



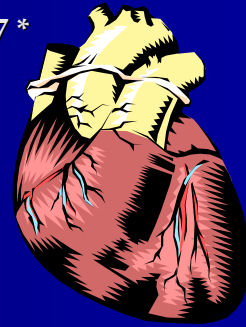
3-NİTROPROPİONİK ASİT'İN SIÇAN KALBİNDEKİ KİMYASAL ÖNKOŞULLAYICI ETKİSİ

Yrd. Doç. Dr. Nilüfer TURAN DURAL

TÜRKİYE'DE

Kalp hastalıkları % 41

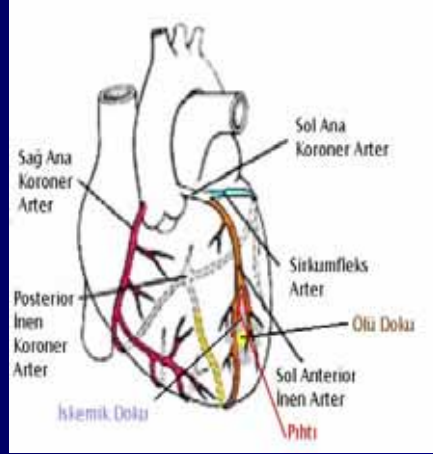
İskemik Kalp Hastalıkları %21.7 *



* DİE, 1999 verilerine göre

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

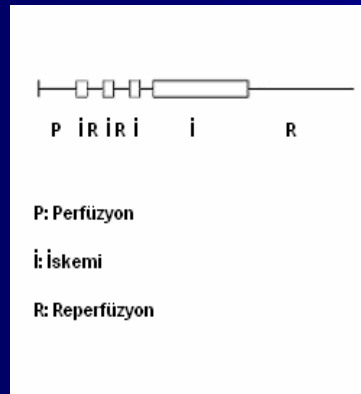
İskemi



- Dokulara kan sağlayan damarların pıhtı veya mekanik etkenle tıkanması sonucu dokunun beslenememesidir

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

Önkoşullama



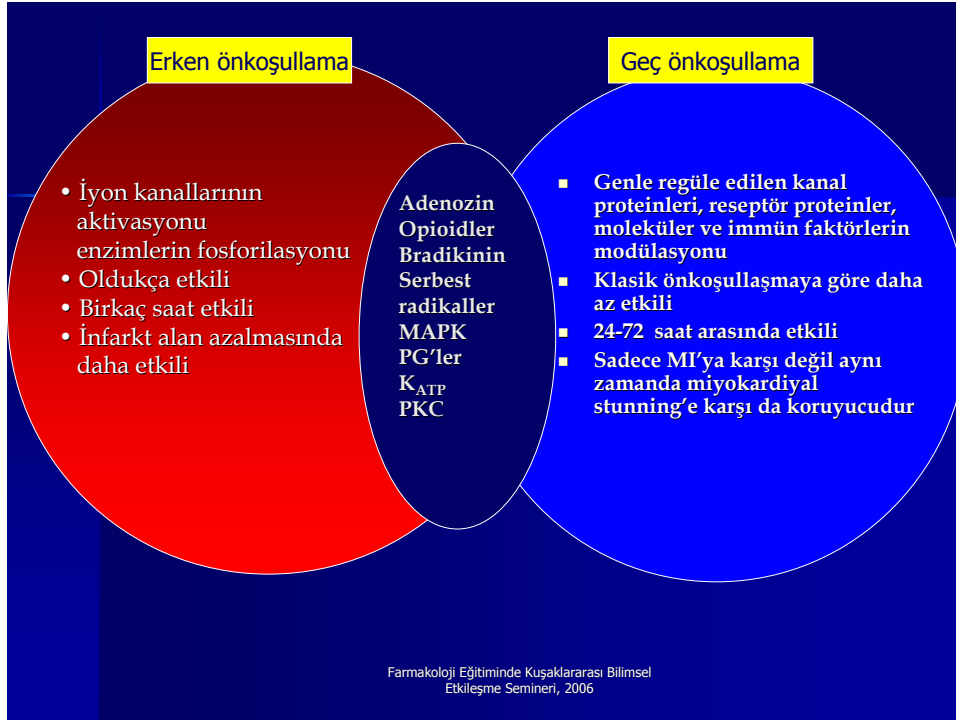
Kısa süreli tek yada tekrarlanan iske mi periyodlarının uzun süreli iske mi periyodlarına karşı organ, doku ve hücrelerde nekroz gelişimine karşı belirgin bir direnç oluşturması ile gerçekleşen koruyucu bir mekanizmadır

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

■ İskemik önkoşullama koruması

- Türe ve dokuya özgü değil
- Erken faz (klasik, 1. pencere)
- Geç faz (2. pencere)

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006



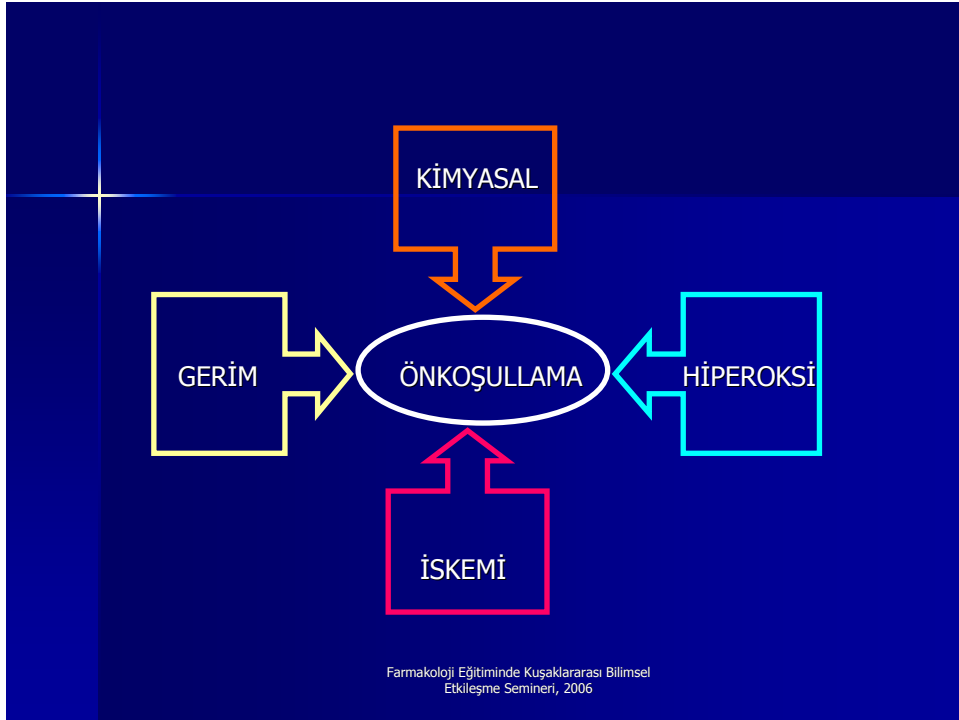
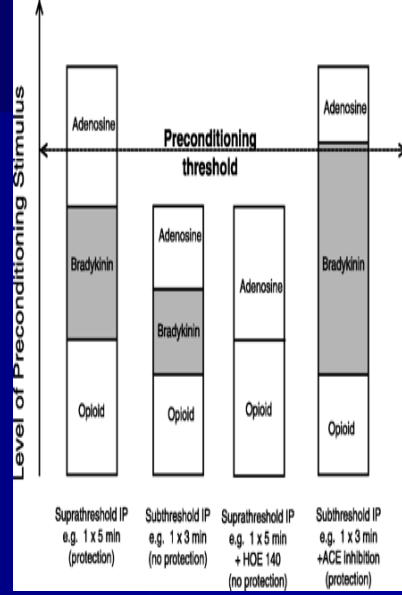
Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

■ Çok sayıda bilinmeyen olan bu koruma sisteminin - adaptasyon- mekanizması bilinmemektedir

■ Önkoşullamada, birden fazla tetikleyici veya mediyatör aynı anda rol alır

■ ÖK oluşabilmesi için bu tetikleyicilerin belli bir düzeyde olması gerekir

* Yellon ve ark. Pyhsiol Rev. 2003



Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

Kimyasal önkoşullama

- hipoksik ve iskemik toleransın artırılmasında güvenli ve pratik bir strateji sağlayabilir.

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

Klinikte kullanılan kimyasal önkoşullayıcılar

- Adenozin
- Nikorandil

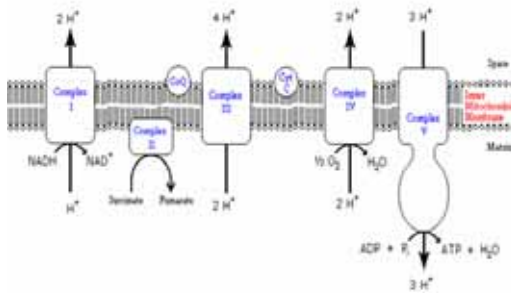
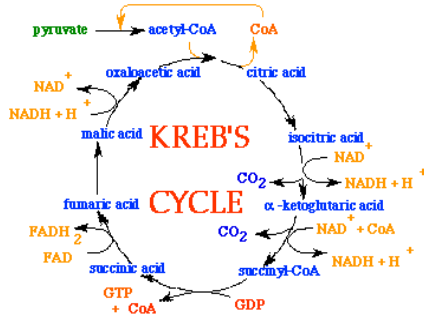
Deneysel amaçlı kimyasal önkoşullayıcılar

- Pinasidil (Mitokondriyal kompleks I inhibitörü)
- Haloperidol (Mitokondriyal kompleks I inhibitörü)
- Diazoksit (Mitokondriyal kompleks II inhibitörü)
- 3-nitropropiyonik asit (Mitokondriyal kompleks II inhibitörü)

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

Neden 3-NP ?

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006



✓ 3-Nitropropiyonik Asit (3-NP) fungus kaynaklı bir toksindir



✓ Krebs siklusunda ve mitokondriyal elektron transport zincirinde bulunan kompleks II'nin bir parçası olan süksinat dehidrogenazın irreversible inhibitörüdür

■ Riepe ve ark. Exp. Neurol., 1996

Mitochondrial Oxidation in Rat Hippocampus
Can Be Preconditioned by Selective Chemical
Inhibition of Succinic Dehydrogenase

■ Riepe ve ark. Mol. Cell Biochem., 1997

Chemical Preconditioning: A cytoprotective
strategy

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

➤ İskemiye karşı koruyucu etkisi

➤ Serebral iskemi

- Riepe ve ark. Mol. Cell Biochem., 1997
- Riepe ve ark. J Cereb Blood Flow Metab., 1997
- Akerta ve ark. Exp. Neurol., 2000
- Von armin ve ark. Neuroscience, 2001
- Horiguchi ve ark. Stroke, 2003
-

➤ Akciğerler

- Hirata ve ark. Transplantation 2001

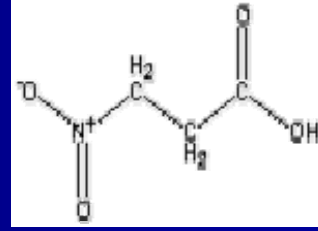
➤ Miyokardiyal iskemi

- Ockaili ve ark. Am j Physiol Heart Circ Physiol., 2001

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

AMACI

- ✓ 1. amaç: 3-NP'nin in vitro sıçan myokardında kardioprotektif etkisinin olup olmadığını göstermek....
- ✓ 2. amaç: 3-NP oluşturduğu koruyucu etkinin olası mekanizmalarında peroksinitritin rolünü araştırmak.....



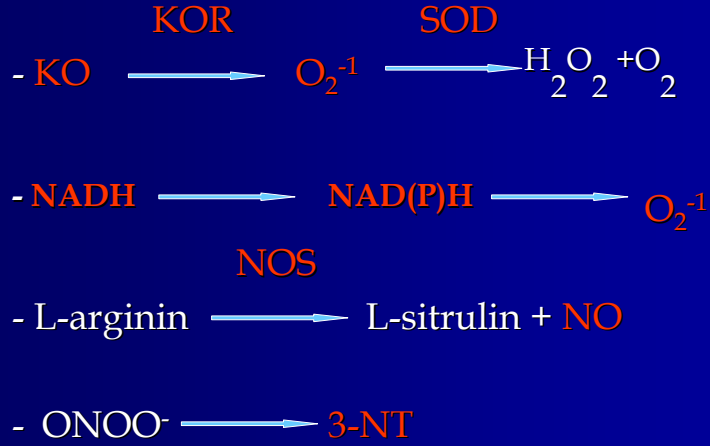
Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

Materyal ve Yöntem

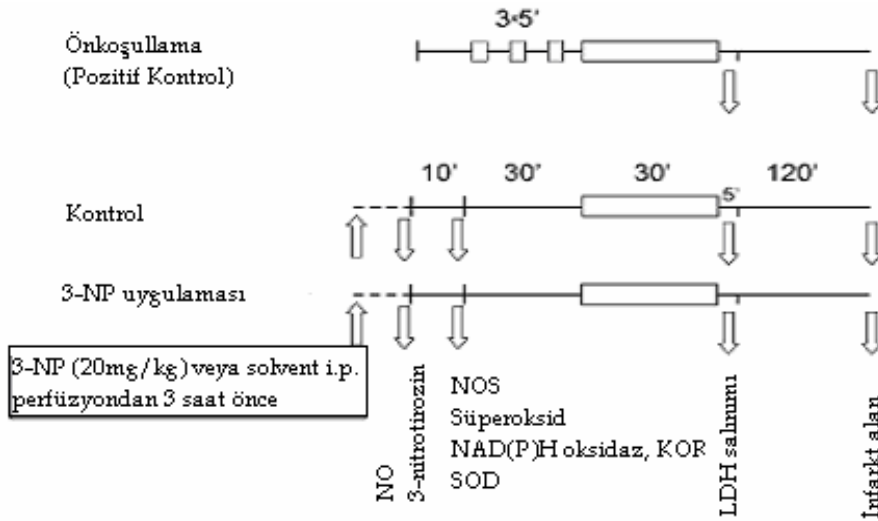
- Hayvan: 300-350 g Wistar erkek sıçanlar
- Anestezik: Dietileter
- Heparin (500 IU/kg) i.v.
- Sistem: Langendorff perfüzyon sistemi
- Krebs-Henseleit bikarbonat tamponu

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

NELER ÖLÇTÜK?



Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006



- Şekil 1: Kontrol, iskemik önkoşullama ve perfüzyondan 3 saat önce uygulanan (20 mg/kg) 3-NP grupları. NO, nitrik oksit; NOS, nitrik oksit sentaz; LDH, laktat dehidrogenaz, KOR, ksantin oksidaz redüktaz; SOD, süperoksid dizmutaz.

İnfarkt alan değeriendirilmesi

%1'lik trifeniltetrazolium klorür



% Nekrotik alan/total kalp

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

LDH saliverilmesi ölçümü

Koroner efluent



LDH seviyeleri kit yardımı ile
(Diagnosticum Rt, Hungary)



Spektrofotometrik (340 nm) olarak ölçüldü

NO ölçümü

NO- Fe²⁺- DETC ile işaretlenmesi

Dietil-ditiyokarbamat (DETC), FeSO₄ eter anestezisi altında femoral venden



Uygulamadan 5 dk sonra, kalpler izole edildi ve kanı uzaklaştırmak için 1 dk süre ile Langendorff perfüzyon sistemine asıldı



Apeks'den alınan yaklaşık 150 mg doku örneği kuartz ESR tüplerinin içine yerleştirildi ve sıvı nitrojende donduruldu.



Elektron spin rezonans (ESR)

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

Süperoksid ölçümü

Lusigenin ile artırılmış kemilüninesans'ın sintilasyon cihazında ölçümü

Apeks'den yaklaşık 100 mg doku örneği HEPES + lusigenin içeren 1 ml Krebs-Henseleit solüsyonuna konuldu ve ölçüm yapıldı



Nitrobluetetrazolium (NBT) ilave edildi ve tekrar sintilasyon sayıcısında ölçüm yapıldı



NBT ile inhibe edilen kemiluminesans miyokardiyal süperoksid oluşumunun bir indeksi olarak kabul edildi

NO sentaz aktivitesinin ölçümü



Ca²⁺-bağımlı ve Ca²⁺-bağımsız

NO sentaz aktivitesi

L-NMMA

varlığında ve yokluğunda

sintilasyon sayıcısında ölçülmüştür

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

Ksantin oksidoredüktaz (KOR) aktivitesinin ölçümü

tKOR: KO+KDH

KOR
Pterin \longrightarrow izoksantopterin+ metilen mavisi

KO
Pterin \longrightarrow izoksantopterin



Fluorometrik ölçüm ile ventrikül
homojenatlarında yapılmıştır.

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

SOD aktivitesinin ölçümü

Süperoksid ile azo boyasının oluşturduğu
Formazan pigmentinin inhibisyonunun
ölçümü

Kit yardımı ile (Randox Lab. UK)



Spektrofotometrik olarak

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

NAD(P)H oksidaz aktivitesinin ölçümü

Lusigenin ile artırılmış kemilüninesans'ın
sintilasyon cihazında ölçümü

Ventrikül homojenatı + HEPES-NaOH + lusigenin
içeren KrebsHenseleit tamponunda
baseline süperoksit ölçümü yapıldı



NADH veya NAD(P)H
ilave edildi ve luminesansdaki
değişimler kaydedildi

Nitrotirozin ölçümü

Serum örnekleri

Süpernatant nitrojen altında uçuruldu ve
ultra-saf suda çözüldü



önceden fare antitavşan IgG ile
kaplanmış mikropiplaklarında
kit ile ölçüldü



ELISA'da ölçüldü

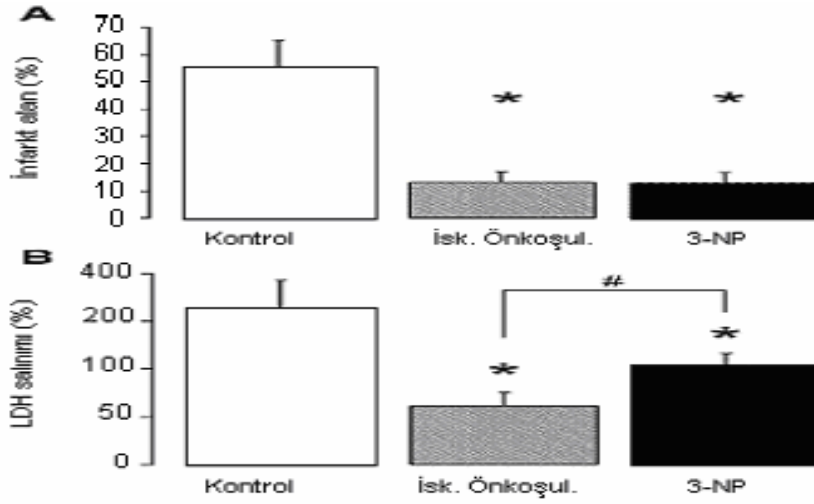
İSTATİSTİK

- Veriler $\text{ort} \pm \text{std.hata}$ olarak verilmiştir
- Tek yönlü ANOVA
 - Tukey's testi
- Student t testi
- $p < 0.05$

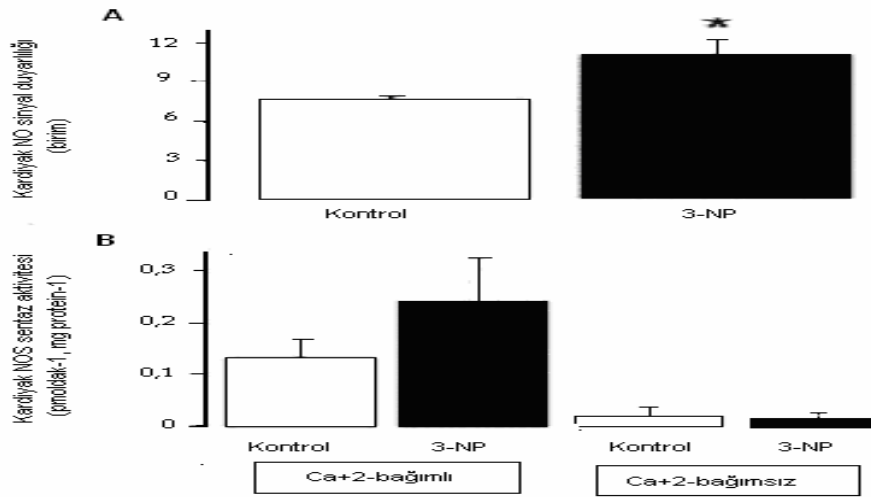
BULGULAR



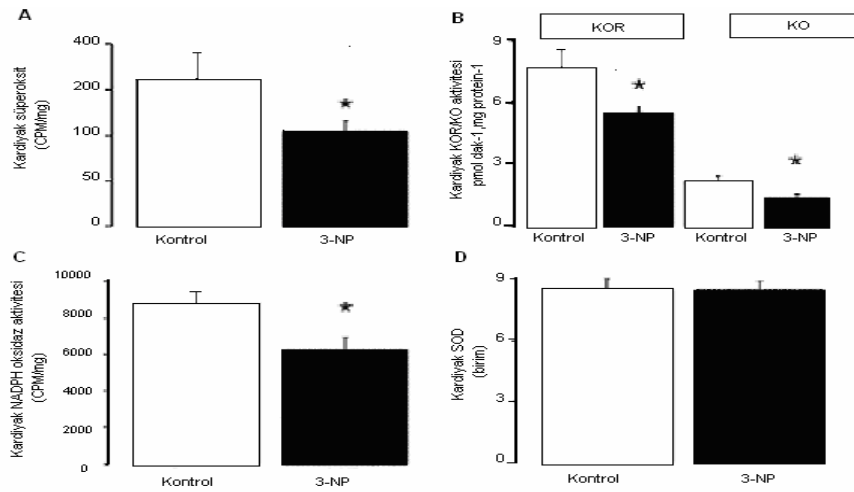
Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006



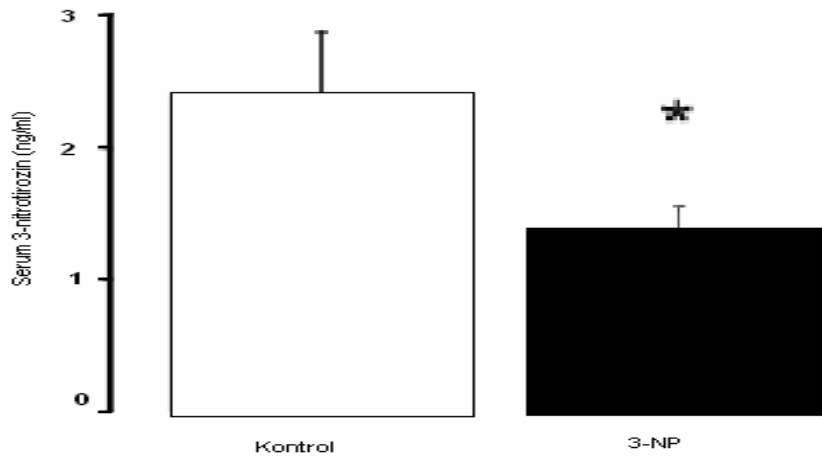
- Şekil 2: 30 dak. iskemi, 120 dak. reperfüzyon periyodundan sonra infarkt alan (2A) ve LDH (2B) değerleri. Değerler * $p < 0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında, # $p < 0.05$ iskemik önkoşullama ve 3-NP uygulanan hayvanlar arasında (n=7 her bir grup).



Şekil 3: İn vivo spin trap (A, n=4) sonrasında ESP kullanarak miyokardiyumdan ölçülen kardiyak NO içeriği ve NO sentaz aktivitesi (B, n=7, her iki grup). Değerler ort±Std .hata, *p<0.05.



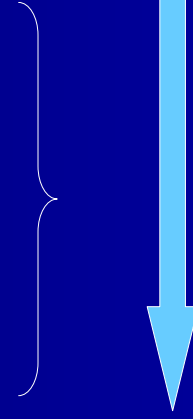
Şekil 4: Süperoksit içeriği (A), ksantin oksidoredüktaz (KOR), ksantin oksidaz (KO) (B), NADH oksidaz (C), ve süperoksit dizmutaz (SOD) (D) aktivitesi. Değerler ort±std hata , *p < 0.05 (n =6 -7 her bir grupta).



Şekil 5: Peroksinitrit indikatörü serum nitrotirozin konsantrasyonu. Değerler ort±std hata , *p < 0.05 (n =7-8 her bir grupta).

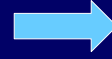
global İ/R uygulanan izole sıçan kalbinde 3-NP.....

- İnfarkt alanı
- LDH
- Süperoksit
- Serum nitrotirozin seviyeleri
- KOR
- NAD(P)H oksidaz aktivitesini



Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

- SOD
- NOS aktivitesinde



- NO içeriğini



Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

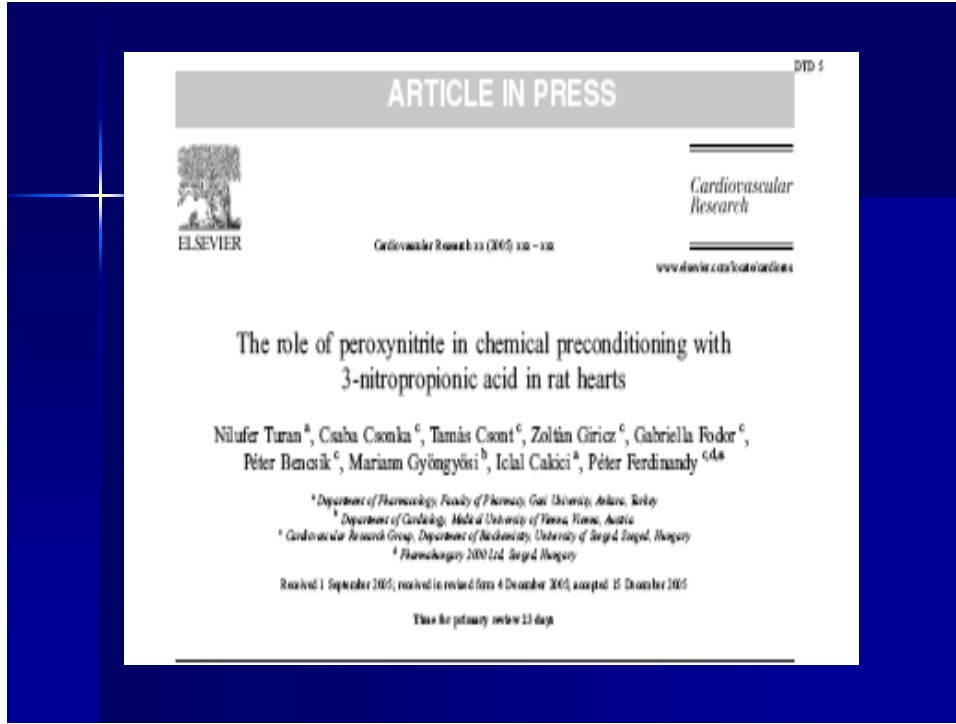
TARTIŞMA



Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

- 3-NP, in vitro sıçan kalbinde infarkt alanında azalma yapmıştır
- İnfarkt alandaki azalmaya,
 - NO'in artması
 - KOR ve NADH oksidaz aktivitesinin inhibisyonu ile süperoksit oluşumunda azalma ve buna bağlı olarak peroksinitrit oluşumundaki azalma aracılık etmiştir

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006



Cevaplanamamış sorunlar?

- 3-NP'nin neden olduğu KOR, NADH, oksidaz aktivitesindeki azalmanın nedeni
- NO miktarı artarken, NOS aktivitesinin değişmemesinin nedeni

Halen araştırılmakta olan konular,

- Anesteziye sıçan kalbinde 3-NP'nin
 - infarkt alanı
 - hemodinamik parametreler
 - bcl-2/bax ekspresyonu üzerine

etkisinin incelenmesi.

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

DESTEK

- Hungarian Scientific Research Found (OTKA T046417, F046810, F049574)
- Hungarian Ministry of Health (ETT 616/2003, 515/2003)
- The National Research ve Development Program (NKFP 001/2001)
- The North Atlantic Treaty Organization Cooperative Linkage grant (NATO, LST.CLG. 976650)
- The Austrian-Hungarian Action Foundation (OMA 59 u14)
- The National Office for Research and Technology (NKTH-RET2004, GVOP-TST0095/2004).

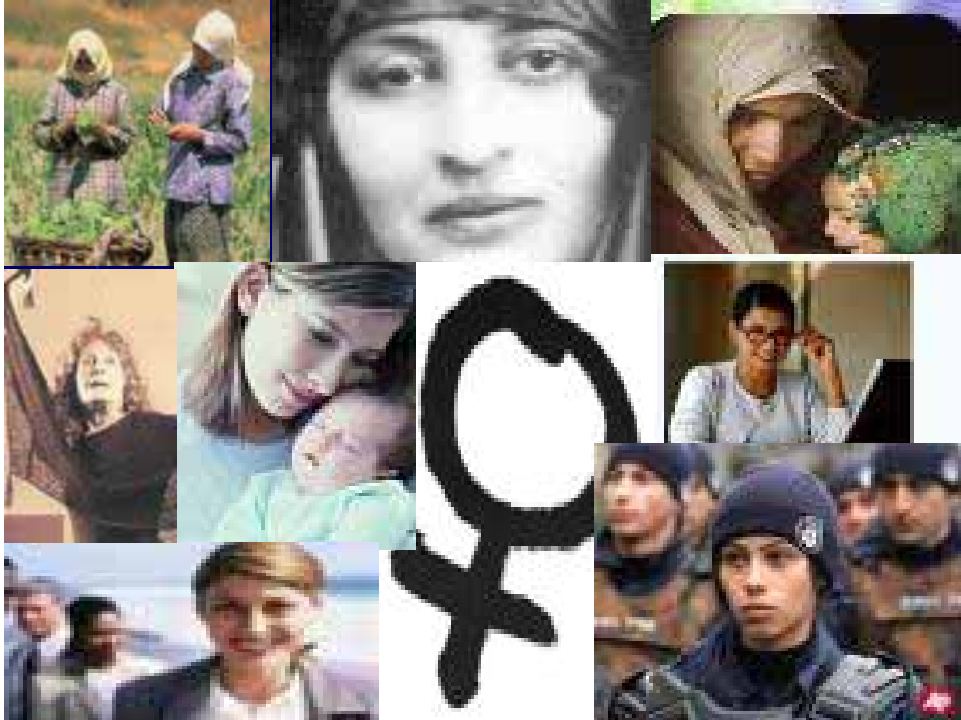
Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

Prof. Dr. İclal Çakıcı

Prof. Dr. Peter
Ferdinandy
ve ekibine



Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006



Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası
Bilimsel Etkileşme Semineri, 2005

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel
Etkileşme Semineri, 2006

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası
Bilimsel Etkileşme Semineri, 2005

- nöronal, endotelyal ve indüklenabilir NO sentaz mRNA'sının fare hipokampal kesilerinde 3-NP (20 mg/kg) ile yapılan önkoşullamadan 12, 24 ve 72 saat sonra, kontrol seviyelerinde kaldığını göstermişlerdir (Von Armin ve ark. Neurosci Lett 2001)

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

- 3-NP ile yapılan kimyasal önkoşullamanın, sıçan hipokampusunda hipoksi ile oluşan NADH oksidaz aktivitesindeki artışı geciktirmiştir (Riepe ve ark. Brain Res 1996, J Cereb Blood Flow Metab 1997)

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006

- Csonka ve ark. ilk kısa önkoşullamada iskemi/reperfüzyon siklusunda ONOO- oluşumunun arttığını, iskemi/reperfüzyon'unun 3. siklusundan sonra ise azaldığını göstermişlerdir (Circulation 1999)

Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, 2006