güney Ege sevdalısı olan ve yaz tatillerini bu yörede geçiren Prof. Dr. M. Şahin AKMAN 13 Temmuz 1981 tarihinde yaş haddinden (70) emekliye ayrılmış ve 1 Aralık 1989 tarihinde Ankara'da vefat etmiştir.

Rahatı iyi, rahmeti bol ola.

Nitrik oksit sentaz gen polimorfizmleri ve renal hastalıklar

Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ

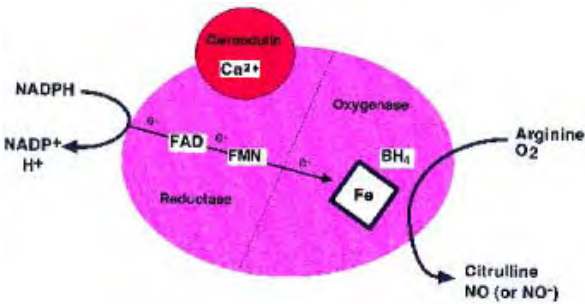
Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., Gaziantep

GİRİŞ

Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri

Nitrik oksit (NO) sentaz (NOS) enzimleri, bir çok fizyolojik olayda rol oynayan bir mediyatör molekül olan sentezinden sorumlu olan enzimlerdir. İlk olarak 1989 yılında tanımlanmalarını takiben, 1991-1994 yıllarında major izoformları ve 1998-1999 yıllarında ise NOS kristal yapıları belirlenmiştir.

NOS enzimi L-arjinin amino asidinden guanido grubunun hidrosilasyonu ile NO ve L-sitrülin sentezini katalizlemektedir. Reaksiyonda 5,6,7,8-tetrahidrobiopterin (BH₄) FAD, FMN ve demir protoporfirin IX (hem) kofaktör olarak kullanılmakta, ve sonuçta NO, L-sitrülin ve NADP oluşmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. NOS'un kofaktörleri ve katalizlediği reaksiyonlar. NADPH tarafından ortama verilen elektronlar redox taşıyıcıları FAD ve FMN tarafından oksijenaz bölgesine taşınmakta ve burada Fe ve BH₄ ile etkileşime girerek L-arjinin ve oksijenden NO ve sitrülin oluşturan reaksiyonu katalizlemektedir (Alderton et al., 2001).

NOS enzimleri aktif haldeyken 134 kd'luk iki monomerden oluşan dimerik yapıdadır. N-terminal oksijenaz bölgesinde (*oxygenase domain*) hem, BH₄ ve L-arjinin bağlanma bölgeleri bulunmakta, C terminal redüktaz bölgesinde (*reductase domain*) ise FAD, FMN ve NADPH için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bu iki bölge Ca²⁺/kalmodulin tanıma sahası ile birbirine bağlanmıştır (1).

Vücutta yaygın olarak bulunan ve çeşitli fonksiyonlarda görev alan NOS enzimlerinin,

üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar farklı genler tarafından kodlanmakta ve her bir izoformun lokalizasyonları, regülasyonları, katalitik özellikleri ve inhibitör duyarlılıkları farklıdır. İnsandaki NOS enzimleri arasında %51-57'lik bir homoloji vardır.

NOS izoformları; nNOS (tip 1, NOS-I veya NOS-1) ilk bulunandır. nNOS esas olarak santral sinir sisteminde ve periferik nitrejik sinirlerde bulunmakta ve nörotransmitter/nöromodülatör olarak görev yapmaktadır.

iNOS (tip 2 NOS-II veya NOS-2) indüklenebilir özelliktedir, hücre ve dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Fizyolojik olarak non-spesifik immünitede görev almasının yanı sıra esas olarak şok durumları, inflamatuvar hastalıklar gibi patolojik olaylarda rol oynamaktadır.

eNOS (tip III, NOS-III veya NOS-3) ilk olarak vasküler endotelial hücrelerde tanımlanmıştır. eNOS kardiyovasküler sistemde vasküler düz kas gevşemesi, damar tonüsü, trombosit agregasyonunun inhibe edilmesi gibi fizyolojik olaylarda görev almaktadır. Bu izoformlar ayrıca yapısal (*constitutive NOS, cNOS*) (eNOS ve nNOS) ve indüklenebilir (*inducible*) (iNOS) olarak ve kalsiyum bağımlı (nNOS ve eNOS) ve bağımsız (iNOS) olarak da sınıflandırılabilir (1).

Her üç izoform da ilk tanımlandıkları yerler dışında çeşitli dokularda yaygın olarak bulunmakta ve fizyolojik ve patolojik olaylarda görev almaktadırlar.

NOS izoformları tek bir atasal genden geldiği düşünülen farklı genler tarafından kodlanmaktadır. NOS enzimlerini kodlayan genler ve özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Renal NOS

İlk olarak Biondi ve ark. (2) renal medullada özellikle vaza rektanin endotelial hücrelerinde EDRF varlığını göstermiş ve medullanın oksijenasyonunda rol oynadığını bildirmişlerdir. Sonraları segmental tübüler yapılarda,

Tablo 1. NOS izoformlarını kodlayan genler ve özellikleri.

NOS izoformları	Gen yapısı ve büyüklüğü	Kromozomal yerleşim	aa sayısı, protein büyüklüğü
nNOS	29 ekzon, 28 intron, > 200kb	12q24.2- 12q 24.3	1434 aa, 161 kDa
iNOS	26 ekzon, 25 intron, 37 kb	17cen-q11.2	1153 aa, 131 kDa
eNOS	26 ekzon, 25 intron, 21-22 kb	7q35-7q36	1203aa, 133kDa

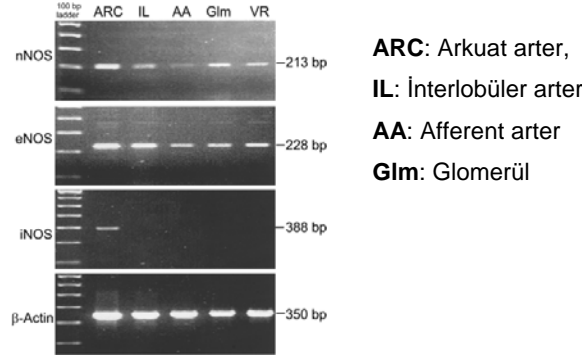
mikrodisseke yapılarda ve mikrovasküler yapılarda, NOS enzim aktivitesinin varlığı saptanmıştır (3). Bu çalışmalar sonucunda renal korteks ve medullar dokuların fazla miktarlarda NO üretme kapasitesinde olduğu gösterilmiştir. Renal tübül yapılarında; NOS I ekspresyonu; makula densa, glomerül, bazı tübül segmentleri, vaza rekta, toplayıcı tübüller, perivasküler ve pelvik sinirlerde, NOS II ekspresyonu, medullar kalın çıkan kol ve iç medulla toplayıcı tübüllerde en fazla olmak üzere kültüre mezengial hücreler, renal tübüller, renal medüller interstisyel hücreler, distal tübüller ve toplayıcı kanallarda, NOS III ekspresyonu ise; glomerül, proksimal tübül, henlenin kalın çıkan kolu, kortikal ve dış medullar toplayıcı tübüllerde saptanmıştır. İç medulladaki toplayıcı tübüller renal NOS akti-

vitesinin yoğun olarak bulunduğu en önemli bölgedir (4-6).

Renal vasküler yapılarda ise özellikle eNOS yaygın olarak bulunmasına rağmen diğer NOS izoformlarının da ekspresyonu vardır. Mattson ve ark. (7) çalışmalarında böbrekteki NOS enzimatik aktivitesinin özellikle vaza rekta ve afferent arteriyolde belirgin olduğunu, arkuat ve interlobüler arterlerde ise daha az aktivite bulunduğunu göstermişlerdir. Renal vasküler yapılardaki NOS aktivitesi kalsiyum bağımlıdır. RT-PCR kullanılarak nNOS ve eNOS mRNA aktivitesinin saptanması da bu bilgiyi doğrulamıştır. nNOS ve eNOS aktivitesi tüm vasküler segmentlerde bulunmasına rağmen iNOS aktivitesi sadece arkuat arterlerde lokalizedir (Tablo 2; Şekil 2).

Tablo 2. Renal vasküler yapılarda NOS izoformlarının dağılımı.

	nNOS mRNA	iNOS mRNA	eNOS mRNA
Glomerül	(+) Ref:8	(+) Ref:10	(+) ref:11
Vaza rekta	(+)f Ref 8		
Efferent arteriyol	(+) Ref 9		
Arkuat arterler		(+) Ref:10	(+) Ref: 11
İnterlobüler arterler		(+) Ref:10	(+) Ref:11
Afferent arteriyol			(+) Ref:11
Preglomerüler ve postglomerüler damarlar			(+) ref:9



Şekil 2. nNOS, eNOS ve iNOS RT-PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri (Mattson et al., 2000).

Böbrekte bulunan NO, renal akımı, sodyum homeostazı ve arteriyel kan basıncının akut ve kronik regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. NO, proksimal tübül, kalın çıkan kol, distal tübüller ve toplayıcı kanallar gibi tüm tübüller segmentlerde Na^{2+} reabsorpsiyonunu azaltmaktadır. NO üretiminin major kaynağı olan renal medulladaki NO üretimi renal meduller kan akımı, sodyum ekskresyonu ve arteriyel basıncın uzun süreli regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Deney hayvanlarında NOS inhibitörü L-NAME'nin kronik olarak renal meduller interstisyuma infüze edilmesi renal medullar kan akımında belirgin bir azalma (yaklaşık %30) yaparken kortikal kan akımında hesaplanamayan ölçüde değişiklik yapmıştır (12). Medullar kan akımındaki bu azalma Na^{2+} ekskresyonunda hızlı azalma, Na^{2+} retansiyonu ve hipertansiyon gelişimi ile birlikte. Bu da gösteriyor ki medullada NO yapımının azalması tek başına medullar kan akımını azaltarak HT gelişmesine neden olabilmektedir.

NO, renal vasküler rezistansın düşük olmasında önemli rol oynamaktadır. Makula dısında üretilen NO, tübüloglomerüler *feed-back* mekanizma ile afferent arteriolar direnç, renal kan akımı, glomerüler filtrasyon hızı (GFR) ve renin sekresyonunun otheregülasyonunu sağlamaktadır. NOS izoformlarına spesifik inhibitörler kullanılarak yapılan çalışmalar NOS I ve/veya NOS II'den kaynaklanan NO'nun renal medullar kan akımı üzerinde minimal etki yaptığını göstermiştir (13,14). NOS III ise hem vaza rekta endotelyumunda hem de medullar kalın çıkan kol ve iç medulla toplayıcı tübüllerin epitelyal hücrelerinde bulunduğundan tübüller sodyum reabsorpsiyonu ve medullar kan akımının her ikisini de etkilemektedir (3).

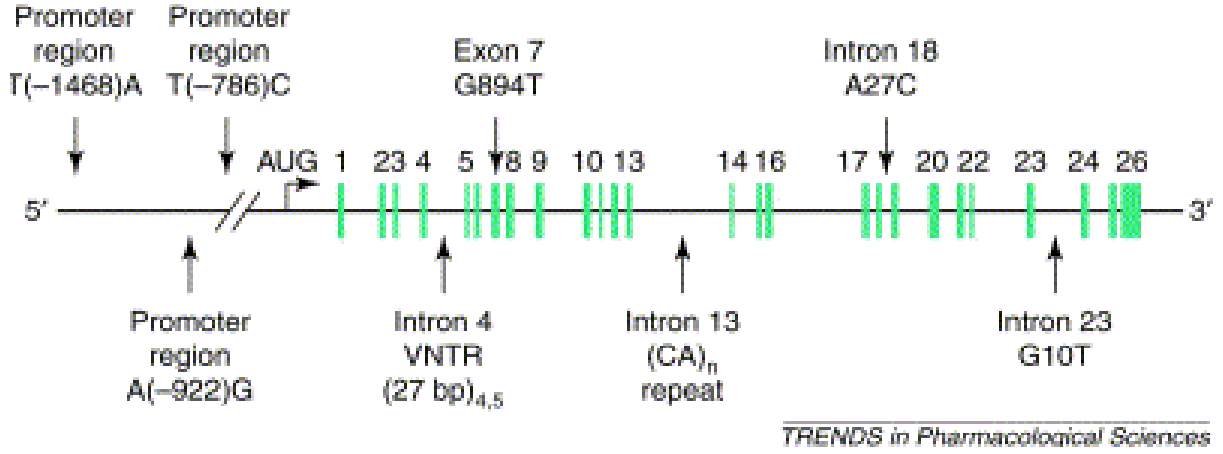
eNOS Gen Polimorfizmleri

Bir gen veya DNA dizisinin alternatif formlarından (allel) birinin toplumda %1'den fazla bulunduğu durumlar polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. eNOS geninde bugüne kadar tanımlanmış olan yaklaşık 161 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bulunmasına rağmen fonksiyonel önemi olan polimorfizmler şunlardır (Şekil 3):

- İtron 4, 27 bp'lik variable number tandem repeat (VNTR) (4b/4a)
- Ekson 7, missense Glu298Asp
- İtron 13, CA repeat
- İtron 18, Ala27Cys (A-C nükleotid değişimi, SNP)
- İtron 23, Gly10Thr (G-T nükleotid değişimi, SNP)
- Promoter bölgesinde 3 tane SNP tanımlanmıştır. Thr786Cys, Ala922Gly, Thr1468Ala.

Glu298Asp polimorfizmi protein dizisinde değişiklik yapan tek polimorfizmdir. Proteinin primer yapısını bozarak, enzimde fonksiyonel değişiklikler oluşturmaktadır. eNOS geni 7. eksonunda guanin (G) nükleotidinin timin (T) ile yer değiştirmesi enzim yapısında 298 numaralı glutamat'ın (Glu) aspartat'a (Asp) dönüşmesine neden olmaktadır.

Bu polimorfizm ile eNOS geninde 100 kDa ve 35 kDa ürünler ve sonuçta parçalanmaya eğilimli protein ürünleri oluşmaktadır. Yani bu polimorfizm eNOS proteininde fonksiyonel etki yapmaktadır (20).



Şekil 3. eNOS geni polimorfizmleri.

eNOS genindeki polimorfizmler ile NO seviye-leri arasında ilişki olup olmadığını araştırmak üzere, genotip ve serum nitrit/nitrat (NOx) ve/veya NO seviyelerinin karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalarda çelişkili sonuçlar alınmıştır. İntron 4 VNTR polimorfizminde NOx düzeyleri aa genotipine sahip olanlarda (yaklaşık %20) ve a alleli taşıyanlarda da anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (15). Ekson 7 Glu298Asp polimorfizminde ise TT genotipi ve T alleli taşıyanlarda anlamlı olarak daha düşük NOx seviyeleri saptanırken, aynı çalışmada intron 4 VNTR ve intron 23 G10-T polimorfizmleri ile NOx düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır (16). Sağlıklı Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada da, ekson 7 Glu298Asp polimorfizmi ile NO düzeyleri karşılaştırılmış ve T alleli taşıyanlarda NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (17). Benzer şekilde Veldman ve ark. (18) çalışmalarında Glu298Asp polimorfizminin bazal NO salınımını azalttığı gösterilmiştir. Shin ve ark (19) çalışmalarında ise sağlıklı Kore popülasyonunda Glu298Asp polimorfizmi ile plazma NO seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

eNOS gen polimorfizmleri ve renal hastalıklar

eNOS gen polimorfizmleri ile çeşitli hastalıklar arasında ilişki olup olmadığı farklı hasta gruplarında çalışılmıştır. Renal hastalıklarda ise özellikle tip I veya tip II diyabetik veya non-diyabetik son dönem böbrek hastalarında (ESRD) eNOS geni intron 4a/b polimorfizmi ve glu298asp

polimorfizmi çeşitli gruplar tarafından çalışılmıştır. Kronik glomerulonefrit

(KGN), diyabet, hipertansiyon, polikistik böbrek hastalığı, lupus nefriti, vaskulit, reflü, obstrüktif nefropati, otosomal dominant polikistik böbrek hastalığı (ADPKD) ve interstisyel nefrit gibi renal hastalıklar sonucu ESRD gelişen ve hemodiyalize giren hastalarda Glu298Asp mutasyonu kontrollere göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Bu çalışmalarla diyabet ve nefropatisi olan hastalar için Glu298Asp polimorfizminin kötü prognoz ve ESRD'ye gidiş için bir risk oluşturduğu (21,22), benzer şekilde, eNOS intron 4 VNTR polimorfizmi a allelinin diyabetik ve non-diyabetik hastalar, kronik glomerulonefrit, membranöz nefropati ve lupus nefriti gibi renal patolojilerde hastalığın prognozu ve ESRD'ye gidiş için olası bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (23-29).

Literatürde nefrotik sendrom (NS) ve NO yolağının ilişkisinin araştırıldığı çok az çalışma vardır. NS'li çocuk hastalarda kan ve idrarda nitrit/nitrat düzeyleri relaps ve remisyon dönemlerinden bağımsız olarak yüksek bulunmuştur (30,31). Yani, NS'de NO yolağının bir şekilde rolü bulunmaktadır. Bu nedenle eNOS gen polimorfizminin çocuklarda sık görülen minimal lezyon nefrotik sendrom (*minimal change nephrotic syndrom*, MCNS) başta olmak üzere, akut proliferatif glomerulonefrit, Henoch-Schönlein purpurası (HSP) gibi çeşitli renal patolojilerdeki olası rolünün araştırılması için bu çalışmalar planlanmıştır.

Bizim çalışmalarımız Pediatrik Nefroloji Bilim Dalı ile sürdürülmekte olan çalışmalardır. Pe-

diatrik grupta eNOS enzimi Glu298Asp polimorfizmi ile çeşitli renal hastalıklardaki hastalık riski, prognoz ve tedavi yanıtlarının incelenmesi hedeflenmektedir.

Çalışmalarımızın birisi NS'li hastalarda eNOS gen polimorfizmi ve klinik bulguların karşılaştırılmasıdır. Nefrotik sendrom; ağır proteinüri (>40 mg/m²/saat), hipoproteinemi, hiperlipidemi ve ödemle karakterize, rölaps ve remisyonlarla seyreden bir tablodur. Primer ve sekonder olmak üzere başlıca iki formu vardır. Primer formlar içinde çocuklarda en sık görüleni MCNS'dir. Daha az sıklıkta görülen diğerleri ise fokal segmental glomeruloskleroz, proliferatif glomerulonefritler (membranoproliferatif, diffüz mezengial, kreşentik) ve membranöz nefropatilerdir (32).

Devam etmekte olan diğer çalışmalarımız ise akut proliferatif glomerulonefrit ve akut nefritik (hematüri) sendromla seyredabilen Henoch-Schönlein purpurası (HSP) ve akut post infeksiyöz glomerulonefritlerde (APGN) NOS gen polimorfizminin araştırılmasıdır. Bunlardan HSP, çocukluk çağıında en sık görülen vaskülit olup başta cilt olmak üzere eklemler, gas-trointestinal sistem ve böbrekleri etkileyen multisistemik bir hastalıktır (33).

APGN ise genellikle ani başlayan, hematüri, proteinüri, oligüri ve volüm yüklenmesi ile karakterize bir tablodur. Sıklıkla enfeksiyonları (özellikle akut farenjit ve cilt enfeksiyonu) takiben gelişmektedir. Bu antijenlere karşı verilen immün cevabı belirleyen, konakçının genetik faktörleridir. İnflamatuvar işlevde ise birçok sitokin ve oksijen radikalleri salınmakta, hedef organ ise böbrekler olmaktadır (34).

MATERYAL VE YÖNTEM

Hasta ve Kontrol Grupları

Bu çalışmalarımıza 2-16 yaş arasında, klinik ve laboratuvar bulguları ile nefrotik sendrom, akut proliferatif glomerulonefrit, ve Henoch-Schönlein purpurası tanısı alan hastalar ile benzer yaş ve cinsiyetteki sağlıklı çocuklar alınmıştır. Çalışmalar için Yerel etik Kurul başvuruları yapılmış ve ebeveynlere "Bilgilendirilmiş Olur Formu" imzalatılmıştır.

eNOS Geni G298T Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Analizi

Hasta ve kontrol bireylerine ait periferik kan örneklerinden tuzla çöktürme yöntemi kullanılarak genomik DNA eldesi yapıldı (35). Çalışmaya alınan DNA örneklerinin 260 nm'de konsantrasyonları ölçülüp tüm DNA'lar son konsantrasyonları 1 mikrolitrede 100 nanogram olacak şekilde sulandırılarak ara stok hazırlandı. Yapılacak tüm çalışmalarda her bireyin DNA konsantrasyonlarının eşit olması deneylerin sağlıklı sonuç vermesi açısından önemlidir. Ayrıca ara stok hazırlanması mevcut DNA örneklerinin minimal düzeyde kullanımına imkan sağlamaktadır. Primer dizileri kaynaklardan saptanıp ilgili firmaya sentezlettiler. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) sağlıklı sonuç verebilmesi için uygun primer konsantrasyonu gerektiğinden ana stoktan 1:99 (primer:steril distile su) oranında sulandırılarak 260 nm'de konsantrasyonları ölçüldü, sonuçta primer son konsantrasyonu 1 mikrolitrede 110 nanogram olacak şekilde ara stok hazırlandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, DNA üzerinde incelenmesi istenen bölgenin oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntemde, denatürasyon ile çift zincirin birbirinden ayrılması, primerlerin ayrılmış olan DNA zincirlerine bağlanması ve hedef bölgenin DNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenmesi gerçekleşmektedir. Bu aşamalar 30-35 kez tekrarlanmaktadır (36).

eNOS geni Glu298Asp polimorfizmi ilgili bölgenin PCR ile çoğaltılması için kullanılan primer dizileri: F-5'-AAGGCAGGAGACAG TGGATGGA-3' ve R-5'-CCAGTCAATCCC TTTGGTGCTCA-3' dir. Çalışmada kullanılan malzemeler ve reaksiyon içeriği aşağıda verilmiştir gibidir. Amplifikasyonun kontrolü %2'lik agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır (37,38).

eNOS PCR içeriği

<u>PCR</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
10X Buffer	1X (Fermentas)
MgCl ₂	1.5mM (Fermentas)
dNTPs	0.05mM (Sigma)
Primer F	0,5 pmol
Primer R	0,5 pmol

Taq DNA Polimeraz 0,02 U(Fermentas)
DNA 2 ng

ddH₂O ile 25 ml 'ye tamamlandı.

eNOS PCR koşulları

94 °C	5'	
<hr/>		
94 °C	1'	35 döngü
66 °C	1'	
72 °C	45"	
<hr/>		
72 °C	7'	

PCR ürünlerinin gözlenebilmesi için %2'lik agaroz jel hazırlanması:

Agaroz	2 g
TE (Tris-EDTA) Tampon	100 ml
Etidyum bromür	2 µl

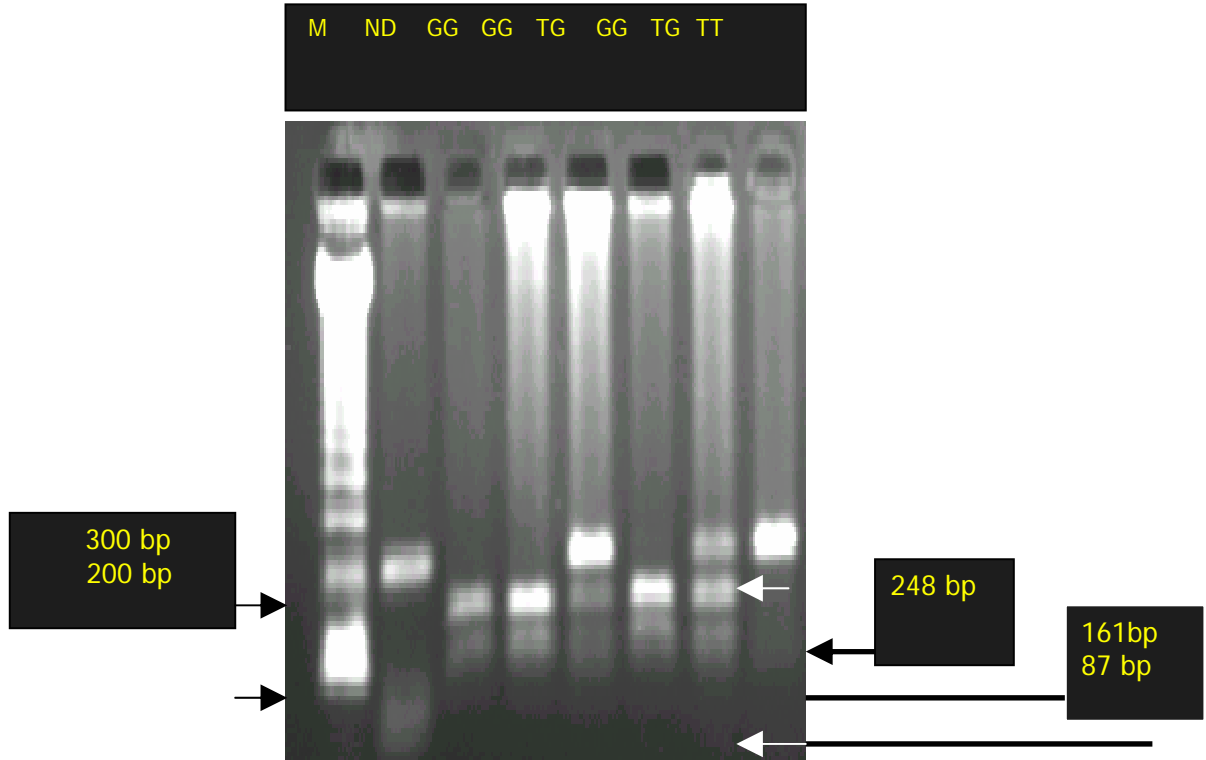
Jelin hazırlanmasından sonra örnekler jel üzerindeki yuvalara konuldu, 20 dk 120 V akım uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Örneklerin doğru büyüklükte olup olmadıklarını kontrol etmek için 100bp DNA marker (Fermentas) kullanıldı. Etidyum bromür bağlandığından dolayı UV'de görünür hale gelen örnekler UV altında incelendi.

BanII ve Mbol endonükleazlar ile kesim reaksiyonu

10 X Tampon	
BanII/Mbol kesim enzimi	0.5 U
PCR ürünü	10 ml

distile su ile 20 ml'ye tamamlandı.

Bu şekilde hazırlanan kesim reaksiyon tüpleri 37° C'de 15-16 saat inkübe edildi. Kesim ürünleri %3'lük agaroz jelde elektroforez işlemine maruz bırakıldıktan sonra UV'de fotoğrafları çekildi (Şekil 4). Fotoğrafta görüldüğü gibi G alleli olduğunda BanII enzimi için kesim bölgesi oluşmaktadır. BanII enzimi için kesim bölgesi içeren homozigot bireylerde (GG)163 ve 85 baz-çiftlik iki ayrı bant gözlemlendi. Heterozigot bireylerde ise (GT) 248, 163 ve 85 baz çift uzunluğunda 3 bant gözlemlendi. BanII enzimi için kesim bölgesi içermeyen bireylerde (TT) sadece 248 baz çift uzunluğunda bant gözlemlendi. BanII enzimi ile kesim reaksiyonuna maruz bırakılan örneklerden TT genotipine sahip olanlar kont-



Şekil 4. eNOS Glu298Asp polimorfizmi jel elektroforez görüntüsü.

Tablo 3. APGN hasta ve kontrol gruplarında eNOS genotip sıklığının karşılaştırılması

Genotip	APGN (n= 21 (%))	Kontrol (%) (n= 90 (%))
TT	2 (.10)	15 (.16.6)
TG	1 (.5)	28 (.31.1)
GG	18 (.85)	47 (.52.2)

Tablo 4. NS hasta ve kontrol gruplarında eNOS genotip sıklığının karşılaştırılması.

Genotip	NS (n= 68)	Kontrol ol (%) (n= 90)	p	Odds ratio CI 95%
TT	20 (.29)	15 (.16.6)	0.04	2.083 0.9730-4461
TG	16 (.47)	28 (.31.1)	0.1	0.6813 0.3328-1.395
GG	32 (.24)	47 (.52.2)	0.3	0.8132 0.4327-1528

rol amacı ile Mbol enzimi ile kesim reaksiyonuna maruz bırakıldılar. Mbol enzimi T alleli olduğunda bu ürünü 158. bazdan kesmektedir. Mbol enzimi için kesim bölgesi içeren homozigot bireylerde (TT)158 ve 90 baz çiftlik iki ayrı bant gözlemlendi. Heterozigot bireylerde (TG) ise 248, 158 ve 90 baz çift uzunluğunda 3 bant gözlemlendi. Mbol enzimi için kesim bölgesi içermeyen bireylerde (GG) sadece 248 baz çift uzunluğunda bant gözlemlendi.

BULGULAR

APGN hasta ve kontrol gruplarındaki çalışmalar devam ettiğinden henüz kesin sonuçlar verilememektedir. Kontrol grubu olarak aldığımız 90 sağlıklı bireyde yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar Japon ve Kore gibi uzak doğu popülasyonları ile belirgin farklılık göstermekte, ancak içinde Türk popülasyonunda yapılmış çalışmaların da bulunduğu Kafkas popülasyonlarıyla benzerlik göstermektedir. Bu hasta grubundaki sayımız henüz 21 gibi oldukça yetersiz bir sayı olduğundan belirli bir sonuçtan bahsedilemez. Bu gruptaki çalışmalarımızda APMN'li hastalarda renal tutulumun derecesi, HT varlığı ve derecesi, tedavi yanıtları gibi klinik bulgularla genotipler arasında ilişki olup olmadığı yüksek sayıdaki hasta grubu ile belirlenebilecektir. Tablo 3'te şimdiye kadar elde edilen sonuçlar özetlenmiştir.

NS hasta grubunun (n= 68) kontrol grubu ile karşılaştırılmasında eNOS geni glu298asp polimorfizmi TT genotipi, NS'li hasta grubun-

da anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 4). Ancak bu sonuçlar henüz çalışmanın kesin sonuçları olmadığından hasta sayılarının artması ile alt gruplarla ilişki kurulabilecek ve hastaların klinik gidişleri, relaps sıklıkları, kronisite, yaş, cinsiyet ve tedavi yanıtlarının genotip dağılımı ile ilişkisinin olup olmadığı belirlenebilecektir. Ancak şu andaki sonuçlarımızla da TT genotipinin NS için bir risk faktörü olduğunu söyleyebiliriz.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Böbrekte sentezlenen NO, tübüler yapılarda ve vasküler yapılarda fizyolojik olarak renal kan akımı ve bölgesel mikrosirkülasyonda ve Na⁺² homeostazında rol oynamaktadır. Çeşitli çalışmalarla renal patolojilerde L-arginin-NO yolağının rolü olduğu gösterilmiştir (30,31,39,-40). Primer glomerüler hastalıklardan minimal lezyon hastalığı çocuklarda, membranöz glomerülo nefrit, minimal lezyon hastalığı ve fokal segmental glomerüloskleroz ise erişkinlerde nefrotik sendromun en önemli sebeplerindedir. Nefrotik düzeyde proteinüriye sebep olan bütün durumlarda asıl anormallik glomerüler geçirgenliğin artmasıdır (41). Glomerüler geçirgenliği artıran neden tam bilinmemesine rağmen çeşitli faktörler suçlanmaktadır. NO gibi vasküler düzeyde bazı vazoaaktif mediyatörlerin proteinüriyi artırabileceğine dair çalışmalar bildirilmekle birlikte NO'nun nefrotik sendromdaki kesin rolü ve prognostik değeri bilinmemektedir (31).

Gerek HSP ve gerekse APGN'de renal tutulumun derecesi bireylere göre oldukça farklı olmaktadır. Klinik bulgular mikroskopik hematüriden ağır nefritik-nefrotik sendroma kadar değişen geniş bir spektrum oluşturmaktadır. HSP'de endotelial disfonksiyon oldukça önemlidir. Islek ve ark(42) çalışmalarında HSP'li hastalarda NOx düzeylerinin hastalığın akut fazında yüksek, iyileşme döneminde ise kontrollerle benzer olduğunu göstermişlerdir. Bu patolojide NO yolağının rolü (hastalığın nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu) bilinmemekte, ancak bir şekilde rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu nedenle, böbrekte tübüler ve vasküler yapılarında yoğun olarak bulunan eNOS'un genotipik varyantlarının dağılımının bilinmesi gerek hastalığa yatkınlık gerekse prognoz ve tedavi yanıtlarının değerlendirilmesi açısından önemlidir. eNOS polimorfizmlerinden intron 4a/b polimorfizmi ve glu298asp polimorfizmi tip1 ve tip2 diyabetik hastalarda, ADPKD, SLE gibi hastalıklarda renal tutulumun varlığı ve şiddeti, kötü prognoz ve ESRD'ye gidiş ile ilişkili bulunmuştur (21-29).

eNOS genindeki polimorfizmlerin hastalık riski ve/veya prognozun kötü olması üzerindeki etkileri konusunda çeşitli yorumlar yapılabilir. Şöyleki; bu polimorfizmler eNOS'un kompleks posttranslasyonel modifikasyonunu etkileyerek veya protein degradasyonunu artırarak düşük enzimatik aktivite ve endotelial disfonksiyona neden olabilir, veya başka bir deyişle NO sentezinde defekt ve buna bağlı olarak NO düzeylerinin azalmasına yol açarak renal vasküler tonusun artması ve angiotensin II etkilerinin potansiyalize olması ile renal patolojilere neden olabilir. Ancak, bir çok hastalıkta olduğu gibi renal patolojilerin de multifaktöryel olduğu ve NO aktivitesinin patoloji gelişimine bir katkıda bulunuyor olabileceği de düşünülebilir. Stratta ve ark. (29) renin-angiotensin sistemine ait genler ve NOS geni polimorfizmleri ile membranöz glomerulonefrit progresyonu arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarında ACE I/D polimorfizmi, eNOS 4b/a polimorfizmi ve angiotensinojen (AGT) M235T polimorfizmini incelenmişlerdir. Membranöz glomerulopati ve eNOS geni intron 4 VNTR polimorfizmi arasında tek başına anlamlı bir ilişki bulunamazken, ACE I/D polimorfizminin D alleli, NOS 4 b/a polimorfizminin a alleli, ve AGT M235T polimorfizminin T alleli birlikte olduğunda riskin arttığını göstermiştir.

Bu nedenle eNOS geni renal hastalıklarda aday genlerden birisi olabilir. Bu çalışmalarla yüksek sayıdaki hasta ve kontrol grupları ile renal tutulumla seyredilebilen sistemik hastalıklar ve primer renal patolojilerde kliniğin şiddeti, prognoz ve tedavi cevapları konusunda yorum yapılabilecek ve yeni bakış açıları kazanılabilecektir.

Teşekkür

Bu çalışmalarda yardım ve desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Ayşe Balat ve Öğr. Gör. Dr. Sibel Oğuzkan'a teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Biochem J 357: 593-615 (2001).
2. Biondi ML, Dousa T, Vanhoutte P, Romero JC. Am J Hypertens 3(11): 876-8 (1990).
3. Zhang W, Pibulsonggram T, Edwards A. Am J Physiol Renal Physiol 287(6): F1189-203 (2004).
4. Bachmann S, Mundel P. Am J Kidney Dis 24:112-129 (1994).
5. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HHW. Proc Natl Acad Sci USA 89:11993-11997 (1992).
6. Kone BC. Semin Nephrol 24(4):299-315 (2004).
7. Mattson DL, Wu F. Hypertension 35:337-341 (2000).
8. Wu F, Park F, Cowley AW Jr, Mattson DL. Am J Physiol Renal Physiol 276:F874-F881 (1999)
9. Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. Am J Physiol 268: F885-F898 (1995).
10. Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, Kone BC. Kidney Int 46:653-665 (1994).
11. Ujii K, Yuen J, Hogarth L, Danziger R, Starr RA. Am J Physiol. 267: F296-F302 (1994).
12. Mattson DL, Lu S, Nakanishi K, Papanek PE, Cowley AW Jr. Am J Physiol Heart Circ Physiol 266:H1918-H1926 (1994).
13. Kakoki M, Zou AP, Mattson DL. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 281(1): R91-97 (2001).
14. Mattson DL, Maeda CY, Bachman TD, Cowley AW Jr. Hypertension 31(1): 15-20 (1998).
15. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Biochem Biophys Res Commun 245: 190-193 (1998).
16. Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Clin Chem 46: 1626-1630 (2000). Erratum in: Clin Chem 47(1):151.
17. Babaoğlu MÖ, DeSantis P, Freedman JE, Abernethy DR. XVI. Farmakoloji Kongresi, S3.
18. Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA, Vervoort G, Kroon AA, de Leeuw PV, et al. J Hypertens 20: 2023-2027 (2002).
19. Shin YS, Baek SH, Chang KY, Park CW, Yang CW, Jin DC, et al. Diab Res and Clin Prac 65: 257-265 (2004).
20. Tesaro M, Thompson WC, Rogliani P, Oi L, Chaudhary PP, Moss J. PNAS USA 97: 2832-2835 (2000).

21. Suzuki H, Nagase S, Kikuchi S, Wang Y, Koyama A. Clin Chem 46(11):1858-1860 (2000).
22. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El-Khattabi O, et al. Hum Mol Genet 11: 229-241 (2002).
23. Nagase S, Suzuki H, Wang Y, Kikuchi S, Hirayama A, Ueda A, et al. Mol Cell Biochem 244: 113-118 (2003).
24. Noiri E, Satoh H, Taguchi J, Brodsky SV, Nakao A, Ogawa Y. Hypertension 40: 535-540 (2002).
25. Zanchi A, Moczulski DK, Hanna LS, Vantman M, Warram JH, Krolewski AS. Kidney Int 57(2): 405-13 (2000).
26. Buraczynska M, Ksiazek P, Zaluska W, Nowicka T, Ksiazek A. Nephrol Dial Transplant 19: 2302-2306 (2004).
27. Neugebauer S, Baba T, Watanabe T. Diabetes. 49(3): 500-503 (2000).
28. Wang Y, Kikuchi S, Suzuki H, Nagase S, Koyama A. Nephrol Dial Transplant 14: 2898-2902 (1999).
29. Stratta P, Bermond F, Guarrera S, Canavese C, Carturan S, Dall'Omo A, et al. Nephrol Dial Transplant 19: 587-595 (2004).
30. Balat A, Cekmen M, Yurekli M, Gulcan H, Kutlu O, Turkoz Y, et al. Pediatr Nephrol 15: 70-73 (2000).
31. Trachtman H, Gauthier B, Frank R, Futterweit S, Goldstein A, Tomczak J. J Pediatr 128: 173-176 (1996).
32. Barratt TM, Godfrey C. In: Pediatric Nephrology. Holliday MA, Barratt TM, Avner ED (eds), 3rd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp: 767- 787 (1994).
33. White RHR, Yoshikawa N. In: Pediatric Nephrology. Holliday MA, Barratt TM, Avner ED (eds), 3rd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp: 729- 738 (1994).
34. Cole BR, Salinas- Madrigal L. In: Pediatric Nephrology. Holliday MA, Barratt TM, Avner ED (eds), 3rd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp: 697- 718 (1994).
35. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. Nuc. Acid. Res. 16, 1215 (1988).
36. Bottema CD, Sarkar G, Cassady JD, Li S, Dutton Cm. Methods Enzymol 218: 388-402 (1993).
37. Miyamoto S, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Hypertension 32: 3-8 (1998).
38. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. Hum Genet 103: 65-69 (1998).
39. Deng A, Baylis C. Am J Physiol 33: F212-F215 (1993).
40. Ito S, Arima S, ren YL, Juncos LA, Carretero OA. J Clin Invest 91: 2012-2019 (1993).
41. Shalhoub RJ. Lancet 2(7880): 556-560 (1974).
42. Islek I, Balat A, Cekmen M, Yurekli M, Muslu A, Sahinoz S. Pediatr Nephrol 18(11):1132-1137 (2003).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Belgin ALAŞEHİRLİ
Adresi : Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ab.D. 27310 Gaziantep

Doğum Yeri : Gaziantep
Doğum Tarihi : 13 Temmuz 1961
E-posta : alasehirli@gantep.edu.tr

Eğitim Durumu

Lisans; Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi (1985).
Tıbbi Farmakoloji Uzmanlığı; Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ab.D. (1995)

Akademik Kariyer

Yardımcı Doçent Doktor; Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ab.D., Gaziantep

Yayın Listesi

II. Araştırma Makaleleri

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Alasehirli B, Cekmen M, Nacak M, Balat A. Caffeine and placental NO production: An experimental study. Curr Ther Res (baskıda).
2. Ozkur M, Erbagci Z, Nacak M, Tuncel AA, Alasehirli B, Aynacioglu AS. Association of insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with psoriasis. Br J Dermatol 151(4): 792-5 (2004).
3. Evereklioglu C, Güldür E, Alasehirli B, Cengiz B, Sari I, Pirbudak L. Excessive maternal caffeine exposure during pregnancy is cataractogenic for neonatal crystalline lenses in rats: a biomicroscopic and histopathologic study. Acta Ophthalmol Scand 82: 552-556 (2004).
4. Evereklioglu C, Ozkiris A, Alasehirli B, Sari I, Guldur E, Cengiz B, Kontas O. Effect of gestational nicotine treatment on newborn rat retina: a histopathological and morphometric analysis. Ophthalm Physiol Opt 23: 527-533 (2003).
5. Evereklioglu C, Alasehirli B, Sari I, Cengiz B, Bagci C. Effect of nicotine exposure during gestation on neonatal rat crystalline lenses. Eye 18(1): 67-73 (2003).
6. Evereklioglu C, Sari I, Alasehirli B, Guldur E, Cengiz B, Balat Z, Bagci C. High dose of caffeine administered to pregnant rats causes histopathological changes in the cornea of newborn pups. Med Sci Monit 9(5): 168-173 (2003).
7. GURSOY S, ERDAL E, HERKEN H, MADENCI E, ALASEHIRLI B, ERDAL N. Significance of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in fibromyalgia syndrome. Rheumatol Int 23(3): 104-7 (2003).
8. ZOROGLU SS, ERDAL ME, ERDAL N, OZEN S, ALASEHIRLI B, SIVASLI E. No Evidence for an Association between the T102C and 1438 G/A Polymorphisms of the Serotonin 2A Receptor Gene in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in a Turkish Population. Neuropsychobiology 47 (1): 17-20 (2003).
9. ZOROGLU SS, ERDAL ME, ALASEHIRLI B, ERDAL N, SIVASLI E, TUTKUN H, SAVAS HA, HERKEN H. Significance of serotonin transporter gene 5-HTTLPR and variable number of tandem repeat

- polymorphism in attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology* 45: 176-181 (2002).
10. Gürsoy S, Erdal E, Herken H, Madenci E, Alaşehirli B. Absence of association of the serotonin transporter gene polymorphism with the mental healthy subset of fibromyalgia patients. *Clinical Rheumatology* 21: 194-197 (2002).
 11. Araz M, Aynacıoğlu Ş, Aktaran Ş, Alaşehirli B, Okan V. Association Between Polymorphism of the Angiotensin I Converting Enzyme Gene and Hypertension in Turkish Type II Diabetic Patients. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 44(1): 29-32 (2001).
 12. Gürsoy S, Erdal E, Herken H, Madenci E, Alaşehirli B. Association of T102C polymorphism of the 5-HT2A receptor gene with psychiatric status in fibromyalgia syndrome. *Rheumatol Int* 21: 58-61 (2001).
 13. Alaşehirli B, İnalöz HS, Ünal B, Eralp A, İnalöz SS, Can İ. The Effects of Caffeine on rat skin. *Int Med J* 8 (4):299-302 (2001).

Ulusal Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Alaşehirli B, Kara AF. Gebelik ve nitrik oksid. *Anadolu Tıp Dergisi* 6:70-74 (2004).
2. Alaşehirli B, Kara AF. Gebelik ve kafein. *Çukurova Üniversitesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi (baskıda)* (2005).
3. Alaşehirli B. Kolinesteraz inhibitörleri. *Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel Sayısı (baskıda)* (2005).
4. Alaşehirli B, Aksulu HE. Tavuklarda uzun süreli anjiotensin dönüştürücü enzim inhibisyonunun hipertansiyon ve ateroskleroz üzerindeki etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* 9: 22-27 (2000).
5. Sönmez OF, Ünal B, Yüncü M, Eralp A, Alaşehirli B. Serebral vazospazmda nitrik oksidin rolü ve nitrik oksid donörlerinin tedavideki yeri. *Ç. Ü. Tıp Fakültesi Arşiv Tarama Dergisi* 10: 190-200 (2001).
6. Alaşehirli B. Nitrik oksid sentaz (NOS) enzimleri ve genetik özellikleri. *Anadolu Tıp Dergisi* 2: 71-76 (2000).

Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Zoroğlu SS, Erdal ME, Alaşehirli B, Sivaslı E. Serotonin 2A reseptör geni T102C ve 1438G/A polimorfizmi ile dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu arasındaki ilişki. 13. Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kongresi, 7-9 Mart, Ankara (poster) (2003).
2. Zoroğlu SS, Erdal ME, Alaşehirli B, Sivaslı E. MAO-A (MAO-A-LPR)gen polimorfizmi ile dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu arasındaki ilişki. 13. Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kongresi, 7-9 Mart, Ankara (poster) (2003).
3. Alaşehirli B, Araz M, Özkur M, Nacak M. Bir türk popülasyonunda ACE genotip dağılımı. 39. Ulusal Diyabet Kongresi, 12-16 Mayıs, İstanbul (sözlü) (2003).
4. Alaşehirli B, Çekmen M, Nacak M, Özkur M, Kara AF. Plasental Nitrik oksit (NO) üretimi üzerine

- kafeinin etkileri. 17.Ulusal Biyokimya Kongresi, 24-27 Haziran, Ankara (poster) (2002).
5. Alaşehirli B, Balat A, Özkur M, Nacak M, Güler E. ACE gen insersiyon/delesyon polimorfizminin çocuklardaki minimal lezyon hastalığı ile ilişkisi. V. Ulusal Hipertansiyon & Böbrek Hastalıkları Kongresi. 21-25 Mayıs, Antalya (poster) (2003).
 6. Alaşehirli B, Zoroğlu SS, Sivaslı E. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in children with attention deficit/hyperactivity disorder. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish Dutch Pharmacological Societies, Ekim 17-21, Antalya Scientific Programme & Abstract Book, P-15 (2003).
 7. Gürsoy S, Erdal E, Alasehirli B, Madenci E, Erdal N. Association of Taq I polymorphism of vitamin D receptor gene with osteoporosis on the quality of life in postmenopausal Turkish women. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology Symposium, & Joint Meeting of The Turkish Dutch Pharmacological Societies, Ekim 17-21, Antalya, Scientific Programme & Abstract Book, P-1 (2003).
 8. Alasehirli B, Gursoy S, Erdal E. Association between vitamin D receptor gene Apa I polymorphism and bone-mineral density in a Turkish population. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish Dutch Pharmacological Societies, Ekim 17-21, Turkey, Scientific Programme & Abstract Book, P-16 (2003).
 9. Özkur M, Erbağcı Z, Nacak M, Tuncel AA, Alasehirli B, Aynacıoğlu A.Ş. Association of insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with psoriasis. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish Dutch Pharmacological Societies, Ekim 17-21, Turkey, Scientific Programme & Abstract Book, P-18 (2003).
 10. Evereklioğlu C, Alaşehirli B, Sarı İ, Cengiz B. Gestasyonel dönemde maternal nikotin alımının neonatal rat lenslerine olan teratojenik ve kataraktojenik etkileri: Histopatolojik araştırma ve yeni bir katarakt modeli. TOD XXXVI. Ulusal Oftalmoloji Kongresi, Ankara, 120-121 (2002).
 11. Caner F, Evereklioğlu C, Güldür E, Alaşehirli B, Cengiz B, Sarı İ, Pirbudak L. Gebelikte annenin aşırı miktarda kafein tüketimi yenidoğan yavru rat kristalin lenslerine teratojenik ve kataraktojenik etkiler göstermektedir: Deneysel-histopatolojik araştırma. TOD XXXVII. Ulusal Oftalmoloji Kongresi, İstanbul, 271 (2003).
 12. Evereklioğlu C, Sari İ, Alaşehirli B, Güldür E, Cengiz, B. Hamilelik süresince gebe ratlara uygulanan değişik dozlardaki nikotinin yenidoğan yavru rat retinaları üzerindeki etkilerinin deneysel olarak incelenmesi: Histopatolojik araştırma. TOD XXXVII. Ulusal Oftalmoloji Kongresi, İstanbul 172 (2003).

Akut ve kronik hareket kısıtlama stresi ile oluşan yanıtlarda santral anjiyotensin II ve reseptörlerinin rolü*

Dr. M. Devrim DOĞAN

GİRİŞ

Omega Sözleşmeli Araştırma Kuruluşu, Tıbbi Yazım ve Dökümantasyon Departmanı, Ankara Stres, hipotalamo-pituiter-adrenal (HPA) aks, sempatik sinir sistemi, renin anjiyotensin sis-temi (RAS) gibi çeşitli sistemleri aktive eden içsel veya dışsal bir uyarıdır. Bu uyarı, vücut sıcaklığı ya da kan basıncı artışı gibi fizyolojik bir değişikliğe ya da adaptasyona neden olur, bu adaptasyon da organizma için tehlikeli olabilecek bu durum ile mücadele edebilmeyi sağlar (1-4).

Aktive olan sistemlerin her birinin istirahat koşullarında kardiyovasküler homeostazisin idamesinde önemli rolleri vardır. Bu sistemler birbirleriyle hem periferde hem beyinde etkileşirler. Strese bağlı olarak aktive olan sistemler hem bazal hem stres durumlarında birbirlerinin regülasyonunu da kontrol ederler. Strese neden olan etkenin tipi ve süresi, bir kez veya tekrarlı olması, ya da homotipik veya heterotipik olması bu sistemlerin aktivasyonlarının büyüklüğünü ve aktivasyon tipini etkileyen faktörlerdir. Bu sistemlerin aktivasyonuna hem periferde hem santral sinir sisteminde çeşitli enzimatik ve hormonal değişiklikler eşlik eder (1-4).

HPA aks ve sempatik sinir sisteminin stresle aktivasyonu sonucunda adrenal medulla aktive olur ve sonucunda katekolamin biyosentezinden sorumlu enzimlerin (tirozin hidroksilaz [TH], dopamin β -hidroksilaz, ve fenil etanolamin N metiltransferaz [PNMT]) aktivitelerinde değişiklikler oluşur (3). Katekolamin biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan TH, soğuk, hareket kısıtlaması/immobilizasyon, hipoglisemi, sosyal stresler gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak oluşan streslerden sonra belirgin olarak artar. Akut streslerde TH aktivitesi enzim moleküllerinin sayısında bir değişiklik olmadan hızla artarken, kronik streslerde TH, enzim moleküllerinin sayısındaki artışa bağlı olarak bir aktivite artışı gösterir (3, 5-11). Strese neden olan uyarılardan sonra TH, hem sempatik sinirler, servikal gangliyonlar, adrenal medulla gibi periferik organlarda hem de çeşitli beyin bölgelerinde artış gösterir (3, 12, 13).

TH ekspresyonu ve aktivitesi kardiyovasküler hastalıkların patogenezi ile yakından ilişkilidir. Örneğin kan basıncı yüksek olan sıçanların adrenal medulla ve beyinlerinde TH ve PNMT daha yüksek düzeylerde eksprese edilirler (14-18). Bu nedenle TH'yi etkileyen düzenleyici mekanizmalar bu sistemlerin fizyolojik homeostazisinde çok önemlidirler.

RAS, stresi takiben santral ve periferik sistemlerde aktive olur (19, 20) ve hem santralde hem periferde strese yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynar (21). Santral RAS periferdekinden bağımsız olarak düzenlenir.

RAS'ın aktivasyonu sonucunda oluşan anjiyotensin (ANG) II, kan basıncı ve kalp hızını artıran güçlü bir vazokonstriktördür (1, 21). ANG II vazokonstriktör etkisi yanı sıra beyinde nörotransmitter olarak da görev yapar. Nörotransmitter olarak ANG II adrenal bezin sempatik aktivasyonunu da içeren genel sempatik aktivite artışına neden olur.

ANG II, beyini ve HPA aksı da içeren bazı hedef organlarda lokal olarak üretilir ve etki eder. ANG II'nin fizyolojik etkileri esas olarak iki reseptör üzerinden gerçekleşmektedir. Bunlar G-proteinine bağlı reseptörler ailesinden olan AT₁ ve AT₂ reseptörleridir. AT₁ reseptörleri, HPA aksı boyunca bulunur fakat stres yanıtının düzenlenmesinde anahtar rolü olan paraventriküler nukleus (PVN), medyan eminens, anterior pituiter, adrenal medulla ve adrenal zona glomeruloza gibi bölgelerde daha yoğun olarak bulunmaktadır. Ayrıca PVN'ye sinyal gönderen, kan beyin bariyerinin dışındaki bir sirkumventriküler organ olan ve dolaşımdaki ANG II düzeylerine duyarlı olan subfornikal organda (SFN) da yoğunur. HPA aksında, adrenal medulla hariç, AT₂ reseptörü çok az bulunur. AT₂ reseptörleri

adrenal medullada hakim olan ANG II reseptör alt tipidir (20, 22-25).

ANG II'nin santral enjeksiyonu strese yanıt olarak oluşan bazı değişiklikleri taklit eder. Bunlar kan basıncı, vücut sıcaklığı, kortikotropin salıcı hormon (CRH), adrenokortikotropik hormon, oksitosin, prolaktin, kortikosteroid düzeylerinin artışı, ve sempatik sinir sistemi aktivasyonudur (25, 26). ANG II ile indüklenen stres benzeri yanıtların çoğunun, esas olarak sempatik sinir sistemi ve HPA aksı düzenlenmesinden sorumlu beyin bölgelerinde lokalize olan AT₁ reseptörleri aracılığı ile düzenlendiği düşünülmektedir. Stres yanıtında AT₂'nin rolü daha az bilinmekle birlikte stresle ilgili rolü iyi tanımlanmış nukleus lokus seruleus (LC) gibi bazı beyin bölgelerinde AT₂ reseptör mRNA'sı ve bağlanma bölgeleri saptanmıştır (26, 27). Stres sırasında AT₂ reseptörleri AT₁ reseptörleri ile etkileşim veya "cross-talk" içinde olabilir. Bazı elektrofizyolojik ve biyokimyasal bulgulara dayanarak AT₁ ve AT₂ reseptörlerinin antagonistik bir şekilde etkileştikleri öne sürülebilir (28, 29). ANG II'nin AT₁ aracılığıyla olduğu gösterilmiş iyi bilinen etkilerinden kan basıncı artışı, miyozit hipertrofisi, vazopresin salınımı, susama ve natriüretik etkileri AT₂ reseptörünün inhibe edici etkisi altındadır (30-32). Bu iki reseptör alt tipi arasındaki fonksiyonel etkileşimlerin ANG II ile indüklenen nöromodülatör etkilerde anahtar rol oynadığı öne sürülür (33). Reseptör geni silinmiş farelerle yapılan deneyler de bu bulguları desteklemektedir. AT₂ reseptör geni olmayan farelerde HPA aksının düzenlenmesinde rolü olan beyin bölgelerinde AT₁ reseptör bağlanması ve adrenomedullar TH mRNA ve katekolamin sentezinin arttığı ve ANG II ile oluşan kan basıncı artışının daha büyük olduğu gösterilmiştir (34).

AT₂ reseptörlerinin fizyolojik ve stres koşullarındaki rolü çok net olarak aydınlatılmamıştır, fakat AT₂ reseptörünün kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği, deri lezyonları, vasküler hasarlar, myokard infarktüsü, beyin iskemisi, beyin ve sinir lezyonları gibi durumlarda artması, ANG II'nin bu reseptörler üzerinden stres durumlarına adaptif bir rolü olabileceğini düşündürür (35).

Stres, ANG II fonksiyonunu hem periferde hem santral bölgelerde düzenler ve bu modülasyon stres seanslarının sayısına göre değişir. Şöyle ki, akut kısıtlama stresi PVN'da

AT_{1A} mRNA'sını artırırken kronik stresle hem AT_{1A} mRNA'sı hem AT₁ bağlanması artar. Tekrarlayan kısıtlama stresi ile SFO ve median eminensde de AT₁ bağlanması artar. Akut stres ön pitüiter bezde AT_{1A} mRNA ve AT₁ bağlanmasını artırırken AT_{1B} mRNA'yı azaltmıştır. Tekrarlayan kısıtlama stresi ile AT_{1A} mRNA artışı devam ederken AT₁ ve AT_{1B} mRNA'da oluşan değişiklikler normal koşullardaki duruma geri dönmüştür. Akut stres ile adrenal zona glomerulozada AT_{1B} mRNA, AT₁ bağlanması, AT₂ mRNA ve AT₂ bağlanması azalır. Tekrarlayan stres ile, AT₂ mRNA'da gözlenen artış hariç, bu durum normale döner. Akut stres adrenal medullada AT_{1A} mRNA artışına ve AT₂ mRNA azalmasına neden olur. Tekrarlayan stres ile AT_{1A} mRNA artışı devam ederken, AT₂ mRNA'ındaki azalma ortadan kalkar (20). Akut stres ayrıca PVH ve SFO'da ANG II bağlanma bölgelerini, bağlanma afinitesinde değişiklik olmadan artırır (20, 26, 36, 37). Soğuk stresinin etkisi daha farklıdır: AT₁ mRNA ve reseptör bağlanması hipotalamus ve beyin sapında artarken, AT₂ mRNA ve reseptör bağlanması inferior olive nukleusta ve beyin sapında LC'da azalır (38).

Stres ile HPA aksının aktive olmasına bağlı olarak kortikosteroid düzeylerinin arttığı çok iyi bilinmektedir (1, 2). HPA aksı aktivasyonu ve kortikosteroid artışı da strese neden olan faktörün tipine, süresine, ve sayısına bağlı olarak değişkenlik gösterir (39-41). HPA aks aktivasyonu ve CRH yanıtı tekrarlayan stresler sonucunda körelir. Yanıtlarda azalma veya tekrarlayan strese alışmanın kısmen de olsa negatif geribildirim mekanizmalarında değişikliklere bağlı olduğu düşünülür (42-44). Hipotalamustaki PVN lezyonunun akut ve kronik stresle uyarılan yanıtlarda değişikliklere neden olmasına dayanarak bu nukleusun kronik strese yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu düşünülür (41, 43, 44). Her ne kadar bulgular arasında çelişkiler olsa da, ANG II'nin kortikosteroid yanıtında ve kronik strese alışmada düzenleyici bir rolü olabilir (45, 46).

Bu çalışmada santral ANG II'nin, akut ve kronik hareket kısıtlama stresi ile oluşan kan basıncı artışı, hipertermi, adrenal TH mRNA artışı ve kortikosteron düzeyleri artışındaki rolünü ANG II, AT₁ reseptör antagonisti losartan ve AT₂ reseptör antagonisti PD123319 santral infüzyonu ile araştırdık.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada toplam 164 yetişkin erkek Fisher 344 sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar beslenme ve su içmelerine kısıt konmadan sıcaklığı 24° C'de sabit tutulan ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü sağlanan bir odada tutulmuşlardır.

Lateral Serebroventrikül İnfüzyonu

Sıçanlar, ketamin (50-60 mg/kg) ve ksilazin (6 mg/kg) ile anestezi sağlandıktan sonra Kopf stereotaksi aletine yerleştirilmiş ve 28 G paslanmaz çelikten bir rehber kanüle sahip beyin infüzyon kiti (Alzet, Beyin İnfüzyon Kiti Model 2 Durect Corp. Cupertino, CA) sağ lateral serebroventriküle bregma -1.30 mm, lateral 1.50 mm, kafa tasından -4.50 mm (48) stereotaksik koordinatlar kullanılarak yerleştirilmiştir. Bir mini infüzyon pompası (Alzet, Mini-osmotik Pompa, model 2001, Durect Corp. Cupertino, CA) bu kanüle bağlanmış ve sıçanlara yapay beyin omurilik sıvısı (aCSF) infüze edilmeye başlanmıştır.

Bu ameliyattan bir hafta sonra izofluran ile kısa süreli bir anestezi sağlanarak iki skapula arasında 1 cm uzunluğunda bir cilt kesisi yapılmış ve infüzyon pompası bir hafta boyunca aCSF, ANG II (120 ng/saat/µl), losartan (15 µg/saat/µl), veya PD123319 (30 µg/saat/µl) infüze edecek pompa ile değiştirilmiş ve sonra cilt kapatılmıştır.

Kan Basıncı

Kan basıncı telemetri ile (Data Sciences International, St Paul, MN). ölçülmüştür. Lateral serebroventriküle kanül yerleştirme ameliyatı ile eşzamanlı olarak cilt altına telemetri vericisi yerleştirilmiş, vericiye bağlı kateterin basınca duyarlı ucu ise femoral arter yolu ile abdominal aortaya yerleştirilmiştir.

Vücut Sıcaklığı Ölçümü

Vücut sıcaklığı rektal yoldan uygulanan bir elektrikli termometre (Ellab, Denmark) ile ölçülerek kaydedilmiştir. Sıçanlar, probun deneylerden önce en az 4-5 kez rektal yoldan uygulanması ile bu deneysel işleme alıştırmışlardır. Deneyler sırasında her sıçandan kısıtlama stres seanslarından önce ve sonra 5 dakika ara ile 3 ölçüm alınmış ve bunların ortalamaları kaydedilmiştir. Kontrol sıçanlarının vücut sıcaklıkları da benzer şekilde, eşza-

manlı olarak kaydedilmiştir. Vücut sıcaklığı değişiklikleri (ΔT) her sıçanın stres sonrası ölçülen ortalama değerinin stres öncesi ortalama değerinden farkı ile ifade edilmiştir.

Stres Modeli

Sıçanlara, bir hafta iyileşme süresinden sonra serbest hareket etmelerini kısıtlayan akrilik silindir şeklinde hareket kısıtlayıcı aletler ile (Broome Rodent Restrainer, Harvard Apparatus, Holliston MA) hareket kısıtlama stresi uygulanmıştır. Akut stres grubundaki sıçanlar ilaç infüzyonunun 7. gününde sabah 2 saat (09:00-11:00) hareket kısıtlayıcı içine konmuş ve bu sürenin bitimini takiben hemen pentobarbital (90 mg/kg ip) ile derin anesteziden sonra dekapite edilmişlerdir. Kronik stres grubundaki sıçanlar 7 gün boyunca her gün sabah 2 saat (09:00-11:00) kısıtlayıcı içine konmuşlar her kısıtlama seansı sonunda kafeslerine geri dönmüşlerdir. 7. gün son kısıtlama stresini takiben aynı yöntemle ötenazi uygulanmıştır. Kontrol olarak kullanılacak sıçanlar ise ötenazi uygulanana kadar kafeslerinde tutulmuşlardır.

Doku Hazırlanması

Ötenaziden hemen sonra kalp ventrikülünden kan örnekleri alınmış ve dolaşım sistemi 20 ml soğuk serum fizyolojik ile perfüze edilmiştir. Adrenal bezler hızla çıkarılmış ve sıvı nitrojen ile hemen dondurulmuştur. Dokular deney zamanına kadar -80 °C'de tutulmuşlardır. Deney esnasında adrenal bezlerin kapsülü ayrılmış, medulla korteksten ayrılarak 100 µl fosfat tamponda (2 mM NaPO₄, %0.2 Triton, pH 7.0) homojenize edilmiştir.

Adrenal bez TH mRNA immünreaktivitesi Northern blot yöntemi ile semikantitatif olarak ölçülmüş ve referans olarak gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (G3PDH) mRNA (house-keeping gen) normalizasyon için kullanılmıştır.

Plazma kortikosteron düzeyi ise radyoimmunoassay yöntemi ile ölçülmüştür.

İstatistiksel Analiz

Veriler, ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur. Grupların ortalamaları tek yönlü ANOVA kullanılarak karşılaştırılmıştır; takiben Newman-Keuls *post hoc* testi uygulanmıştır.

Olasılık değeri $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Etik İşlemler

Bu çalışmadaki tüm *in vivo* ve *in vitro* deneysel prosedürler "The Association for Assessment of Laboratory Animal Care" kuralları ile uyumlu olarak yapılmıştır ve çalışma protokolü "The Veterans Administration Institutional Animal Care and Use Committee" tarafından onaylanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm radyoaktif maddeler Florida Üniversitesi Radyasyon Güvenlilik Talimatnamesine uyularak kullanılmış ve atılmıştır.

BULGULAR

ANG II'nin Stres Yanıtlarına Etkisi

Kan Basıncı

ANG II infüze edilen gruplarda ortalama arteriyel kan basıncı beklendiği üzere aCSF infüze edilen gruplara göre birinci günden itibaren anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 1A). Akut stres oluşturmak amacıyla 7. günde uygulanan 2 saatlik kısıtlama stresi aCSF infüze edilen sıçanların kan basıncını kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır. ANG II infüze edilen sıçanlarda akut kısıtlama stre-sinden sonra olan artış yalnız aCSF infüzyon grubundan değil, ANG II grubundan da anlamlı olarak daha büyük bulunmuştur (Şekil 1A).

Kronik stres hem aCSF hem de ANG II infüze edilen gruplarda deney süresince anlamlı olarak daha yüksek kan basıncı artışına neden olmuştur (Şekil 1B). Fakat aCSF + kronik stres ve ANG II + kronik stres gruplarının kan basınçları artışı arasında fark bulunmamıştır.

Vücut Sıcaklığı

7. günde uygulanan 2 saatlik kısıtlama stresi aCSF infüze edilen sıçanların vücut sıcaklığı değişikliklerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırdı (Şekil 2A). Benzer olarak ANG II infüze edilen sıçanlarda da akut stres vücut sıcaklığı artışına neden olurken, bu artış aCSF + akut stres ile olan artıştan anlamlı olarak daha küçüktü (Şekil 2A).

Kronik kısıtlama stresi uygulaması da 7 gün boyunca aCSF infüze edilmiş sıçanlarda anlamlı olarak yüksek vücut sıcaklığı artışına

neden olurken, ANG II infüzyonu vücut sıcaklığındaki bu artışın inhibisyonuna neden oldu (Şekil 2B).

TH mRNA

Adrenal medulla TH mRNA düzeyinin ANG II'nin 7 gün boyunca santral infüzyonunu takiben aCSF verilmiş gruba göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 3).

Akut ve kronik stres aCSF infüze edilmiş grupta adrenal medullada kontrole göre anlamlı olarak daha yüksek TH mRNA artışına neden olmuş aynı zamanda akut stres ile gözlenen TH mRNA artışının kronik stres ile gözlenen artıştan da anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 3).

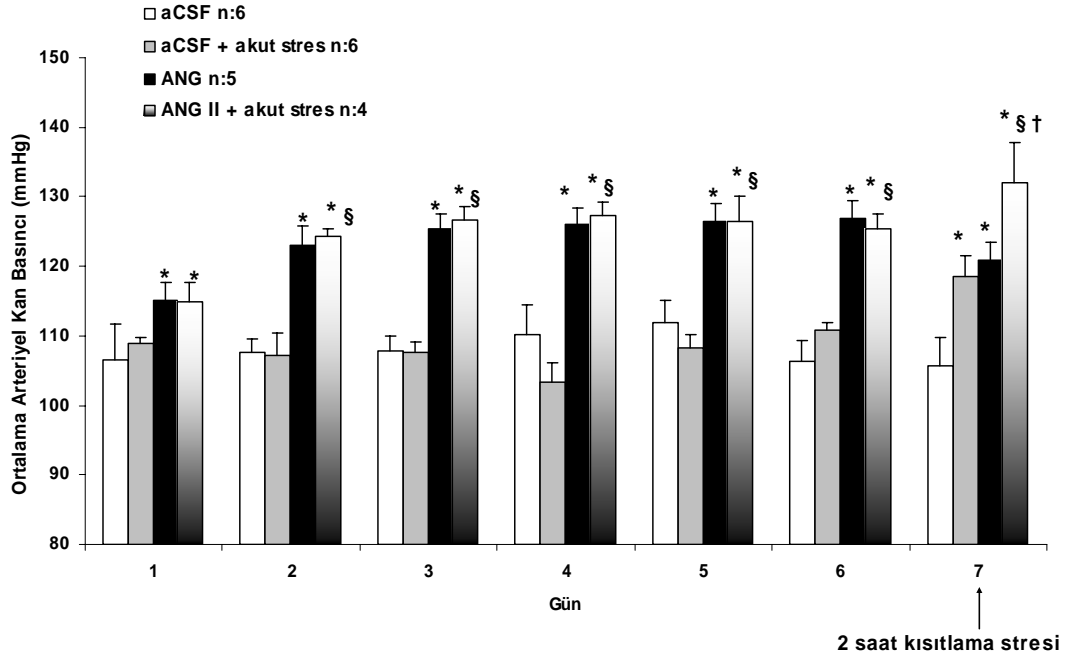
ANG II infüze edilmiş grupta TH mRNA artışı yalnız akut stres uygulanan grupta aCSF kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, hem akut hem kronik stres yalnız ANG II uygulanan gruba göre TH mRNA düzeyinde belirgin artışa neden olmuştur. Ayrıca ANG II grubunda akut veya kronik stres ile oluşan TH mRNA artışları aCSF verilmiş sıçanlardaki denk gelen stres uygulanmış gruplara göre anlamlı olarak daha düşük izlenmiştir. Benzer olarak ANG II + akut stres grubunda gözlenen TH mRNA artışının ANG II + kronik stres uygulanan gruptan da anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

Kortikosteron

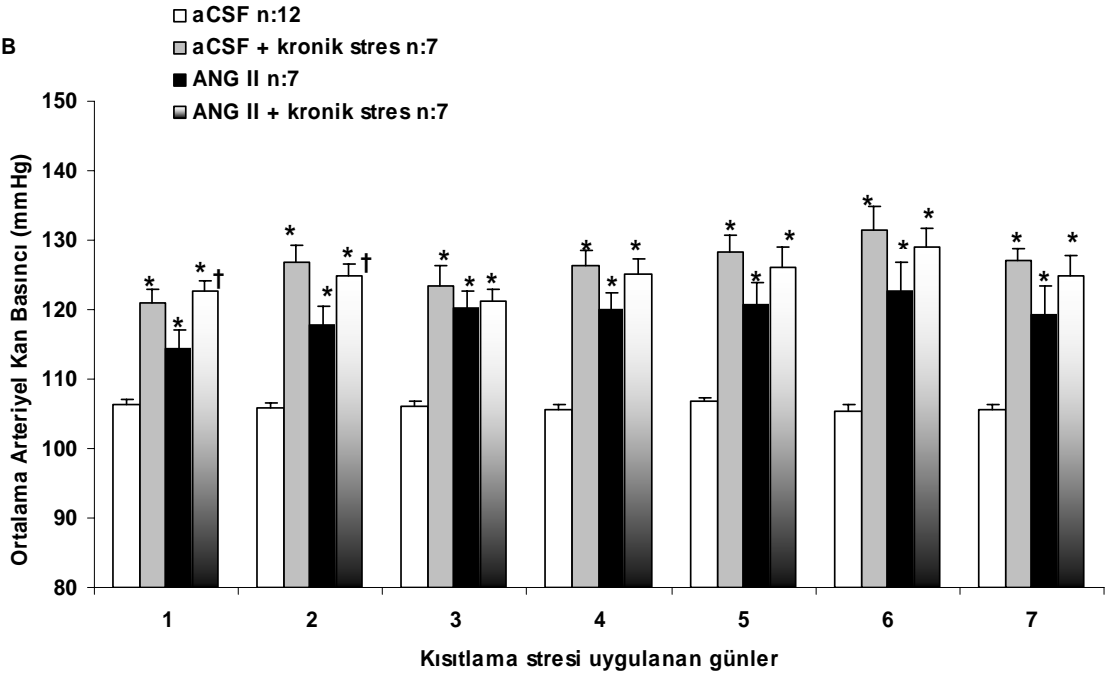
Akut stres, hem aCSF hem ANG II infüze edilmiş gruplarda plazma kortikosteron düzeylerinde aCSF kontrol grubuna göre belirgin artışa neden olurken, kronik stres ile bu artış gözlenmemiştir (Şekil 4).

ANG II uygulanan grupta akut stresi takiben gözlenen kortikosteron artışı ANG II grubundan da anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. ANG II + akut stres ile gözlenen kortikosteron artışı aCSF + akut stres grubuna göre anlamlı olarak daha az olmuştur (Şekil 4).

A

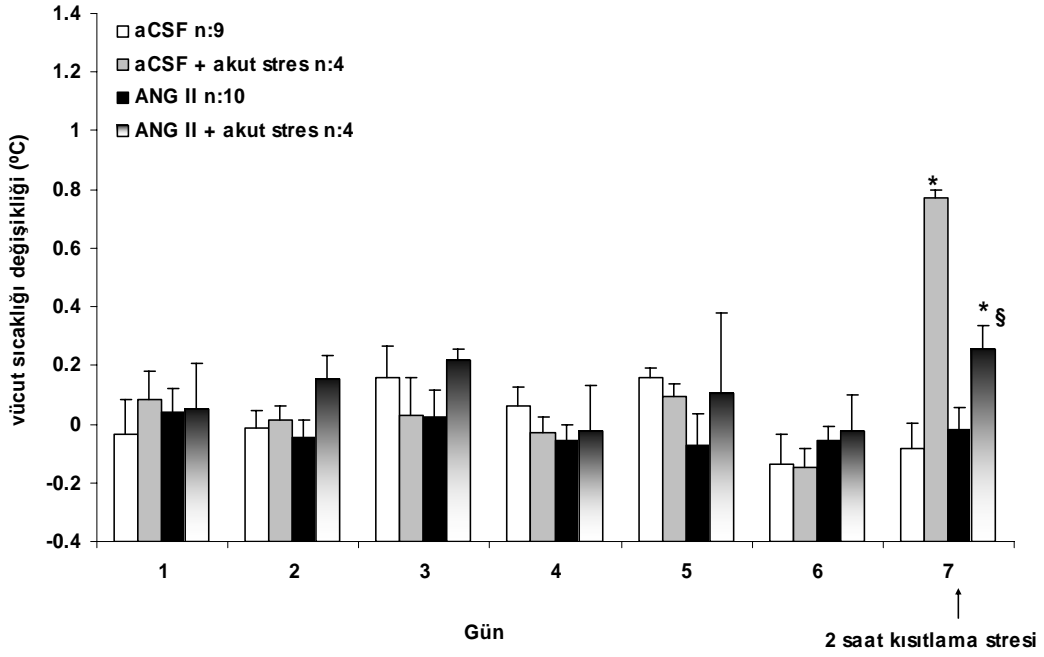


B

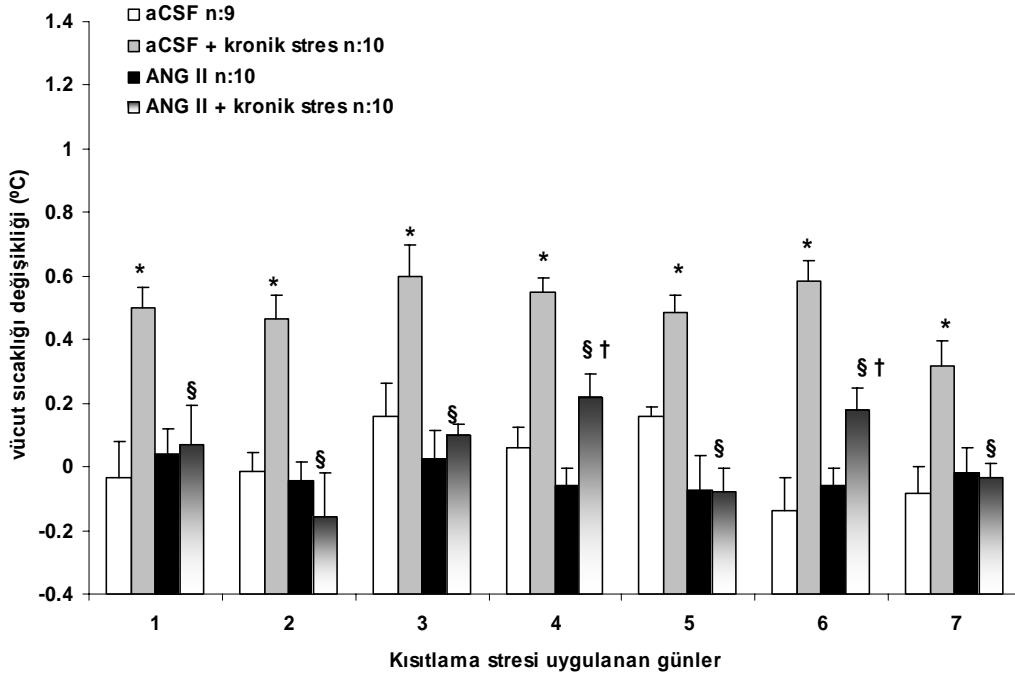


Şekil 1. Akut (A) ve kronik (B) kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya ANG II infüze edilmiş sıçanların ortalama arteriyel kan basıncına etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; †: ANG II grubuna göre $p < 0.05$.

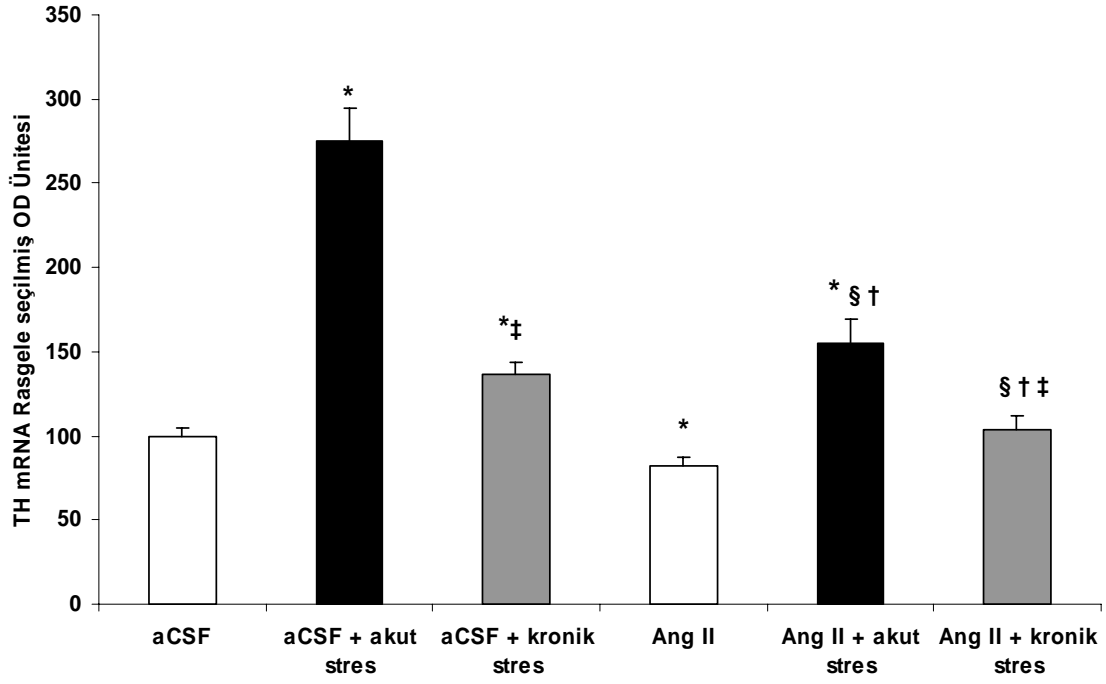
A



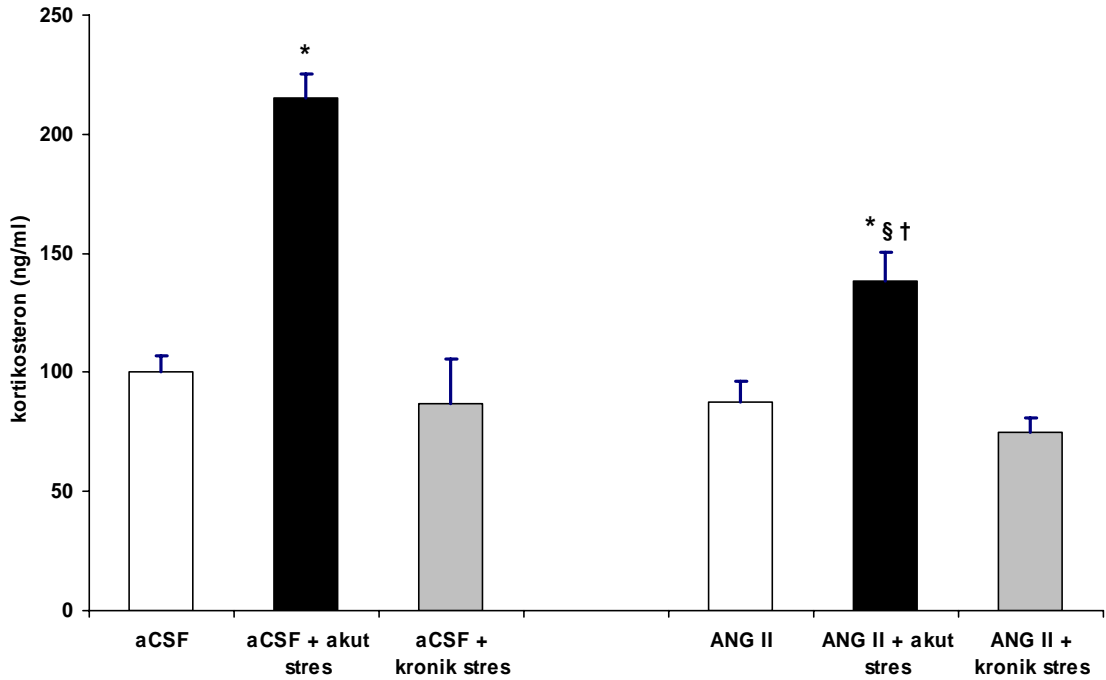
B



Şekil 2. Akut (A) ve kronik (B) kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya ANG II infüze edilmiş sıçanların vücut sıcaklığı değişikliklerine etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; §: aCSF + stress grubuna göre; †: ANG II grubuna göre p < 0.05.



Şekil 3. Akut ve kronik kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya ANG II infüze edilmiş sıçanların adrenal medulla TH mRNA düzeylerine etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; §: aCSF + stress grubuna göre; †: ANG II grubuna göre; ‡: akut stres grubuna göre $p < 0.05$.



Şekil 4. Akut ve kronik kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya ANG II infüze edilmiş sıçanların plazma kortikosteron düzeylerine etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; §: aCSF + stress grubuna göre; †: ANG II grubuna göre $p < 0.05$.

AT₁ reseptör antagonisti losartanın stres yanıtlarına etkisi

Kan Basıncı

Losartan infüzyonu ortalama arteriyel kan basıncını 2-6. günlerde aCSF infüze edilmiş gruba göre anlamlı olarak düşürmüştür (Şekil 5A). Akut stres ile hem aCSF hem losartan grubunda kan basıncı kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek izlenmiştir (Şekil 5A). Losartan + akut stres grubundaki kan basıncı artışı yalnız losartan uygulanan gruptan da anlamlı olarak daha yüksektir (Şekil 5A).

Kronik stres aCSF grubunda kan basıncının 7 gün boyunca kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek izlenmesine neden olmuştur (Şekil 5B). Losartan + kronik stres grubundaki kan basıncı artışı ilk iki gün aCSF kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olmasına rağmen diğer günlerde bu artış ortadan kalkmıştır (Şekil 5B). Losartan + kronik stres grubundaki kan basıncı artışı 1-5. günler arasında yalnız losartan uygulanan gruptan anlamlı olarak daha yüksek izlenmiştir (Şekil 5B). 4-6. günlerde losartan + kronik stres grubunda izlenen kan basıncı artışı aCSF + kronik stres grubunda izlenen kan basıncı artışından anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (Şekil 5B).

Vücut Sıcaklığı

Akut ve kronik kısıtlama stresi hem losartan hem aCSF uygulanan gruplarda belirgin

vücut sıcaklığı artışına neden olmuştur (Şekil 6A ve 6B). Losartan + kronik stres ile oluşan vücut sıcaklığı artışı 3 ve 4. günlerde aCSF + kronik stres grubundan anlamlı olarak daha az olmuştur (Şekil 6B)

TH mRNA

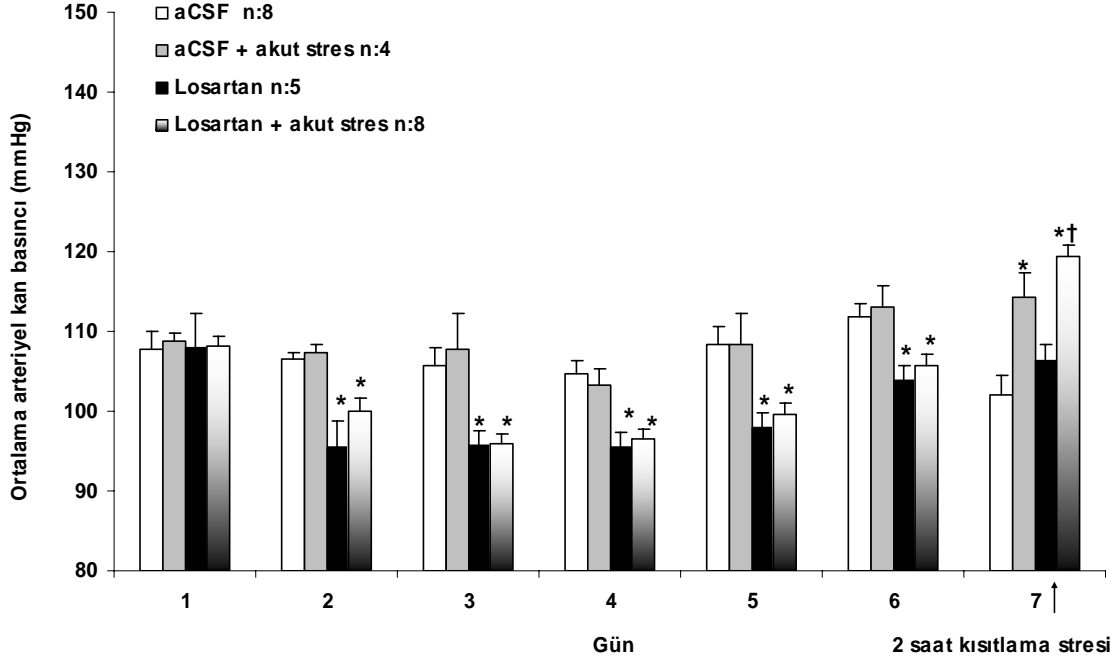
Akut stres hem aCSF hem losartan infüze edilen gruplarda TH mRNA düzeyinde belirgin artışa neden olmuştur (Şekil 7). Fakat losartan grubunda gözlenen artışın, aCSF grubunda gözlenen artıştan anlamlı olarak daha düşük olduğu izlenmiştir.

Kronik stres ise aCSF infüze edilen grupta TH mRNA düzeyinde artışa neden olurken, losartan infüze edilen grupta bu artış izlenmemiştir (Şekil 7). Hem aCSF + kronik stres hem de losartan + kronik stres grubunda ölçülen TH mRNA düzeyleri, denk gelen akut stres gruplarından anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (Şekil 7).

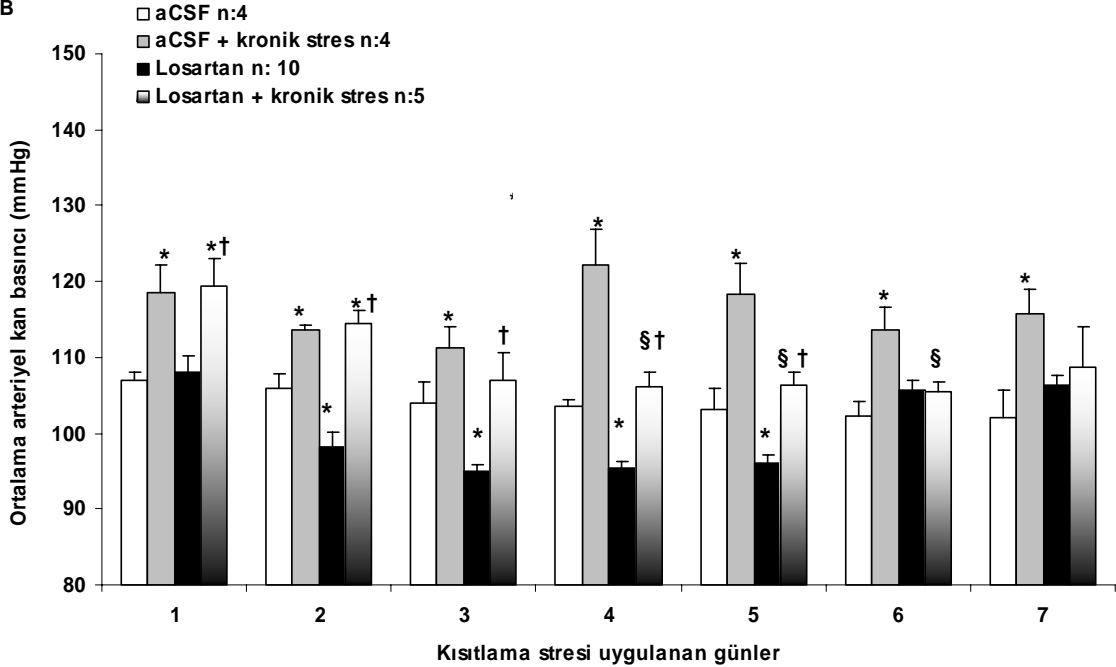
Kortikosteron

Akut stres hem aCSF hem de losartan infüzyonu yapılmış sıçanlarda plazma kortikosteron düzeylerini anlamlı olarak artırmıştır (Şekil 8). Kronik stres aCSF infüze edilmiş sıçanlarda kortikosteron düzeylerini etkilemezken, losartan grubunda kronik stresten sonra da plazma kortikosteron düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Losartan grubundaki bu artış hem aCSF + kronik stres grubundan hem de losartan grubundan da anlamlı olarak daha yüksektir (Şekil 8).

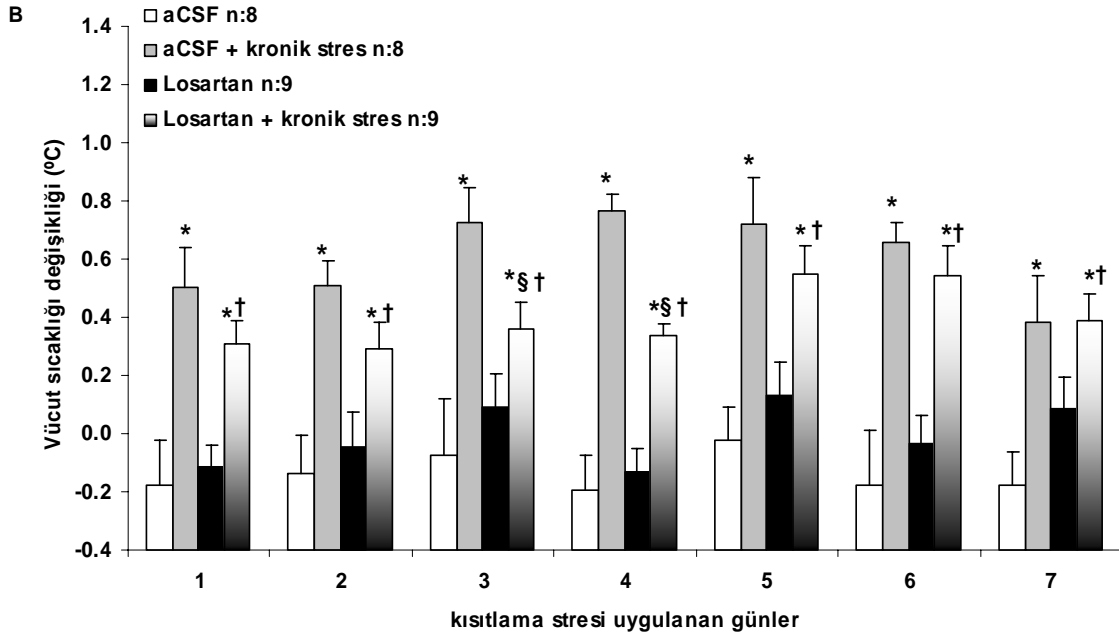
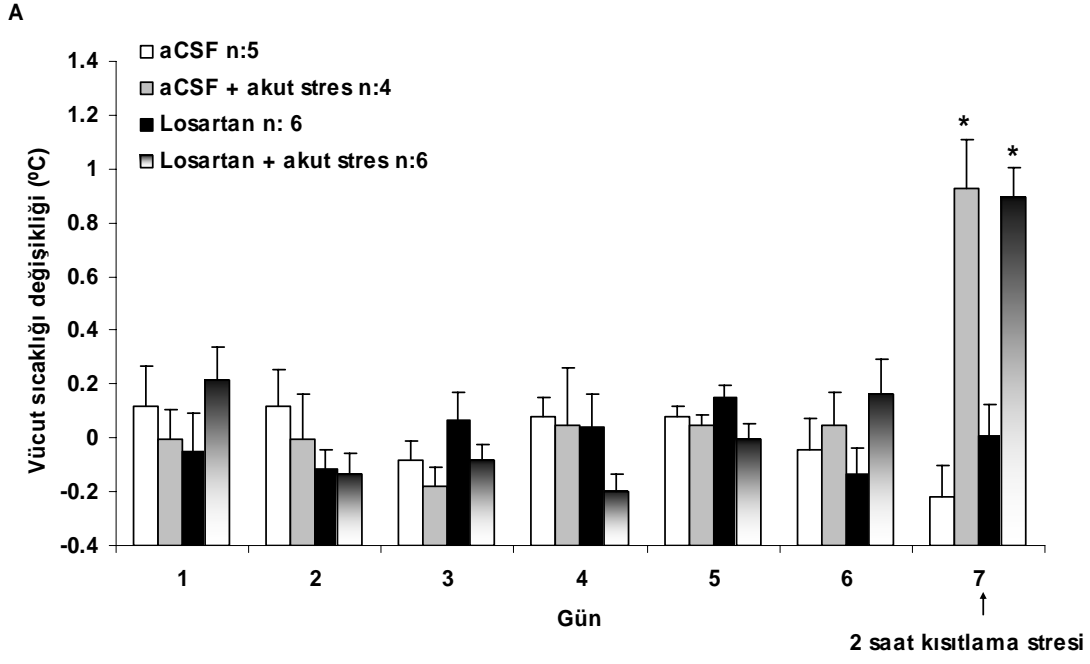
A



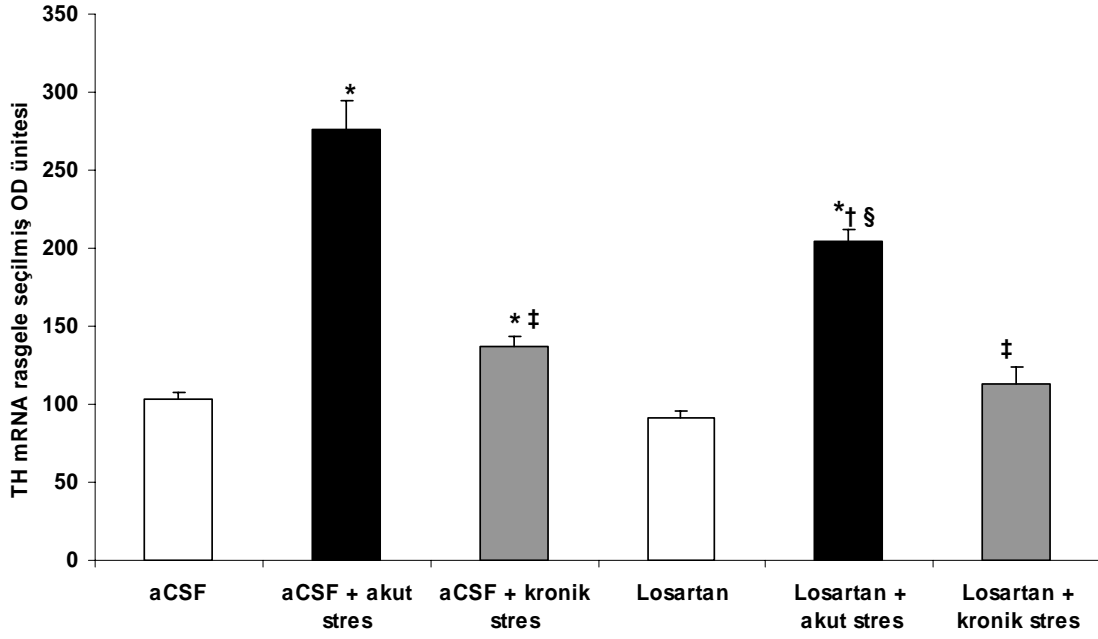
B



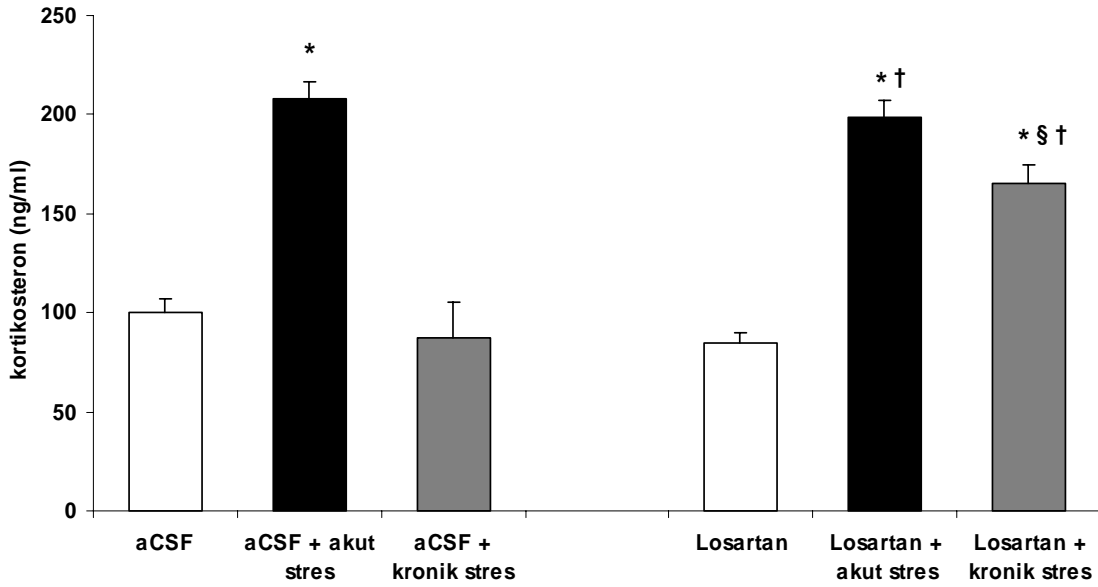
Şekil 5. Akut (A) ve kronik (B) kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya losartan infüze edilmiş sıçanların ortalama arteriyel kan basıncına etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; §: aCSF + stress grubuna göre; †: losartan grubuna göre p < 0.05.



Şekil 6. Akut (A) ve kronik (B) kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya losartan infüze edilmiş sıçanların vücut sıcaklığı değişikliğine etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; §: aCSF + stress grubuna göre; †: losartan grubuna göre p < 0.05.



Şekil 7. Akut ve kronik kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya losartan infüze edilmiş sıçanların adrenal medulla TH mRNA düzeylerine etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; §: aCSF + stress grubuna göre; †: losartan grubuna göre; ‡: akut stres grubuna göre $p < 0.05$.



Şekil 8. Akut ve kronik kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya losartan infüze edilmiş sıçanların plazma kortikosteron düzeylerine etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; §: aCSF + stress grubuna göre; †: losartan grubuna göre $p < 0.05$.

AT₂ Reseptör Antagonisti PD123319'un Stres Yanıtlarına Etkisi

Kan Basıncı

Kronik stres hem aCSF hem PD123319 uygulanmış sıçanlarda kan basıncını anlamlı olarak artırmıştır. Bu artış iki grupta da benzer düzeyde olmuştur (Şekil 9).

Vücut Sıcaklığı

Kronik stres hem aCSF hem PD123319 uygulanmış sıçanlarda vücut sıcaklığı artışına neden olmuş ve bu artışın her iki grupta da benzer düzeyde olduğu izlenmiştir (Şekil 10).

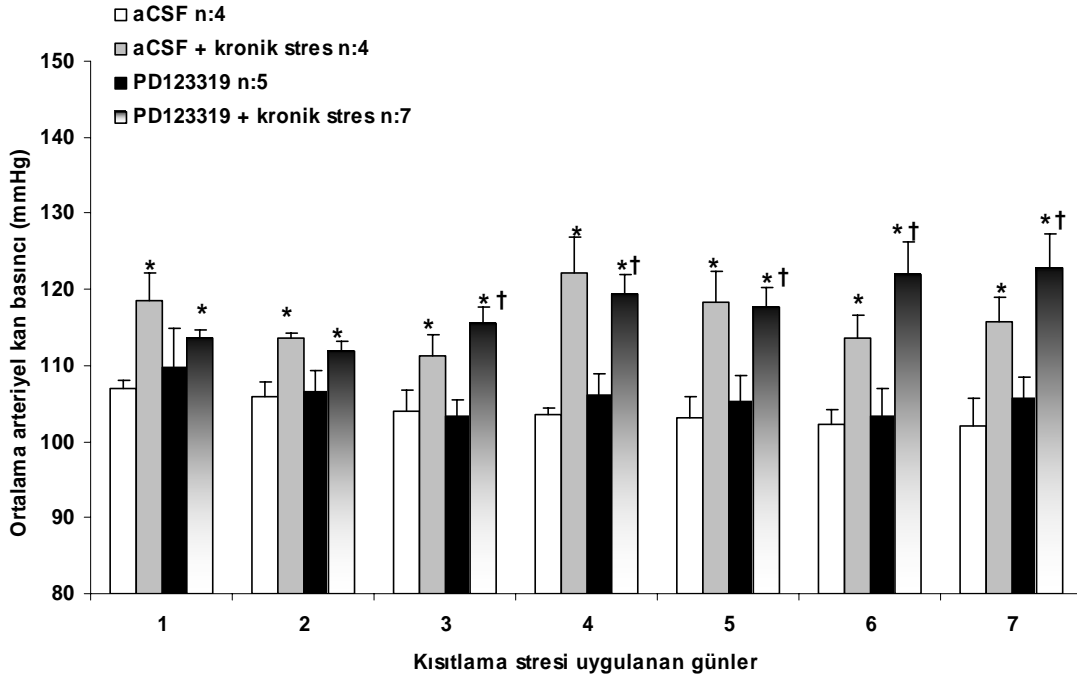
TH mRNA

PD123319 infüzyonu adrenal medulla TH mRNA düzeyini kontrol grubuna göre düşürmüştür (Şekil 11).

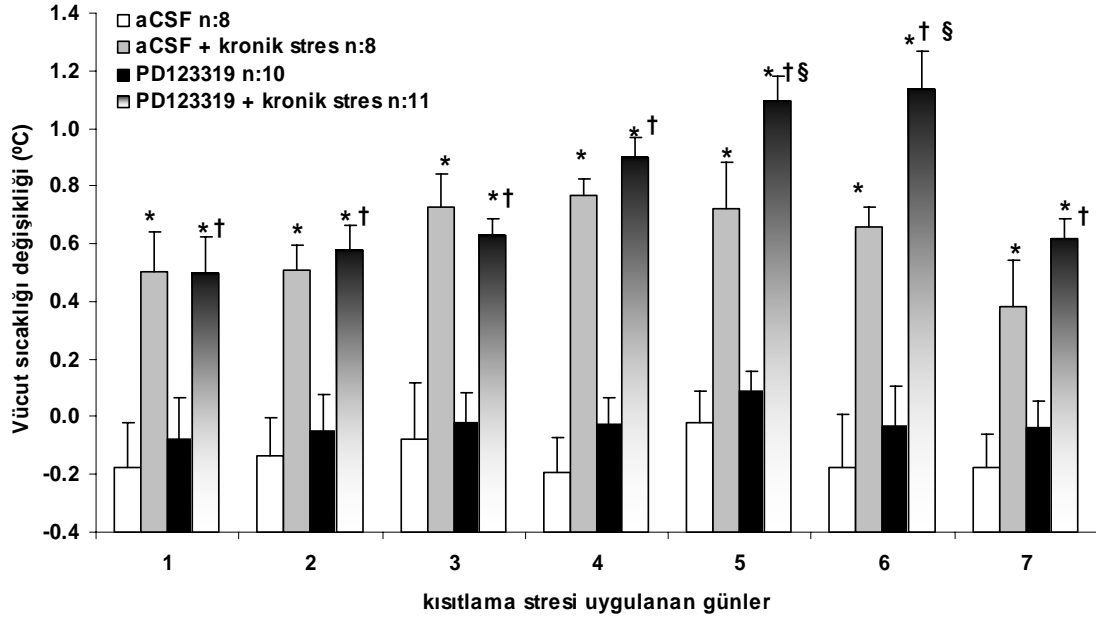
Kronik stres aCSF verilen sıçanlarda adrenal medulla TH mRNA düzeylerini anlamlı olarak artırmıştır (Şekil 11). Kronik strese bağlı olarak PD123319 verilen gruptaki adrenal medulla TH mRNA artışı aCSF kontrol grubundan farklı olmamakla birlikte PD123319 grubundan anlamlı olarak daha yüksek izlenmiştir.

Kortikosteron

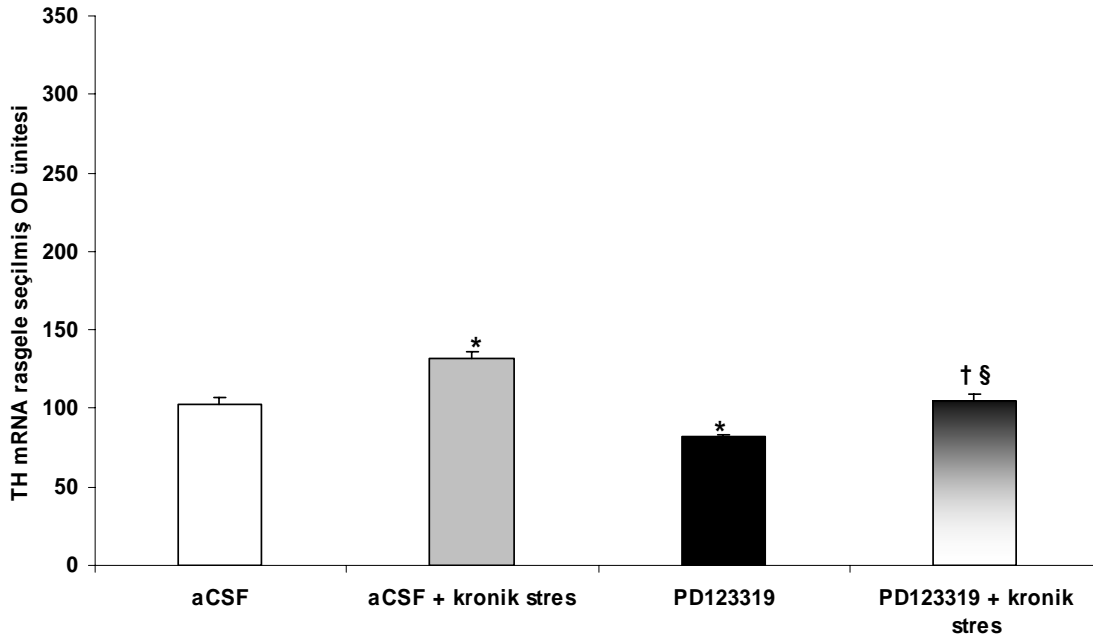
Kronik stres ile aCSF verilmiş sıçanların plazma kortikosteron düzeylerinde bir değişiklik gözlenmezken PD123319 verilen grupta kronik stresten sonra plazma kortikosteron düzeylerinin diğer üç gruptan da anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 12).



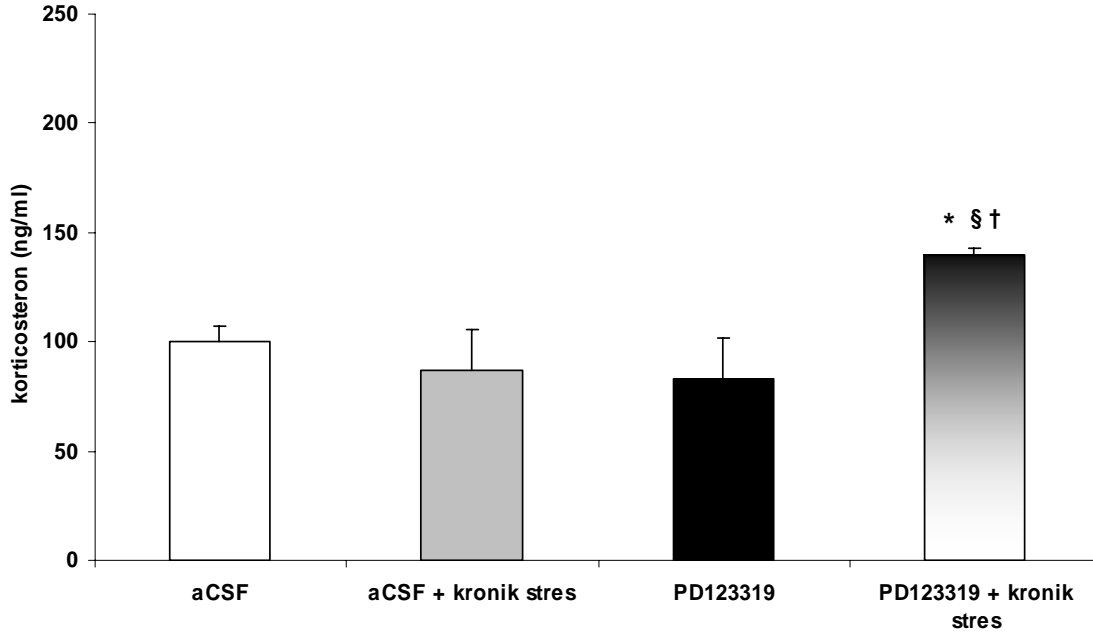
Şekil 9. Kronik kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya PD123319 infüze edilmiş sıçanların ortalama arteriyel kan basıncına etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; †: PD123319 grubuna göre p < 0.05.



Şekil 10. Kronik kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya PD123319 infüze edilmiş sıçanların vücut sıcaklığı değişikliğine etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; §: aCSF + stress grubuna göre; †: PD123319 grubuna göre p < 0.05.



Şekil 11. Kronik kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya PD123319 infüze edilmiş sıçanların adrenal medulla TH mRNA düzeylerine etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; §: aCSF + stress grubuna göre; †: PD123319 grubuna göre p < 0.05.



Şekil 12. Kronik kısıtlama stresinin bir hafta süreyle aCSF veya PD123319 infüze edilmiş sıçanların plazma kortikosteron düzeylerine etkisi. *: kontrol (aCSF) grubuna göre; §: aCSF + stress grubuna göre; †: PD123319 grubuna göre $p < 0.05$.

TARTIŞMA VE SONUÇ

ANG II'nin bazal koşullarda kan basıncını artırması beklenen bir sonuçtur. ANG II'nin akut stres koşullarında plazmada daha belirgin olarak arttığı izlenirken, ancak kronik stres durumunda hipotalamus, medulla oblongata, myokard gibi dokularda belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (40). Bu çalışmada ANG II ile akut strese bağlı kan basıncı artışının daha büyük olduğu izlenmiştir. Bu durumun, santral olarak infüze edilen ANG II'nin, akut strese bağlı kan basıncı artışına aditif etkisi sonucunda olduğu düşünülebilir. Kronik stres ile indüklenen kan basıncı artışı ise ANG II infüzyonu ile değişmemiştir. Bu durumda da strese bağlı olarak santral dokularda endojen ANG II artışının zaten maksimal düzeyde olduğu ve bu nedenle dışardan verilen ANG II'nin kronik strese bağlı kan basıncı artışına ek bir etkisinin olmadığı öne sürülebilir.

Losartan akut strese indüklenen kan basıncı artışını önleyememiştir. Bu da AT_1 reseptörünün bu durumda rolü olmadığını düşündürmektedir. Fakat losartan kronik strese bağlı kan basıncı artışını inhibe etmiştir. Aynı koşullarda PD123319'un bir etkisi olmadığı da saptanmıştır. Bu da AT_2 reseptörünün olmasa da AT_1 reseptörlerinin kronik strese bağlı kan basıncı artışının regülasyonunda

önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Bazı çalışmalarda intraserebroventriküler yoldan uygulanan losartanın bazı akut stres modellerinde kan basıncı artışını inhibe ettiği gözlenmiştir (25, 48-51). Bu farklılık hem kullanılan stres modeline hem de ilacın uygulanma metoduna bağlı olabilir. Losartanın doğrudan enjekte edildiği çoğu çalışmadan farklı olarak bu çalışmada losartan çok düşük bir dozda sürekli infüzyon yolu ile verilmiştir. Bu şekilde uygulama ayrıca enjeksiyon sırasında yapılan müdahalelere bağlı olarak oluşabilecek stresi de engellediğinden, deney koşulları ile etkileşmeyen daha güvenilir bir yol olduğunu önermek yanlış olmaz.

ANG II ile akut strese bağlı vücut sıcaklığı artışı olmakla birlikte aCSF grubundaki artıştan daha küçüktür. Benzer olarak ANG II infüzyonu kronik strese bağlı vücut sıcaklığı artışını tamamen inhibe etmiştir.

Losartan akut strese bağlı vücut sıcaklığı artışını önleyememekle birlikte kronik strese olan artışı kısmen inhibe edebilmiştir. Aksine, PD123319 ile kronik strese olan vücut sıcaklığı artışının kısmen de olsa daha abartılı olduğu gözlenmiştir.

Bulgularımız strese bağılı vücut sıcaklığı artışında AT₁ ve AT₂ reseptörlerinin birbiri ile zıt düzenleyici etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Bazı çalışmalarda AT₁ ve AT₂ reseptörlerinin özellikle ANG II ile kan basıncı düzenlenmesinde antagonistik bir işleyişi olduğu gösterilmiştir (30-32, 34). Bu durum vücut sıcaklığı düzenlenmesinde de geçerli olabilir. Ayrıca ANG II reseptörlerinin akut ve kronik stres koşullarında farklı şekillerde düzenlenmesinin de rolü olabilir (20). Akut ve kronik stres durumlarında reseptör tipi ve bağlanmasında olan değişiklikler bu iki koşulda ANG II ve reseptör blokörlerinin farklı davranmasını açıklayabilir.

ANG II'nin vücut sıcaklığı düzenlenmesindeki rolü de değişkendir. ANG II santral veya periferik yoldan verildiğinde hipotermi oluşturabilir (52). Oysa, endojen ANG II soğuk ve sıcak çevre koşullarında vücut sıcaklığını "set point"te tutacak şekilde etki gösterir (52). Bu çalışmada ANG II infüzyonu yapılan sıçanlarda strese bağılı vücut sıcaklığı artışının daha az olması veya hiç olmaması dışardan verilen ANG II'nin hipotermik etkisine bağlanabilir. Ayrıca AT₁ reseptörü üzerinden strese bağılı hipertermi ve lipopolisakkarid ile oluşan ateş koşullarında endojen ANG II'nin düzenleyici etkisi de gösterilmiştir (25, 52). AT₂ reseptör geninin silindiği farelerde stres ile oluşan hipertermik yanıtın daha abartılı olması bu reseptörün de strese sekonder hipertermik yanıtı katkısı olduğunu gösterir (24).

Akut stres durumunda gözlenen adrenal medulla TH mRNA artışı kronik stres durumunda büyük olasılıkla adaptasyon mekanizmalarına bağılı olarak, daha az olmuştur. ANG II infüzyonu ile hem akut hem kronik stres koşullarında görülen adrenal medulla TH mRNA düzeylerindeki artış daha az olmuştur. Hücre kültürleri ve *in vivo* çalışmalarda ANG II'nin adrenal medulla TH düzeyini artırdığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (15, 33, 53). Strese maruz kalan sıçanlarda TH zaten artmış olduğu için ANG II ile daha fazla artmamış olması beklenebilecek bir durumdur.

Benzer şekilde losartan da hem akut hem kronik strese bağılı olarak artan TH mRNA düzeyini inhibe etmiştir.

PD123319 bazal TH mRNA düzeylerini inhibe etmiştir. Bu durum katekolamin sentezinde AT₁ ve AT₂ reseptörlerinin birbirleri ile ters düzenleyici etkileri olduğu varsayımına ters

olmakla birlikte AT₂ antagonisti PD 123319 ile AT₂ bağlanmasının inhibisyonu adrenal nor-epinefrin ve TH mRNA'yı azalttığı başka çalışmalarda da gösterilmiştir (55). Kronik stres ile oluşan TH mRNA artışı da PD123319 varlığında daha az olmuştur. Tüm bu bulgular hem AT₁ hem AT₂ reseptörlerinin istirahat ve stres koşullarında TH transkripsiyonel regulasyonunda sinerjik etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Beklenildiği gibi kortikosteron düzeyleri akut stres ile artarken, kronik streste bu yanıt ortadan kalkmıştır. Bu durum stres uyarısına kronik olarak maruz kalma ile adaptasyon veya uyum geliştiğini gösteren bulgularla uyumludur (39-44). Bu adaptasyon ANG II ve reseptörleri aracılığı ile gerçekleşiyor olabilir, çünkü ANG II akut stresle oluşan kortikosteron artışını azaltmış, hem losartan hem de PD123319 ile kronik streste görülmeyen kortikosteron artışı izlenmiştir.

Bulgularımız ANG II ve reseptör blokörlerinin strese bağılı artan kortikosteron artışındaki rolleri ile ilgili çalışmalarla çelişkilidir. Şöyle ki, losartanın, oral yoldan uygulandığında akut ve kronik immobilizasyona bağılı plazma kortikosteron artışını inhibe ettiği gösterilmiştir (45). Bu durum stres metodlarının, farmakolojik ajanların uygulama yolu ve dozlarının ve kullanılan sıçan türünün farklılığına bağılı olabilir.

Stres birden fazla sistemin aynı anda aktive olmasına ve strese karşı iyi koordine edilmiş bir yanıt ortaya çıkmasına neden olur. Stresle aktive olan HPA aks ve RAS bu iyi koordine yanıtın iki üyesidir. Üstelik stres uyarısı ile eşzamanlı olarak aktive olmakla kalmayıp, oluşan yanıtta "birlikte" çalışırlar. Bu yolların majör hormonal ürünleri kortikosteroidler, katekolaminler ve ANG II fizyolojik yanıtları düzenleyen ana faktörlerdir. Aynı zamanda bu hormonlar birbirlerinin düzeylerini de kontrol ederler (1-4, 19, 20, 25, 26, 40, 54). Hem losartan hem PD123319 ile kronik streste körelmiş kortikosteron yanıtının artması ANG II'nin stres yanıtına adaptasyonda da rolü olduğunu düşündürür. Stres yanıtının düzenlenmesinde çok önemli rolü olduğu gösterilmiş PVN lezyonunun kronik strese olan yanıtta değişiklik oluşturması da bu nukleusta çok yoğun olarak bulunan AT₁ reseptörlerinin stres yanıtı ve adaptasyonun düzenlenmesinde önemli olabileceğini gösterir (20, 23). AT₂ reseptör blokörü PD123319

ile de benzer etkinin oluşması çelişkili gibi görünse de strese bağlı olarak, stres yanıtının düzenlenmesinde önemli olduğu bilinen santal ve periferik dokularda AT₂ reseptör ekspresyonunun değişmesi (20), fizyolojik koşullarda belirgin bir etkisi olmasa da stres koşullarında AT₂ reseptörünün de önemli olabileceği, bazı yanıtların oluşumunda AT₁ reseptörü ile ters etkili çalışırken, bazı yanıtlarda her iki reseptörün sinerjik etkili olabileceği öne sürülebilir.

Sonuç olarak, bu bulgular ANG II'nin strese bağlı kan basıncı, vücut sıcaklığı, TH mRNA ve kortikosteron artışının düzenlenmesinde, özellikle kronik stres durumunda önemli rol oynadığını göstermektedir. ANG II'nin AT₁ ve AT₂ reseptörleri üzerinden etkisi kronik strese bağlı hipertermide zıt iken, adrenal TH mRNA ve plazma kortikosteron düzeylerinin regülasyonunda paraleldir.

ANG II ve reseptörlerinin strese yanıt oluşturmundaki düzenleyici rolünün daha iyi anlaşılması, kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde önemli rol oynayan stresle ilgili mekanizmalara ışık tutacaktır.

Destek:

Bu çalışma "American Heart Association Postdoctoral Research Fellowship Grant: Central Angiotensin II Induces Tyrosine Hydroxylase in the Adrenals via the Splanchnic Nerve Following Restraint Stress". AHA Ödül Numarası: 0325368B ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Black PH, Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Psychosomatic Research* 2002; 52:1-23.
2. Kvetnansky R, Pacak K, Fukuhara K, Viskupic E, Hiremagalur B, Nankova B, Goldstein DS, Sabban EL, Kopin IJ. Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 771:131-58.
3. Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 1984; 224(4648):452-9.
4. Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003 28; 463(1-3):235-72.
5. Osterhout CA, Chikaraishi DM, Tank AW. Induction of tyrosine hydroxylase protein and a transgene containing tyrosine hydroxylase 5' flanking sequences by stress in mouse adrenal gland. *J. Neurochem* 1997; 68(3):1071-7.
6. Wommack JC, Delville Y. Chronic social stress during puberty enhances tyrosine hydroxylase immunoreactivity within the limbic system in

- golden hamsters. *Brain Res.* 2002; 933(2):139-43.
7. Makino S, Smith MA, Gold PW. Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress. *Brain Res.* 2002; 943(2):216-23.
8. Kvetnansky R, Nankova B, Hiremagalur B, Viskupic E, Vietor I, Rusnak M, McMahon A, Kopin IJ, Sabban EL. Induction of adrenal tyrosine hydroxylase mRNA by single immobilization stress occurs even after splanchnic transection and in the presence of cholinergic antagonists. *J Neurochem* 1996; 66(1):138-46.
9. McMahon A, Kvetnansky R, Fukuhara K, Weise VK, Kopin IJ, Sabban EL. Regulation of tyrosine hydroxylase and dopamine beta-hydroxylase mRNA levels in rat adrenals by a single and repeated immobilization stress. *J Neurochem.* 1992; 58(6):2124-30.
10. Nankova B, Kvetnansky R, Hiremagalur B, Sabban B, Rusnak M, Sabban EL. Immobilization stress elevates gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids. *Endocrinology.* 1996; 137(12):5597-604.
11. Sabban EL, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci.* 2001; 24(2):91-8.
12. Rusnak M, Kvetnansky R, Jelokova J, Palkovits M. Effect of novel stressors on gene expression of tyrosine hydroxylase and monoamine transporters in brainstem noradrenergic neurons of long-term repeatedly immobilized rats. *Brain Res* 2001; 899(1-2):20-35.
13. Pardon MC, Gould GG, Garcia A, Phillips L, Cook MC, Miller SA, Mason PA, Morilak DA. Stress reactivity of the brain noradrenergic system in three rat strains differing in their neuroendocrine and behavioral responses to stress: implications for susceptibility to stress-related neuropsychiatric disorders. *Neuroscience.* 2002; 115(1):229-42.
14. Henry JP, Nadra WE, Qian C-g, Liu Y-Y, Mormede P, Lemaire V, Ely D, Hendley E: Psychosocial stress induced chronic hypertension in normotensive strain of rats. *Hypertension* 1993; 21:714-723.
15. Yu K, Lu D, Rowland NE, Raizada MK. Angiotensin II regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the neuronal cultures of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* 1996; 137:3566-3576.
16. Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Kobayashi S. Elevated tyrosine hydroxylase mRNA levels in the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol.* 1994; 65(4):367-9.
17. Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Nakura H, Tateishi T, Kobayashi S. Elevated tyrosine hydroxylase mRNA levels in medulla oblongata

- of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996; 36(1):197-9.
18. Reja V, Goodchild AK, Phillips JK, Pilowsky PM. Tyrosine hydroxylase gene expression in ventrolateral medulla oblongata of WKY and SHR: a quantitative real-time polymerase chain reaction study. *Auto Neurosci Basic Clin*. 2002; 98:79-84.
 19. Yang G, Wan Y, Zhu Y. Angiotensin II-an important stress hormone. *Biol Signals*. 1996; 5(1):1-8.
 20. Leong DS, Terron JA, Falcon-Neri A, Armando I, Ito T, Johren O, Tonelli LH, Hoe KL, Saavedra JM. Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors. *Neuroendocrinology*. 2002; 75(4):227-40.
 21. Aguilera G, Kiss A, Luo X, Akbasak BS. The renin angiotensin system and the stress response. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; 771:173-86.
 22. Wolf G. "The road not taken": role of angiotensin II type 2 receptor in pathophysiology. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17(2):195-8.
 23. Kiss A, Jurkovicova D, Jezova D, Krizanova O. Changes in angiotensin AT1 receptor mRNA levels in the rat brain after immobilization stress and inhibition of central nitric oxide synthase. *Endocr Regul*. 2001; 35(2):65-70.
 24. Watanabe T, Hashimoto M, Okuyama S, Inagami T, Nakamura S. Effects of targeted disruption of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene on stress-induced hyperthermia. *J Physiol*. 1999; 515 (Pt 3):881-5.
 25. Saiki Y, Watanabe T, Tan N, Matsuzaki M, Nakamura S. Role of central ANG II receptors in stress-induced cardiovascular and hyperthermic responses in rats. *Am J Physiol*. 1997; 272(1 Pt 2):R26-33.
 26. Raghavendra V, Chopra K, Kulkarni SK. Brain renin angiotensin system (RAS) in stress-induced analgesia and impaired retention. *Peptides*. 1999; 20(3):335-42.
 27. Dumont EC, Rafrafi S, Laforest S, Drolet G. Involvement of central angiotensin receptors in stress adaptation. *Neuroscience*. 1999; 93(3):877-84.
 28. Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension*. 1996; 27(3 Pt 2):760-5.
 29. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature*. 1995; 377(6551):744-7.
 30. Hohle S, Spitznagel H, Rascher W, Culman J, Unger T. Angiotensin AT1 receptor-mediated vasopressin release and drinking are potentiated by an AT2 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*. 1995; 275(3):277-82.
 31. Israel A, Sosa B, Gutierrez CI. Brain AT(2) receptor mediate vasodepressor response to footshocks: role of kinins and nitric oxide. *Brain Res Bull*. 2000; 51(4):339-43.
 32. Li Z, Iwai M, Wu L, Shiuchi T, Jinno T, Cui TX, Horiuchi M. Role of AT2 receptor in the brain in regulation of blood pressure and water intake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284(1):H116-21.
 33. Gelband CH, Sumners C, Lu D, Raizada MK. Angiotensin receptors and norepinephrine neuromodulation: implications of functional coupling. *Regul Pept*. 1998; 73(3):141-7.
 34. Armando I, Terron JA, Falcon-Neri A, Takeshi I, Hauser W, Inagami T, Saavedra JM. Increased angiotensin II AT(1) receptor expression in paraventricular nucleus and hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation in AT(2) receptor gene disrupted mice. *Neuroendocrinology*. 2002; 76(3):137-47.
 35. Stoll M, Unger T. Angiotensin and its AT2 receptor: new insights into an old system. *Regul Pept*. 2001; 99(2-3):175-82.
 36. Castren E, Saavedra JM. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus and subfornical organ. *Endocrinology* 1988; 122(1):370-2.
 37. Jezova D, Ochedalski T, Kiss A, Aguilera G. Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinol* 1998; 10(1):67-72.
 38. Peng JF, Phillips MI. Opposite regulation of brain angiotensin type 1 and type 2 receptors in cold-induced hypertension. *Regul Pept*. 2001; 97(2-3):91-102.
 39. Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav* 1988; 43:47 – 55.
 40. Yang G, Xi ZX, Wan Y, Wang H, Bi G. Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress. *Biol Signals*. 1993; 2(3):166-72.
 41. Zelena D, Mergl Z, Foldes A, Kovacs KJ, Toth Z, Makara GB. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285(5):E1110-7.
 42. Bhatnagar S, Dallman MF. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic– pituitary – adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 1998; 84(4): 1025– 39.
 43. Jaferi A, Nowak N, Bhatnagar S. Negative feedback functions in chronically stressed rats: role of the posterior paraventricular thalamus. *Physiol Behav*. 2003; 78(3):365-73.
 44. Bhatnagar S, Huber R, Nowak N, Trotter P. Lesions of the posterior paraventricular thalamus block habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to repeated restraint. *J Neuroendocrinol*. 2002; 14(5):403-10.
 45. Uresin AY, Tonyali H, Karamursel S. The effects of losartan and immobilization stress on heart rate variability and plasma corticosterone levels in rats. *Int J Neurosci*. 2004; 114(3):365-79.
 46. Buckner FS, Chen FN, Wade CE, Ganong WF. Centrally administered inhibitors of the gene-

ration and action of angiotensin II do not attenuate the increase in ACTH secretion produced by ether stress in rats. *Neuroendocrinology*. 1986; 42(2):97-101.

47. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, 1998.
48. Dallman MF, Akana SF, Scribner KA, Bradbury MJ, Walker CD, Strack AM, et al. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 1991; 4(5):517–26.
49. Cierco M, Israel A. Role of angiotensin AT1 receptor in the cardiovascular response to footshock. *Eur J Pharmacol*. 1994; 251(1): 103-6.
50. Mayorov DN, Head GA. AT1 receptors in the RVLM mediate pressor responses to emotional stress in rabbits. *Hypertension*. 2003; 41(5): 1168-73.
51. Kregel KC, Stauss H, Unger T. Modulation of autonomic nervous system adjustments to heat stress by central ANG II receptor antagonism. *Am J Physiol*. 1994; 266(6 Pt 2): R1985-91.
52. Kubo T, Numakura H, Endo S, Hagiwara Y, Fukumori R. Angiotensin receptor blockade in the anterior hypothalamic area inhibits stress-induced pressor responses in rats. *Brain Res Bull*. 2001; 56(6): 569-74.
53. Watanabe T, Miyoshi M, Imoto T. Angiotensin II: its effects on fever and hypothermia in systemic inflammation. *Front Biosci*. 2004; 9:438-47.
54. Dogan MD, Sumners C, Broxson CS, Clark N, Tumer N. Central angiotensin II increases biosynthesis of tyrosine hydroxylase in the rat adrenal medulla. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313(3):623-6.
55. Holmes PV, Drugan RC. Stress-induced regulation of the renal peripheral benzodiazepine receptor: possible role of the renin-angiotensin system. *Psychoneuroendocrinology*. 1994; 19(1):43-54.
56. Armando I, Jezova M, Bregonzio C, Baiardi G, Saavedra JM. Angiotensin II AT1 and AT2 receptor types regulate basal and stress-induced adrenomedullary catecholamine production through transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1018:302-9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Müberra Devrim DOĞAN
Doğum Yeri : Yozgat
Doğum Tarihi : 25 Mart 1970
Adres : Hüseyin Onat Sok. 11/20
Aşağı Ayrancı, Ankara
E-posta : mdevrimdogan@gmail.com

Eğitim Durumu

Teğmen Kalmaz İlkokulu, Ankara, 1976-1981.
Atatürk Anadolu Lisesi, Ankara, 1981-1988.
Lisans; Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara, 1988-1994.

Mesleki Deneyim

Pratisyen Hekim; Yozgat 6. No'lu Sağlık Ocağı ve Ankara Lalahan Sağlık Ocağı, Kasım 1994-Haziran 1997.

Tıbbi Yazar; Omega Sözleşmeli Araştırma Kurumu, Mayıs 2004- .

Akademik Kariyer

Araştırma Görevlisi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Ab.D., Danışman: Prof. Dr. Eyüp Sabri Akarsu, Haziran 1997-Mart 2001.

Yurtdışı Deneyim

Doktora sonrası araştırma; Florida Üniversitesi Tıp Fakültesi; Danışman: Prof. Dr. Nihal Tumer, Mart 2002-Mayıs 2004.

Doktora sonrası araştırma; St Joseph Hastanesi ve Tıp Merkezi Travma Araştırma Bölümü; Danışman: Dr. Andrej A. Romanovsky, Mayıs 2001-Şubat 2002.

Bilimsel Başarılar

American Heart Association Postdoctoral Research Fellowship Grant: Central Angiotensin II Induces Tyrosine Hydroxylase in the Adrenals via the Splanchnic Nerve Following Restraint Stress. AHA Ödül Numarası: 0325368B .

Katıldığı Kurslar

Teorik ve Uygulamalı Klinik İlaç Araştırmaları Kursu: Araştırmacı Formasyonu. Nantes ve Ankara Üniversiteleri, Tıp Fakülteleri, Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Ana Bilim Dalları tarafından birlikte organize edilmiştir. Mayıs 18-24, 1998, Kuşadası, İzmir.

Klinik çalışmaların tasarım, uygulama, sunum ve kalite kontrolü TÜBİTAK ve Türk Tabipler Birliği tarafından ortaklaşa organize edilmiştir. Aralık 1998, Ankara.

Antihipertansif İlaçların Klinik Farmakolojisi, Klinik Farmakoloji Derneği, 26-30 Ekim 1999, Belek, Antalya.

Wake Forest Üniversitesi Fare ve Sıçan mikrocerrahi kursu (aortaya veya renal artere akım probu yerleştirme, kan basıncı ölçüm transmittininin femoral arter, aorta, karotid artere yerleştirilmesi ameliyatları), 27-28 Mart 2003, Winston-Salem, Kuzey Karolina, ABD.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

Türk Farmakoloji Derneği
American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics
Society for Neuroscience
The American Physiological Society

Yayın Listesi

I. Araştırma Projeleri

1. Maya mantarı hücre duvarı komponentlerinin sıçanlardaki akut *in vivo* etkilerinin karakterizasyonu.
2. Gram (-) bakterileri lipopolisakaritinun sıçanlarda termoregülasyona etkileri.
3. Termoregülasyonda otonomik sinir sisteminin rolü.
4. Vanniloid reseptörlerin termoregülasyondaki rolü.
5. Leptin reseptörlerinin termoregülasyondaki rolleri.
6. Yaşlılığa bağlı Kardiyovasküler Fonksiyon Bozuklukları: Tirozin Hidroksilazın düzenlenmesinde anjiyotensin II ve GDNF rolü.
7. Strese bağlı hipertansiyon: Anjiyotensin ve katekolaminlerin rolü.

II. Bildiriler

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Ataoğlu H, İlhan MD, Ferhat M, Akarsu ES. Maya mantarı hücre duvarı bileşenlerinin sıçanlarda oluşturduğu akut faz yanıtının karakterizasyonu; XIV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 2-7 Kasım 1997 Antalya. Sayfa: 105.
2. Doğan MD, Akarsu ES. İki farklı LPS ile oluşan termoregulator yanıtın telemetrik ve rektal ölçüm teknikleri ile karakterizasyonu. XIV Ulusal Farmakoloji Kongresi, 1-5 Kasım 1999 Antalya. Sayfa: p12-02.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Akarsu ES, İlhan MD, Ataoğlu H. Polysaccharide mannan component of *Saccharomyces cerevisiae* produces acute phase response in rats; New York Academy of Sciences Conference, Molecular Mechanisms of Fever, 2-4 Kasım 1997 Santa Fe, New Mexico, poster no: P1.
2. İlhan MD, Ataoğlu H, Ataoğlu O, Akarsu ES. Polysaccharide mannan component of *Candida Albicans* cell wall produces fever by icv injection in rats. 13.th International Congress of Pharmacology, 26-31 Temmuz 1998, Münih, Almanya. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Ek. 2 Cilt: 358 No 1, sayfa no: R 740, 1998.
3. Dogan MD, Ataoğlu H, Akarsu ES. Effects of indomethacin on the rectal temperature changes and cytokine release induced by two different LPSs in rats; 11th International Symposium Pharmacology of Thermoregulation, 9-13 Mayıs 1999, Sevilla, İspanya; poster no: 5.
4. Dogan İlhan MD, Ataoğlu H, Akarsu ES. Indomethacin and nimesulid inhibit LPS-induced hypothermia and TNF- α release in rats; 2nd European Congress of Pharmacology, 3-7 Temmuz 1999, Budapeşte Macaristan; Fundamental and Clinical Pharmacology Cilt: 13, Ek 1, sayfa no: 195s, 1999.
5. Dogan MD, Akarsu ES. Effects of selective cyclooxygenase enzyme inhibitors on the lipo-

polysaccharide-induced dual thermoregulatory changes in rats. 11th International conference on advances in prostaglandin and leukotriene research: Basic science and new clinical applications, 4-8 Haziran 2000, Floransa İtalya, sayfa no: 38 (sözlü bildiri).

6. Dogan MD, Ataoğlu H, Akarsu ES. Polysaccharide components of exogenous pyrogens produce fever in rats. Basic and Applied Thermophysiology, Minsk, Beyaz Rusya 2000, Eylül 19-20 (sözlü bildiri).
7. Akarsu ES, Dogan MD. The possible role of cyclooxygenase (COX) isoenzymes in lipopolysaccharide (LPS)-induced hypothermia and fever in rats. FASEB Experimental Biology 20-24 Nisan 2002, New Orleans, Louisiana, ABD (sözlü bildiri).
8. Dogan MD, Wos L, Patel S, Szekely M, Romanovsky AA. Are Vanilloid Receptors (VR) involved in phase 1 of lipopolysaccharide (LPS) fever? Poster#: A625 FASEB Experimental Biology 20-24 Nisan 2002, New Orleans, Louisiana, ABD.
9. Romanovsky AA, Ivanov AI, Kulchitsky VA, Dogan MD, Chen G, Reichlin S, Berthoud HR. Cholinergic banti-inflammatory pathway: Where does it lead? Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting Orlando, Florida, ABD. Program No: 868.8. 3-7 Kasım 2002.
10. Zhu X, Erdem SR, Erdem A, Broxson CS, Dogan MD, Scarpacci PJ, Tümer N. Long term effect of angiotensin II on blood pressure and tyrosine hydroxylase expression, *in vivo*, in rats. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting Orlando, Florida, ABD 3-7 Kasım 2002.
11. Dogan MD, Broxson CS, Summers C, Tümer N. Central angiotensin II increases biosynthesis of tyrosine hydroxylase in the adrenal medulla. Poster#:D585 FASEB Experimental Biology 11-15 Nisan 2003 San Diego, Kaliforniya ABD.
12. Akarsu ES, Dogan MD, Mamuk S. Lipopolysaccharide (LPS)-induced hypothermia is a regulated and cyclooxygenase (COX)-1 dependent decrease on body temperature in rats. Poster#: D459 FASEB Experimental Biology 11-15 Nisan 2003 San Diego, Kaliforniya ABD.
13. Romanovsky AA, Steiner AA, Dogan MD, Ivanov AI, Patel S, Rudaya AY, Jennings DH, Orchinik M, Pace TWW, O'Connor KA, Watkins LR. Leptin receptor mediates the recovery from lipopolysaccharide-induced hypothermia. Accepted to Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting 8-12 Kasım 2003 San Diego Kaliforniya, ABD.
14. Dogan MD, Broxson CS, Scarpacci PJ, Kontaridis S, Tümer N. Effects of losartan and PD123319 on stress-induced alterations in blood pressure and body temperature. Endocrinology Society Meeting 16-19 Haziran 2004 New Orleans, ABD.

III. Araştırma Makaleleri

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Dogan MD, Ataoğlu H, Ataoğlu O, Akarsu ES. Polysaccharide mannan components of *C. albicans* and *S. cerevisiae* cell wall produce fever by intracerebroventricular injection in rats. *Brain Res Bull* 48(5): 509-512, 1999.
2. Ataoğlu H, Dogan MD, Mustafa F, Akarsu ES. *Candida Albicans* and *Saccharomyces Cerevisiae* cell wall mannans produce fever in rats: Role of nitric oxide and cytokines. *Life Sci* 67(18): 2247-2256, 2000.
3. Dogan MD, Ataoğlu H, Akarsu ES. Effects of different serotypes of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on body temperature in rats. *Life Sci* 67(19): 2319-2329, 2000.
4. Dogan MD, Ataoğlu H, Akarsu ES. Effects of selective cyclooxygenase enzyme inhibitors on lipopolysaccharide-induced dual thermoregulatory changes in rats. *Brain Res Bull* 57(2): 179-85, 2002.
5. Dogan MD, Ataoğlu H, Akarsu ES. Characterization of the hypothermic component of LPS-induced dual thermoregulatory response in rats. *Pharmacol Biochem Be* 72(1-2): 143-150, 2002.
6. Dogan MD, Ataoğlu H, Akarsu ES. Nimesulide and diclofenac inhibit lipopolysaccharide-induced hypothermia and tumour necrosis factor- α elevation in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 16(4): 303-309, 2002.
7. Dogan MD, Kulchitsky VA, Patel S, Pétervári E, Székely M, Romanovsky AA. Bilateral transection of the splanchnic nerve does not affect lipopolysaccharide-induced fever in rats. *Brain Res* 993: 227-229, 2003.
8. Dogan MD, Sumners C, Broxson CS, Clark N, Tümer N. Central angiotensin II increases biosynthesis of tyrosine hydroxylase in the rat adrenal medulla. *Biochem Biophys Res Com* 313(3): 623-626, 2004.
9. Steiner AA, Dogan MD, Ivanov AI, Patel S, Rudaya AY, Jennings DH, Orchinik M, Pace TW, O'Connor KA, Watkins LR, Romanovsky AA. A new function of the leptin receptor: mediation of the recovery from lipopolysaccharide hypothermia. *FASEB J* 18(15): 1949-51, 2004.
10. Dogan MD, Patel S, Rudaya AY, Steiner AA, Székely M, Romanovsky AA. Lipopolysaccharide fever is initiated via a capsaicin-sensitive mechanism independent of the subtype-1 vanilloid receptor. *Br J Pharmacol* 143(8): 1023-32, 2004.

Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında melatoninin koruyucu etkileri

Dr. Engin ŞAHNA

Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., Elazığ

GİRİŞ

Koroner arterlerde meydana gelen daralma ve tıkanıklık sonucu bu damarların beslediği kalp kasında kalıcı veya geri döndürülebilir hasar meydana gelebilmektedir. Günümüzde koroner arterlerde en sık görülen hastalık, atheroskleroz sonucunda gelişen iskemik kalp hastalığıdır ve ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Akut miyokardiyal iskeminin tedavisinde amaç, kan akımının etkili bir şekilde düzeltilmesidir. Reperfüzyon iskemik dokunun canlılığını koruyabilmesi için çok önemlidir. Bununla beraber, miyokardiyal hücre fonksiyon bozukluğu ve hücre nekrozu oluşturabilecek olaylar dizisini de başlatabilir. Reperfüzyon hasarı, trombolizis, perkutan koroner girişimler (balon anjiyoplasti), koroner arter *by-pass* cerrahisi, kalp kapak operasyonları ve kalp transplantasyonu gibi birçok klinik durumda ortaya çıkabilmektedir¹⁻⁴. Hipertansiyon, miyokard infarktüsünün prognozunu kötüleştirebilen en önemli risk faktörleri arasındadır ve reperfüzyon hasarını arttırdığı belirtilmiştir^{2,3}.

MİYOKARDİYAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı; koroner endotelial hücreler, sirkulasyondaki kan hücreleri ve kardiyak miyositler gibi çok sayıda hücrenin etkileşimlerini kapsamaktadır. Bu hücrelerin çoğu, serbest oksijen radikalleri üretme kapasitesine sahiptir. Bu radikaller, vasküler hücre ve kardiyak miyositlere direkt zarar verebilirler ve miyokardiyal hasar oluştururlar. Ayrıca miyokardiyal hücre hasarı ve nekroza neden olabilecek olaylar serisini de tetikleyebilir, lökosit, endotelial hücre adezyon molekülleri, nötrofil aktivasyonunu kapsayan inflamatuvar olaylar zincirini başlatabilirler. İ/R sırasında miyokardiyal dokularda üretilen radikaller aracılı reaksiyonlar, enzim ve iyon transportlarının inaktivasyonu ile sonuçlanabilir. Hücre içi kalsiyum (Ca^{++}) dengesinde meydana gelen değişiklik (hücre içi Ca^{++} artışı) İ/R hasarının gelişiminde önemli rol oynar¹⁻³.

Antioksidan sistemin kapasitesini aşan aşırı radikal üretimi, membran hasarı, DNA yıkımı, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümlü meydana getirmektedir. Son zamanlarda yapılan deneysel ve klinik çalışmalar da, radikallerin hipertansiyon, aritmi, endotelial fonksiyon bozukluğu, atheroskleroz, miyokard infarktüsü ve kardiyak operasyonlarda görülen doku hasarında önemli rol oynadığı, radikal süpürücü ve antioksidanların faydalı etkileri gösterilmiştir^{2,4}.

Miyokardiyal İ/R hasarında antioksidan enzim tedavisinin ilk değerlendirilmesi Jooly ve ark⁵ tarafından süperoksit dismutaz (SOD) ile yapılmıştır. SOD bu çalışmalarda infarkt alanını azaltırken yetersiz bir koruma sağlamış ya da reperfüzyon süresi uzadığında erken koruyucu cevabın azaldığı rapor edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda değişik kombinasyonlarla plazma yarı ömrü uzatılmış ve hücrel *uptake*'i artırılmış SOD benzeri preparatlar daha olumlu sonuçlar vermiştir⁶. Hücre içi enzim düzeylerinde İ/R hasarına karşı kalbin korunması için önemli artışlara gereksinim duyulabilir. Tek enzime spesifik antioksidanlarla yapılan çalışmalarda diğer enzimlerde istenilen düzeye ulaşmada yetersizlik önemli sorun olabilmektedir. Direkt radikal süpürebilen, birden fazla antioksidan enzime etkili ajanların kullanılması koruyuculuğun artırılmasında etkili olabilir. Miyokardiyal iskemi ve komplikasyonlarında tedavi için uygun ajanların belirlenmesine yönelik çalışmalarda hasardan sorumlu mekanizmaları önleyebilen ajanların kombine verilmesinin hasarın azaltılmasında çok daha etkili olduğu bildirilmektedir⁴.

MELATONİN

Üç yüzyıl önce, Fransız filozof Rene Descartes, pineal bezi "ruhun sandalyesi" olarak tanımlamıştır. Buradan salgılanan ana maddenin melatonin olduğu ise, ancak 1950'li yılların sonlarına doğru gösterilmiştir. Melatoninin sirkadiyen ritimler, uyku, ruhsal durum, üreme, tümör gelişimi ve yaşlanma gibi birçok

olayın biyolojik regülasyonunda rolü olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır^{7,8}.

Karanlık başladığında melatonin seviyesi yükselmeye başlar. Gece yarısından sonra (02⁰⁰-04⁰⁰) pik seviyesine ulaşır ve sonra giderek düşer. Genel olarak, ışık melatonin sentezini azaltırken, karanlık artırır. Serum melatonin konsantrasyonunun, yaşlanma ile birlikte giderek azaldığı bilinmektedir⁷. Melatoninle ilgili yapılan deneysel çalışmalar; farmakolojik dozlarda hem akut hem de kronik olarak verilen melatoninin toksisite oluşturmadığını, oral verildiğinde çok hızlı absorbe edildiğini, intravenöz uygulamasının çok kolay ve güvenli olduğunu belirtmektedir. Ayrıca ekzojen verilen melatoninin endojen salgılanmaya engel olmadığını da rapor edilmiştir⁹.

Serbest radikal süpürücü ve antioksidan olarak melatoninin keşfi, deneysel ve klinik kullanımlarda büyük bir ilgi artışına neden olmuştur. Melatoninin, güçlü bir radikal süpürücü (hidroksil radikali, süperoksid anyon radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve peroksinitrit anyonuna güçlü etkili) ve antioksidan (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz stimülasyonu ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibisyonu) özelliğinin olması^{8,9}, İ/R hasarında etkili bir koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. Melatonin hem yağda hem de suda çözünebildiğinden vücudun her hücresine ve hücre içindeki diğer yapılara kolaylıkla girebilir. Bu nedenle de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha fazla etkilidir⁸.

Ani ölüm insidanslarının sabah saatlerinde yüksek olması ve bu saatlerde melatonin seviyesinin düşük oluşu¹⁰, koroner kalp hastalarında plazma melatonin düzeylerinin azalmış izlenmesi¹¹ ve insan antioksidan düzeyinin de serum melatonin seviyesi ile ilişkili olması¹² gibi bulgular kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde melatoninin rolü olabileceğini düşündürülebilir. Melatonin sempatik aktiviteyi baskılayabilir¹³, İ/R'a bağlı hücre içi Ca⁺⁺ artışını engelleyebilir¹⁴. Melatonin, adezyon molekülleri sentezini, lökosit adezyonunu azaltarak İ/R süresince kardiyak hasarın azalmasında yararlı etkiler gösterebilir^{9,15}. Melatoninin İ/R hasarında ve kemoterapotiklerin radikaller aracılıklı yan etkilerinin önlenmesinde faydalı etkileri bildirilmiştir^{8,16-20}. Yaptığımız deneysel çalışmalarda melatoninin, böbrekte İ/R²¹ ve gentamisin²², kalpte de dokso-rubisi-

nin²³ toksisitelerinin önlenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Cerrahi İşlem

Pinealektomi

Pinealektomi (px) Kuszak ve Rodin'in²⁴ tarif ettiği gibi yapıldı. Sham operasyonunda (Non-Px); pinealektomideki gibi cerrahi işlemler yapıldı, fakat pineal bez çıkarılmadı. Sıçanlar İ/R çalışmaları için 2 aylık bekleme periyoduna bırakıldılar.

İskemi Reperfüzyon

Üretan ile anestezi altına alınan erkek Wistar sıçanlarda trakea, sol karotid arter (kan basıncını kaydetmek için) ve jugüler ven (ilaç enjeksiyonu) kanüle edildi. Sol 4. ve 5. kaburgalar arasından toraks boşluğu açıldı ve hayvan hemen suni solunum pompasına bağlandı. Kalp, kaburgalara yapılacak hafif bir basınçla göğüs kafesinden dışarı doğru çekilip sol ana koronerin altından 10 mm'lik atravmatik yuvarlak iğne ile 6/0 ipek iplik geçirildi. İpek ipliğin her iki ucu plastik bir borudan geçirilip boru kalp ile temas eder halde bekletildi. İplik, boru içine çekilip bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak damarın kapatılması (oklüzyon) sağlandı. İskemi süresi tamamlandığında klemp açılarak tüp içinden geçen ip gevşetildi ve böylece reperfüzyon sağlandı. Hazırlık sırasında ve İ/R boyunca, EKG, kan basıncı ve kalp hızı kaydedildi.

Aritmilerin Değerlendirilmesi

Sol ana koroner artere 7 dak iskemi, ardından 7 dak reperfüzyon uygulandı. Ventriküler ektoptik aktivite, Lambeth Conventions'da²⁵ önerilen diagnostik kriterlere uygun olarak belirlendi. Deney sonunda yapılan kayıtlardan ventriküler ektoptik atımların (VEB; *ventricular ectopic beats*) sayıları, ventriküler taşikardi (VT) ve ventriküler fibrilasyon (VF) süreleri ve insidansları değerlendirildi.

Nekroz Alanının Ölçülmesi

Gruplara iskemi süresi 30 dak reperfüzyon süresi ise 120 dak olarak uygulandı. Deneye son verilmeden önce heparin uygulandı. Her deneyin sonunda kalpler hızlıca yerlerinden çıkarılıp Langendorff düzeneğine asıldı. Bir

miktar serum fizyolojik ile perfüze edildi. Koroner arterin çevresinde bulunan ipek sütür yeniden sıkıştırıldı. Risk alanı floresan partikül (Çinko Kadmiyum) ile tespit edildi. Nekroz alanını tespiti ise %1'lik trifenil tetrazolium klorid (TTC) boyama ile yapıldı. Nekroz alanlarının sınırları (TTC negatif doku) ve risk zonu (ultraviyole ışığı altında floresan partikülleri tutmayan alan) bir şeffaf asetat üzerine kopyalandı. Nekroz alanları ve risk zonu planimetrik metod ile ölçüldü. Nekroz miktarı risk zonunun yüzdesi olarak ifade edildi.

Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi

Kaplara, apoptotik DNA kırıklarının tayininde sıkça kullanılan bir yöntem olan TdT-mediated X-dUTP nick end labeling (TUNEL) karışımı uygulandı. Boyama sonunda TUNEL pozitifliği değerlendirildi.

Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

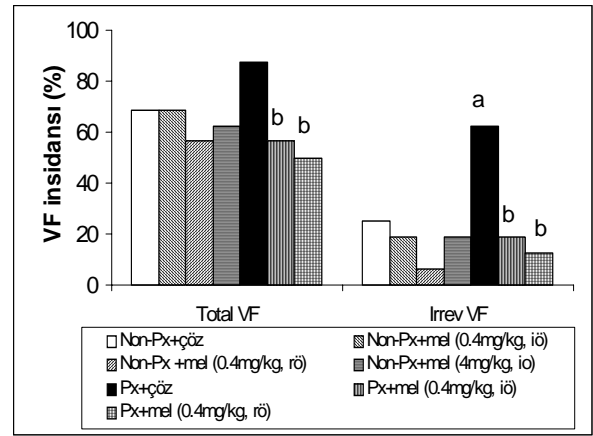
Kalp numuneleri malondialdehit (MDA) ve miyeloperoksidaz (MPO) düzeyini belirlemek için soğuk 150 mM KCl çözeltisinde homojenize edildi. Homojenizatların MDA konsantrasyonu, tiyobarbitürik asid reaktif maddelerinin varlığının belirlenmesi ile spektrofotometrik olarak tespit edildi²⁶. MPO düzeyleri Hillegass ve ark²⁷ tarif ettiği gibi belirlendi. GSH Elman reaktifi kullanımına dayanan spektrofotometrik metotla belirlendi. Sonuçlar MPO için U/g doku, MDA ve GSH için nmol/g doku olarak ifade edildi²⁶.

BULGULAR

Melatoninin I/R'a Bağlı Aritmilere Etkisi

Hemodinamik parametrelerde (kan basıncı ve kalp hızı) deney başlangıcında ve deney boyunca gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

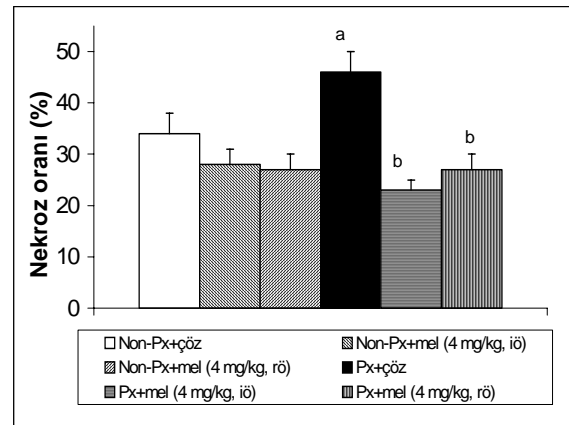
Aritmi deneylerinde, Px sıçanlardaki total ve irreversibl VF insidansları (%93.8 ve %62.5) kontrol grubuna (Non-Px) (%45.7, %12.5) göre yüksek bulundu. Gerek iskemi, gerekse reperfüzyon öncesi melatonin (0.4 veya 4 mg kg⁻¹) verilmesi, pinealektomize sıçanlardaki total ve irreversibl VF sıklığını azalttı. Non-Px sıçanlarda melatonin uygulaması hasarı azaltma eğiliminde olmakla beraber anlamlılığa ulaşmadı²⁸ (Şekil 1).



Şekil 1. Pinealektomi (Px) ve sham operasyonu (non-Px) yapılmış sıçanlarda total ve irreversibl ventrikül fibrilasyonu (VF) insidansları ve iskemi (iö) veya reperfüzyon (rö) öncesi verilen melatoninin (mel) bunlar üzerine etkisi. a: Kontrol (non-Px)'den anlamlı olarak farklı, b: Melatonin verilmesine bağlı anlamlı farklılık, p<0.05 (Sahna ve ark. *J Pineal Res*, 32: 194-8, 2002).

Melatoninin I/R'a Bağlı Nekroz Alanına Etkisi

Nekroz deneylerinde de, benzer şekilde, pinealektomi kontrol grubuna oranla nekroz oranını anlamlı bir şekilde artırırken, iskemi ya da reperfüzyon öncesi uygulanan melatonin, bu artışı kontrol değerlerine geri çevirdi. Melatonin pinealektomi yapılmamış sıçanlarda, hasarı azaltma eğiliminde olmakla beraber sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı²⁹ (Şekil 2).



Şekil 2. Pinealektomi (Px) ve sham operasyonu (non-Px) yapılmış sıçanlarda miyokardiyal nekroz oranları ile iskemi (iö) veya reperfüzyon (rö) öncesi verilen melatoninin (mel) etkisi. a: Kontrol (non-Px)'den anlamlı olarak farklı, b: Melatonin verilmesine bağlı anlamlı farklılık, p<0.05 (Sahna ve ark. *J Pin Res* 33:234-8, 2002).

Sonraki çalışmamızda daha yüksek doz (10 mg/kg) melatoninin verdiğimiz sıçanlarda, melatoninin nekroz oranını anlamlı derecede azalttığı belirlendi²⁶ (Tablo 1).

Tablo 1. Nekroz oranları. İskemi-reperfüzyon (İ/R), melatonin (Mel), n=8.

Gruplar	Risk zonu (cm ³)	Nekroz alanı (cm ³)	Nekroz alanı/Risk zonu (%)
İ/R+çözücü	45 (3)	23 (3)	50 (4)
İ/R+Mel (10 mg/kg)	48 (1)	16 (1) ^a	35 (1) ^a

a: Melatonin verilmesine bağlı anlamlı farklılık (p<0.05) (Sahna ve ark. *Physiol Res.* 2005).

Melatoninin İ/R'a Bağlı MDA ve GSH Düzeylerine Etkisi

İ/R, MDA düzeyinde anlamlı artışa neden olurken GSH düzeyini azaltmıştır. Melatonin (10 mg/kg) iskemi öncesi verildiğinde miyokarda oksidatif hasarın göstergesi olan MDA düzeyini anlamlı azaltırken, antioksidan savunma sisteminde önemli rolü olan GSH seviyesini artırdı²⁶ (Tablo 2).

Tablo 2. İskemi-reperfüzyon (İ/R) ve melatoninin kalpte glutasyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeylerine etkileri n=8.

Gruplar	GSH (nmol/gr)	MDA (nmol/gr)
Kontrol	675(48)	55(5)
İ/R+çözücü	462(25)	141(10) ^a
İ/R+Melatonin	794(140) ^b	52(34) ^b

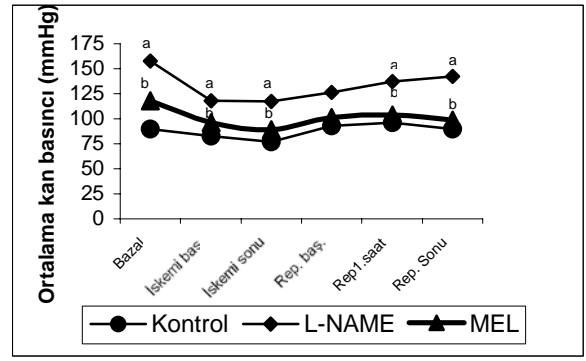
a: Kontrolle göre anlamlı farklılık, b: Melatonin verilmesine bağlı anlamlı farklılık p<0.05 (Sahna ve ark. *Physiol Res* 2005).

Melatoninin İ/R'a Bağlı Apoptotik Değişiklikler Üzerine Etkisi

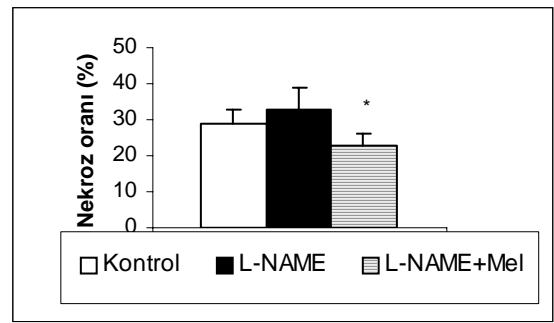
TUNEL boyama sonuçlarına göre; İ/R grubunda özellikle sol ventrikül serbest duvarı ve apekse yakın bölgeler yoğun boyanma alanları gösterirken, melatonin (10 mg/kg) uygulamasının İ/R grubuna göre aynı kesit düzleminde önemli ölçüde TUNEL pozitifliğini azalttığı belirlendi³⁰.

L-NAME ile Kronik Nitrik Oksit Sentaz (NOS) İnhibisyonu Oluşturulan Sıçanlarda Melatoninin Kan Basıncı ve İ/R'a Bağlı Nekroz Alanına Etkisi

L-NAME (15 gün, 40 mg/kg/gün) ile kronik Nitrik Oksit Sentaz (NOS) inhibisyonu kan basıncını anlamlı artırdı. Melatonin (L-NAME uygulamasının son 5 günü 10 mg/kg) verilmesi kan basıncı (Şekil 3) ve kalpte İ/R'a bağlı nekrozu anlamlı azalttı (Şekil 4).



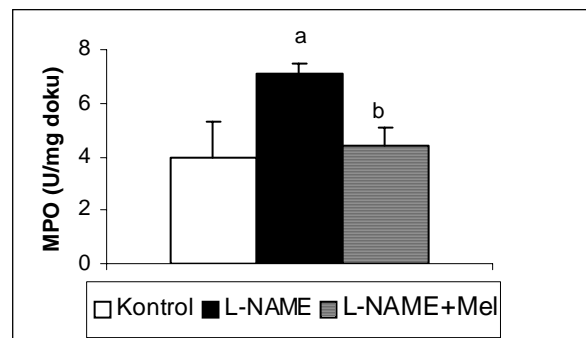
Şekil 3. L-NAME ile NOS inhibisyonu oluşturulan sıçanlarda bazal ve iskemi-reperfüzyonun değişik aşamalarında ortalama kan basıncı değerleri. a: kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, b: L-NAME grubuna göre anlamlı farklılık (p<0.05).



Şekil 4. L-NAME ile NOS inhibisyonu oluşturulan sıçanlarda nekroz oranları (%). *: melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık (p<0.05).

L-NAME ile Kronik NOS İnhibisyonu Oluşturulan Sıçanlarda Melatoninin İ/R'a Bağlı MPO Düzeyine Etkisi

L-NAME'in, kontrol grubuna oranla İ/R sonunda, nötrofil aktivasyonunun göstergesi MPO düzeyini anlamlı artırdığı (sırasıyla 7.1±0.4 ve 4.0±1.3) ve melatonin uygulamasının da bu artışı anlamlı azalttığı belirlendi (4.4±0.7) (Şekil 5).



Şekil 5. L-NAME ile NOS inhibisyonu oluşturulan sıçanlarda iskemi-reperfüzyon sonunda kalplerde miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri. a: L-NAME uygulamasına bağlı anlamlı farklılık (p<0.05); b: melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık (p<0.05).

SONUÇ

Melatoninin hücre içine hızlıca girebilme ve tüm yapılara ulaşabilme özelliği VF gibi klinik acillerde oldukça önemli olabilir. Çalışmalarımızda; reperfüzyonun hemen başında melatonin uygulamasının reperfüzyonun indüklediği VF, mortalite ve infarkt alanı üzerine koruyuculuğu belirlenmiştir.

Yapılan deneysel çalışmalarda miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarında önemli koruyucu etkileri belirlenen melatoninin, iskemik kalp hastalıklarının önlenmesi-tedavisinde, *by-pass*, koroner arter spazmı, angioplasti ve trombolitik süreçler sonrası gelişen reperfüzyon hasarının (özellikle hayatı tehdit eder nitelikteki aritmilerin ve ileriki yaşam kalitesini etkileyebilen infarkt alanının) önlenmesinde klinik olarak test edilebileceği düşünülebilir.

Teşekkür

Bu çalışmalar İnönü Üniversitesi (P-99/30) ve Fırat Üniversitesi (P-938) Bilimsel Araştırmalar Birimleri tarafından desteklenmiştir.

Çalışmalara katkılarından dolayı Prof. Dr. Ahmet Acet, Prof. Dr. Ercüment Ölmez, Prof. Dr. Hakkı Engin Aksulu, Doç. Dr. Mustafa Birincioğlu ve Dr. Hakan Parlakpınar'a teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Lefer DJ, Granger DN. Am J Med 109:315-23, (2000).
2. Wattanapitayakul SK, Bauer JA. Pharmacol Ther 89:187-206, (2001).
3. Verma S, Fedak PWM, Weisel RD et al. Circulation 105:2332-2336, (2002).
4. Wang Q-D, Pernow J, Sjöquist PO et al. Cardiovascular Research 55:25-37, (2002).
5. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB et al. Circ Res 54:277, (1984).
6. Kilgore KS, Friedrichs GS, Johnson CR et al. J Mol Cell Cardiol 26:995-1006, (1994).
7. Ölmez E, Sahna E, Ağkadir M et al. Turgut Özal Tıp M Derg 7:177-187, (2000).
8. Reiter RJ, Tan DX, Gitto E et al. Pol J Pharmacol 56:159-70, (2004).
9. Reiter RJ, Tan DX. Cardiovascular Research 58:10-19, (2003).
10. Muller JE, Ludmer PL, Willich SN, et al. Circulation 75:131-8, (1987).
11. Marktl W, Brogger P, Herold M. Wien Clin Wochenschrift 109:747-9, (1997).
12. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ et al. Ann N Y Acad Sci 854:410-24, (1998).
13. Laflammer K, Wu S, Foucart AL et al. Am J Hypertens 11:219-29, (1998).
14. Salie R, Harper I, Cillie C et al. J Mol Cell Cardiol 33:343-357, (2001).

15. Del Zar MM, Martinuzzo C, Falcon C et al. J Clin Endocrinol 70:246-51, (1990).
16. Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM et al. Cardiovasc Drugs Ther 16:5-6, (2002).
17. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ et al. J Pin Res 25:184-91, (1998).
18. Lagneux C, Joyeux M, Demenge P et al. Life Sci 66:503-509, (2000).
19. Dobsak P, Siegelova J, Eicher JC et al. Pathophysiology 9:179-187, (2003).
20. Lee YM, Chen HR, Hsiao G, et al. J Pineal Res 33:72-80, (2002).
21. Sahna E, Parlakpınar H, Ozturk F et al. Urol Res 31:188-93, (2003).
22. Ozbek E, Turkoz Y, Sahna E et al. BJU Int 85:742-6, (2000).
23. Sahna E, Parlakpınar H, Ozturk F et al. J Pineal Res 35:257-61, (2003).
24. Kuszak J, Rodin M. Experientia 33:283-284, (1977).
25. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ et al. Cardiovasc. Res 22:447-455, (1988).
26. Sahna E, Parlakpınar H, Türköz Y et al. In press (Physiological Res 2005).
27. Hillegass LM, Griswold DE, Brickson B, et al. J Pharmacol Methods 24:285-95, (1990).
28. Sahna E, Olmez E, Acet A. J Pineal Res 32:194-198, (2002).
29. Sahna E, Acet A, Olmez E et al. J Pineal Res 33:234-8, (2002).
30. Parlakpınar H, Sahna E, Ozgen U et al. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium, Joint Meeting of the Turkish & Dutch. Pharmacological Societies, Oct 17-21, Belek Antalya/TURKEY, (2003).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Engin ŞAHNA
Doğum Yeri : Yusufeli, Artvin
Doğum Tarihi : 05.05.1972
Adres : Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., 23100, Elazığ
Tel. : 0 424 237 00 00/6699
Faks : 0 424 237 91 38
E-mail : esahna@firat.edu.tr

Eğitim Durumu

Terme Lisesi, Samsun, Orta Öğrenim
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Ankara, Lisans
İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., Malatya, Doktora

Kurs ve Sertifikalar

Rasyonel Farmakoterapi Eğitici Eğitimi, Sağlık Bakanlığı, Ankara, 2-14 Temmuz 2001.
Therapeutic Drug Monitoring. EACPT 6th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics. İstanbul, 24-28 June 2003.

Bilimsel Başarılar

Birincilik Ödülü, Poster Yarışması, Türk Alman Jinekoloji Derneği. III. Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi 19-23 Mayıs 1999, Antalya "Estrogen restores adrenomedullin levels back to premenopausal values in ovariectomized rats."

Birincilik Ödülü, Poster Yarışması Türk Farmakoloji Derneği, XVI. Ulusal Farmakoloji Kongre-si, 01-05 Ekim, 2001, Kuşadası. "Melatoninin sisleptine bağlı akut böbrek hasarına etkileri."

Üyelikler

Türk Farmakoloji Derneği, 1999

Yayın Listesi

I. Araştırma Makaleleri

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Sahna E, Kurcer Z, Ozturk F, Cengiz N, Vardi N, Birincioglu M, Olmez E. Effects of chronic ethanol consumption on alpha-adrenergic-induced contractions and endothelium-dependent relaxations in rat thoracic aorta. *Pharmacol Res* 2000; 4: 629-633.
2. Ozbek E, Turkoz Y, Sahna E, Ozugurlu F, Mizrak B, Ozbek M. Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU Int* 2000; 85: 742-746.
3. Sahna E, Olmez E, Acet A. Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: can we reduce the incidence of sudden cardiac deaths. *J Pineal Res* 2002; 32: 194-198.
4. Sahna E, Acet A, Ozer M.K, Olmez E. Myocardial ischemia-reperfusion in rats: reduction of infarct size either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin. *J Pin Res* 2002; 33: 234-238.
5. Ozer MK, Sahna E, Birincioglu M, Acet A. Effects of captopril and losartan on myocardial ischemia-reperfusion induced arrhythmias and necrosis in rats. *Pharmacol Res* 2002; 45: 257-263.
6. Parlakpınar H, Sahna E, Ozer MK, Ozugurlu F, Vardi N, Acet A. Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury *J Pineal Res* 2002; 33: 161-166.
7. Esrefoglu M, Kurus M, Sahna E. The beneficial effect of melatonin on chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *J Int Med Res* 2003; 31: 42-44.
8. Parlakpınar H, Ozer M.K., Sahna E, Vardi N, Cigremis Y, Acet A. Amikacin-induced acute renal injury in rats: protective role of melatonin. *J Pineal Res* 2003; 35: 85-90.
9. Sahna E, Parlakpınar H, Ozturk F, Cigremis Y, Acet A. The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Urol Res* 2003; 31: 188-193.

10. Aladag M.A., Turkoz Y, Sahna E, Parlakpınar H, Gul M. The attenuation of vasospasm by using a SOD mimetic after experimental subarachnoidal haemorrhage in rats. *Acta Neurochirurgica* 2003; 145: 673-677.
11. Sahna E, Parlakpınar H, Ozturk F, Ozer MK, Ozuğurlu F, Acet A. Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *J Pineal Res* 2003; 35: 257-261.
12. Sahna E, Parlakpınar H, Vardi N, Cigremis Y, Acet A. Efficacy of melatonin as protectant against oxidative stress and structural changes in liver tissue in pinealectomized rats. *Acta Histochem* 2004; 106: 331-336.
13. Sahna E, Parlakpınar H, Cihan OF, Turkoz Y, Acet A. Effects of aminoguanidine against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Cell Biochem Funct* 2004.
14. Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, Acet A. Protective effects of melatonin on myocardial ischemiareperfusion induced infarct size and oxidative changes. *Physiol Res* 2005 (baskıda).
15. Parlakpınar H, Sahna E, Acet A, Mızrak B, Polat A. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on myocardial ischemia-reperfusion induced apoptotic cell death. *Toxicology* (2005) (baskıda).

Ulusal Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Gökdeniz R, Yürekli M, Birincioglu M, Özer MK, Şahna E, Olmez E. Estradiol restores adrenomedullin levels back to premenopausal state in ovariectomized rats. *New J Med* 2000; 17: 237-239.
2. Ölmez E, Sahna E, Ağkadir M, Acet A. Melatonin: Emeklilik yaşı 80 olur mu? *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 2000; 7: 177-187.
3. Sahna E and Acet A. Effects of pinealectomy on myocardial ischemia-reperfusion induced infarct size. *Fırat Tıp Dergisi* 2001; 6: 446-452.
4. Kurçer Z, Şahna E, Toğal T, Türköz A, Kurçer MA, Birincioglu M. Turgut Özal Tıp Merkezinde Ameliyat Olan Hastalarda Serum Kolinesteraz Aktiviteleri. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2003; 10: 191-193.

II. Bildiriler

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, F Ozturk, Acet A. Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. 2nd International Meeting on Free radicals in Health and Disease: The role of oxidants and antioxidants in the regulation of chronic disease and free radical school. May 8-12, 2002 Istanbul, Turkey.
2. Parlakpınar H, Sahna E, Ozer MK, Çigremis Y, Ozuğurlu F, Acet A. Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity. 1st International Meeting on Medicinal and Phar-

- maceutical Chemistry September 25-28, 2002 Ankara, Turkey.
3. Aladağ MA, Turkoz Y, Sahna E, Parlakpınar H, Gül M. The prevention of vasospasm by using a SOD mimetic after experimental subarachnoidal hemorrhage in rats. 2nd International Meeting on Free radicals in Health and Disease: The role of oxidants and antioxidants in the regulation of chronic disease and free radical school. May 8-12, 2002 Istanbul, Turkey.
 4. Aladağ MA, Turkoz Y, Sahna E, Parlakpınar H, Gül M. The prevention of vasospasm by using a protein kinase C inhibitor after experimental subarachnoidal hemorrhage in rats. 2nd International Meeting on Free radicals in Health and Disease: The role of oxidants and antioxidants in the regulation of chronic disease and free radical school. May 8-12, 2002 Istanbul, Turkey.
 5. Parlakpınar H, Ozer MK, Sahna E, Gaffaroglu M, Acet A. Reduction of amikacin-induced nephrotoxicity in rats by caffeic acid phenethyl ester (cape). EACPT 6th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics. 24-28 June 2003 İstanbul, Turkey.
 6. Parlakpınar H, Ozer M.K., Sahna E, Çiğremiş Y, Acet A. Protective effect of aminoguanidine against cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats. EACPT 6th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics. 24-28 June 2003 İstanbul, Turkey
 7. Parlakpınar H, Ozer MK, Sahna E, Acet A. Attenuation of ischemia-reperfusion-induced myocardial infarct size in rats by aminoguanidine. EACPT 6th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics. 24-28 June 2003 İstanbul, Turkey.
 8. Parlakpınar H, Sahna E, Kavaklı A, Mızrak B, Acet A. Effects of melatonin on brain ischemia-reperfusion induced apoptotic changes in rats. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish & Dutch Pharmacological Societies. October 17-21, 2003. Belek-Antalya/Turkey.
 9. Parlakpınar H, Sahna E, Kavaklı A, Mızrak B, Acet A. Effects of caffeic acid phenethyl ester on brain ischemia-reperfusion induced apoptotic changes in rats. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium, & Joint Meeting of The Turkish & Dutch Pharmacological Societies. October 17-21, 2003. Belek-Antalya/Turkey.
 10. Sahna E, Parlakpınar H, Çiğremiş Y, Vardı N, A. Acet. Effects of pinealectomy and melatonin on liver tissue. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish & Dutch Pharmacological Societies. October 17-21, 2003. Belek-Antalya/Turkey.
 11. Sahna E, Parlakpınar H, Cihan OF, Y. Türköz, A. Acet. Comparative investigation of the efficiency of melatonin and aminoguanidine against renal ischemia-reperfusion injury in rats. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish & Dutch Pharmacological Societies. October 17-21, 2003. Belek-Antalya/Turkey.
 12. Tuğrul İ, Ayar A, Sahna E, Aksulu HE. Chronic indomethazin application decreases alpha-2 adrenoceptor contractile responses in rat aorta. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish & Dutch Pharmacological Societies. October 17-21, 2003. Belek-Antalya/Turkey.
 13. Parlakpınar H, Ozer MK, Sahna E, Cigremis Y, Acet A. Effects Amikacin induced acute renal injury in rats: protective role of melatonin. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish & Dutch Pharmacological Societies. October 17-21, 2003. Belek-Antalya/Turkey.
 14. Parlakpınar H, Ozer MK, Sahna E, Cigremis Y, Acet A. Protective role of melatonin on liver injury related to myocardial ischemia-reperfusion. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish & Dutch Pharmacological Societies. October 17-21, 2003. Belek-Antalya/Turkey.
 15. E. Sahna, H. Parlakpınar, Y. Türköz, A. Acet. Effects of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion-induced infarct size and oxidative stress. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish & Dutch Pharmacological Societies. October 17-21, 2003. Belek-Antalya/Turkey.
 16. Parlakpınar H, Sahna E, Ozgen U, Mızrak B, Acet A. Protective role of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion-triggered apoptosis. Turkish Pharmacological Society, 17th National Congress of Pharmacology, 1st Clinical Pharmacology Symposium & Joint Meeting of The Turkish & Dutch Pharmacological Societies. October 17-21, 2003. Belek-Antalya/Turkey.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Şahna E, Birincioğlu M, Ölmez E, Acet A. Pinealektomi İskemi-reperfüzyona bağlı aritmileri ve ölüm sıklığını artırıyor. Türk Farmakoloji Derneği, XV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 1-5 Kasım 1999, Manavgat, Antalya.
2. Şahna E, Kurçer Z, Öztürk F, Cengiz N, Vardı N, Birincioğlu M, Ölmez E. Kronik etanol tüketiminin sıçan torasik aortasında alpha-adrenerjik uyarıma bağlı kasılma ve endotele bağımlı gevşeme cevaplarına etkisi. Türk Farmakoloji

- Derneği XV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 1-5 Kasım 1999 Manavgat, Antalya.
3. Kurçer Z, Şahna E, Birincioğlu M, Ölmez E, Turgut Özal tıp Merkezinde ameliyat olan hastalarda plazma kolinesteraz düzeylerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı. Türk Farmakoloji Derneği XV. Ulusal Farmakoloji Kongresi 1-5 Kasım 1999 Manavgat, Antalya.
 4. Gökdeniz R, Yürekli M, Birincioglu M, Özer MK, Sahna E, Ölmez E. Estrogen restores adreno-medullin levels back to premenopausal values in ovariectomized rats. Türk-Alman Jinekoloji Derneği, 3. Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, 19-23 Mayıs 1999, Antalya, Türkiye.
 5. Aladağ MA, Türköz Y, Cihan OF, Şahna E, Cengiz N. Inhibition of post laminectomy epidural fibrosis by aminoguanidine in a rat model. XVIII. Gevher Nesibe Tıp Günleri III. Deneysel ve Klinik Araştırma Workshop'u, 18-20 Mayıs 2000, Kayseri.
 6. Türköz Y, Aladağ MA, Cihan OF, Şahna E, Cengiz N. The effects of nitric oxide on extensive epidural fibrosis after laminectomy in rats: a preliminary study. Gevher Nesibe Tıp Günleri III. Deneysel ve Klinik Araştırma Kongresi ve Workshop'u, 2000, Kayseri.
 7. Özer MK, Şahna E, Birincioğlu M, Acet A. Kaptopril ve losartan'ın kardiyak iskemi-reperfüzyona bağlı nekroz üzerine etkileri XVI. Ulusal Farmakoloji Kongresi 1-5 Ekim 2001, Kuşadası.
 8. Parlakpınar H, Şahna E, Özer MK, Özüğurlu F, Acet A. Melatoninin sisplatine bağlı akut böbrek hasarına etkileri XVI. Ulusal Farmakoloji Kongresi 1-5 Ekim 2001, Kuşadası.
 9. Kurçer Z, Şahna E, Ölmez E, Acet A. Pinealektominin sıçan torasik aortasında vazokonstriktör ajanlara bağlı kasılma ve endoteliuma bağlı gevşeme cevaplarına etkisi XVI. Ulusal Farmakoloji Kongresi 1-5 Ekim 2001, Kuşadası.
 10. Şahna E, Özer MK, Ölmez E, Acet A. Melatoninin sıçanda in vivo miyokardial iskemi-reperfüzyona bağlı infarkt alanına fizyolojik ve farmakolojik etkileri XVI. Ulusal Farmakoloji Kongresi 1-5 Ekim 2001, Kuşadası.
 11. Şahna E, Ölmez E, Acet A. Melatoninin miyokardial iskemi-reperfüzyona bağlı aritmiler üzerine fizyolojik ve farmakolojik etkileri XVI. Ulusal Farmakoloji Kongresi 1-5 Ekim 2001, Kuşadası.
 12. Kavaklı A, Parlakpınar H, Akpolat N, Sahna E, Acet A. Effects of pinealectomy and melatonin on brain ischemia-reperfusion induced morphologic changes in rats, 3rd National Congress of Neuroscience, Neuroanatomy 3, 2004, Denizli.

Amitriptilinin kardiyovasküler toksik etkisinde adenozin reseptörlerinin rolü

Dr. Şule Kalkan

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., İzmir

GİRİŞ

Trisiklik antidepresanlar (TSA), dünyada yaygın olarak kullanılan ve aşırı dozda alındığında ölümle sonuçlanabilen ciddi zehirlenmelere yol açan ilaçlardır. Amerika Birleşik Devletleri Zehir Danışma Merkezleri Birliği tarafından, ölümle sonuçlanan ilaç zehirlenmeleri arasında ikinci sırayı antidepresan ilaçların aldığı ve bunların 1/3'den de bir TSA olan amitriptilinin sorumlu olduğu bildirilmiştir¹. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç ve Zehir Danışma Merkezine yapılan başvurular da da antidepresan ilaçlarla olan zehirlenmelerin %81.8'nin TSA ilaçlarla oluştuğu bildirilmektedir².

TSA ilaçlarla zehirlenmelere bağlı morbidite ve mortaliteden kardiyovasküler toksik etkiler sorumlu tutulmaktadır. TSA zehirlenmesi nedeniyle oluşan kardiyovasküler toksik bulgular iletimde gecikme, aritmi ve hipotansiyondur. Bu toksik etkiler ilacın kalpte aksiyon potansiyeli üzerine, direk damar tonusu üzerine ve otonom sinir sistemi üzerine olan etkilerine bağlı olarak gelişmektedir³⁻⁴. TSA ilaç zehirlenmesine sekonder gelişen hipotansiyon tedaviye dirençli olup, ciddi komplikasyonlara yol açmakta ve sık görülen ölüm nedenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. TSA ilaçların oluşturduğu hipotansiyonda farklı mekanizmaların rol oynadığı bildirilmektedir. Bu mekanizmalar arasında; hızlı sodyum kanallarının blokajına bağlı ileti bozuklukları ve kalp yetmezliği, postsinaptik sempatik alfa adrenerjik reseptör blokajına bağlı vazodilatasyon ve noradrenalinin sinir ucuna geri alınımının inhibisyonu sonucu gelişen noradrenalin deplesyonu yer almaktadır. Yapılan *in vivo* çalışmalarda sıçanlarda nitrik oksid (NO) üretiminin TSA zehirlenmesine bağlı oluşan hipotansiyonu artırdığı bildirilmektedir⁵⁻⁶. TSA zehirlenmelerinde oluşan elektrokardiyogram (EKG) anormallikleri (QRS uzaması ve QT uzaması) kardiyovasküler toksisitenin klinik kanıtı olarak kabul edilmektedir⁷⁻⁸.

TSA zehirlenmelerinde oluşan hipotansiyonun standart tedavisinde intravenöz sıvı verilmesi ve sodyum bikarbonat ile alkalinizasyon

önerilmektedir. Bu tedavilere dirençli hipotansiyonda noradrenalin, fenilefrin ve dopaminin vazopressör dozları kullanılmaktadır⁴⁻⁵. Sodyum bikarbonat iletim gecikmeleri ve hipotansiyonu geri çevirebildiği gibi TSA'na bağlı gelişen geniş kompleksli disritmilerin tedavisinde de önerilmektedir³⁻⁴. Nitrik oksid sentaz inhibitörü L-NAME'in TSA zehirlenmelerine bağlı oluşan hipotansiyonu etkin olarak geri çevirdiği bildirilmektedir⁵⁻⁶.

Adenozin çeşitli kimyasal olayların düzenlenmesinde rolü olan endojen bir nükleoziddir. Adenozin, etkilerini dört tip reseptör aracılığı ile gösterir (A₁, A_{2a}, A_{2b}, A₃). Adenozin reseptörleri birçok dokuda yaygın olarak bulunmakla birlikte özellikle kardiyovasküler sistemde etkilerini A₁, A_{2a} ve A₃ reseptörleri aracılığı ile yapmaktadır. A₁, A_{2a} ve A₃ reseptörlerinin ventrikül miyozitlerinde bulunduğu gösterilmiştir⁹. İnsanlarda vasküler düz kas ve endotel hücrelerinde A₁, A_{2a} ve A_{2b} reseptörleri gösterilmiştir¹⁰. Adenozin A₁ reseptörlerinin aktivasyonunun kardiyovasküler sistemde, negatif inotrop, negatif kronotrop ve negatif dromotrop etkiye neden olduğu bildirilmektedir. Adenozin A₁ reseptörlerinin uyarılması kalp kası hücrelerinde adenilat siklazı inhibe ederek antiadrenerjik (β -adrenerjik reseptör stimülasyonunun inhibisyonu) etki ile kardiyak etkilerini oluşturmaktadır. Adenozin A₂ reseptörleri ise, kalpte A₁ reseptörlerinin antiadrenerjik etkisine zıt yönde etki oluşturmaktadır. Aynı zamanda güçlü bir vazodilatör olduğu bilinen adenozin bu etkisini özellikle periferik A_{2a} reseptörleri aracılığı ile yapmaktadır^{9,11}.

Adenozinin; A₁ reseptörleri ile kardiyak depresyon oluşturarak, A_{2a} reseptörleri ile periferik vazodilatasyon yaparak ve A₃ reseptörleri ile mast hücre degranülasyonu sonucu histamin salınımına yol açarak hipotansif etki oluşturduğu bildirilmektedir¹²⁻¹⁵. Yapılan çalışmalarda non-selektif adenozin reseptör antagonistleri ile kronik tedavi edilen sıçanlarda hipertansiyon ve kardiyovasküler sistemde yapısal değişiklikler geliştiği bildirilmiştir¹⁶⁻¹⁷.

Çalışmamızın amaçları; bir trisiklik antidepresan olan amitriptilinin yüksek dozuyla oluşan kardiyovasküler toksik etkilerin düzeltilmesinde adenozin reseptör antagonistlerinin etkinliğinin ve amitriptilinin kardiyovasküler toksik etki mekanizmasında adenozin reseptörlerinin rolü olup olmadığının anestezi altındaki sıçanlarda araştırılmasıdır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Randomize, kontrollü deneysel bir araştırma olan çalışmamıza Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulundan izin alındıktan sonra başlamış ve Farmakoloji Ab.D. laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda randomize olarak seçilen, ağırlıkları 250-300 g (255.7 ± 4.0) arasında değişen, 66 adet erkek Wistar sıçanlar kullanıldı. Deneyden 12 saat önce sıçanlar aç bırakılarak sadece su içmelerine izin verildi. Deney günü sıçanlar üretan/ α -kloraloz (500 mg/kg/50 mg/kg) ile i.p. olarak anestezi edildi. Kan basıncı ölçümü için sol karotis arteri heparinize serum fizyolojik (100 ünite/ml) içeren polietilen kanül [PE 50 OD mm (in.) .97 (.038) ID mm (in.) .58 (.023)] ile kanüle edildi. Ortalama arteriyel kan basıncı (OAB), sistolik (SB) ve diyastolik (DB) arteriyel kan basıncı, kalp atım hızı (KAH), EKG de QRS süreleri ve yaşam süreleri bir data acquisition sistem (BIOPAC, MP30B-CE, 206B1564; USA) aracılığı ile kaydedildi. İlaçlar kanüle edilen sol eksternal juguler ven ve sol femoral venden i.v. bolus veya infüzyon pompası aracılığı ile infüze edilerek verildi (Harvard Apparatus, UK). Ortalama arteriyel basınç, sistolik ve diyastolik arteriyel kan basınçlarından $OAB = [SB + 2(DB)]/3$ formülü kullanılarak hesaplandı⁶.

Deney Protokolu

Deney protokolu iki bölüm olarak planlandı. İlk bölümde, amitriptilinin oluşturduğu kardiyovasküler toksik etkilerin adenozin reseptör antagonistleri ile geri döndürülebilirliği araştırılırken, ikinci bölümde amitriptilin ile oluşturulan hipotansiyon ve diğer kardiyovasküler toksik etkilerde adenozin reseptörlerinin rolü araştırıldı.

Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra 15 dk. sıçanların stabilizasyonu için beklendi. Stabilizasyon sonrası sistolik arteriyel kan basıncı

(SB) 90 mmHg'nin altında olan sıçanlar deneye alınmadı.

Ön Çalışma

Amitriptilinin 15 dakika içinde ortalama arteriyel basınçta %40-45 azalma yapan dozu bulundu (n= 6). Tüm sıçanlarda amitriptilin zehirlenmesi 0.94 mg/kg/dk dozunda amitriptilin infüzyonu (0.05mL/kg/dk) ile oluşturuldu. Amitriptilin infüzyonuna başlanmadan 3 dk önce tüm sıçanlara adenozin A₃ reseptörleri aracılığıyla oluşan hipotansiyonu bloke etmek amacıyla mast hücre stabilizatörü sodyum kromoglikat (kromolin, 10 mg/kg) intravenöz yolla uygulandı¹⁵.

Adenozin antagonistlerinin çözücüsü olan dimetil sülfoksidin (DMSO) amitriptilin ile oluşan kardiyovasküler toksisite üzerine etkisi test edildi. Bu amaçla bir gruba amitriptilin infüzyonundan sonra 60 dk, diğer gruba amitriptilin infüzyonundan önce 20.dk tek başına DMSO (%1) infüzyonu yapıldı (n= 4, n= 8 sırasıyla).

Protokol 1

Amitriptilinin oluşturduğu kardiyovasküler toksisitede adenozin reseptör antagonistlerinin etkisi

Tüm sıçanlara, 0.94 mg/kg/dk dozunda amitriptilin OAB'da %40-45 azalma oluşturuncaya kadar infüze edildi. Bu sürenin sonunda randomize olarak üç gruba ayrılan sıçanlara; 20 µg/kg/dk DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthine, selektif A₁ reseptör antagonisti, n= 8), 24 µg/kg/dk CSC (8-(3-chlorostyryl) caffeine, selektif A_{2a} reseptör antagonisti, n= 8), veya eşit volümde %5 dekstroz (n= 8) 60 dk boyunca infüze edildi¹⁸⁻¹⁹.

Protokol 2

Amitriptilinin oluşturduğu kardiyovasküler toksisitede adenozin reseptörlerinin rolü

Sıçanlar kromolin enjeksiyonundan sonra randomize olarak üç gruba ayrıldı. Amitriptilin infüzyonuna başlamadan 20 dk önce tedavi grubundaki sıçanlara adenozin A₁ ve A_{2a} reseptörlerini bloke etmek için sırasıyla 20 µg/kg/dk DPCPX (n=8) veya 24 µg/kg/dk CSC (n= 8) infüze edilirken, kontrol grubuna eşit hacimde %5 dekstroz (n=8) infüzyonu yapıldı. Bu sürenin sonunda 0.94 mg/kg/dk dozunda amitriptilin 60 dk boyunca infüze edildi.

Tüm sıçanlara eşit hacimde sıvı verilmesi için deney boyunca ilaç solüsyonları 0.05 mL/kg/dk hızında infüze edildi.

Kullanılan Maddeler

Amitriptilin (trisiklik antidepresan ilaç) (Merck Chem. Comp., Darmstadt, Germany); 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) (selektif adenozin A₁ reseptör antagonisti (Sigma Chem. Comp., St. Louis, MO, USA); 8-(3-chlorostyryl)caffeine (CSC) (selektif adenozin A_{2a} reseptör antagonisti (Sigma Chem. Comp., St. Louis, MO, USA); sodyum kromoglikat (kromolin) (mast hücre membran stabilizatörü) (Sigma Chem. Comp., St. Louis, MO, USA); dimetil sülfoksit (DMSO) (DPCPX ve CSC'nin çözücüsü) (Sigma Chem. Comp., St. Louis, MO, USA); üretan (Sigma Chem. Comp., St. Louis, MO, USA); α -kloraloz (Sigma Chem. Comp., St. Louis, MO, USA).

İlaçların Hazırlanışı

Üretan 300 mg/ml'de olacak şekilde noniyonize suda hazırlandı. α -Kloraloz 20 mg/ml'de olacak şekilde noniyonize suda hazırlandı. Amitriptilin HCl 30 mg/ml'de olacak şekilde noniyonize suda hazırlandı. Sodyum kromoglikat (kromolin) 12 mg/ml'de olacak şekilde noniyonize suda hazırlandı. DPCPX 4 mg/ml'de olacak şekilde DMSO (%1) içinde hazırlandı. CSC 6 mg/mL'de olacak şekilde DMSO (%1) içinde hazırlandı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz verilerin % cevap değerleri hesaplanarak yapıldı. Grup içi karşılaştırmada Student'in t testinin eşler arası farkın anlamlılık testi (paired t-test), üç grup arasındaki farkın değerlendirilmesinde varyans analizi (ANOVA) ve takiben Tukey-Kramer multiple karşılaştırma testleri, yaşam sürelerinin karşılaştırılması için ise Kaplan-Meier prosedürü ve log-rank testleri kullanıldı (Graphpad InStat V2.05a-1994). Tüm veriler ortalama \pm standart hata ortalaması (SH) olarak gösterildi. Çalışmamızda p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Gruplar arasında başlangıç ve kromolin enjeksiyonu sonrası OAB, KAH ve QRS süreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05). Ayrıca tüm grup-

larda kromolin uygulamasını takiben OAB, KAH ve QRS sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı (p>0.05).

Adenozin antagonistlerinin çözücüsü olan DMSO'nun etkisinin test edildiği ön çalışmada; amitriptilin infüzyonundan önce ve sonra verilen DMSO'nun dekstro grubuna göre OAB, KAH, QRS ve yaşam sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı gösterildi (p>0.05).

Protokol 1

Amitriptilinin oluşturduğu kardiyovasküler toksisitede adenozin reseptör antagonistlerinin etkisi

Amitriptilin infüzyonu 15 dk içinde OAB'da, başlangıç değerlerine göre anlamlı inhibisyon oluşturdu (p<0.05). Gruplar arası amitriptilin sonrası OAB da oluşan, ortalama % inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (dekstro grubunda %57.9 \pm 0.9; DPCPX grubunda %58.9 \pm 0.8; ve CSC grubunda %55.9 \pm 1.7, p>0.05). Gruplar arasındaki farkın istatistiksel analizi dekstro grubunda 35. dk'dan sonra ölümlerin artması nedeniyle 0-35 dk için yapıldı. Dekstro infüzyonu amitriptilinin oluşturduğu OAB inhibisyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (p>0.05). DPCPX ve CSC infüzyonunun; amitriptilinin OAB üzerinde oluşturduğu inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı saptandı (DPCPX için; %88.5 \pm 2.8, p<0.0001, 25. dk; %97.3 \pm 4.6, p<0.0001, 35. dk; CSC için %75.6 \pm 4.7, p<0.01, 25. dk; %89.8 \pm 6.5, p<0.001, 35. dk). (Tablo 1).

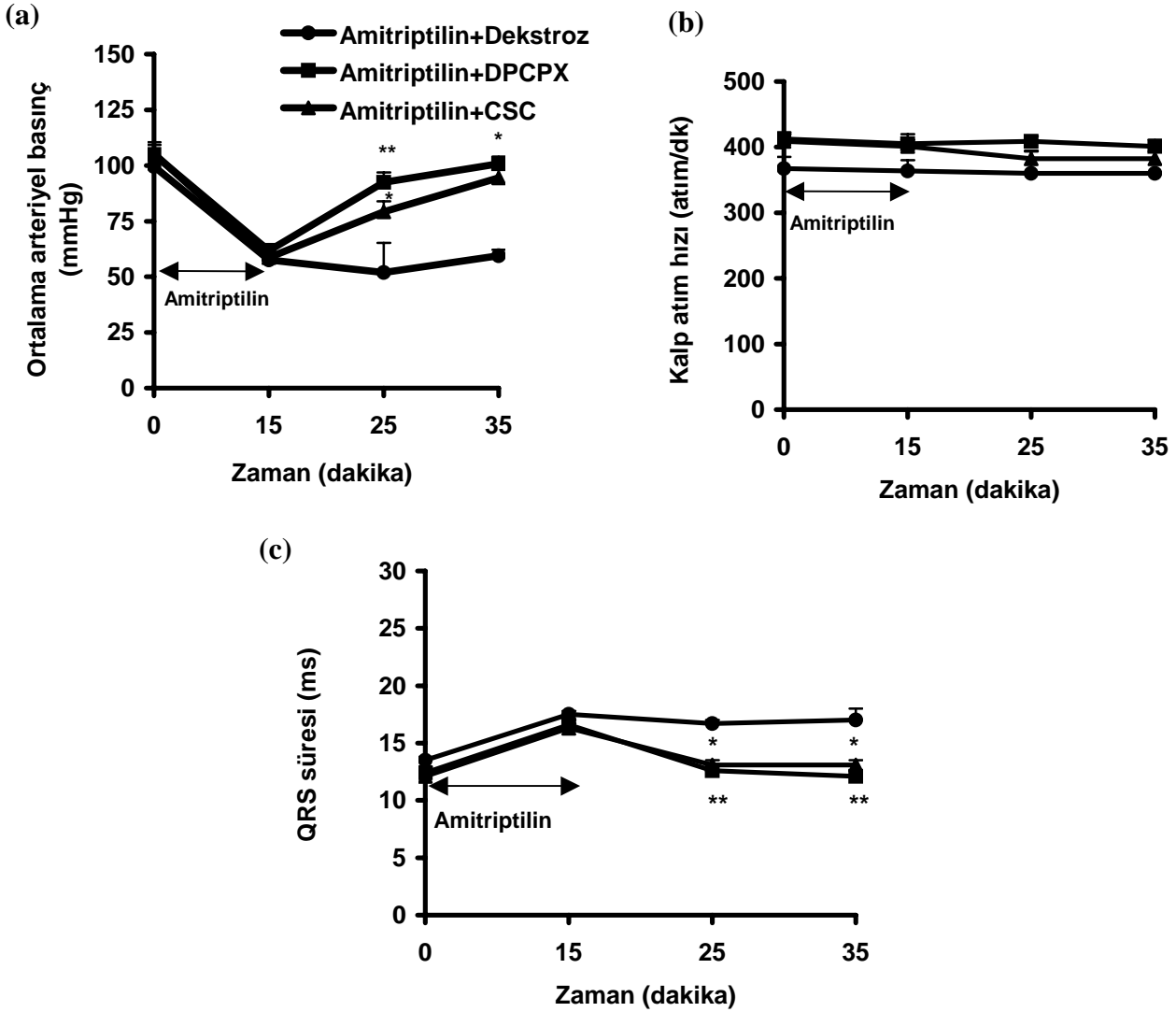
Dekstro grubu ile karşılaştırıldığında DPCPX infüzyonu OAB'da 10. ve 20. dk'larda istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluştururken (sırasıyla; %50.1 \pm 14.7, %88.5 \pm 2.8, p<0.01, %95 CI -62.2 - -14.5, 10.dk; %58.8 \pm 4.2, %97.3 \pm 4.6, p<0.05, 95 % CI -49.3- -1.6, 20. dk), CSC infüzyonunun oluşturduğu artış yalnızca 10. dk'da anlamlı bulundu (sırasıyla; %50.1 \pm 14.7, %75.6 \pm 4.7, p<0.05, %95 CI -49.3- -1.6, 10. dk). Bu etkide DPCPX ve CSC infüzyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 1a).

Tüm deney gruplarında; KAH'da, deney boyunca istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Tablo1, Şekil 1b).

Tablo 1. Amitriptilin infüzyonundan sonra verilen ilaçların OAB, KAH ve QRS süreleri üzerine etkisi.

	0. dk (başlangıç)	15. dk (amitriptilin)	25. dk	35. dk
Ortalama arteriyel basınç (mmHg)				
Amt + Dekstroz	99.6±3.8	57.6±1.9 **	51.9±13.3	59.4±2.7
Amt + DPCPX	104.9±5.6	61.8±2.9 ***	92.4±4.5 ###	100.8±3.2 ###
Amt + CSC	105.4±3.9	58.7±2.1 ***	79.3±4.6 #	94.5±7.2 ##
Amt + DMSO	95.1±10.7	53.4±5.4 **	50.9±9.2	59.4±6.9
Kalp atım hızı(atım/dk)				
Amt + Dekstroz	367.5±17.7	363.8±16.5	360.0±34.6	360.0±0.0
Amt + DPCPX	412.5±7.5	405.0±15.0	408.8±7.9	401.3±9.7
Amt + CSC	408.8±13.8	401.3±9.7	382.5±10.9	382.5±10.9
Amt + DMSO	382±14.4	360.0±34.6	307.5±57.9	360.0±34.6
QRS süresi (ms)				
Amt + Dekstroz	13.5±0.3	17.5±0.3 **	16.7±0.3	17.0±1.0
Amt + DPCPX	12.4±0.5	16.6±0.4 **	12.6±0.5 ###	12.1±0.5 ###
Amt + CSC	12.1±0.5	16.3±0.4 **	13.1±0.4 ##	13.1±0.4 ##
Amt + DMSO	13.3±0.8	18.3±1.3 *	17.0±2.1	15.3±1.8

(*), (**),(***) sırasıyla, $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.0001$, başlangıç değerine göre. (#),(##),(###) sırasıyla, $p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.0001$, amitriptiline göre. Amt= Amitriptilin.

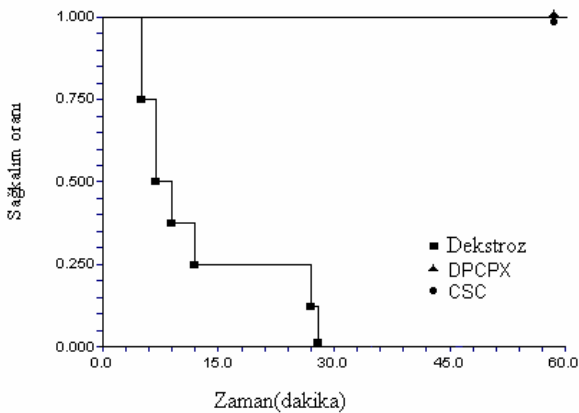


Şekil 1. Amitriptilin infüzyonundan sonra verilen ilaçların OAB, KAH ve QRS süreleri üzerine etkisi. (*), (**) sırasıyla, $p<0.05$, $p<0.01$ dekstroz grubuna göre.

Amitriptilin infüzyonu 15 dk içinde QRS sürelerinde başlangıç değerlerine göre anlamlı uzama oluşturdu ($p<0.05$). Gruplar arası, amitriptilin sonrası QRS sürelerinde oluşan uzama karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (dekstroz grubunda, 129.9 ± 3.1 ; DPCPX grubunda, 135.2 ± 4.1 ; CSC grubunda, 135.6 ± 6.9 , $p>0.05$). Dekstroz infüzyonu amitriptilin sonrası oluşan QRS sürelerindeki uzama üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı ($p>0.05$). DPCPX ve CSC infüzyonu; amitriptilin QRS süresi üzerinde oluşturduğu inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede düzeltti (sırasıyla, $p<0.0001$, $p<0.001$, 15. dk; $p<0.0001$, $p<0.001$, 25. dk) (Tablo 1).

Dekstroz grubu ile karşılaştırıldığında DPCPX ve CSC infüzyonu QRS sürelerinde 10. ve 20. dk'larda istatistiksel olarak anlamlı düzeltme oluşturdu (sırasıyla 131.9 ± 5.3 , 102.3 ± 3.4 , 109.4 ± 5.3 , $p<0.01$, 95 CI 8.4 - 50.9; $p<0.05$, 95 CI 1.2 - 43.7, 25. dk; 136.6 ± 13.5 , 98.1 ± 2.8 , 109.4 ± 5.3 , $p<0.01$, 95 CI 12.6 - 64.2; $p<0.05$, 95 CI 1.3 - 52.9, 35. dk). Bu etkide DPCPX ve CSC infüzyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 1c).

Kaplan-Meier yöntemi kullanılarak yapılan bir saatlik yaşam hızı analizi DPCPX ve CSC infüzyonu yapılan grupta %100 olarak bulunurken dekstroz grubunda %0'dı. Gruplar arası yaşam hızları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.00001$). Ortanca yaşam süreleri tedavi edilen grupta 60 dk, dekstroz grubunda ise 8 dk olarak hesaplandı (Şekil 2).



Şekil 2. Gruplar arası yaşam sürelerinin karşılaştırılması.

Protokol 2

Amitriptilin oluşturduğu kardiyovasküler toksisitede adenozin reseptörlerinin rolü

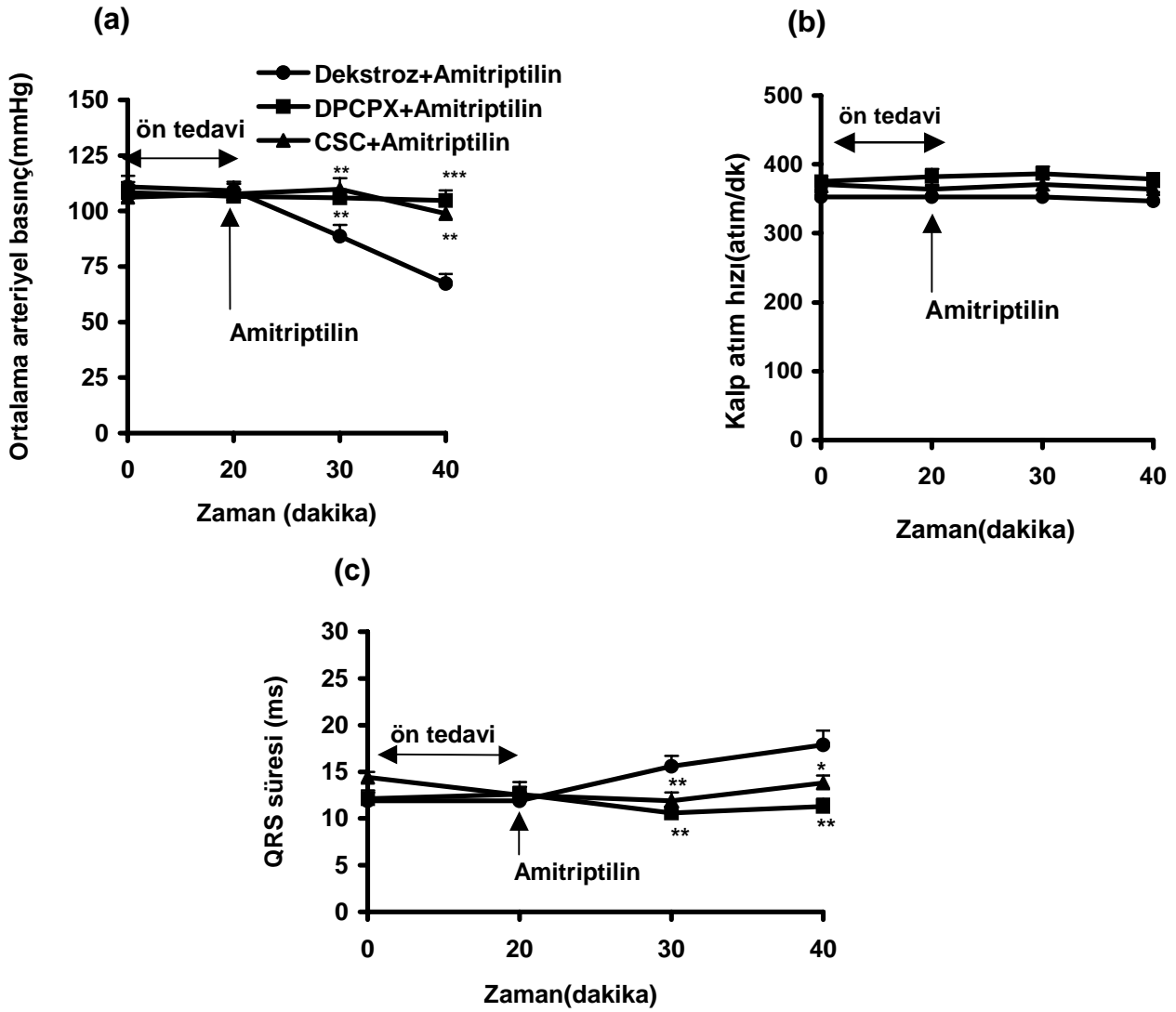
Amitriptilin infüzyonundan önce 20 dk infüze edilen DPCPX ve CSC; OAB, KAH ve QRS süresinde başlangıç değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (Tablo 2). İstatistiksel analiz dekstroz grubunda 40. dk'dan sonra ölümlerin artması nedeniyle 0-40 dk için yapıldı. Dekstroz grubunda; amitriptilin infüzyonu OAB da istatistiksel olarak anlamlı azalma oluşturdu (81.8 ± 5.4 , $p<0.05$, 30. dk; 64.9 ± 4.7 , $p<0.01$, 40. dk, Tablo 2). DPCPX ve CSC verilen gruplarda amitriptilin infüzyonundan sonra OAB da istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı (sırasıyla 99.5 ± 2.6 , 102.4 ± 2.6 , 30. dk; 98.0 ± 2.9 , 93.5 ± 6.0 , 40. dk $p>0.05$) (Tablo 2). DPCPX ve CSC tedavisinden sonra başlanan amitriptilin infüzyonu dekstroz grubu ile karşılaştırıldığında OAB da anlamlı bir azalmaya yol açmadı (sırasıyla; 99.5 ± 2.6 , 102.4 ± 2.6 , 81.8 ± 5.4 , $p<0.01$, 95 CI $-31.1 - -4.2$, 95 CI $-34 - -7.2$, 30. dk; 98.0 ± 2.9 , 93.5 ± 6.0 , 64.9 ± 4.7 , $p<0.001$, 95 CI $-50.2 - -15.9$; $p<0.01$, 95 CI $-45.8 - -11.5$, 40. dk) (Şekil 3a).

Tüm deney gruplarında; KAH'da, deney boyunca istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Tablo2, Şekil 3b).

Dekstroz grubunda; amitriptilin infüzyonu QRS süresinde istatistiksel olarak anlamlı uzama oluşturdu (sırasıyla 135.4 ± 12.4 , 30. dk; 164.3 ± 21.0 , 40. dk, $p<0.05$) (Tablo 2). DPCPX ve CSC verilen gruplarda amitriptilin infüzyonu QRS süresinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (sırasıyla 30. dk, 40. dk, $p>0.05$) (Tablo 2). DPCPX ve CSC tedavisinden sonra başlanan amitriptilin infüzyonu dekstroz grubu ile karşılaştırıldığında QRS süresinde anlamlı bir uzamaya yol açmadı (sırasıyla 87.4 ± 5.4 , 95.8 ± 4.2 , 135.4 ± 12.4 , $p<0.01$, 95 CI 18.9 - 77.1, 95 CI 10.4 - 68.7, 30. dk; 91.6 ± 4.7 , 112.5 ± 8.2 , 164.3 ± 21.0 , $p<0.01$, 95 CI 27.8 - 117.7; $p<0.05$, 95 CI 6.8 - 96.7, 40. dk) (Şekil 3c).

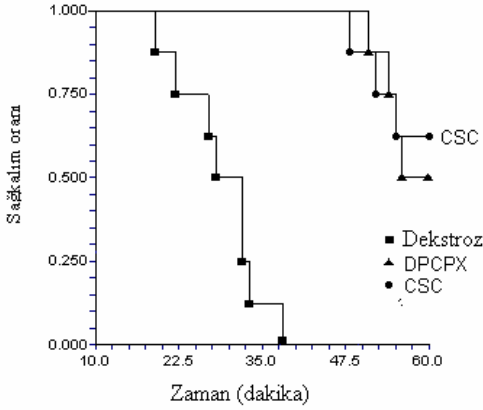
Tablo 2. Amitriptilin infüzyonundan önce verilen ilaçların OAB, KAH ve QRS süreleri üzerine etkisi. (*), (**), sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$, vs. 20.dk'ya (ilaç tedavisi) göre. Amt=amitriptilin.

	0.dk (başlangıç)	20.dk (ilaç tedavisi)	30.dk	40.dk
Ortalama arteriyel basınç (mmHg)				
Dekstroz + Amt	110.9±4.9	109.1±3.1	88.6±5.2 *	67.4±4.3 **
DPCPX + Amt	108.3±4.7	106.6±3.1	106.0±3.7	104.7±4.6
CSC + Amt	106.2±5.5	107.7±5.5	109.8±5.0	98.9±4.5
DMSO + Amt	106.9±5.3	106.3±4.9	81.4±4.2 **	75.7±5.9 **
Kalp atım hızı(atım/dk)				
Dekstroz + Amt	352.5±7.5	352.5±17.7	352.5±9.4	347.1±12.9
DPCPX + Amt	375.0±8.0	382.5±10.9	386.3±10.5	378.8±7.9
CSC + Amt	371.3±7.9	363.8±3.8	371.3±7.9	363.8±3.8
DMSO + Amt	367.5±7.5	367.5±7.5	337.5±19.4	342.8±17.1
QRS süresi (ms)				
Dekstroz + Amt	11.9±0.9	11.9±0.9	15.6±1.1*	17.9±1.5 *
DPCPX + Amt	12.1±0.9	12.6±1.3	10.6±0.6	11.3±0.8
CSC + Amt	14.4±0.6	12.5±0.9	11.9±0.9	13.8±0.8
DMSO + Amt	12.5±0.9	14.4±0.6	16.9±0.9 *	17.1±1.0 *



Şekil 3. Amitriptilin infüzyonundan önce verilen ilaçların OAB, KAH ve QRS süreleri üzerine etkisi. (*),(**),(***), $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ dekstroz grubuna göre.

Kaplan–Meier yöntemi kullanılarak yapılan bir saatlik yaşam hızı analizi DPCPX grubunda %50, CSC grubunda %62.5 olarak bulunurken dekstroz grubunda %0'dı. Gruplar arası yaşam hızları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.0001$). Ortanca yaşam süreleri DPCPX ve CSC verilen gruplarda sırasıyla 58.0 dk ve 60. dk iken dekstroz grubunda 30 dk olarak hesaplandı (Şekil 4).



Şekil 4. Gruplar arası yaşam sürelerinin karşılaştırılması.

TARTIŞMA

Çalışmamızda; amitriptilin infüzyonundan sonra verilen selektif adenosin A_1 reseptör antagonisti (DPCPX) ve selektif adenosin A_{2a} antagonisti (CSC) infüzyonu, ortalama arteriyel basınçta oluşan azalmayı ve QRS süresindeki uzamayı anlamlı olarak düzeltti. Adenosin antagonistleri yaşam süresini artırarak amitriptilin zehirlenmesindeki mortaliteyi azalttı. Ayrıca çalışmamızda amitriptilinden önce infüze edilen adenosin antagonistlerinin de (DPCPX veya CSC) amitriptilin zehirlenmesine bağlı oluşan hipotansiyonu ve QRS süresindeki uzamayı engellediği, yaşam süresini uzattığı bulundu. Tüm deney boyunca kalp atım hızında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadı.

Adenosin birçok fizyolojik ve patofizyolojik olayda rol oynayan endojen bir nükleoziddir. Adenosin kardiyovasküler sistemde etkilerini A_1 , A_{2a} ve A_3 reseptörleri aracılığı ile yapmaktadır. Adenosinin; A_1 reseptörleri üzerinden kardiyak depresyon oluşturarak, A_{2a} reseptörleri üzerinden periferik vazodilatasyon yaparak ve A_3 reseptörleri üzerinden mast hücre degranülasyonu sonucu histamin salınımına yol açarak hipotansif etki oluşturduğu gösterilmiştir¹²⁻¹⁵. Sıçanlarda adenosinin fizyolojik vazodilatör tonusun düzenlenmesine

katkıda bulunduğu; renin salınımını ve noradrenerjik iletimi inhibe ederek kalp atım hızı ve kan basıncını azalttığı bildirilmiştir²⁰⁻²¹. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda; nonselektif adenosin reseptör antagonistleri ile kronik tedavinin hipertansiyon ve kardiyovasküler sistemde yapısal değişikliklere yol açtığı bulunmuştur¹⁶⁻¹⁷.

Amitriptilin zehirlenmesine bağlı oluşan kardiyovasküler toksisitenin karakteristik bulguları iletimde gecikme, aritmiler ve hipotansiyondur. Çeşitli ajanlar amitriptilin zehirlenmesine bağlı hipotansiyonu geri çevirebilir. Birbirini izleyen iki çalışmada nitrik oksid sentaz inhibitörü L-NAME'nin TSA zehirlenmesinde oluşan hipotansiyonu düzelttiği gösterilmiştir. Pentel ve ark. L-NAME'in sıçanlarda bir TSA olan desipramin bağlı oluşan hipotansiyonu düzelttiğini ancak yaşam süresini etkilemediğini göstermişlerdir⁵. Tunçok ve ark. ise L-NAME'in sıçanlarda amitriptilin zehirlenmesine bağlı oluşan hipotansiyonu düzelttiğini ve yaşam süresini uzattığını bildirmişlerdir⁶. Çalışmamızda adenosin antagonistleri amitriptilin zehirlenmesinde oluşan hipotansiyonu belirgin şekilde düzelttiği gösterilmiştir. Bu düzelme endojen adenosinin A_1 ve A_{2a} reseptörleri aracılığı ile oluşan hipotansif tonusunun antagonize edilmesi ile açıklanabilir. Elde ettiğimiz bulgular selektif adenosin A_1 reseptör antagonisinin endojen adenosinin negatif inotrop etkisini ortadan kaldırarak, selektif adenosin A_{2a} reseptör antagonisinin ise endojen adenosinin periferik vazodilatör etkisini azaltarak hipotansiyonu düzelttiğini düşündürmektedir. Çalışmamızın ilk bölümünde sıçanlarda amitriptilin zehirlenmesi sonucu oluşan hipotansiyonun selektif adenosin A_1 ve A_{2a} antagonistleri ile geri döndürülebilmesi amitriptilin oluşturduğu kardiyak toksisitenin patofizyolojisi üzerinde adenosin reseptörlerinin rolünü açıklayamamaktadır. Bu yüzden çalışmamızın ikinci bölümünde adenosin reseptör antagonistleri DPCPX ve CSC amitriptilin infüzyonundan önce verilerek amitriptiline bağlı gelişen hipotansiyonu önleyip, önleyemedikleri araştırılmıştır. Amitriptilin infüzyonundan önce verilen adenosin reseptör antagonistleri ile amitriptiline bağlı gelişen hipotansiyonun önlenmesi, amitriptilin zehirlenmesinde oluşan hipotansiyonda adenosin A_1 ve A_{2a} reseptör aktivasyonunun rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

TSA'lar miyokard hücrelerinde aksiyon potansiyelinin Faz 0'ı sırasında hücre içine olan

hızlı sodyum kanallarından sodyum girişini yavaşlatarak kardiyak depresyon ve ventrikül-lerde ileti gecikmelerine neden olurlar. Bu durum EKG'de QRS süresinin uzamasına yol açar³. QRS süresinde uzama gelişen hastalarda sodyum bikarbonat tedavisi etkin bulunmuştur. Sodyum bikarbonat tedavisi TSA'nin ekstrasellüler sodyum konsantrasyonundaki artışa bağlı gelişen membran depresan etkileri geri çevirerek etki göstermektedir³⁻⁴. Çalışmamızda amitriptilin infüzyonunun neden olduğu QRS süresindeki uzama adenosin reseptör antagonistleri DPCPX ve CSC infüzyonu ile düzeldi. Ayrıca çalışmamızın ikinci bölümünde amitriptilin infüzyonundan önce verilen adenosin antagonistlerinin QRS süresinde oluşan uzamayı önlediği gösterildi.

Çalışmamızda adenosin antagonistlerinin sıçan amitriptilin zehirlenme modelinde yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir. Tunçok ve ark. L-NAME'in amitriptilin zehirlenmesinde yaşam süresini %40 oranında uzattığını göstermişlerdir⁶. Çalışmamızda amitriptilin infüzyonundan önce verilen adenosin antagonistleri yaşam süresini %50-60 oranında uzatırken, çalışmanın birinci bölümde adenosin antagonistlerinin yaşam süresini %100 uzattığı bulunmuştur. Yaşamın devamlılığı için çok önemli bir faktör olan vital organların perfüzyonu sistemik kan basıncının artırılması ve iletim gecikmelerinin önlenmesi ile korunabilir. Adenosin antagonistleri kan basıncındaki düşmeyi ve ileti bozukluklarını düzeltip, amitriptiline bağlı kardiyak depresyonun ortadan kaldırarak yaşamsal organların perfüzyonunu düzeltmek suretiyle yaşam süresini artırmış olabilir.

SONUÇ

Çalışmamızda amitriptilin infüzyonundan sonra verilen selektif adenosin A₁ reseptör antagonisti (DPCPX) ve selektif adenosin A_{2a} antagonisti (CSC) amitriptilin zehirlenmesinde oluşan hipotansiyonu ve QRS süresindeki uzamayı düzeltti. Ayrıca amitriptilin infüzyonundan önce verilen adenosin reseptör antagonistleri ile amitriptilin oluşturduğu hipotansiyon ve QRS süresindeki uzama önledi. Her iki deney protokolünde de adenosin antagonistlerinin yaşam süresini uzattığı bulundu. Elde edilen bu sonuçlar amitriptilin zehirlenmesinde oluşan kardiyovasküler toksisite bulgularının gelişmesinde adenosin A₁ ve A_{2a} reseptörlerinin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmanın sonuçları adenosin

reseptör antagonistlerinin amitriptilin zehirlenmesinde oluşan kardiyovasküler toksisitenin önlenmesi için yeni bir antidot olarak kullanımına yol gösterici olacaktır.

Ancak amitriptilin oluşturduğu kardiyovasküler toksik etkilerin mekanizmasında kardiyak veya periferik damarlarda bulunan adenosin reseptörlerinden hangisinin aktivasyonunun daha baskın olduğunun gösterilmesi için ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızı izleyen 2 ayrı çalışma daha planlanmıştır. Bunlardan birinde "izole sıçan kalp modelinde yüksek doz amitriptilin ile oluşturulan kardiyotoksik etkinin mekanizmasında adenosin reseptörlerinin rolünün" araştırılması, diğerinde ise "izole sıçan aortunda amitriptilin oluşturduğu vazodilatör etkide adenosin reseptörlerinin rolünün" araştırılması planlanarak çalışmalara başlanmıştır.

Destek

Bu çalışmanın birinci bölümü oluşturan projemiz Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiştir (02.KB.SAG.055).

Bu proje Amerika Birleşik Devletleri Klinik Toksikoloji Akademisi Araştırma Destekleme Komitesi tarafından verilen 2003 Micromedex International Travel Award kazanmış ve 4-6 Eylül 2003 de Chicago'da yapılan Kuzey Amerika Klinik Toksikoloji kongresinde sözlü bildiri olarak, 17-21 Ekim 2003 de Antalya da yapılan 17. Ulusal Farmakoloji Kongresi ve 1. Klinik Farmakoloji sempozyumunda poster bildiri olarak sunulmuştur. Çalışmamız; J Toxicol Clin Toxicol dergisinde yayınlanmıştır (Kalkan S, Aygören O, Akgun A, Gidener S, Guven H, Tuncok Y. Do adenosine receptors play a role in amitriptyline-induced cardiovascular toxicity in rats., 42(7):945-954, 2004).

Teşekkür

Bu çalışmanın ve devam eden çalışmaların yürütülmesindeki katkılarından dolayı; Prof. Dr. Yeşim Tunçok, Prof. Dr. Hülya Güven, Prof. Dr. Sedef Gidener, Dr. Oğuz Aygören, Dr. Aylin Akgün ve Dr. Nil Hocaoğlu'na teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Watson WA; Litovitz TL; Rodgers GC; Klein-Schwartz W; Youniss J; Rose SR; Borys D; May ME. 2002 Annual reports of the American Association of Poison Control Centers toxic exposure surveillance system. Am J Emerg Med 21(5): 353- 423 (2003).
2. Kalkan S; Tuncok Y; Guven H. Poisonings reported to Drug and Poison Information Center, in İzmir, Turkey. J Dokuz Eylul University Faculty of Medicine 12(3): 275- 283 (1998) (In Turkish).

3. Liebelt EL; Francis PD. Cyclic Antidepressants. In: Goldfrank LR; Flomenbaum NM; Lewin NA; Howland MA; Hoffman RS; Nelson LS; (eds), Goldfrank's Toxicology Emergencies, Seventh edition, McGraw-Hill Companies: USA 847-864 (2002).
4. Benowitz NL. Tricyclic antidepressants. In: Olson KR; (ed), Poisoning and Drug Overdose, Third edition, Connecticut, USA 310-312 (1999).
5. Pentel PR, Wananukul W; Scarlett W; Keyler DE. Nitric oxide contributes to desipramine-induced hypotension in rats. *Hum Exp Toxicol* 15: 320-328 (1996).
6. Tuncok Y; Kalkan S; Murat N; Arkan F; Güven H; Aygören O; Kurt S. The effects of L-NAME on amitriptyline-induced hypotension in rats. *J Toxicol Clin Toxicol* 40(2): 121-127 (2002).
7. Newton EH; Shih RD; Hoffman RS. Cyclic antidepressant overdose: a review of current management strategies. *Am J Emerg Med* 12: 376-379 (1994).
8. Harrigan RJ; Brady WJ. ECG abnormalities in tricyclic antidepressant ingestion. *Am J Emerg Med* 17: 387-393 (1999).
9. Fredholm BB, Arslan G, Kull B, Wasserman W, Schulte G. Structure and function of adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 276(3): 1113 (2000).
10. Lynge J, Hellsten Y. Distribution of adenosine A₁, A_{2a} and A_{2b} receptors in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 169(4): 283-290 (2000).
11. Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70: 761-845 (1990).
12. Belardinelli L; Linden J; Berne RM. The cardiac effects of adenosine. *Prog Cardiovasc Dis* 23: 73-97 (1989).
13. Webb RL; Barclay BW; Graybill SC. Cardiovascular effects of adenosine A_{2a} agonists in the conscious spontaneously hypertensive rat: A comparative study of three structurally distinct ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 259: 1203-1212 (1991).
14. Linden J. Cloned adenosine A₃ receptors: Pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends Pharmacol Sci* 15: 298-306 (1994).
15. Hannon JP; Pfannkuche HJ; Fozard JR. A role of mast cell in adenosine A₃ receptor-mediated hypotension in the rats. *Br J Pharmacol* 115: 945-952 (1995).
16. Guimaraes S; Albino-Teixeria A. Hypertension due to chronic blockade of P₁-purinoceptors. *J Auton Pharmacol*, 16: 367-370 (1996).
17. Guimaraes S; Morato M; Sousa T; Albino-Teixeria A. Hypertension due to blockade of adenosine receptors. *Pharmacol Toxicol* 92: 160-162 (2003).
18. Mathot RAA; Van Der Wenden EM; Soudijn W; Breimer DD; Ijzerman AP; Danhof M. Partial agonism of the nonselective adenosine receptor agonist 8-Butylaminoadenosine at the A₁ receptor in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 1439-1446 (1996).
19. Kuan CJ; Herzer WA; Jackson EK. Cardiovascular and renal effects of blocking A₁

adenosine receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*, 21(5): 822-828 (1993).

20. Kamikawa Y; Cline JWH; Su C. Diminished purinergic modulation of vascular adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 66: 347-353 (1980).
21. Kuan CJ; Wells JN; Jackson EK. Endogenous adenosine restrains renin release in conscious rats. *Circ Res*, 66: 637-646 (1990).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şule KALKAN
Doğum Yeri : İzmir
Doğum Tarihi : 19 Aralık 1967
Adresi : Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., İzmir
Telefon : 0 232 4123905
Faks : 0 232 2590541
E-posta : sule.kalkan@deu.edu.tr

Eğitim Durumu

Tıbbi Farmakoloji Uzmanlığı; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., İzmir, Nisan 1994–Nisan 1998.

Lisans; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir (1985-1991).

Akademik Kariyer

Pratisyen Hekim; 4 Nolu Merkez Sağlık Ocağı, Kırıkkale, 1991-1994.

Araştırma Görevlisi; Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D, İzmir, Nisan 1994–Nisan 1998.

Uzman Doktor; Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D, İzmir, Nisan 1998- Eylül 1998.

Yardımcı Doçent; Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D, İzmir, Eylül 1998- .

Mesleki Eğitim

1. Participated at the Workshop on Program Evaluation in Medical Education, Held at Dokuz Eylul University School of Medicine, İzmir, 8 Nisan 2004.
2. Langendorf İzole Perfüze Kalp Modeli ve Araştırmalarda Kullanım Alanları. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 13 Kasım 2003.
3. Pharmacogenetics course. 6th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, İstanbul, Türkiye, 24-28 Haziran 2003.
4. Deneysel düşük perfüzyon modelleri kursu. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara, 5-6 Şubat 2001.
5. Kanıta Dayalı ve Eleştirel Değer Bıçme Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 6-8 Mart 2002.
6. Bilimsel Araştırma Projelerinin Planlanması, Hazırlanması ve Desteklenmesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 12 Ocak 2001.

7. Monitörlük sertifika kursu, XVI. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Türk Farmakoloji Derneği, Kuşadası, İzmir, 2 Ekim 2001.
8. Türkiye'de Akılcı İlaç kullanımı ilkelerinin yerleştirilmesinde Farmakoterapi eğitimi ve Klinik Farmakolojinin yeri çalışma toplantısı, Kızılcahamam, Ankara. 27-30 Eylül 1999
9. Probleme Dayalı Öğretim Kursu. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 2-5 Mart 1999.
10. Fifth Training Course on Teaching Rational Drug Therapy, Groningen, The Netherlands, 12- 21 Ağustos 1998.
11. Klinik Eğitim Becerileri kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 22- 25 Eylül 1997.
12. Biyosinyal 96, Biyolojik Sinyal Kaydı ve İşleme Yöntemleri Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir 1-6 Eylül 1996.
13. Araştırma planlaması kursu, Türk Tabipler Birliği İzmir Tabip Odası, İzmir. Ocak-Nisan 1995.

Ödüller

- TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (1997).
 TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (1997).
 TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (1997).
 TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (1999).
 TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (1999).
 TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (2001).
 TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (2002).
 TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (2003).
 TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (2004).
 TÜBİTAK Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü (2004).
 Birincilik ödülü (Poster yarışması, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sağlık Bilimleri Günü, İzmir, 2004).
 Birincilik ödülü (Poster yarışması, Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 2003).
 İkincilik ödülü (Poster yarışması, Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 2003).
 Micromedex International Travel Award, Research Award Committee of American Academy of Clinical Toxicology, 2003.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

- Türk Farmakoloji Derneği, 1994-
 Tıp Eğitimi Geliştirme Derneği , 31 Ekim 2000-
 Klinik Farmakoloji Derneği, 2001-

Yayın Listesi

I. Araştırma Projeleri

1. Sıçan organofosfat zehirlenme modelinde adenozin reseptör agonistleri atropin ve pralidoksimin karşılaştırmalı etkileri, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü, 04.KB.SAĞ.068, Araştırmacı, 2004 (Çalışma tamamlanarak yayın olarak değerlendirilmek üzere Human and Experimental Toxicology dergisine gönderilmiştir).
2. İzole perfüze normal ve hiperkolesterolemik tavşan kalbinde St. Thomas Hospital Kardiyoplejik solüsyonuna eklenen propofolün iskemi-reper-

füzyon hasarına etkisi. Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü, 04.KB.SAĞ.071, Araştırmacı, 2004 (Çalışma devam ediyor)

3. İzole sıçan kalp modelinde yüksek doz amitriptilin ile oluşturulan kardiyotoksik etkinin mekanizmasında adenozin reseptörlerinin rolü. Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü, 03.KB.SAĞ.00, Araştırmacı, 2004 (Çalışma devam ediyor)
4. Sıçanlarda yüksek doz amitriptilinin oluşturduğu hipotansiyonda adenozinin rolü, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü, 02.KB. SAĞ.055, Proje Yöneticisi, 2002 (Bu proje ve devamı J Toxicol Clin Toxicol 42(7): 945-54, 2004).
5. Sıçanlarda P.O ve I.V yolla verilen CsA' nın farmakokinetiğine diltiazemin etkisi. Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü, 0909.20.02.15, Proje Yöneticisi, 2000 (Eur J Drug Metab Pharmacokinet 29(2): 119-123, 2004).
6. Diabetik sıçanlarda metotreksatin farmakokinetiğinde sirkadian ritmin rolü. Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü, 0909.20.02.13, Araştırmacı, 2000 (Biol Rhythm Res) (baskıda).

II. Araştırma Makaleleri

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Gumustekin M, Kalkan S, Murat N, Gur O, Hocaoglu N, Gidener S. The role of circadian rhythm on the pharmacokinetic of methotrexate in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. Biol Rhythm Res (baskıda).
2. Kalkan S, Aygoren O, Akgun A, Gidener S, Guven H, Tuncok Y. Do adenosine receptors play a role in amitriptyline-induced cardiovascular toxicity in rats. J Toxicol Clin Toxicol 42(7): 945-954, 2004.
3. Kalkan S, Gumustekin M, Aygoren O, Tuncok Y, Gelal A, Guven H. The interaction of diltiazem with oral and intravenous cyclosporine in rats. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 29(2): 119-123, 2004.
4. Yanturalı S, Ergün N, Eminoğlu E, Kalkan S, Tunçok Y. Life threatening tongue angioedema associated with angiotensin converting enzyme inhibitor. Vet Hum Toxicol 46(2): 85-86, 2004.
5. Kalkan S, Cevik AA, Cavdar C, Aygoren O, Akgun A, Ergun N , Tuncok Y. Acute methanol poisonings reported to drug and poison information center (DPIC) in Izmir, Turkey. Vet Hum Toxicol 45(6): 334-7, 2003.
6. Kalkan S, Erdoğan A, Aygören O, Çapar S, Tuncok Y. Pesticide poisonings reported to the drug and poison information center in Izmir, Turkey. Vet Hum Toxicol 45(1): 50-2, 2003.
7. Tuncok Y, Kalkan S, Murat N, Arkan F, Guven H, Aygoren O, Kurt S. The effect of L-NAME on amitriptyline-induced hypotension in rats. J Toxicol Clin Toxicol 40 (2): 121-127, 2002.
8. Gelal A, Gumustekin M, Kalkan S, Guven H, Yoruk O. The Effects of subchronic parathion

exposure on cyclosporine pharmacokinetics in rats. *J Toxicol Environ Health, PartA*, 62: 289-294, 2001.

9. Kırımlı Ö, Kalkan S, Güneri S, Tuncok Y, Akdeniz B, Özdamar M, Güven H. The effects of captopril on serum digoxin levels in patients with severe congestive heart failure. *Int J Clin Pharmacol Ther* 39 (7): 311-314, 2001.
10. Öztekin S, Kalkan S, Özzeybek D, Tuncok Y, Guven H, Elar Z. The effects of propofol on normal and hypercholesterolemic rats. *Gen Pharmacol: The Vascular System* 35(2): 65-69, 2000.
11. Murat N, Kalkan S, Gidener S. Effect of verapamil on responses to endothelin-1 in aortic rings from streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol I Res* 40(1): 37-40, 1999..
12. Öztürk T, Tuncok Y, Kalkan S, Aran G. Midazolam's cardiac depressant effects and their lack of reversal by flumazenil in an isolated rabbit hearts. *Pharm Res* 39(4): 283-287, 1999.
13. Tuncok Y, Hazan E, Oto Ö, Güven H, Catalyürek H, Kalkan S. Relationship between high serum digoxin levels and toxicity. *Int J Clin Pharmacol Ther* 35(9): 366-368, 1997.
14. Gidener S, Kalkan S, Küpeliolu Ali, Güre A. The effects of acute bilateral adrenalectomy on serotonin- induced inhibition of gastric acid secretion and acute gastric mucosal injury in rats *Int J Exp Pathol* 77: 163- 166, 1996.
15. Tuncok Y, Apaydın Ş, Kalkan S, Ateş M, Güven H. The effects of amrinone and glucagon on verapamil-induced cardiovascular toxicity in anaesthetized rats. *Int J Exp Pathol* 77: 207-212, 1996.

Ulusal Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Öztekin S, Kalkan Ş, Mavioğlu O, Elmas T, Elar Z, Güven H. Sigara kullananlarda cinsiyet ve menopozun serum lidokain düzeyleri üzerine etkileri. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(2): 119-1124, 2003.
2. İyilikçi L, Çatal D, Gökel E, Onat Ü, Kalkan Ş. Endoskopik mesane girişimlerinde intravezikal lidokain uygulaması. *Türk Anest Rean Cem Mecmuası*, 28: 162-165, 2000.
3. Kalkan Ş, Tuncok Y. İzole sıçan atriyumunda adenosinin oluşturduğu negatif kronotropik etkide nitrik oksidin rolü. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 12(3): 243-248, 1998.
4. Öztekin S, Kalkan Ş, Özzeybek D, Tunçok Y, Güven H, Elar Z. Propofolün normal ve hiperkolesterolemik tavşan izole kalbine etkileri. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 12(3): 261-270, 1998.
5. Kalkan Ş, Tunçok Y, Güven H. İlaç ve Zehir Danışma Merkezine bildirilen olgular. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 12(3): 275-283, 1998.
6. Murat N, Gidener S, Kalkan Ş. Endotelinin diabet vasküler hiperaktivitesindeki rolü ve kalsiyum antagonistlerinin yararlılığı. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 12: 201-207, 1998.

III. Bildiriler

Uluslararası Kongrelere Sunulan Bildiriler

1. Aygoren O, Kalkan S*, Akgun A, Guven H, Tuncok Y. The effect of adenosine receptor antagonist on amitriptyline-induced cardiovascular toxicity in rats. North American Congress of Clinical Toxicology Annual Meeting, 4-6 September, 2003, Chicago, Illinois (Sözlü Bildiri) (* Sözlü bildiri yapan kişi).
2. Kalkan S, Gumustekin M, Aygoren O, Tuncok Y, Gelal A, Guven H. The interaction of the diltiazem with oral and intravenous cyclosporine in rats. 6th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, 24-28 June 2003, İstanbul, Türkiye (poster).
3. Eminoglu O, Kalkan S, Guven H, Benker T, Gelal A, Gidener S. The effects of age and gender on fluvoxamine caffeine interaction in rats. 6th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, 24-28 June 2003, İstanbul, Türkiye (poster).
4. Gumustekin M, Kalkan S, Murat N, Gur O, Hocaoglu N, Gidener S. The role of circadian rhythm in the pharmacokinetic of methotrexate in sidm rats. 6th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, 24-28 June 2003, İstanbul, Türkiye (poster).
5. Kalkan S, Cevik AA, Erdogan A, Aksay E, Tuncok Y. Acute methanol poisoning. The First Multinational Middle Eastern Conference on Emergency Medicine (1st MECEM), 4-7 October 2001, İstanbul, Türkiye (poster).
6. Tuncok Y, Kalkan S, Murat N, Arkan F, Guven H, Aygoren O, Kurt S. The effects of L-NAME on amitriptyline-induced hypotension in rats. European Association of Poisons Centers and Clinical Toxicologists XXI International Congress, 16-19 May 2001, Barcelona, Spain (sözlü).
7. Kalkan S, Oztekin S, Ozzeybek D, Tunçok Y, Guven H. The effect of propofol on normal and hypercholesterolemic isolated rabbit heart. 2nd European congress of pharmacology. 3-7 July 1999, Budapest, Hungary (poster).
8. Ozturk T, Tuncok Y, Guven H, Kalkan S, Aran G. Effects of midazolam and flumazenil in isolated rabbits hearts. European Society of Anaesthesiologists Annual Congress April 25-28, 1998, Barcelona (sözlü).
9. Guven H, Tuncok Y, Gelal A, Apaydın S, Kalkan S, Gidener S, Fowler J. Poisoning reported to poison control center in İzmir, Turkey. North American Congress of Clinical Toxicology September 13-16, 1997, St.Lous, Missouri, USA (sözlü).
10. Tuncok Y, Apaydın S, Kalkan S, Ates M, Guven H. The effects of amrinone and glucagon on verapamil-induced cardiovascular toxicity in anaesthetized rats. XVII. International Congress of the European Association of Poison Centres and Clinical Toxicologists (EAPCCT) June 4- 7, 1996, Marsilya, Fransa (poster).

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Duman M, Ozdemir D, Arslan N, Kalkan Ş. Triprolidine/pseudoephedrine alımı sonrası görülen halüsinasyonlar: Olgu sunumu. I. Ulusal Çocuk Acil ve Yoğun Bakım Kongresi, Edirne, Mayıs 2004.
2. Kalkan Ş, Aygören O, Akgün A, Gidener S, Güven H, Tunçok Y. Sıçanlarda amitriptilin ile oluşturulan kardiyovasküler toksisitede adenozin reseptörlerin rolü. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mezuniyet Töreni ve Sağlık Bilimleri Günü, İzmir, 26 Ekim 2004.
3. Kalkan Ş, Ergür B.U, Akgün A, Kaplan YC, Kınay AÖ, Tunçok Y. Sıçan organofosfat zehirlenme modelinde adenozin A₁ reseptör etkinliğinin atropin ve pralidoksim ile karşılaştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mezuniyet Töreni ve Sağlık Bilimleri Günü, İzmir, 26 Ekim 2004.
4. Barış N, Kalkan Ş, Güneri S, Bozdemir V, Güven H. Konjestif Kalp yetmezliği tedavisine eklenen karvedilol'ün serum digoksin düzeyleri üzerine olan etkisinde cinsiyet farklılığının rolü. XX. Ulusal Kardiyoloji Kongresi, Antalya, 27-30 Kasım 2004.
5. Aygören O, Kalkan Ş, Akgün A, Güven H, Tunçok Y. Sıçanlarda amitriptilin ile oluşturulan kardiyovasküler toksisitede adenozin reseptörlerin rolü Türk Farmakoloji Derneği 17. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 1. Klinik Farmakoloji Sempozyumu, Türk Hollanda farmakoloji Dernekleri Ortak Toplantısı, Belek Antalya, 17-21 Ekim 2003.
6. Kalkan Ş, Çevik AA, Aygören O, Akgün A, Ergün N, Tunçok Y. İlaç ve Zehir Danışma Merkezine bildirilen metanol zehirlenmeleri. Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 8-9 Mayıs, 2003.
7. Kalkan Ş, Akgün A, Aygören A, Çapar S, Hakgüder G, Yanturalı S, Soytürk M. İlaç ve Zehir Danışma Merkezine bildirilen Koroziv ajanlarla zehirlenmeler. Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 8-9 Mayıs, 2003.
8. Erdoğan A, Kalkan Ş, Aygören O, Güven H, Tunçok Y. İzole tavşan kalbinde midazolamın oluşturduğu kardiyak depresan etkide nitrik oksidin rolü. Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 8-9 Mayıs, 2003.
9. Özdemir D, Yıs U, Kalkan Ş, Duman M, Ünal N. Akut çocukluk çağı zehirlenmeleri. Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 8-9 Mayıs, 2003.
10. Gümüştekin M, Kalkan Ş, Murat N, Gür O, Hocaoglu N, Gidener S. Diabetik sıçanlarda metotreksatin farmakokinetiğinde sirkadian ritmin rolü. Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 8-9 Mayıs, 2003.
11. Eminoğlu Ö, Kalkan Ş, Akdağ H, Tunçok Y, Güven H. Dokuz Eylül Üniversitesi İlaç ve Zehir Danışma Merkezine bildirilen toksik gaz zehirlenmeleri. Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 8-9 Mayıs, 2003.
12. Karcioğlu O, Topaçoğlu H, Ünverir P, Bozkurt S, Korkmaz T, Kaynak F, Kalkan Ş. Acil serviste kostik bileşikler ile zehirlenmeler. Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 8-9 Mayıs, 2003.
13. Benker T, Kalkan Ş, Güven H, Gidener S, Kurt S. Dokuz Eylül İlaç ve Zehir Danışma Merkezine (ZDM) bildirilen mantar zehirlenmeleri. Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 8-9 Mayıs, 2003.
14. Kalkan Ş, Gümüştekin M, Aygören O, Tunçok Y, Gelal A, Güven H. Sıçanlarda oral ve intravenöz verilen siklosporin ile diltiazemin etkileşimi. Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 8-9 Mayıs, 2003.
15. Kalkan Ş, Erdoğan A, Aygören O, Çapar S, Tunçok Y. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç ve Zehir Danışma Merkezine bildirilen pestisidlerle zehirlenmeler. Klinik Toksikoloji Derneği 8. Toplantısı, Dr. Refik Saydam Hıfzı-sıhha Merkezi. Sıhhiye, Ankara, 18 Mayıs 2002.
16. Kalkan Ş, Tunçok Y, Murat N, Arkan F, Güven H, O. Aygören, S. Kurt. Sıçanlarda amitriptiline bağlı hipotansiyonda L-NAME'nin etkisi. Türk Farmakoloji Derneği XVI. Ulusal Farmakoloji Kongresi Kuşadası, İzmir, 1-5 Ekim 2001.
17. Kalkan Ş, Tunçok Y, Gümüştekin M, Güven H, İtil O, Uçan E, Akkoçlu A. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi göğüs stajında uygulanan probleme dayalı "İyi Reçete Yazma" eğitim programı. Türk Farmakoloji Derneği XV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Manavgat, Antalya, 1-5 Kasım 1999.
18. Kalkan Ş, Kırımlı Ö, Güneri S, Tunçok Y, Akdeniz B, Özdamar M, Güven H. Kaptoprilin serum digoksin düzeyine etkisi. Türk Farmakoloji Derneği XV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Manavgat, Antalya, 1-5 Kasım 1999.
19. Kalkan Ş, Tunçok Y, Soykan F, Güven H. İzole tavşan kalbinde midazolamın oluşturduğu miyokard depresyonuna L-NAME' in etkisi. Türk Farmakoloji Derneği XIV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Tekirova, Antalya, 2-7 Kasım 1997.
20. Tunçok Y, Apaydın Ş, Güven H, Kalkan Ş, Ateş M. Verapamil toksisitesinde Amrinon, Glukagon ve 4- Aminopiridin'in etkileri. Türk Farmakoloji Derneği XIII. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Tekirova, Antalya, 4-8 Kasım 1996.

IV. Kitap/Derleme

1. Çeviri:

Emergency medicine: A Comprehensive Study Guide. 5th Ed. Companion Handbook. Eds: David M Cline, O. John Ma, Judith E. Tintinalli, Gabor E. Kelen, J. Stephan Srapczynski, Mc Graw Hill 2000.

Acil Tıp Kapsamlı Çalışma Rehberi, El Kitabı. Ed: David M Cline, O. John Ma, Judith E. Tintinalli, Gabor E. Kelen, J. Stephan Srapczynski. Çeviri Editörü: Arif Alper Çevik. AND 2002. Bölüm Toksikoloji- 12. Bölüm (96-113), Çevrilen Konular: 105-113.

2. Şule Kalkan. Pestisidlerle zehirlenmeler. Türkiye Klinikleri (Toksikoloji Özel Sayısı) 48-52, 2003.

Nöronal plastisitede, presinaptik vezikül döngüsünün rolü

Dr. M. Yıldırım Sara

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., Ankara

GİRİŞ

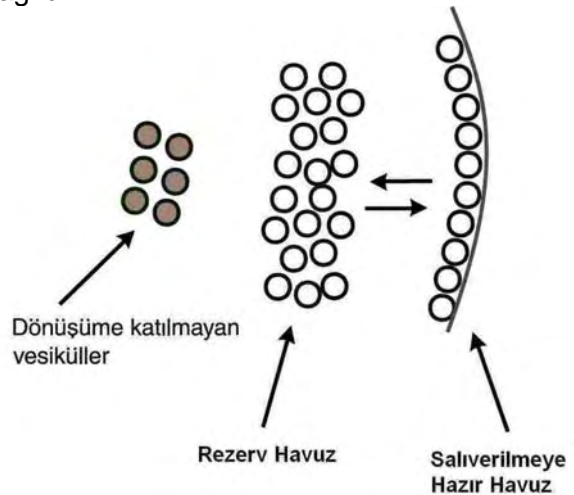
Sinaptik aşırım, bir aksiyon potansiyelinin sinir terminalinden nörotransmitter saliverilmesini tetiklemesi ile başlar (1). Presinaptik membran, aksiyon potansiyeli ile depolarize olunca açılan Ca^{2+} kanalları aktif zon civarındaki kalsiyumu, yaklaşık 100 nM'lık dinlenme konsantrasyonlarından senkronize ekzositozun gerçekleştiği 100 μ M düzeyine ulaştırır (2). Tüm sinapslarda uyarı başına meydana gelen vezikül ekzositoz sayısı, saliverilmeye hazır vezikül ile veziküllerin saliverilme olasılığının çarpımıdır. Bunun sonucu olarak santral sinapslardaki var olan düşük vezikül sayısı ve düşük saliverilme olasılığı, çoğu santral sinir terminaline ulaşan aksiyon potansiyellerinin ancak %10-20'sinde nörotransmitter saliverilmesine neden olur. Aksiyon potansiyeli-saliverilme ilişkisinin bu kadar düşük olasılıklı olması, bu ilişkinin hücre içi ve dışı modülatörler ve özellikle de sinapsın kullanım sıklığı ile dramatik bir şekilde kontrol edilebilmesini sağlar.

Santral sinapslarda, elektron mikroskopi çalışmalarında sinaps başına >200 vezikül bulunduğu saptanmakla birlikte bu veziküllerin yaklaşık $\frac{1}{4}$ 'ünün fonksiyonel olarak vezikül döngüsünde yer aldığı bilinmektedir (3). Fonksiyonel çalışmalarda nörotransmitter saliverilmesinin hızlı ve yavaş olmak üzere iki fazdan meydana geldiği saptanmıştır (4). Hızlı fazı oluşturan veziküllerin, fonksiyonel olarak ilk önce saliverilmeye hazır (SH) bir havuzdan geldiği, bunun yanında ise yavaş ekzositozun daha zor mobilize olan rezerv havuzdan (RH) gelen veziküllerden kaynaklandığı bulunmuştur (Şekil 1). Hipokampal piramidal nöron sinapslarında SH havuzunda yaklaşık 4-8 ve rezerv havuzda ise 17-20 vezikülün var olduğu hesaplanmıştır (5). SH ve rezerv havuzun dışında kalan veziküllerin fonksiyonel rolleri henüz bilinmemektedir.

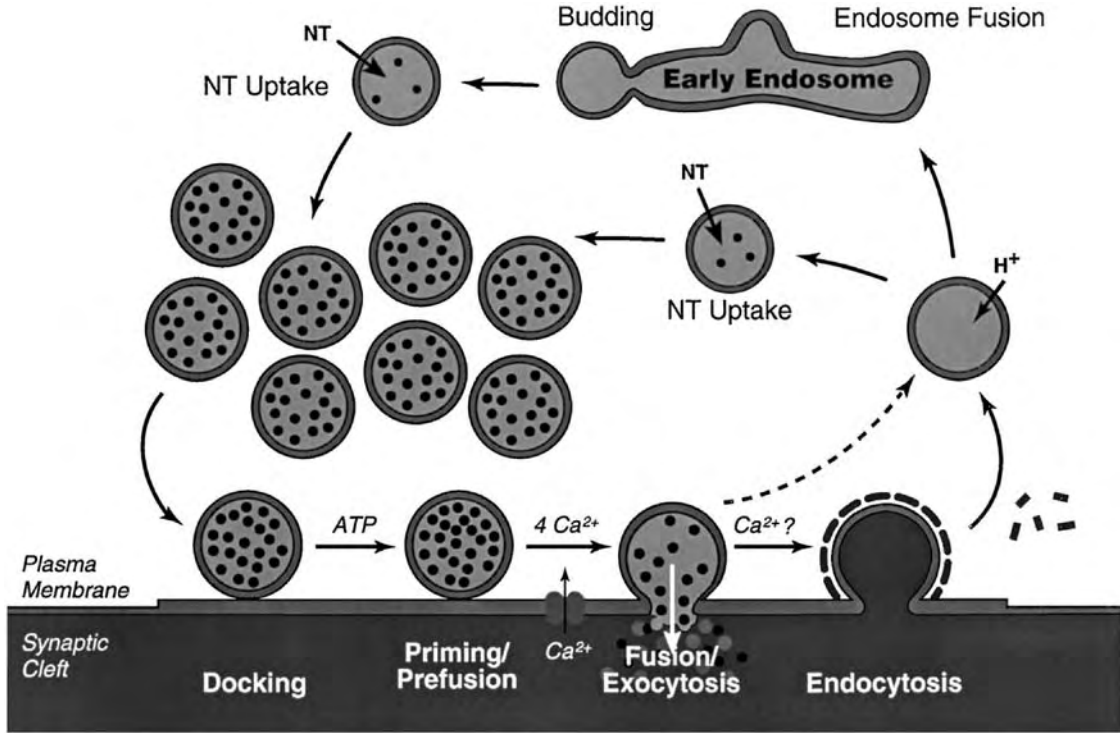
Sinapslarda her bir vezikül benzer yaşam siklusunu takip eder. Önce veziküller membran

civarında toplanır, membrana yanaşırlar (*docking*), saliverilmeye hazır hale gelirler (*priming*) ve Ca^{2+} uyarısı ile membran ile füzyon oluşturup içeriklerini hücre dışı aralığa boşaltırlar (Şekil 2) (6). Ekzositozu takiben yeniden vezikül oluşumu (endositoz) iki yol ile olur. 1) Klasik yol (klatrin aracılı yol): Vezikül hücre membranından sıfırdan başlanarak yapılır (7). 2) Öp ve kaç (*kiss and run*) yolu (8,9): Vezikül ekzositozda tam olarak membran ile bütünleşmez, içeriğini boşalttıktan sonra vezikül bütünlüğünü kaybetmeden geri çekilir. Bu noktadan sonra nörotransmitterler vezikül içine proton gradiyentini kullanan özel taşıyıcılar ile doldurulur. Bu iş için gerekli olan proton gradiyenti ATP kullanan vakuoler tip proton pompası ile sağlanır ve veziküller tekrar saliverilmeye hazır hale gelirler (10).

Nöron terminalleri yüksek hızlarda uyarıldıkları zaman nörotransmitter saliverilmesi hızla azalır ve sonunda bir plato düzeyine ulaşır. Bu yüksek frekanslı uyarımda gelişen hızlı depresyon fazı SH havuzundaki veziküllerin tükenmesini gösterir. Plato fazı ise vezikül döngüsü ve/veya rezerv havuzdan gelen yeni veziküller ile meydana gelir ve plato fazının amplitüdü yeni veziküllerin saliverilecekleri bölgeye gelme (endositoz) hızına bağlıdır.



Şekil 1. Fonksiyonel vezikül havuzları.



Şekil 2. Sinaptik vezikül döngüsü.

Beyinde sinaptik iletimin efikasitesi yaşam boyunca devamlı olarak yeniden ayarlanır. Bu durum nöronal plastisite olarak adlandırılır. Sinaptik gücün ayarlanması çoğunlukla Hebb kurallarına göre, pre- ve post-sinaptik aktivite ile korele olarak gerçekleşir. Bu aktivitenin şiddeti, frekansı ve devam süresi, uygulandığı sinapsın gücündeki azalma veya artma şeklinde gelişecek değişikliklerin düzeyini ve bu yeni düzeyin kısa veya kalıcı olacağını belirleyen ana faktörlerdir (11, 12). Presinaptik bölgenin gücünü belirleyen iki ana faktör vardır: 1) Aksiyon potansiyeli sonucu ulaşılan maksimum Ca^{2+} konsantrasyonu, 2) Veziküllerin salıverilme olasılığı. Salıverilme olasılığı büyük oranda sinaptik vezikül döngü kinetiği ve vezikül sayısı ile belirlenir (13, 14).

Sinapslar gelişim süreçlerinde çeşitli aşamalardan geçerek yaklaşık 200 vezikül ve üç ayrı havuzdan oluşan olgun hallerine gelirler. Hipokampal kültürlerde, sinapsların başlangıçta çok az sayıda vezikül içerdiği, ve ilk günlerinde tamamen rezerv havuzdan oluştuğu, bir sonraki aşamada (5. günden sonra) ise tüm veziküllerin SH havuza göç ettiği ve toplam vezikül sayısının artması ile olgun hale eriştikleri (2 hafta) saptanmıştır (15).

Uyarılma ile indüklenen veya spontan olarak gerçekleşen presinaptik vezikül aktivitesinin

özellikle kısa dönem plastisitede major rolü olduğu bilinmektedir. Sinaptik plastisitede, postsinaptik mekanizmalar oldukça çok incelenmiş olmakla beraber presinaptik alan, ancak moleküler ve görüntüleme tekniklerinin gelişmesi ile son yıllarda ağırlıklı olarak incelenmeye başlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

Hipokampal nöron kültürleri 1-3 günlük Sprague-Dawley sıçan yavrularından ve sinaptobrevin-2 mutant fare embriyolarından (E18) hazırlandı (16). Nöron kültürlerinde sinapslar, fonksiyonel çalışmalardan elde edilen verilere dayanılarak 5-10 gün arasında immatür ve 14 günden sonrası erişkin olarak kabul edildi.

Floresan Görüntüleme

Tüm deneylerde modifiye Tyrode solüsyonu kullanıldı; (mM) 150 NaCl, 4 KCl, 2 MgCl₂, 10 Glikoz, 10 HEPES and 2 CaCl₂ (pH 7.4, ~310 mOsm). Sinapslar FM2-10 (Molecular Probes, Eugene, OR) veya AM1-44 (Biotium Inc, Hayward, CA) boya ile inkübe edilen kültürlerin yüksek K^+ (90 mM) solüsyonu, elektrik alan stimülasyonu (30mA, 1ms devam süresi) veya 800 mOsm'lik solüsyon uygulanması ile dolduruldu. Hipokampal terminaller yüksek

K⁺ solüsyonu veya elektrik alan stimülasyonu ile boşaltıldılar. Görüntüler soğutulmuş "intensified" dijital CCD kamera (Roper Scientific, Trenton, NJ) ile 1 Hz ve 40 ms'lik ışık darbeleri ile 480±20 nm de (505 DCLP, 535±25 BP) kayıt edildi. Bütün istatistikler Student'in *t-testi* ile yapıldı. Sonuçlar ortalama ± O.S.H olarak sunuldu.

Elektron Mikroskopisi

Nöron kültürleri, 90 veya 4 mM K⁺lu Tyrode solüsyonları ile muamele edildiler. Deney grubuna göre, horseradish peroksidaz (10mg/ml, Sigma) içeren ve içermeyen solüsyonlar 120 s veya 5 dakika boyunca uygulandı. Bu sürenin sonunda kültürler hızla yıkandılar ve sonra 30 dakika boyunca 0.1 M Na⁺ fosfat tamponu içindeki, %2'lik glutaraldehit ile fikse edildiler. Uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanan dokulardan hazırlanan 60 nm'lik kesitlerde JEOL 1200 EX transmisyon mikroskopu ile resimler elde edildi.

Elektrofizyoloji

Bazı deneylerde kültürler 67 nM folimycin (Calbiochem, La Jolla, CA) ve 1 µM tetrodotoksin (TTX) içeren solüsyon ile muamele edildi. Elektrod solüsyonu (mM): 115 Cs-MeSO₃, 10 CsCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 0.6 EGTA, 20 TEA.Cl, 4 Mg-ATP, 0.3 Na₂GTP, 10 QX-314 (pH 7.35, 300 mOsm). Takiben piramidal hücreler "whole-cell patch clamp" yöntemi ile "patch" edildiler ve membran potansiyelleri -70 mV da tutuldu. Veriler, Axopatch 200B amplifikatörü ve Clampex 8.0 yazılımı kullanılarak (Axon Instruments, Union City, CA) kayıt edildi.

BULGULAR

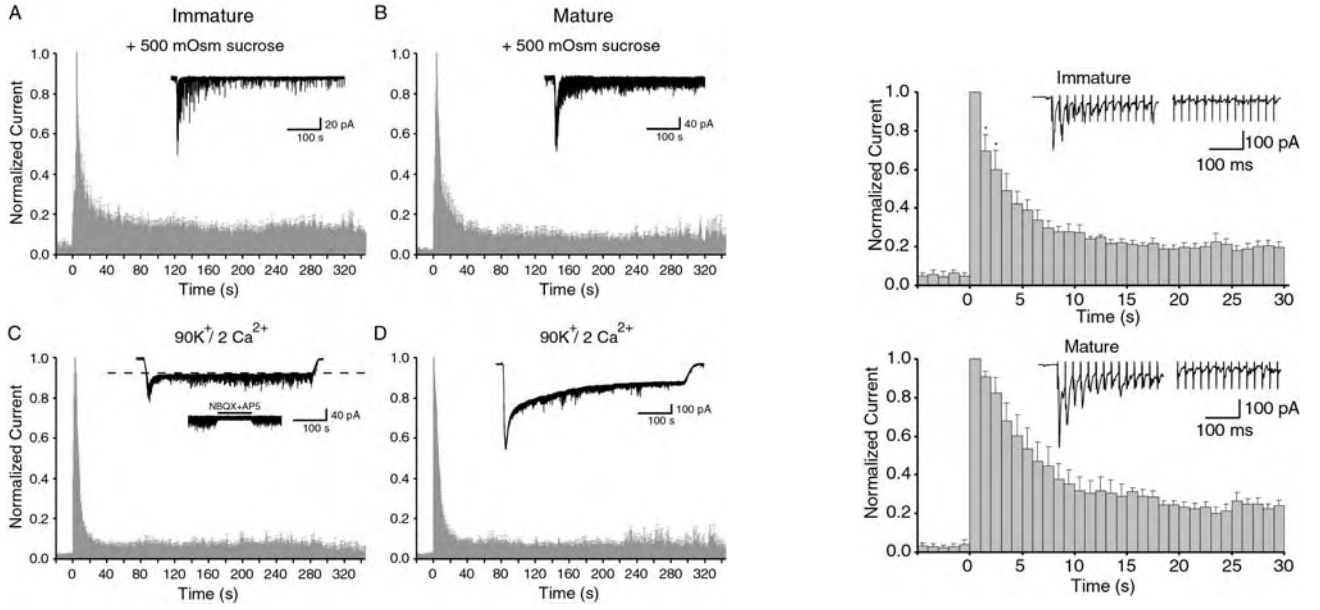
Santral sinapslar az sayıda vezikül bulundurmalarına ve düşük salıverilme olasılıklarına rağmen uzun ve yüksek frekanslı uyarılarda sinaptik aşırımı kesintisiz olarak nasıl sürdürebilmektedirler? Klasik endositoz yolu ile yeni vezikülün tekrar salıverilebilir hale gelmesinin 40-90 s (17, 18) sürdüğü düşünülürse uzun uyarılarda veziküllerin tükenmesini engelleyen mekanizma/lar nedir? Sinaps

gelişimi sırasında sinaptik etkinlik kesintisiz olarak ne kadar sürdürülebilir? Bu soruları yanıtlamak amacıyla, erişkin ve immatür hipokampal nöron kültürleri, tüm veziküllerin birçok defa döngü yapacağı süre kadar uyarıldılar. Erişkin ve immatür sinapsların yüksek frekanslı elektrik alan stimülasyonu (EAS, 30 Hz), hiperosmolar (+500 mOsm sükröz) veya yüksek potasyum (90 mM) ile uyarılması hızla ekzositozu azalttı ve sinaptik çıkış (*output*) sabit bir plato düzeyine erişti ancak her iki grupta da hiçbir zaman sinaptik aktivite tamamiyle tükenmedi (Şekil 3).

Elektron mikroskopisi çalışmalarında sinapslar 10 dakika boyunca 90 K⁺ ile uyarıldıkları zaman toplam vezikül sayısının minimal derecede azaldığı görüldü. Böylesine güçlü ve uzun süreli bir stimülasyon ile hem erişkin hem de immatür sinapsların vezikül ekzositozunu devam ettirebilmeleri hızlı bir endositoz yolunun çalıştığını gösterdi. Bu yolun hızının ölçülmesi için FM2-10 boyası ile sinapslar 5 dakikalık 90 K⁺ uyarısının son 10 saniyesi boyunca dolduruldu. Yeniden hazır olan veya başka bir deyişle boya dolu ve ikinci kere ekzositoz yapan veziküller ilk olarak 5. saniyede saptandı.

Endositoz hızının daha hassas olarak ölçülebilmesi için, eş zamanlı olarak aynı nöronda FM boyanın boşalma kinetiği ile elektrofizyolojik olarak kayıt edilen sinaptik depresyon eğrileri karşılaştırıldı (Şekil 4). Erişkin ve immatür sinapslar 30 s süren sükröz veya 30 Hz'lik EAS ile uyarıldı. İki eğrinin ayrıldığı nokta kullanılarak hızlı endositozun süresinin 1-3 san olduğunu hesaplandı. Sinaptik gelişim farklı dönemlerinde EAS ile uyarılmada, hızın belirgin olarak değişmediği ancak sükröz uyarısının 30 Hz EAS'a göre hızlı endositozu daha çok uyardığı ve endositoz hızının sinaps olgunlaştıkça hızlandığı saptandı.

Endositoz hızının uyarı tipine göre değişmesi, uyarı frekansı ile olabilecek ilişkisini araştırmamıza neden oldu. Bu amaçla aynı deneyler 10 Hz lik uyarılar ile tekrarlandığında endositoz belirgin bir şekilde yavaşladı ve iki eğrinin yaklaşık 20 s sonra ayrıldığı görüldü.



Şekil 3. Erişkin ve immatür sinapslarda uzun süreli stimülasyon ile indüklenen sinaptik depresyon kinetikleri. Sol paneldeki veriler hiperosmolar sükröz (yukarı) ve yüksek potasyum (aşağı) ile sağ paneldeki veriler ise 30 Hz, 30 s'lik elektriksel alan stimülasyonu ile elde edilmiştir.

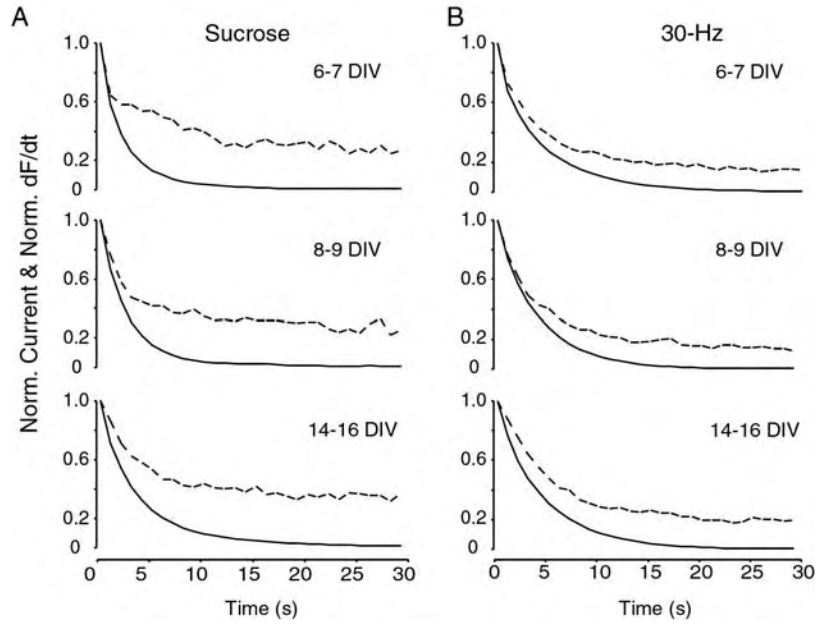
Daha ayrıntılı olarak endositoz hızının ölçülmesi ve uyarı frekansı ile ilişkisinin saptanabilmesi amacı ile sadece elektrofizyolojik olarak hesaplama yapmayı sağlayan bir yöntem geliştirildi. Vakuoler tip proton pompasının farmakolojik olarak folimycin ile inhibisyonundan sonra, her salıverilen vezikül sadece bir kez postsinaptik (elektriksel) yanıt oluşturabilir. Bu nedenle, endositoz ile geri gelen ve ikinci kere salıverilen vezikül nörotransmitter içermeyecektir. Çeşitli frekanslarda uyarılarak elde edilen sinaptik depresyon eğrilerinin, pompanın sağlam olduğu kontrollerden elde edilen eğriler ile karşılaştırılması endositoz oranını ve farkın başladığı an ise endositoz hızını gösterir. Uyarı frekansı azaldıkça (30, 10, 1 ve 0.1 Hz) iki eğrinin birbirlerinden ayrılma noktası belirgin bir şekilde frekansa bağımlı olarak uzadı.

Bu çalışma sırasında folimycin'in spontan aktivitenin frekansını kısa süre içinde yaklaşık 6 kat azalttığı bulundu. Buna karşın folimycin gerek spontan eksitator postsinaptik akımların (EPSA) gerekse uyarılmış aktivitenin amplitüdlerini belirgin olarak azaltmadı (Şekil 5). Spontan EPSA'ların frekanslarının azalması ve amplitüdlerinin anlamlı olarak değişmesi spontan salıverilme ile nörotransmitter dolu veziküllerin tükenmesi ile açıklanabilir. Folimycin varlığında ve yokluğunda elde edilen FM boya boşalma kinetiklerinin tamamıyla aynı olması folimycin'in presinaptik salı-

verilme mekanizmalarını etkilemediğini gösterir. Klasik ve şu an kabul edilen görüşe göre spontan olarak salıverilen veziküller SH havuzdan kaynaklanırlar ancak bu durumda spontan EPSA frekansında 6 kat azalma meydana getiren folimycin etkisinin, SH havuzun veziküllerinde ileri derecede azalma yaratması ve uyarılmış salıverilme amplitüdünde belirgin bir düşüş yapması beklenirdi. Bu beklenmedik farkın nedenini açıklamak için spontan vezikül döngüsünü görüntüleme yöntemleri kullanarak ayrıntılı olarak inceledik.

İlk olarak spontan aktiviteyi kesin olarak görüntüleyip karakterize etmek için farklı boyama yöntemleri ile bulgular karşılaştırıldı. Presinaptik terminallerde spontan vezikül döngüsünü görüntülemek için AM1-44 floresan boyası ve işaretli synaptotagmin-1 antikorları kullanıldı. Kültürler, spontan aksiyon potansiyeli oluşumu sonucu meydana gelen vezikül döngüsünü engellemek için, TTX varlığında 15 dakika boyunca sinapsları seçici olarak işaretleyen boya ve antikorlar ile inkübe edildi. İki farklı yöntemle spontan aktivite gösteren sinapslar görüntüledi (Şekil 6).

Boyama protokolleri sırasında sinapslarda meydana gelebilecek kalıcı bir hasar sonucu sinapslar non-spesifik olarak boya



Şekil 4. Elektriksel ve FM boya kaybı eğrilerinin karşılaştırılması. Kesikli çizgiler elektriksel verileri, düz çizgiler ise FM sinyalini göstermektedir.

veya antikorlar ile işaretlenebilirler. Bu olasılığı elimine etmek için spontan aktivite ile dolan sinapslar iki kademede işaretlendi. Birinci aşamada kültürler herhangi bir stimulus olmadan sinaptotagmin-1 (Syt-1) antikorları ile 15 dakika inkübe edildi. Bu antikor yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra Sty-1'e karşı geliştirilmiş ve kırmızı floresan proteinle işaretli bir antikor ile 15 dakika daha inkübe edildi. En sonunda 2. antikor da yıkanarak uzaklaştırıldı ve kültür fikse edildi. Spontan aktivite ile sinapsların bu iki aşamalı boyama protokolü ile de boyandığı saptandı.

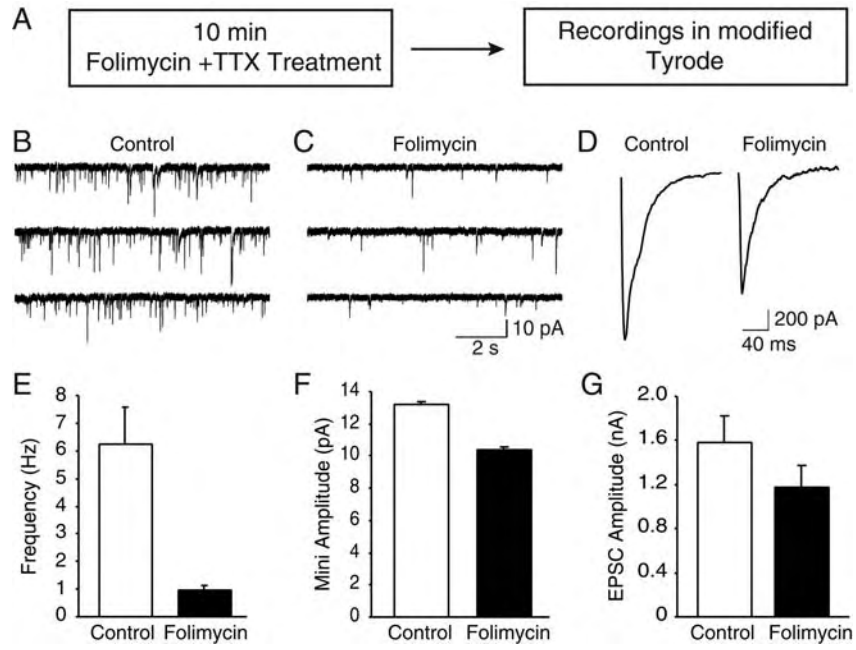
Spontan olarak döngüye uğrayan veziküller, daha sonra hangi vezikül havuzlarına karışırlar? Bu amaçla sinapslar önce spontan sonra maksimal olarak FM2-10 ile dolduruldu. Her doldurma işleminden sonra 90 K^+ veya 10 Hz , 90 s uyarıları ile boşaltılarak ekzositoz kinetikleri ortaya çıkarıldı (Şekil 7). Bu kinetikler spontan endositoza uğrayan veziküllerin seçici olarak daha yavaş salıverildiklerini ve rezerv havuza yöneldiklerini gösterdi.

Spontan doldurma protokolü toplam havuzun ancak %25'ini doldurabilirdi. Spontan endositozun rezerv havuzu seçmesinde bu kısmen doluşun etkisinin araştırılması için sinapslar 30 Hz , 2 s elektriksel olarak uyarılarak yaklaşık %25 oranında FM boya ile dolduruldu.

Aynı miktarda doldurulmuş olmalarına karşın aktivite ile dolan bu sinapsların kinetiği maksimal dolanlar ile aynı bulundu.

Spontan olarak dolan vezikül havuzunun büyüklüğünün saptanması amacıyla, kültürler FM boya ve TTX varlığında değişen sürelerde inkübe edildi. Artan sürelerde beklenerek yavaş ve spontan dönüşen vezikül havuzunun tamamının doldurulması amaçlandı. Sürenin kısaltılması dolma miktarını azalttı ancak sürenin 15 dakikanın üzerinde ve hatta 45 dakikada bile dolma miktarını değiştirmediği bulundu (Şekil 8). Kalsiyumun spontan endositoza uğrayan vezikül havuzuna etkisini incelemek için hücre dışı Ca^{2+} 8 mM 'a çıkarıldığında spontan boya ile dolma hızının arttığı saptandı (Şekil 8).

Aktivite ile doldurulan sinapslarda yeterince beklendiğinde (10 dk) boya ile dolan veziküller SH ve rezerv havuzlar arasında eşit dağılırlar. Spontan aktivite ile 45 dk sonra bile toplam vezikül havuzunun ancak %25'inin dolabilmesinin nedeni araştırıldı. Bu durum spontan aktiviteye katılan veziküllerin seçici olarak rezerv havuzdan gelip ekzositoz yapmaları ve sonra endositoz ile tekrar rezerv havuza gitmeleri ile açıklanabilir. Bu hipotezi test etmek için spontan veya aktivite ile dolduru-

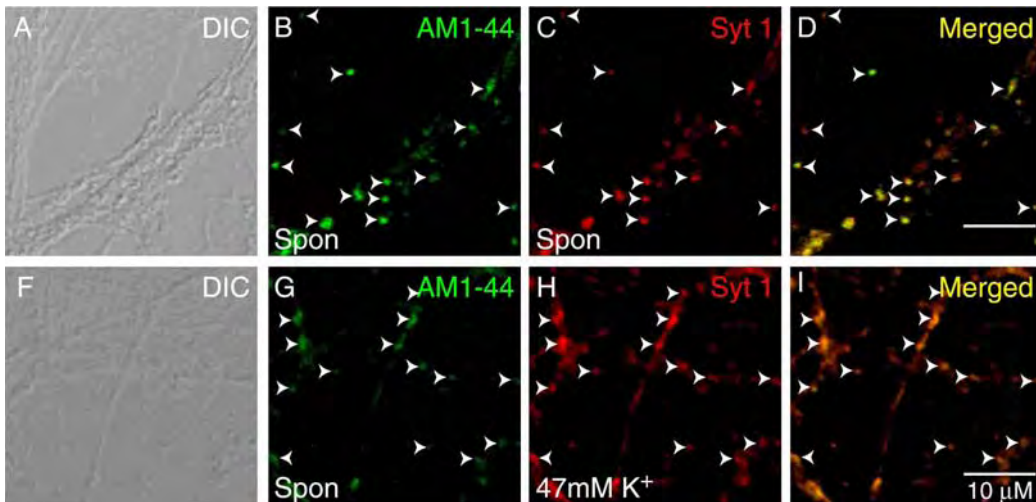


Şekil 5. Folimycin'in spontan ve uyarılmış aktivite üzerine etkileri.

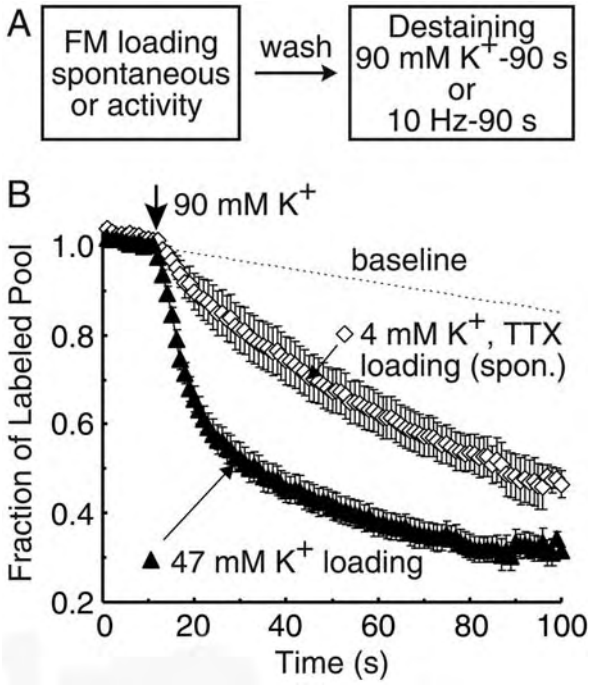
lan sinapsların spontan olarak boya kaybetme kinetikleri karşılaştırıldı (Şekil 9). Spontan olarak dolan veziküllerin aktivite ile dolarlardan daha hızlı ekzositoza uğradıkları bulundu. Spontan ve uyarılmış olarak doldurulan sinapsların morfolojik olarak farklı olup olmadıkları elektron mikroskopisi ile incelendi. "Horseradish" peroksidaz ile işaretlenen veziküllerin her iki grupta da benzer olduğu görüldü.

Spontan vezikül döngüsünü moleküler düzeyde incelemek için SNARE molekülü olan sinaptobrevinin rolü incelendi. SNARE'ler, sinaptobrevin, SNAP-25 ve sintaksin, Ca^{2+} bağımlı hızlı ekzositozun gerçekleşmesi için

şart olan temel moleküllerdir (19). Sinaptobrevinin-2 (beyine spesifik izoform) geni silinmiş fare embriyolarından hazırlanan kültürler kullanıldı. Yabanıl (*wild type*) tip farelerde, spontan veya aktivite ile doldurulan sinapslardan yapılan kayıtlarda spontan veya $90 K^+$ ile indüklenmiş ekzositoz kinetiklerinin sıçan kültürlerinden elde edilenler ile aynı olduğu bulundu. Buna karşın sinaptobrevin-2 geni silinmiş (*sib2^{-/-}*) farelerden hazırlanan kültürlerde aktivite ile doldurulan sinapslar ile spontan dolanların, spontan veya $90 K^+$ ile indüklenmiş ekzositoz kinetikleri tamamen üst üste geldi (Şekil 10).



Şekil 6. Hipokampal kültürlerde spontan veziküller aktivite.

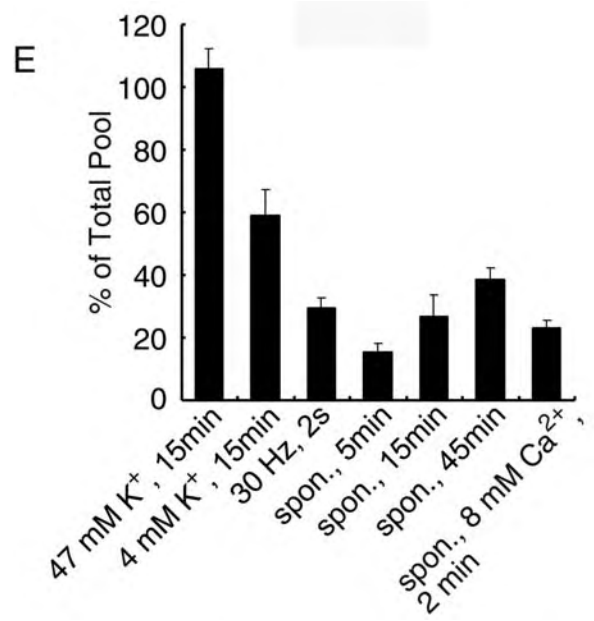


Şekil 7. Spontan veya aktivite ile doldurulan sinapsların uyarı ile FM boya kaybetme kinetikleri.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu deneylerde yüksek osmolarite, yüksek K^+ ve hızlı elektriksel aktivite gibi uzun süren ve şiddetli uyarılarda sinaptik aşırımın anlamlı bir kısmının hızlı vezikül döngüsü ile sağlandığı gösterilmiştir. Yüksek K^+ ile indüklenen sinaptik depresyonun plato fazının 10 s'lik kısmında saliverilen veziküllerin % 30'dan fazlasının 5 s sonra tekrar saliverilmek üzere endositoz ile geri geldiği hesaplandı. Bu yaklaşık değer yavaş endositozdan en az 10 kat daha hızlıydı. Görüntüleme ve elektrofizyolojik analiz eşzamanlı olarak kullanılması ile elde edilen ölçümlerde hızlı vezikül döngüsünün hızının 1 ile 3 s arasında olduğu bulundu. Vezikül yenilenme mekanizmasının sinaps gelişiminin erken dönemlerinden başlayarak yaklaşık aynı derecede aktif olduğu saptandı.

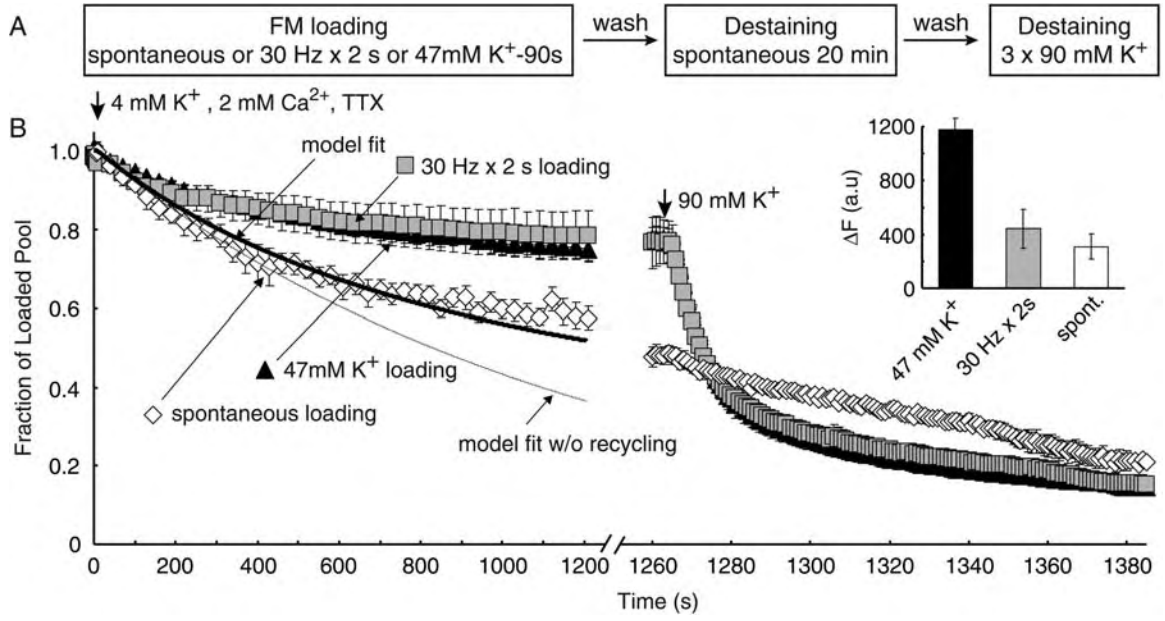
Sükroz (hiperosmolarite, 20) veya 30 Hz gibi şiddetli uyarılar hızla SH havuza ait vezikülleri tüketirler ve eksilenlerin yerine yenileri kısmen rezerv havuzdan ve bu çalışmada da görüldüğü gibi hızlı vezikül döngüsü ile, büyük olasılıkla da "kiss and run" yolu ile gelirler. Ancak 10 Hz deneylerinde 30 Hz'e göre FM boya ve elektriksel yanıt eğrilerinin 10'larca saniye daha geç ayrılması ve 10 Hz ile elde edilen FM kinetiklerinin daha yavaş ve monofazik karakterli olması, uyarı hızının azaldığı bu gibi durumlarda rezerv havuzun



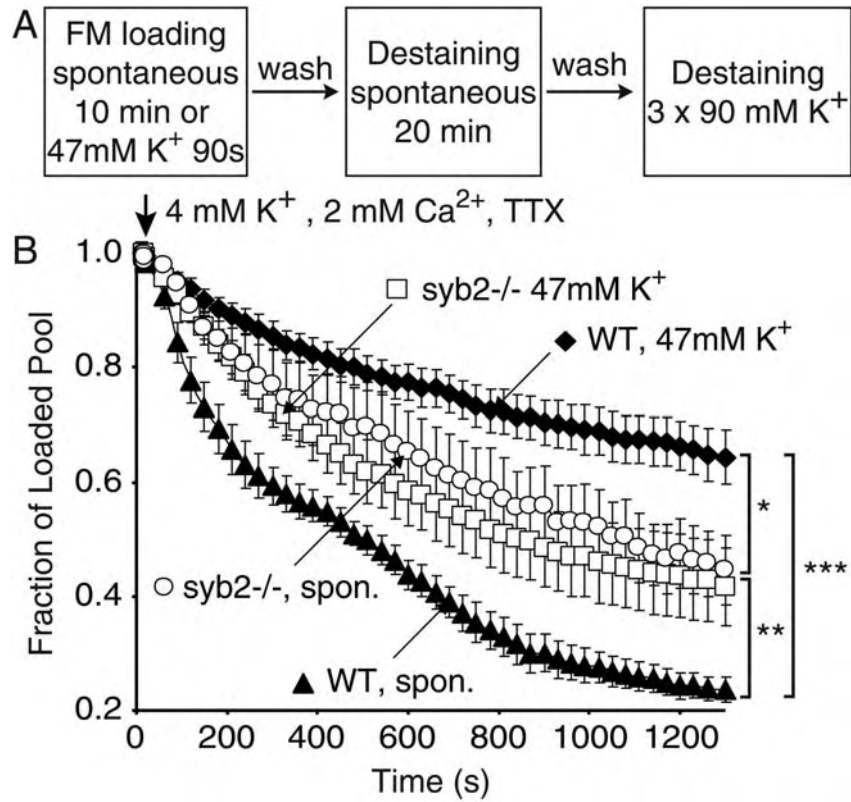
Şekil 8. Sinapsların farklı protokoller ile FM boya ile doldurulma oranları.

ve klasik endositoz yolunun katkılarının daha ön plana çıktığını göstermektedir.

Elektrofizyolojik verileri ve görüntülemeyi eşleştirerek yapılan ölçümlere alternatif olarak sadece elektriksel yanıtlar üzerinden analiz yapabilmek için normal vezikül döngüsünü etkilemeden, veziküllerin sadece bir kere nörotransmitter salivermesin olayına katılmaları sağlandı. Bu amaçla folimycin ile veziküller H^+ pompasının inhibe edildiği deneylerde yüksek frekanslardan düşük frekanslara inildikçe vezikül döngü hızının yavaşladığı saptandı. Bu bulgulara ilaveten, folimycin ile inkübe edilen sinir terminallerinde spontan vezikül döngüsüne katılan veziküllerin uyarılma ile mobilize olan veziküllere göre daha çok etkilendikleri gözlemlendi. Folimycin'in spontan aktiviteyi belirgin olarak azaltmasının yanında SH havuzda duran vezikülleri etkilememesi, spontan saliverilen veziküllerin SH havuzdan kaynaklandıkları hipotezi ile ters düşmektedir (5). Özetle bu konuda yapılan çalışmalarda 1) spontan aktiviteye katılan veziküllerin hem endositoz hem de ekzositozda yavaş (rezerv) havuzu tercih ettikleri, 2) SH havuzdaki veziküller ile karışmadıkları, 3) spontan döngü gösteren veziküllerin oluşturduğu havuzun boyutunun kısıtlı olduğu, 4) Sinaptobrevinin yokluğunda spontan ve uyarılmış aktivite ile mobilize olan veziküllerin benzer davranışları bulundu. Bu bulgular, spontan vezikül ekzositozunda SH havuzunun hiç katkısı ol-



Şekil 9. Spontan veya aktivite ile doldurulan sinapsların spontan FM boya kaybetme kinetikleri.



Şekil 10. Yabancıl ve sinaptobrevin geni silinmiş fare kültürlerinde, spontan veya aktivite ile doldurulan sinapsların spontan FM boya kaybetme kinetikleri.

madığını göstermemekle birlikte santral sinapslarda spontan aktivite için gerekli major yolağın SH dışı, daha yavaş ve büyük olasılıkla rezerv havuz olduğunu göstermektedir. Fiziksel olarak SH veziküllerin aktif zonda yerleştikleri bilinmektedir. Bu çalışmada spontan aktivite gösteren veziküllerin aktif zondan veya aktif zon dışı bölgelerden mi salıverildikleri tam olarak ayırt edilemedi. RIM1 α gibi bir aktif zon proteininin “knock out”larında uyarılmış aktivitenin tamamıyla inhibe olduğu durumda spontan aktivitenin değişmediği bulunmuştur (21). Ancak sinaptobrevin “knock out”larında ise daha çok uyarılmış aktivite baskılanmış olmakla birlikte spontan aktivitenin azalması (22), sinaptobrevinin veziküllerin spontan veya uyarılmış aktivitede hangi yolu seçeceklerinin belirlemede rolü olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Katz B. The release of neurotransmitter substances. Liverpool: Liveerpool Univ. Press., 1969.
- Bollmann JH, Sakmann B, Borst JG. Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. Science 289(5481): 953-7, 2000.
- Schikorski T, Stevens CF. Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. Nat Neurosci 4(4): 391-5, 2001.
- Zucker RS. Short-term synaptic plasticity. Annu Rev Neurosci 12: 13–31, 1989.
- Murthy VN, Stevens CF. Reversal of synaptic vesicle docking at central synapses. Nat Neurosci 2(6): 503-7, 1999.
- Südhof TC. The synaptic vesicle cycle revisited. Neuron 28(2): 317-20, 2000.
- Heuser JE, Reese TS. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuro-muscular junction. J Cell Biol 57(2): 315-44, 1973.
- Barker LA, Dowdall MJ, Whittaker VP. Choline metabolism in the cerebral cortex of guinea pigs. Biochem J 130(4): 1063-75, 1972.
- Ceccarelli B, Hurlbut WP, Mauro A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. J Cell Biol 57(2): 499-524, 1973.
- Arata Y, Nishi T, Kawasaki-Nishi S, Shao E, Wilkens S, Forgac M. Structure, subunit function and regulation of the coated vesicle and yeast vacuolar H⁺-ATPases. Biochim Biophys Acta 1555(1-3): 71-4, 2002.
- von Gersdorff H, Borst JG. Short-term plasticity at the calyx of held. Nat Rev Neurosci 3(1): 53-64, 2002.
- Zucker RS, Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. Annu Rev Physiol. 64:355-405, 2002.
- Wu LG, Borst JG. The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. Neuron 23: 821–832, 1999.
- Goda Y, Stevens CF. Readily releasable pool size changes associated with long-term depression. Proc Natl Acad Sci USA 95: 1283–1288, 1998.
- Mozhayeva MG, Sara Y, Liu X, Kavalali ET. Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. J Neurosci 22(3): 654-65, 2002.
- Kavalali ET, Klingauf J, Tsien RW. Activity-dependent regulation of synaptic clustering in a hippocampal culture system. Proc Natl Acad Sci USA 96: 12893–12900, 1999.
- Betz WJ, Bewick GS. Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. J Physiol (Lond) 460: 287–309, 1993.
- Liu G, Tsien RW. Properties of synaptic transmission at single hippocampal synaptic boutons. Nature 375: 404–408, 1995.
- Deak F, Schoch S, Liu X, Südhof TC, Kavalali ET. Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. Nat Cell Biol 6(11): 1102-8, 2004.
- Rosenmund C, Stevens CF. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. Neuron 16: 1197–1207, 1996.
- Calakos N, Schoch S, Südhof TC, Malenka RC. Multiple roles for the active zone protein RIM1 α in late stages of neurotransmitter release. Neuron 42(6): 889-96, 2004.
- Schoch S, Deak F, Königstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Südhof TC, Kavalali ET. SNARE function analyzed in synapto-brevin/VAMP knockout mice. Science 294(5544): 1117-22, 2001.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : M. Yıldırım Sara
Doğum Yeri : Ordu
Doğum Tarihi : 31 Ocak 1968
Adres : Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 06100 Sıhhiye, Ankara
Telefon : + 90 312 3051086
Fax : + 90 312 3105312
E-posta : ysara@hacettepe.edu.tr

Eğitim Durumu

Lisans; Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara, 1993.
Tıbbi Farmakoloji Uzmanlığı; Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., Ankara, 1999.

Akademik Kariyer

Araştırma Görevlisi; Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., 1993-1999.
Araştırma Görevlisi; Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Ab.D., 2003- .

Yurtdışı Deneyim

Doktora sonrası araştırma; University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Basic Neuroscience Center, 2000-2003.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

Türk Farmakoloji Derneği

Ödüller

Sedat Simavi Sağlık Bilimleri Ödülü, 1999

Yayın Listesi

I. Araştırma Makaleleri

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Sara Y, Virmani T, Deak F, Liu X, Kavalali ET. An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. *Eur J Pharmacol* (baskıda; *Neuron* 2005 Şubat sayısı).
2. Sara Y, Biederer T, Atasoy D, Chubykin A, Mozhayeva MG, Sudhof TC, Kavalali ET. Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *J Neurosci* 25, 260-70 (2005).
3. Sara Y, Ertunc M, Onur R. The role of nitric oxide on contractile impairment during endotoxemia in rat diaphragm muscle. *Eur J Pharmacol* 505, 177-186 (2004).
4. Biederer T, Sara Y, Mozhayeva MG, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Sudhof TC. SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 5586, 1525-1531 (2002).
5. Bolay H, Gürsoy-Özdemir Y, Sara Y, Onur R, Can A, Dalkara T. Persistent defect in transmitter release and synapsin phosphorylation in cerebral cortex after transient moderate ischemic injury. *Stroke* 33, 1369-1375 (2002).
6. Sara Y, Mozhayeva MG, Liu X, Kavalali ET. Fast vesicle recycling supports neurotransmission during sustained stimulation at hippocampal synapses. *J Neurosci*, 22, 1608-1617 (2002).
7. Mozhayeva M G, Sara Y, Liu X, Kavalali ET. Development of vesicle pools during maturation of hippocampal synapses. *J Neurosci* 22, 654-665 (2002).
8. Schoch S, Deak F, Konigstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Sudhof TC, Kavalali ET. SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* 5544, 1117-1122 (2001).
9. Bingöl-Koloğlu M, Sara Y, Ertunç M, Onur R, Büyükpamukçu N, Tanyel FC. Increased intra-abdominal pressure alters the contractile properties of rabbit bladder. *BJU Int* 85, 336-40 (2000).
10. Çiftçi AO, Sara Y, Tanyel FC, Bozdağ Ö, Orer HS, Onur R. The role of nitrergic system on the contractility of colonic circular smooth muscle in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 34, 1477-1481 (1999).
11. Tanyel FC, Sara Y, Ertunç M, Onur R, Büyükpamukçu N. Lack of carbachol response indicates the absence of cholinergic receptors in sacs associated with undescended testis. *J Pediatr Surg* 34, 1339-1344 (1999).
12. Bingöl-Koloğlu M, Sara Y, Tanyel FC, Onur R, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A.. Contractility and electrophysiological parameters of cremaster muscles of boys with a hernia or undescended testis. *J Pediatr Surg* 33, 1490-1494 (1998).
13. Gürdal H, Sara Y, Tulunay FC. Effects of calcium channel blockers on formalin-induced nociception and inflammation in rats. *Pharmacology* 44, 290-296 (1992).

II. Bildiriler

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Virmani T, Sara Y, Kavalali ET. The properties of spontaneous synaptic vesicle recycling. *Channels, Receptors & Synapses*, Cold Spring Harbor Labs, Cold Spring Harbor, 80, 2004.
2. Sara Y, Biederer T, Atasoy D, Mozhayeva MG, Sudhof TC, Kavalali ET. Selective ability of SynCAM and neuroligin to drive functional synapse assembly. *Channels, Receptors & Synapses*, Cold Spring Harbor Labs, Cold Spring Harbor, 105, 2004.
3. Sara Y, Biederer T, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu XR, Sudhof TC, Kavalali ET. Properties of synapses induced on HEK-293 cells by synaptic adhesion molecules. *Biophysical Society 47th Annual Meeting*, *Biophys J*, 84, 133A-133A Part 2 Suppl. S, 2003.
4. Bolay H, Gürsoy YG, Sara Y, Onur R, Dalkara T. Failure of phosphorylation of synapsin-1 may contribute to long lasting synaptic transmission defect after focal transient ischemia. *5th IBRO World Congress of Neuroscience*, Kudüs, 136, 1999.
5. Bozdağ Ö, Sara Y, Onur R. Effects of amiloride on hippocampal CA1 neuronal excitation in rat. *NATO advanced study institute Neurotransmitter release and up-take meeting*, Kuşadası, P115, 1996.
6. Barun S, Onur R, Bozdağ Ö, Sara Y. Effects of PGE₂, indomethacin and amiloride on anoxia-induced changes in rat diaphragm muscle contractility. *1st European Congress of Pharmacology, Pharmacological Research*, 31 (Suppl. 1), 368, 1995.
7. Bozdağ Ö, Sara Y, Onur R. Comparison of the actions of Na⁺/Ca²⁺ and Na⁺/H⁺ exchangers on neurotransmitter release and resting membrane potential in skeletal muscles from different species. *1st European Congress of Pharmacology, Pharmacological Research*, 31 (Suppl. 1), 369, 1995.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Sara Y, Ertunç M, Onur R. LPS ile oluştu-rulan iNOS aktivasyonun çizgili kasın elektriksel, mekanik ve sinaptik aktiviteler üzerine etkileri. Türk Farmakoloji Derneği XV. Ulusal Kongresi, P04-08, Antalya, 1999.
2. Sara Y, Onur R, Bingol-Koloğlu M, Tanyeli FC. İnterabdominal basınç artışıının tavşan mesanesi kasılması özelliklerinde meydana getirdiği değişiklikler. Türk Farmakoloji Derneği XV. Ulusal Kongresi, P10-15, Antalya, 1999.
3. Sara Y, Ertunç M, Onur R, Tanyeli FC, Büyükpamukçu N. İnmemiş testis patogene-zinde prosesus vaginalisin rolü: Kontraktıl ve farmakolojik özellikleri. Türk Farmakoloji Derneği XV. Ulusal Kongresi, P13-03, Antalya, 1999.
4. Sara Y, Onur R, Bingol-Kologlu M, Tanyeli FC. Kriptorşidizimli ve hernili çocuklarda kremaster kaslarının mekanik ve elektrofizyolojik özelliklerinin karşılaştırılması”, Türk Farmakoloji Derneği XIV. Ulusal Kongresi, 118, Antalya, 1997.
5. Sara Y, Bozdağ Ö, Onur R. Amiloridin sıçan, civciv ve kurbağa iskelet kaslarında, nöromüs-küler aşırım ve eksitabilite üzerine etkileri. Türk Farmakoloji Derneği XIII. Ulusal Kongresi, 80, Antalya, 1996.
6. Sara Y, Bozdağ Ö, Onur R. Sıçanda hipokampal CA1 nöron eksitasyonu üzerine amiloridin etkisi”, Türk Farmakoloji Derneği XIII. Ulusal Kongresi, 125, Antalya, 1996.
7. Sara Y, Bozdağ Ö, Çitçi AÖ, Ozer H, Tanyeli FC, Hiçsönmez A, Onur R. Hirschprung’lu hastalardan elde edilen barsak segmentlerinde tonik inhibitör nitroerjik aktivitenin incelenmesi. Türk Farmakoloji Derneği XIII. Ulusal Kongresi, 71, Antalya, 1996.
8. Barun S, Bozdağ Ö, Sara Y, Onur R. Sıçan kasında anoksi etkisi ile meydana gelen değişiklikler üzerine iloprost, PGE₂, indometazin ve amiloridin etkileri. Türk Farmakoloji Derneği XII. Ulusal Kongresi, 25-26, 1994.
9. Bozdağ Ö, Sara Y, Onur R. Amiloridin sıçan ve civciv iskelet kaslarında spontan transmitter salıverilmesi ve istirahat membran potansiyeli üzerine etkilerinin karşılaştırılması. Türk Farmakoloji Derneği XII. Ulusal Kongresi, 26, Antalya, 1994.