

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA MİYOKARDİYAL İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE
TACROLİMUS (FK506)'UN KORUYUCU
ETKİSİNİN PATOLOJİK OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Dr. HAKAN ÇOMAKLI

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2006

İÇİNDEKİLER

SAYFA

1.ÖZET	1
2. İNGİLİZCE ÖZET	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. İskemi ve İskemi / Reperfüzyon hasarının mekanizması	6
4.2. Tacrolimus (FK506)	15
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
5.1. Deney Grupları	18
5.2. Anestezi ve Monitörizasyon	19
5.3. Cerrahi İşlemler	20
5.4. Enfarkt Alanının Hesaplanması	22
5.5. Biyokimyasal Ölçümler	23
5.5. Histopatolojik İnceleme.....	24
5.6. İstatistiksel Yöntem	24
6. BULGULAR	27
7. SONUÇLAR-TARTIŞMA	39
8. KAYNAKLAR	42

KISALTMALAR

ATP	adenozin trifosfat
ADP	adenozin difosfat
AP-1	active protein-1
CaN A	kalsinörin A
CaN B	kalsinörin B
CaM	kalmodulin
CYP-3A	cytrocrom P-3A
DM	diyabetes mellitus
ELAM-1	endothelial leucocyte adhesion molecule-1
FKBP	FK506 binding protein
GMP-140	granule membrane protein-140
HSP 70/90	heat shock protein 70/90
İ/R	iskemi/reperfüzyon
İCAM-1	intercellular adhesive molecule-1
İL	interlökin
KD	ksantin dehidrogenaz
KO	ksantin oksidaz
LAD	left anterior descending
LDH	laktat dehidrogenaz
LTB ₄	lökotrien B ₄
NF-AT	nucleer factor of aktivated T lymphocyte
NF-κb	nucleer factor-κB
PAF	platelet activating factor
PGH ₂	Prostoglandine H ₂
PGG ₂	Prostoglandine G ₂
RBC	red blood cell
SOR	serbest oksijen radikali
TxA ₂	tromboksan A ₂
TNF-α	tumor necrosis factor-α
TTC	tripheniytetrazolium chloride
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
γ-IFN	γ- interferon

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 İskemi ve İskemi/Reperfüzyon hasarının klinik yansımaları.

Şekil 2 Hipoksantin metabolizması ve SOR oluşumu.

Şekil 3 Araşidonik asid ve metabolitlerinin oluşumu.

Şekil 4 İ/R hasarında sitokin ve adhezyon moleküllerinin rolü.

Şekil 5 Tacrolimus (FK506)'un yapısal şekli.

Şekil 6 Kalsinörin – Kalmodulin kompleksinin aktivasyonu ve inaktivasyonu.

Şekil 7 Operasyon sahasının şematik çizimi.

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Sıçanların fizyolojik değerleri.

Tablo 2 Gruplara göre hemodinamik parametreler.

Tablo 3 Gruplara göre kan gazı değerleri.

Tablo 4 Gruplara göre kardiyak enzim(CK-MB) değerleri.

Tablo 5 Gruplara göre miyokard kesitlerinde enfarkt alanı ölçümleri.

Tablo 6 Kontrol ve tacrolimus grubunda miyokard kesitleri enfarkt alanı/tüm alan oranları

RESİM LİSTESİ

Resim 1 Trakeostomisi ve Torakotomisi yapılmış denek.

Resim 2 Reperfüzyon sonrasında ana damar ve perikard bağlantıları kesilerek çıkartılan denek kalbi.

Resim 3 Enfarkt alanı içermeyen miyokard kesitleri.

Resim 4 Enfarkt alanı olan (okla gösterilmiş) miyokard kesitleri.

Resim 5 Miyokardiyal hafif hemoraji.

Resim 6 Miyositolizis

Resim 7 Miyokardiyal ödem

Resim 8 Polimorfonükleer lenfosit (PNL) infiltrasyonu

GRAFİK LİSTESİ

Grafik-1 Çalışma gruplarının hemodinamik sistolik KB ortalaması.

Grafik-2 Çalışma gruplarının hemodinamik diyastolik KB ortalaması.

Grafik-3 Çalışma gruplarının hemodinamik kalp hızı (KH) ortalaması.

Grafik-4 Tüm çalışma grubunda kan gazı PCO₂ (ortalama) değerleri.

Grafik-5 Zamana göre ortalama CK-MB düzey değişimi

Grafik-6 Kontrol ve tacrolimus grubunda ortalama enfarkt alanı/tüm alan oranı.

Grafik-7 Kontrol ve tacrolimus grubunda ortalama PNL infiltrasyon derecesi.

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan hocalarım Prof. Dr. Ünal Açıklık, Prof. Dr. Öztekin Oto, Prof. Dr. Eyüp Hazan, Prof. Dr. Baran Uğurlu, Doç. Dr. O. Nejat Sarıosmanoğlu, Doç. Dr. Erdem Silistreli, Yard. Doç. Dr. A. Cenk Erdal, Yard. Doç. Dr. Ahmet Önen, Yard. Doç. Dr. Aydın Şanlı'ya;

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile büyük katkıda bulunan Doç. Dr. Hüdayi Çatalyürek ve Yard. Doç. Dr. Özalp Karabay'a;

Multidisiplin laboratuvarı sorumlusu Doç. Dr. Osman Yılmaz'a ve Biyolog Dürdane Kaya'ya;

Geçirdiğimiz güzel anılarla dolu yıllar boyunca kendileri ile tanışmaktan dolayı şanslı olduğumu hissettiğim, iyi ve kötü günlerimi paylaştığım değerli asistan arkadaşlarıma ve tüm klinik çalışanlarımıza;

Uzakta olmama rağmen beni hiç yalnız bırakmayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Hakan Çomaklı

1. ÖZET

Sıçanlarda miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı üzerine tacrolimus (FK506)'un koruyucu etkisinin patolojik olarak araştırılması.

Hakan Çomaklı, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, İzmir.

Miyokarda oksijen sunumu ve ihtiyacı arasındaki dengesizlik sonucu oluşan miyokardiyal iskemi, dokuda hızlı bir metabolik ve yapısal bozulmaya yol açar. İskemi sonrası reperfüzyonla beraber aerobik metabolizmaya tekrar geçiş ile ortaya çıkan subsratlar zincirleme olayları başlatarak doku hasarına neden olur. Bu olaya "iskemi reperfüzyon hasarı " denir. Kalp cerrahisinde uygulanmakta olan anestezi teknikleri miyokard koruma yöntemleri ve cerrahi tekniklerdeki gelişmelere rağmen, miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı mortalite ve morbiditenin halen en önemli nedenlerinden biridir.

İskemi reperfüzyon hasarının moleküler olayları ve mekanizmaları karmaşıktır. Olası mekanizmalar serbest oksijen radikalleri, hücre içi aşırı kalsiyum birikimi ve nötrofil başta olmak üzere inflamatuvar cevap kaskadıdır.

DeneySEL miyokard iskemi reperfüzyon hayvan modelinde tacrolimusun İ/R hasarındaki koruyucu etkisi araştırıldı. Bölgesel miyokard iskemi modelinde LAD koroner arteri 45dk oklüde edildi ve daha sonra oklüzyon kaldırılarak üç saat reperfüzyonda tutuldu. Çalışmada deney hayvanı olarak kullanılan Wistar Albino tipi erkek sıçanlar; iskemi (n=4), sham (n=4), kontrol (n=7), tacrolimus (n=7) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Tacrolimus reperfüzyonun ilk 15dk' da juguler venden 100µgr/kg dozunda verildi. Hemodinamik parametreler kaydedildi. Biyokimyasal parametre olarak CK-MB değeri iskeminin 0. ve 45.dk'da, reperfüzyonun 60.dk ve 180.dk 'da alınan kanda bakıldı. Miyokardiyal enfarkt alanı triphenyltetrazolium chloride(TTC) boyama tekniği ile ölçüldü.

İskeminin 0.dk ve 45.dk 'da hemodinamik parametrelerde tüm gruplarda istatistiksel anlamlı fark yoktu. Tacrolimus grubunda reperfüzyonun 60.dk'daki sistolik kan basıncı ortalaması 85mmHg olarak ölçülen bu değer, sham ve kontrol grubuna göre daha yüksekti. İstatistiksel olarak anlamlı fark (p=0.004) bulundu. Tacrolimus grubunda reperfüzyonun 60.dk'daki kalp hızı ortalaması 224/dk idi, bu değer sham ve kontrol grubuna göre düşüktü. İstatistiksel olarak anlamlı fark (p=0.047) bulundu.

Tacrolimus grubunda ortalama enfarkt alanı/tüm alan oranı kesitlerde K1=0.182 (p=0.025), K2=0.212 (p=0.018), K3=0.264 (p=0.013), K4=0.227 (p=0.015) kontrol grubuna göre daha düşüktü. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

PNL infiltrasyon derecesi kontrol grubunda 1.6, tacrolimus grubunda 0.7 bulundu. İki grup arasında fark istatistiksel olarak (p=0.045) anlamlı bulundu.

Veriler incelendiğinde tacrolimus grubunda enfarkt alanı/tüm alan oranı ve PNL infiltrasyon derecesi daha düşüktü. Bu durum tacrolimusun miyokard iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etkisi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: tacrolimus, miyokard, iskemi reperfüzyon hasarı.

2. SUMMARY

Pathologic investigation of the effect of tacrolimus(FK506) on the myocardial ischemia-reperfusion injury of rats.

Hakan Çomaklı, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Cardiovascular Surgery , İzmir.

Myocardial ischemia, appearing as the consequence of imbalance between oxygen supply and demand, causes a rapid metabolic and structural impairment within the tissue. After ischemic period, sudden onset of reperfusion causes a transition to the aerobic metabolism within the living cells. Emerging substrates initiate a chain of reactions leading to tissue injury. This situation is called “ischemia reperfusion injury”. Despite all the technical advances in anesthesia, myocardial protection and cardiac surgical techniques, we still face the clinical reflections of ischemia reperfusion (I/R) injury.

Molecular background of the I/R injury is a bit complicated. As it was shown previously, free oxygen radicals, excessive intracellular calcium deposition and a cascade of inflammatory responses - particularly neutrophils – are the possible mechanisms.

The protective effect of tacrolimus on I/R injury in an animal model of experimental myocardial ischemia and reperfusion was investigated. In the regional myocardial ischemia model LAD was occluded for 45 minutes and then reperfused for three hours. Male Wistar-Albino rats were used as subjects and were allocated into four groups: ischemia (n=4), sham (n=4), control (n=7), and tacrolimus (n=7). Tacrolimus was administered via jugular vein at the dose of $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ during the first 15 minutes of reperfusion. Haemodynamic parameters were recorded. CK-MB was measured at the onset and at the 45th minutes of ischemia and at the 60th and 180th minutes of reperfusion as a biochemical parameter. Myocardial infarct area was measured using triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining technique.

No statistical significance was observed among all groups in haemodynamic parameters recorded at the onset and the 45th minute of ischemia. Systolic arterial pressure was increased in the tacrolimus group (85 mmHg) when compared with sham and control groups at the 60th minute of reperfusion. A statistical significance was

observed ($p=0.004$). Heart rate was decreased in the tacrolimus group (224 bpm) when compared with sham and control groups at the 60th minute of reperfusion. A statistical significance was observed ($p=0.047$).

Mean infarct area/whole area ratio in cross-sections $K1=0.182(p=0.025)$, $K2=0.212(p=0.018)$, $K3=0.264(p=0.013)$, $K4=0.227(p=0.015)$ were lower in the tacrolimus group than the control group. A statistical significance was observed.

PNL infiltration degree was 1.6 in the control group and 0.7 in tacrolimus group. A statistical significance was observed between the two groups ($p=0.045$).

When the data were observed, infarct area/whole area ratio and PNL infiltration degree were lower in the tacrolimus group. This indicates that tacrolimus may have a preventive effect in myocardial ischemia reperfusion injury.

Key Words: Tacrolimus, Myocard, Ischemia reperfusion injury.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kalp cerrahisi genellikle kalbin kansız ve hareketsiz olduğu koşullarda yapılır. Bu koşullar global miyokardiyal iskemi ile sağlanmaktadır. Kuşkusuz global miyokardiyal iskemiye sağlarken olumsuz etkilerde ortaya çıkmaktadır. Kan akımı kesildikten sonra 20dk içerisinde geriye dönülmez miyokard kasarı (iskemik nekroz) oluşur(1). Histolojik çalışmalarda enfarktüsden ortalama dört saat sonra miyokardiyumda koagülasyon nekrozu, ödem ve nötrofil infiltrasyonu saptanır. Hücre ölümü hem iskemi sürecinde hem de iskemi sonrası vasküler yatağa kan akımının yeniden sağlanması olan reperfüzyon sürecinde oluşur. Bu süreçlerde gelişen hücre hasarı aritmi, miyokardiyal stunning ve doku hasarının büyümesi (enfarkt) gibi ciddi klinik sonuçlara neden olur. Miyokard hasarı cerrahinin erken döneminde hastanın kaybı ile sonuçlanabilen düşük kalp debisine neden olur(2).

İskemi reperfüzyon hasarının oluşumundaki temel mekanizmalar; serbest oksijen radikallerinin meydana gelmesi, miyositlerde Ca^{+2} dengesinin bozulması, endotel hücrelerinden yada makrofajlardan salınan sitokin ve interlökinlerin, nötrofil akümüülasyonunu ve adhezyon molekülü oluşumunu stimüle etmesidir(3,4).

Tacrolimus (FK506), yüksek lipofilik özelliğinden dolayı hücre yüzey reseptörlerinden bağımsız olarak intrasellüler aralığa hızla geçer. Sitozolik bağlayıcı proteini immünofiline (FKBP) bağlanarak kalsinörin-kalmodülin (CaN-CaM) kompleksini bloke eder. Tacrolimusun kalsinörinin katalitik aktivitesini (NF-AT, NF- κ B ve AP-1'in fosforilasyonunu) bloke etmesi adhezyon molekülleri ve sitokin üretimini regüle eden gen transkripsiyonu baskılar. Bu durum iskemi reperfüzyon hasarında inflamatuvar hücresel cevabı, platelet aktivasyonunu, nötröfil adhezyon ve agregasyonunu azaltır(5,6,7,8).

Bu çalışmanın amacı, miyokardiyal iskemi reperfüzyon modelinde; immünosupresif ajan olan tacrolimusun koruyucu etkisini biyokimyasal, hemodinamik ve histopatolojik verilerle ortaya koymaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 İskemi ve İskemi / Reperfüzyon Hasarının Mekanizması

Miyokard iskemisi, miyokardın metabolik gereksinimlerine göre, yetersiz kan akımı ile karakterize bir durumdur. Miyokarda oksijen sunumu ve ihtiyacı arasındaki dengesizlik sonucu oluşan iskemi, dokuda hipoksi ve anaerobik metabolizmaya yol açar(9).

Miyokard iskemisi, aterosklerotik koroner arter hastalığının major sonuçlarından biridir ve koroner arter hastalığıyla ilişkili çeşitli klinik sendromlara yol açar. Anjina pectoris ve miyokard enfarktüsü bunun iki klinik göstergesidir. Miyokard iskemisi aşırı egzersiz, kalp cerrahisi, kardiyak transplantasyonlar, perkütan translüminal koroner anjioplasti gibi çeşitli durumlarda da karşımıza çıkmaktadır(2,10).

İskemi sırasında miyokardın enerji dengesi çabucak bozulur. ATP (adenozin trifosfat) düzeyi azalır, ADP (adenozin difosfat) düzeyi artar. Hücreler ATP üretimini devam ettirebilmek için glikojeni kullanarak glikoliz yapar. Anaerobik şartlarda glikolizin son ürünü olan pirüvat, laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi ile laktata çevrilir. İskeminin uzaması enerji balansını daha da bozar. ADP adenosin ve küçük oranda inosine kadar hidrolize uğrar. Bu işlem sırasında büyük oranda proton üretilir. Hücre pH'nın azalması glikolizi inhibe eder. Ciddi ve uzun süreli iskemi ile ATP depolarının %80 ve daha fazlası kaybolursa, hücrenin hacim ve iyon bütünlüğünü idame ettirme kabiliyeti kaybolur. Koroner kan akımı yeniden başlamazsa geriye dönüşümsüz miyokard hasarı (nekroz) son noktadır(11,12).

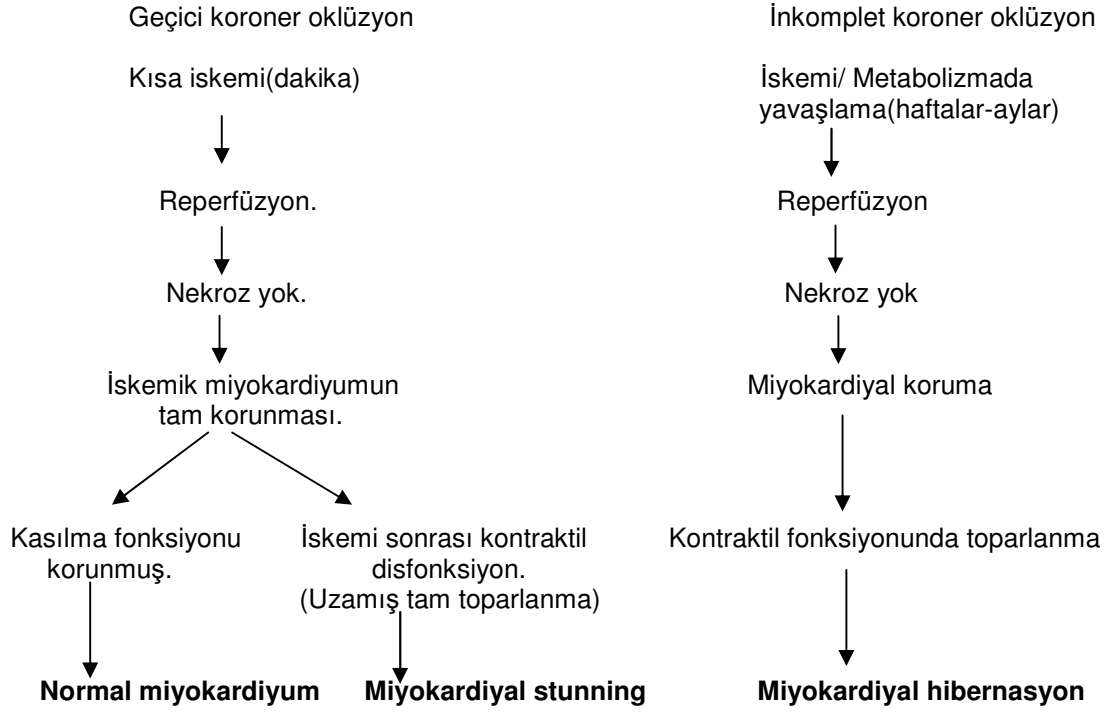
Miyokardiyal iskemi için kritik zaman 20 dk olarak kabul edildiğinden bundan daha kısa süreli iskemilerden sonra sağlanan reperfüzyon durumunda doku hasarının kanıtı bir bulgu saptanmamıştır. 20 dakikadan daha uzun süre devam eden iskemi durumlarında oluşan reperfüzyon hasarı, birbirinden bağımsız etiolojiler sonucunda olmaktadır. Reperfüzyonun dakikalar ile saatler arasındaki döneminde nekroz ve apoptosis nedeniyle hücre ölümünün artışı gibi farklı nedenler miyokard hasarının artmasına neden olmaktadır(3,13,14). Uzamış iskemiden sonra kalp kasının reperfüzyonu, reperfüzyon aritmilerine, mikrovasküler hasara, miyokardiyal stunninge ve miyokardiyal hibernasyona neden olduğu saptanmıştır.(Şekil 1)

Miyokardiyal stunning, iskemi epizodu veya epizodları sonrasında oluşan kontraktil disfonksiyondaki uzamadır. Bu durum reperfüzyon sonrası irreversibl hasar olmamasına ve perfüzyonun normal veya normale yakın olmasına rağmen devam eden mekanik disfonksiyonu ifade eder.

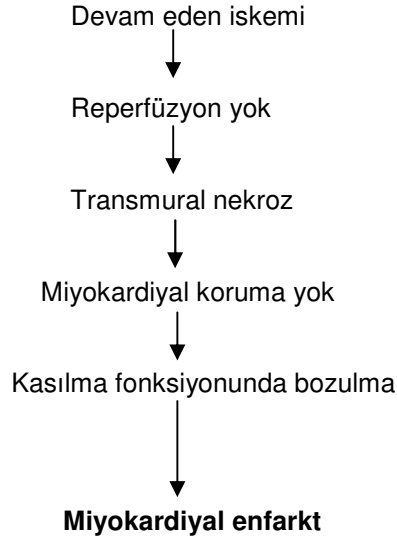
Miyokardiyal hibernasyon, düşük kan akımı ile seyreden uzamış kontraktil disfonksiyonun bir formudur. Yapılan klinik gözlemler, viabilitenin korunması ve enerji gereksiniminin azaltılması, azalmış perfüzyona uyum sağlamak için miyokardiyumun kontraktilitesini azaltarak kronik iskemiye adapte olduğunu göstermiştir. Klinik olarak koroner arter bypass cerrahisi sonrası bozuk ventrikül fonksiyonun gelişme gösterdiği rapor edilmiştir. İskeminin süresi, ciddiyeti, hibernasyon bölgesindeki miyositlerdeki etkilenme derecesi iyileşme süresini belirler. Fonksiyonun ani iyileşmesi, hibernasyonun akut olduğunu, günlerden haftalara kadar olan iyileşmeler subakut hibernasyonu, aylardan yıllara kadar olanlar ise kronik hibernasyonu düşündürür(15,16).

Miyokardiyal stunning, ilk kez Heyndrickx ve ark. Tarafından 1975 yılında köpeklerde kısa koroner oklüzyonla ilgili olarak tanımlanmıştır. Bununla ilgili yapılan çalışmalar kabaca 6 kategoride gruplandırılmıştır.

1. Orijinal olarak Heyndrickx ve ark. Tarafından tanımlanan tek ve tamamıyla reversibl in vivo iskemiye takiben oluşan stunning.
2. İn vivo, tamamıyla reversibl rejyonel multipl iskemi periyodlarını takiben oluşan stunning. (Örn. Köpeklerde tekrarlayıcı 5–10 dk koroner oklüzyonu takiben).
3. Kısmen reversible, kısmen irreversibl in vivo rejional iskemi epizodlarını takiben oluşan stunning. Bu kategori trombolizis tedavisi alan veya anjioplasti geçiren akut myokard infarktüsülü hastaların durumunu temsil eder ve kurtarılmış dokuların fonksiyonunu, gecikmiş iyileşmesini gösterir.
4. İn vitro global iskemi sonrası stunning. (Örneğin izole kalp preparatları)
5. İn vivo global iskemiye takiben stunning. (Örneğin kardioplejik arrest)
6. Egzersize bağlı iskemi sonrası stunning. (Örneğin yüksek akımlı iskemi)



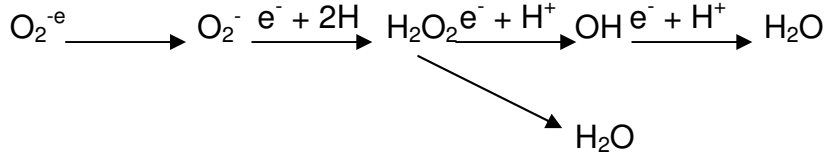
Koroner oklüzyonun devamı



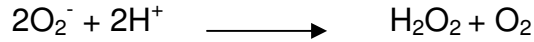
Şekil 1 İskemi ve İskemi/Reperfüzyon hasarının klinik yansımaları.

Reperfüzyon hasarının moleküler olayları karmaşıktır. Birçok çalışma, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve kalsiyum (Ca^{+2})'un reperfüzyon hasarının patogenezindeki iki ana faktör olduğunu göstermiştir. Moleküler oksijenin yüksek oksidasyon potansiyeli olmasına rağmen, organik bileşikleri hızlı okside edemez. Hücreler oksidatif

fosforilasyonla enerji üretirken mitokondriyal elektron transport sisteminde oksijen suya (H₂O) indirgenir. Respirasyon sırasında oksijen mitokondriyada kompleks-IV içerisindeki sitokrom C oksidazla bir seri elektron kaybına uğrar. Böylece superoksit radikal, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve su meydana gelir(17,18).

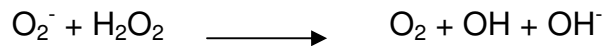


Normal şartlar altında oksijen yaklaşık %2–3 arasında yetersiz redüksiyona uğrayarak superoksit radikallerini (O₂⁻) ve hidrojen peroksidi (H₂O₂) oluşturur.

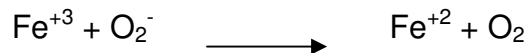


Bu reaksiyon kendiliğinden gelişir fakat superokside dismutaz (SOD) gibi enzimlerle katalizlendiğinde daha da hızlanmaktadır. Serbest radikal tanımlaması, herhangi bir ortam veya molekülün bağımsız olarak dış orbital yapısında bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron içermesiyle ortaya çıkar. Bu atom veya molekül relatif olarak unstabil ve genel olarak aşırı reaktiftir.

Hidrojen peroksitin kendisi güçlü reaktive bir molekül değildir. Bununla beraber Haber-Weiss Reaksiyonu ile güçlü reaktif hidrojen radikallerini oluşturur.



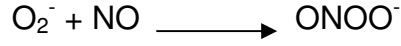
Demir ve bakır gibi metal iyonunun katalizörliğünde hidroksil radikali oluşum hızı artmaktadır. Bu Fenton Reaksiyonu olarak bilinir.



SOR, biyolojik membranlar için tehlikelidir. Lipid peroksidasyonu ile membranların yapısını bozar ve okside eder. Bu malondialdehid (MDA) oluşumu ile değerlendirilmektedir. Oksidasyon reaksiyonlarında ilk lipid peroksid radikalleri (LOO[•]) oluşur, daha sonra hidroksilipid peroksidler (LOOH) oluşur. Bunlar DNA oksidasyonu ve

protein çapraz bağlantıları yaparak sonuçta hücresel disfonksiyon ve hücre ölümüne yol açar(19).

Reperfüzyon hasarına yardım eden diğer bir olasılık da peroksinitrit (ONOO^-) serbest radikallerinin oluşumudur.



İzole kalplerde peroksinitritin ortaya çıkması reperfüzyon sonrası miyokard disfonksiyonuna yardımcı olmaktadır. Yapılan çalışmalarda reperfüzyonun ilk 15dk'da verilen L-NAME (NO sentez inhibitörü) peroksinitrit oluşumunu engelleyerek kalp fonksiyonlarını korumaktadır.

Süperoksit (O_2^-), çok toksik olmayan bir serbest radikaldir. Diğer oksijen bileşiklerinin oluşumunda anahtar rol oynar.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), metal iyonlarının yokluğunda stabil, zayıf oksidan, uzun ömürlü reaktif oksijen bileşiğidir.

Hidroksil ($\cdot\text{OH}$), aşırı reaktif ve kısa ömürlüdür, hücrede olduğu yerden daha uzağa gidemez. Çevresinde oldukça büyük hasara yol açar.

Hidroperoksit ($\text{HO}_2\cdot$), süperoksit radikalının protonlanmasıyla oluşur ve daha reaktiftir. Biyolojik membranları kolay geçmesi ve yağ asitleri ile direkt etkileşime girebilmesi yönünden önemlidir.

İskemik dokunun reperfüzyonu sonuç olarak hasarlı dokuda hızlı bir nötrofil kümelenmesine yol açmaktadır. Deneysel hayvan modellerinde serbest radikal oluşumu reperfüzyonun başında hızlı bir biçimde olmaktadır. Nötrofillerin endotele adhezyonu ve sonrasında transmigrasyonu, canlılığını sürdürebilir dokularda proteolitik enzimleri salarak serbest oksijen radikalleri oluşturur.

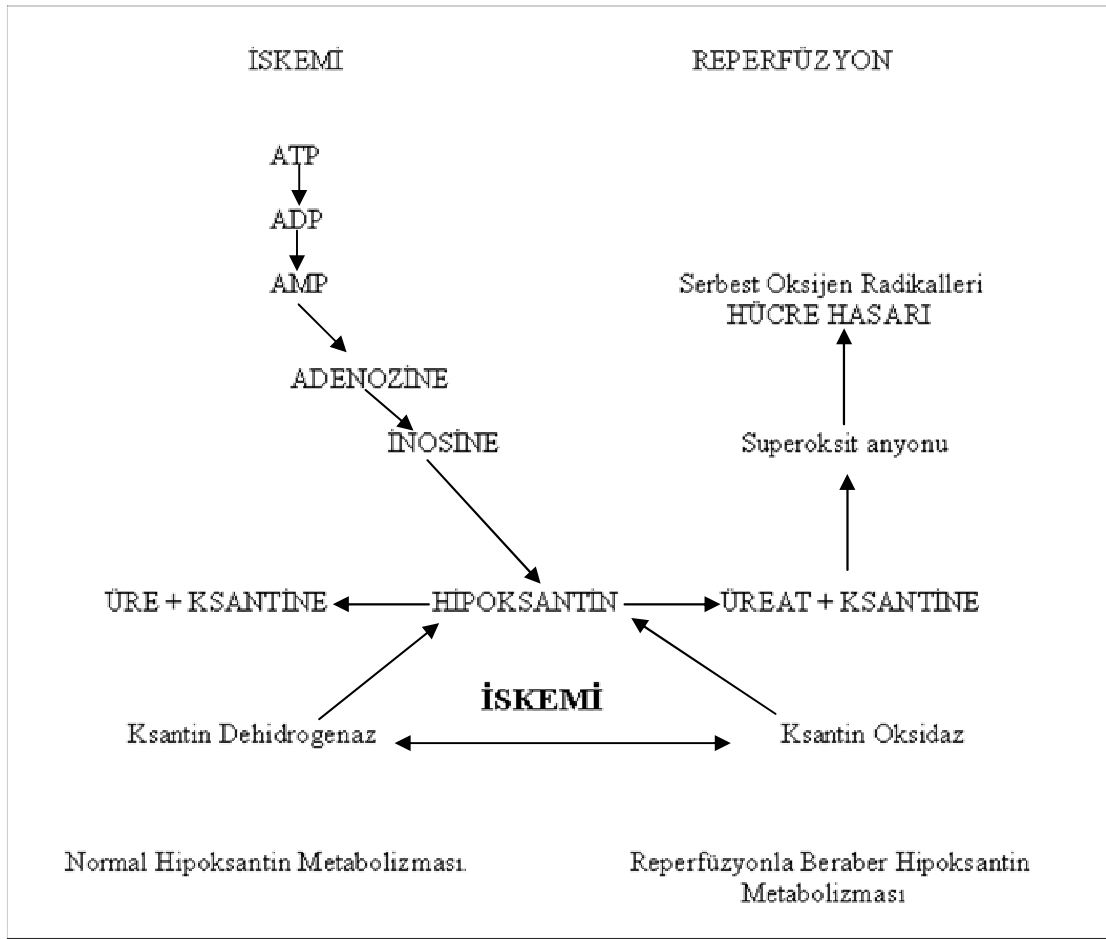
Miyokardiyal İ/R hasarında SOR oluşumuna yardımcı olan birçok intrasellüler enzimatik mekanizmalar vardır. Bunlardan bazıları; ksantin oksidaz, mitokondrial sitokrom oksidaz yolu, siklooksijenaz, lipooksijenaz yolu, katekolaminlerin oksidasyonudur(20,21,22).

Organizmada yukarıda saydığımız metabolik olaylar sırasında sürekli olarak serbest radikaller oluşur ve endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından etkisizleştirilir. Bu korunma glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi enzimler ile oluşur. Serbest radikaller belirli düzeyin üstüne çıktığında ve antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığında hücrenin bazal yapı taşlarını hasara

uğratar. Bu aşamada vücudun diğer doğal savunma sistemi olan tamir işlevi, hasarlı biyomolekülleri ortadan kaldırır. Hasarlı nükleik asitler spesifik enzimler tarafından tamir edilir, okside proteinler proteolitik sistem tarafından ortadan kaldırılır(23,24,25,27)

Adenin trifosfat (ATP) ürünleri ksantin dehidrogenaz (KD) enzimiyle üreye çevrilmektedir. Bununla beraber iskemik durumda Ca^{+2} ile aktive edilen ve "kalpein" olarak tanımlanan sitozolik proteaz enzimi ile ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza (KO) dönüşmektedir. Ayrıca iskemik dokuda sülfhidril oksidasyonu bu dönüşümü hızlandırır. Bu da iskemik dokuda aşırı hipoksantin ve SOR birikimine neden olur.

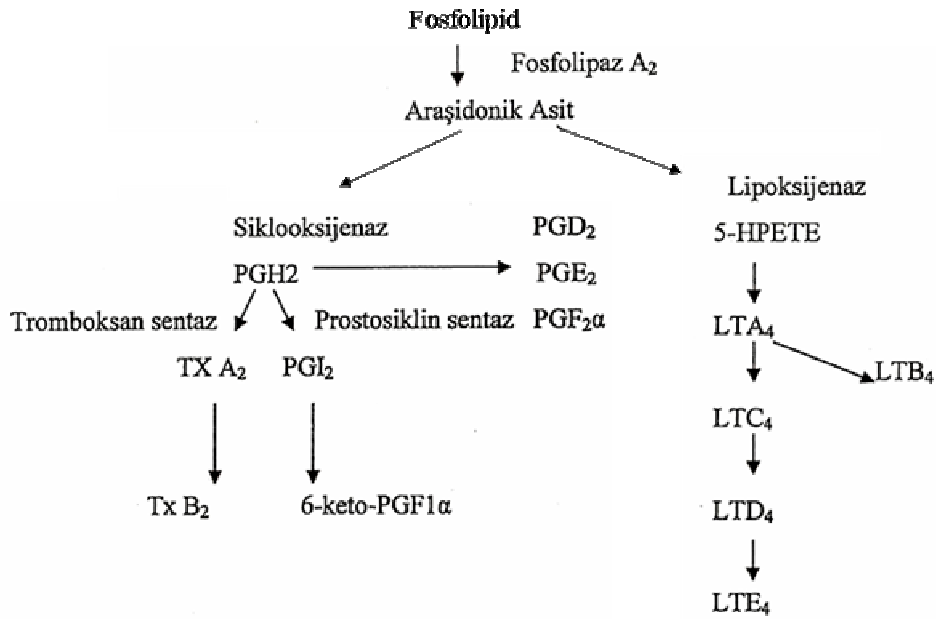
(Şekil 2)



Şekil 2 Hipoksantin metabolizması ve SOR oluşumu.

İskemi sırasında intraselüler serbest Ca^{+2} miktarının hızla artması, plazma membranındaki fosfolipaz A_2 'yi aktive ederek reperfüzyon sırasında ortamda bol miktarda araşidonik asit birikimine neden olur. Siklooksigenaz veya lipooksigenazlarla da metabolize edilir. Siklooksigenaz aktivitesi araşidonik asidi prostoglandin G_2 (PGG_2)'ye çevirir. PGH_2 hücre tipine spesifik farklı prostoglandinler için prokürsördür. PGG_2 'den PGH_2 'ye dönüşüm sırasında superoksit radikal oluşumu gösterilmiştir. Araşidonik asidin

5-lipooksijenaz ile oksidasyonu 5-hidroperoksitetraenoik asit (5-HPETE) oluşturur. Bu daha sonra lökotrienlere çevrilir.(Şekil 3) Bu reaksiyon sırasında süperoksid radikalleri oluşur. LTB_4 'ün nötrofillerden H_2O_2 ve elastaz salınımında rol oynadığı, ayrıca nötrofillerin in vitro ve in vivo olarak endotelial geçirgenliğini arttırmasında potent bir stimülatör olduğu gösterilmiştir. Lökotrienler ve tromboksanlar ayrıca mikrovasküler yatakta vazokonstrüktör etki ile reperfüzyon sonrası kötü kapiller akıma yol açar(23,26,28).



Şekil 3 Araşidonik asid ve metabolitlerinin oluşumu.

Araşidonik asit aynı zamanda myoglobin katalizlediği hidrojen perokside bağımlı peroksidasyon mekanizmasıyla okside olarak, nötrofiller için kuvvetli kemotaktik ürünleri meydana getirir.

Uzamış iskemiden sonra reperfüzyonda sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun artması ciddi myokardial hasarla ilişkilidir. Burada Na^+/H^+ pompası önemli bir role sahiptir. İskemi sırasında proton miktarının artması ki bu asidoza yol açar, Na^+/H^+ pompasını inhibe eder. Reperfüzyonla beraber bu inhibisyon ortadan kalkar ve hücre içi sodyum miktarı artar. Bu Na^+/Ca^+ pompasını aktive ederek hücre içi kalsiyum miktarını artırır. Na/H pompa inhibitörleri kullanımının; intrasellüler Na^+ ve Ca^{+2} artışını durdurarak reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir(29,30). Ayrıca iskemiyle beraber hücre içi asidotik ortam, fizyolojik pH'da proteinlere bağlı olan kalsiyumunda serbest kalmasına neden olarak hücre içi Ca^{+2} arttırır. Sonuç olarak miyokard kontraktıl elemanların kalsiyuma karşı duyarlılığı azalır ve miyosit kontraktilitesinin depresyonu ile

sonuçlanır . İntrasellüler kalsiyum konsantrasyonu kritik bir göstergedir. Çünkü fosfolipaz, proteaz, endonükleaz gibi bazı enzimlerin aktivasyonu ile ilişkili ikincil haberci gibi davranır ki bu hücre ölümünde degradasyon yolunu ve inflamatuvar kaskadı başlatır(4,31,32).

Adhezyon molekülleri IR hasarında inflamatuvar cevabın baskılanmasında ve devamında köşe taşı gibi rol oynar. Bu adhezyon molekülleri üç grupta incelenir.

1. Selektinler
2. β -integrinler
3. İmmünoglobulin süper ailesi

Selektin adhezyon molekülleri, endotel ile nötrofiller arasındaki ilişkinin kurulmasından sorumludur. L-selektin; nötrofil ve monosit hücre yüzeyinde oluşur. E ve P-selektin; damar endotelde ve platelet yüzeyinde oluşur. P-Selektin endotelial hücrelerde de sentez edilir ve Weibel Palad cisimciklerinde depolanır. İntlamatuvar cevapta ortamdaki mediatörlerle endotel yüzeyine hızlıca mobilize olur. Reperfüzyonun 10-20 dakikasında hücre yüzeyinde pik konsantrasyona ulaşır. Reperfüzyon dönemi uzadığında konsantrasyonda belirgin düşme görülür.

β_2 integrinler (CD11-CD18), heterodimerik glikoproteinlerdir ve bunlar nötrofil yüzeyinde eksprese olur. PAF gibi sitokinler CD11-CD18 kompleksinin ekspresyonunu arttırır.

İmmünoglobülin süper ailesi: "ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1, GMP-140" bu ailenin üyelerindedir. IR hasarında plateletlerin vasküler yatağa adhezyonu ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) vasıtasıyla olur. Endovasküler temastan sonra plateletler aktive olur ve ortama inflamasyonda rol oynayan PAF gibi sitokinleri salgılar. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), ELAM-1 (endothelial leucocyte adhesion molecule), GMP140 (granule membrane protein) endotel lökosit adhezyonunda rol oynayan diğer moleküllerdir.

Yapılan çalışmalarda E-Selektin ve ICAM-1'e karşı geliştirilen antikorların, I/R hasarında mikrovasküler hasarı ve apoptozisi azalttığı bulunmuştur(33).

Sitokinler, IR hasarının oluşumunda önemli rol oynayan diğer mediatörlerdir. Etkilerini tek başına veya birbirlerinin etkilerini arttırarak gösterir. İntlamasyonun çok farklı yolları, hangisinin anahtar konumda olduğunu saptamayı güçleştirir.(Şekil 4)

İnflamasyonda önemli olan bazı sitokinler IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ dır(34).

IL-1: Diğer sitokinlerin salınımını başlatır, fizyolojik etkileri TNF- α 'ya benzer.

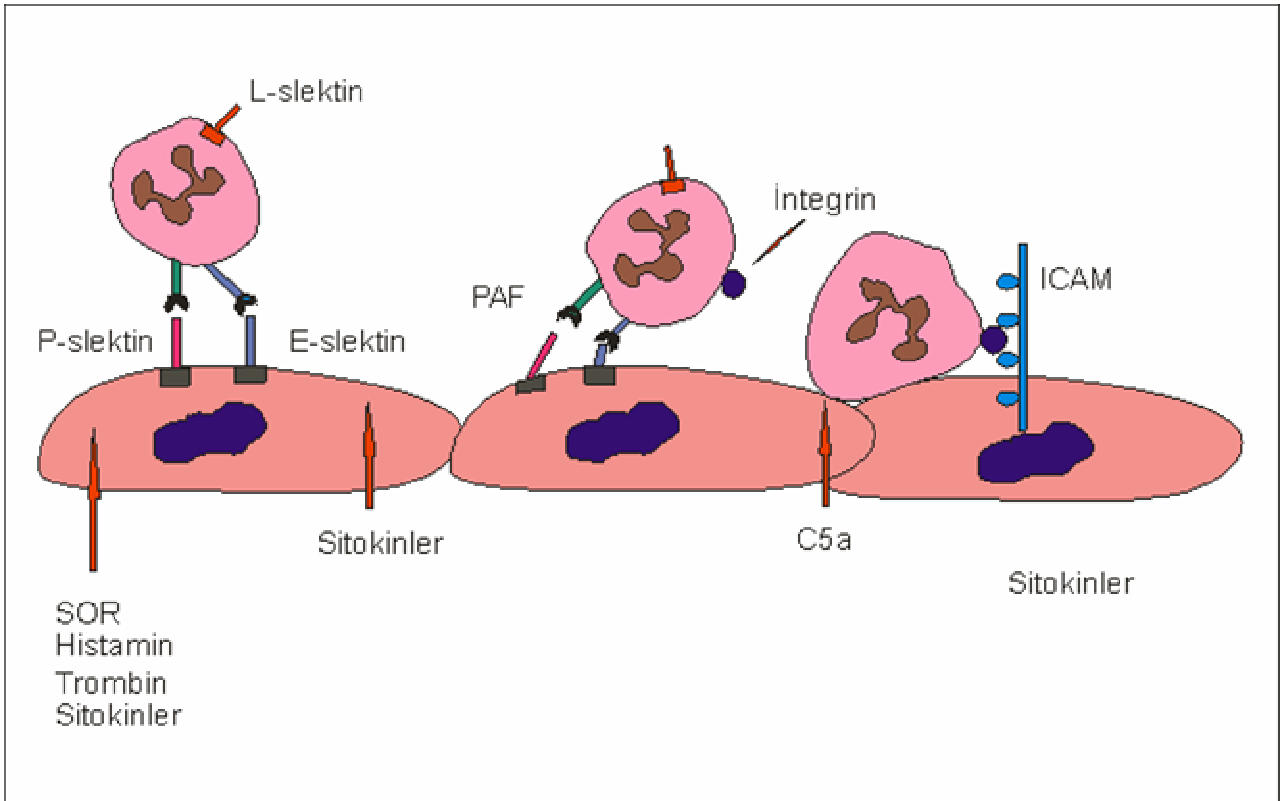
IL-2: En önemli fonksiyonu T-hücre proliferasyonudur.

IL-6: Endotoksine hassastır. B-hücre proliferasyonuna ve onların plazma hücrelerine dönüşümüne neden olur. Hepatositlerden akut faz reaktanların salınımını indükler.

IL-8: Nötrofil hareketlerini stimüle eden güçlü bir kemokindir.

TNF- α : İnflamatuvar yanıtta çok önemli rol oynar. Proinflamatuvar sitokinlerin prototipidir. Ortamda prokoagülanların ve, adhezyon moleküllerinin aktivitesini, IL-1, IL-8 ve LTB₄ salınımını artırır.

IFN- γ : T-lenfositleri tarafından salınır. Özellikle endotel hücrelerinde major histokompatibilite antijen MHC-Sınıf II ekspresyonunu, endotel-lenfosit adhezyonunu ve antijen prezentasyonunu artırır.



Şekil 4 İ/R hasarında sitokin ve adhezyon moleküllerinin rolü.

Miyokardiyal iskemi reperfüzyonda miyokardiyal doku içine nötrofillerin göçü enfarkt alanının genişliği ve iskemi süresiyle ilişkilidir. Doku hasarı polimorfonükleer lökositlerin birikimiyle beraber lokalize inflamatuvar yanıt oluşturur. Nötrofiller, C5_a, İL-8, TNF- β gibi kemotaktik faktörler tarafından inflamasyon alanına yönlendirilirler. Aktive

nötrofiller IL-1, IL-3, IL-5, PAF ve TNF- α gibi önemli proinflamatuvar sitokinlerin kaynağıdır. Platelet aktive edici faktör (PAF), en sık iskemi sonrası perfüzyonda aritmilere neden olur. Reperfüzyonun ilk üç saati içinde polimorfonükleer lökositlerin birikimi başlar. Deneysel İ/R modellerinde ve açık kalp cerrahisi sırasında lökositlerin tüketilmesinin faydalı etkileri olduğu belirtilmektedir(35,36).

Bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B (nükleer faktör kappa B) sitokinlerin, kemokinlerin, immünoresseptörlerin ve hücre adhezyon moleküllerinin I/R hasarı sırasında erken gen ekspresyonuna aracılık etmektedir. NF- κ B'nin selektif blokajı (proline dithiocarbamate) ciddi iskemik stres sonrası reperfüzyonun erken fazında belirgin koruma sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Tacrolimus, NF- κ B'nin erken aktivasyonunu inhibe eder. Sıçan akciğer IR hasarı modelinde düşük doz tacrolimus verilmesiyle NF- κ B'nin inaktivasyonu sağlanmış, böylece IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, TNF- α , γ -IFN düzeylerinde azalma ile doku hasarı azaltılmıştır(37,43,44,45).

İskemi reperfüzyon hasarının mekanizması karmaşık ve zincirleme bir reaksiyondur. Ortaya çıkan doku hasarı esas olarak; serbest oksijen radikalleri, hücre içi Ca^{+2} dengesinin bozulması ve inflamatuvar kaskatın aktivasyonu ile oluşur.

4.2. Tacrolimus (FK506)

Tacrolimus (FK506), genellikle transplantasyon sonrası tedavide kullanılan 822 daltonluk (monohidrat) lipofilik makrolid bir antibiyotiktir(38). (Şekil 5) Doğal bir ürün olup antinomycete, Streptomyces tsukubaensis'den elde edilir. Bu organizma ilk defa 1984 yılında Japonya'da Tsukaba dağı çevresindeki toprak örneklerinde bulundu.(--)* FK506'nın kendisi siklosporinle (kalsinörin inhibisyonu yoluyla etki eden bir immünosupresant) karşılaştırıldığında yaklaşık 100 kat daha aktiftir ancak toksisitesi daha azdır(39,40).

Tacrolimus sitozolik hedef proteini FKBP (FK506- binding protein)'e yüksek afinite ile, özellikle FKBP-12'ye, bağlanarak kalsinörini (CaN) bloke eder.

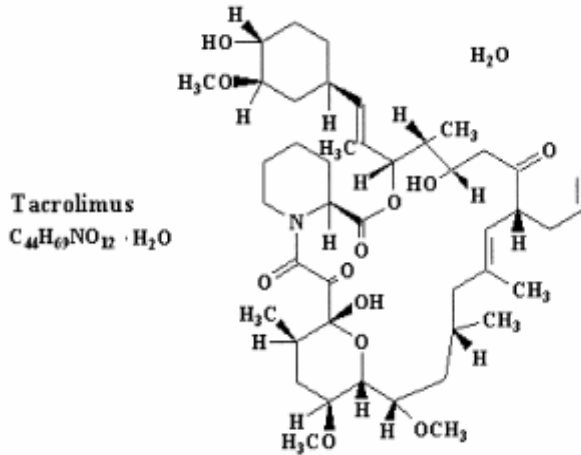
Kalsinörin, kalmoduline(CaM) ve Ca^{+2} ile kontrol edilen bir protein fosfotazdır, heterodimerik bir yapıya sahiptir ve iki alt üniteden oluşur.(Şekil 6) Kalsinörin A: katalitik ve kalmodulinin bağlandığı bölüm, kalsinörin B: Ca^{+2} 'un bağlandığı bölüm. Sitokin gen aktivasyonunu artıran transkripsiyon faktörleri (örneğin; Nucleer factor activating T-lenfosit (NF-AT), NF- κ B, Aktive protein-1(AP-1), AP-3) kalsinörinin direkt yada indirekt substratlarıdır. Tacrolimusun kalsinörini inhibe etmesi, immün ve inflamatuvar cevapta rol

oynayan sitokinlerin, lenfokinlerin (İL-2, İL-3, İL-4, TNF-α, IFN) ve adhezyon moleküllerinin oluşumunu baskılar(41,42).

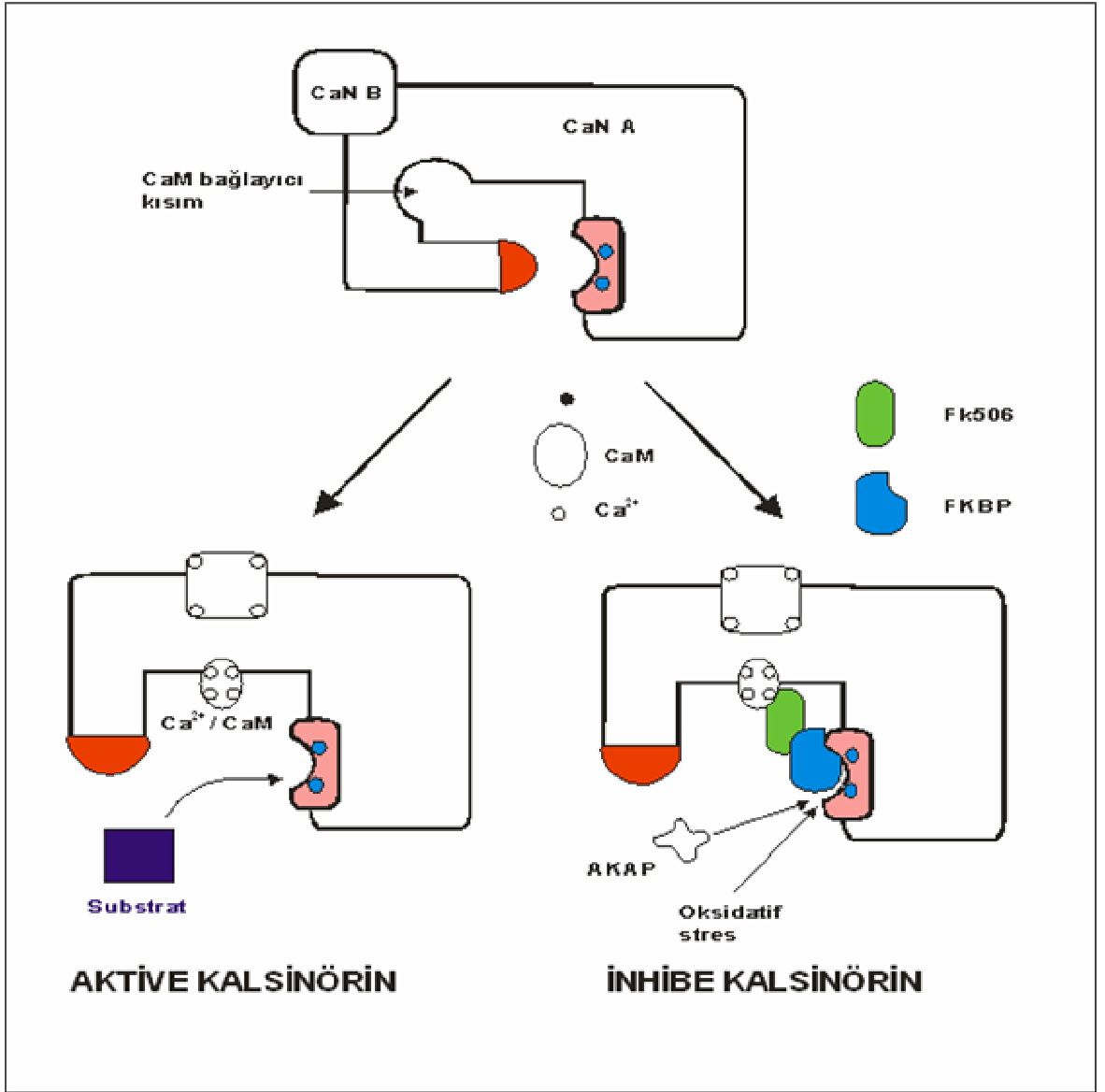
Sıçan renal ve karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı çalışmalarında tacrolimusun koruyucu etkileri gösterilmiştir.

FK506 yüksek lipofiliktir, farmakokinetik özelliği kişinin yağ doku oranına göre değişir. Oral biyoyaralanımı %22'dir ve pik konsantrasyona bir ile dört saatte ulaşır(46). Karaciğer metabolik sisteminde CYP-3A (sitokrom-3A) enzim ailesi ile ilk geçiş eliminasyonuna uğrar ve metabolitleri safra ile atılır, ancak %1-3 kadarı idrarda bulunur(47,48).

Yan etkileri dozla ilişkilidir. Başlıca yan etkileri nefrotoksisite, nörotoksisite, hipertansiyon, DM ve anormal glikoz intoleransıdır. Nefrotoksisite afferent arterioller vazospazmına bağlı renal kan akımında azalma ile oluşur. Kalsiyum kanal blokörü ve anjiyotensin reseptör blokörü ile bu yan etki azaltılabilir. Nörotoksisite %8-20 oranında; temor, baş ağrısı, uykusuzluk, daha nadiren afazi, konfüzyon, ve psikoz biçiminde ortaya çıkar. DM ve/veya glikoz intoleransı %10-20 oranında görülür(49,50). Filler ve ark. yaptığı çalışmada pankreas adacık hücrelerinde vakuolizasyon, degranülasyon gibi morfolojik değişikliklerin tacrolimus alımının kesilmesinden sonra düzeldiği gösterilmiştir(51).



Şekil 5 Tacrolimus (FK506)'un yapısal şekli.



Şekil 6 Kalsinörin – Kalmodulin kopleksinin aktivasyonu ve inaktivasyonu.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Multi Disiplin laboratuvarlarında yetiştirilen 24 adet erkek Wistar Albino tipi sıçan kullanıldı. Genel fizyolojik bilgileri Tablo 1'de verilmiştir. Miyokardiyal iskemi reperfüzyon modellerinde kullanılması ve miyokardiyal koroner kollateral dolaşımının az olması nedeniyle, deney hayvanı olarak sıçan seçilmiştir(52,53).

Sıçanlar oda sıcaklığında, bir kafeste beş tane olmak üzere temiz bir ortamda, standart laboratuvar koşullarında, pellet yem kullanılarak bakıldı. Cerrahi işlemden 12 saat önce yeme işlemi kesilerek su serbest bırakıldı. Deneyin sonunda sıçanlar sakrifiye edildiğinden postoperatif bakım gerekmedi.

Tablo 1 Sıçanların fizyolojik değerleri.

Ortalama yaşam	3-4 yıl
Ağırlık	200-300gr
Beden ısı	37.5 ° C
Solunum sayısı	100-150/ dk
Kan basıncı	80-130mmHg
Kan hacmi	Vücut ağırlığının 1/20' sidir
Kalp ritmi	200-360(240)/dk
Hemoglobin	16-19
Hematokrit	0.1gr/100ml
Sodyum	320mgr/100mg
Potasyum	17.5-22.0 mgr/100ml

5.1 Deney Grupları

Grup-1 (4 adet): Sadece iskemi yapılan grup. Deneklerde uygulanan girişim ve cerrahi işlemden sonra kalpte iskemi oluşturuldu, fakat reperfüzyona izin verilmedi.

Grup-2 (4 adet): Sham grubu. Deneklere uygulanan girişim ve cerrahi işlemden sonra LAD (left anterior descending) koroner arteri intramiyokardiyal geçilen sütün, sner ile oklüde edilmedi.

Grup-3 (7 adet): Kontrol grubu. Cerrahi işlem sonrası LAD koroner arteri oklüde edildi. 45dk'lık iskemiden sonra reperfüzyonun ilk 15 dakikasında serum fizyolojik (SF) intravenöz verildi.

Grup-4 (7adet): Tacrolimus grubu. Cerrahi işlem sonrası LAD koroner arteri oklüde edildi. 45dk'lık iskemi sonrası reperfüzyonun ilk 15 dakikasında tacrolimus intravenöz verildi.

Deneklere uygulanan tüm girişim ve cerrahi işlemlerin çalışmada bakılan hemodinamik, biokimyasal ve patolojik verilere etkisini sham denek grubu kullanarak nötürledik.

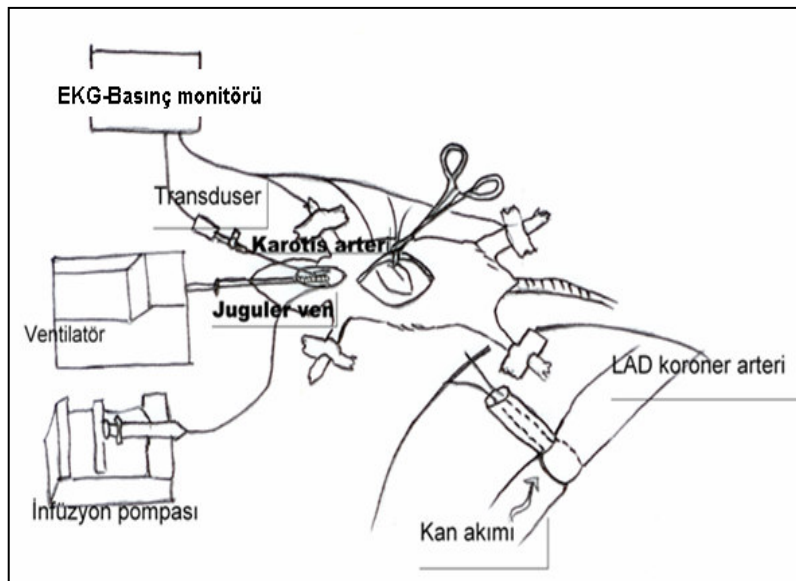
5.2 Anestezi ve Monitörizasyon

Deneklerin anestezisi 35mg/kg ketamin (Ketalar® flakon 100mg/ml Alfasan International Holland) ve 5mg/kg Ksilazine (Alfazyne® 20mg/ml alfasan International Holland) verilerek sağlandı. Gerektiğinde doz tekrarlandı.

Boyun ve göğüs ön duvarı tıraş edilip cerrahi saha %10'luk povidon-iyot (İsol Solüsyonu Merkez Labaratuvarı A.Ş) solüsyonu ile boyandı. Boyun insizyonu ile trakeostomi açılarak entübe edildi. 60 solunum sayısı/dk, %100 oksijen desteğinde, 15 ml/tidal hacimde mekanik hayvan respiratörüne (Ugo Basile S.r.l. Rodent Ventilator İtaly) bağlandı.

Devamlı basınç monitörizasyonu için karotis arteri, intravenöz (IV) SF ve tacrolimusun verilmesi için de juguler ven 24G branül ile kateterize edildi.(Şekil 7)

Entübasyondan 15dk sonra kan gazı parametrelerinin değerlendirilmesi için 0,2cc arteriyel kan alındı. Kalp hızı ve kan basıncı deneyin sonuna kadar EKG-Basınç monitöründen sürekli takip edildi. İskeminin 0.dk ve 45.dk'sında ve reperfüzyonun 60.dk ve 180.dk'da kaydedildi.



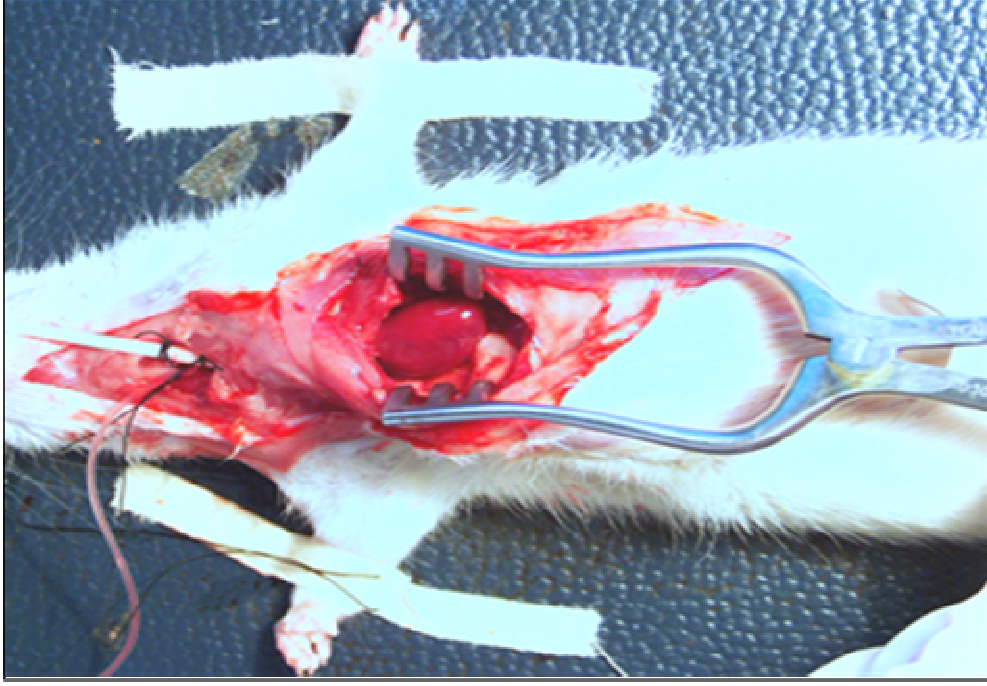
Şekil 7 Operasyon sahasının şematik çizimi.

5.3 Cerrahi İşlem

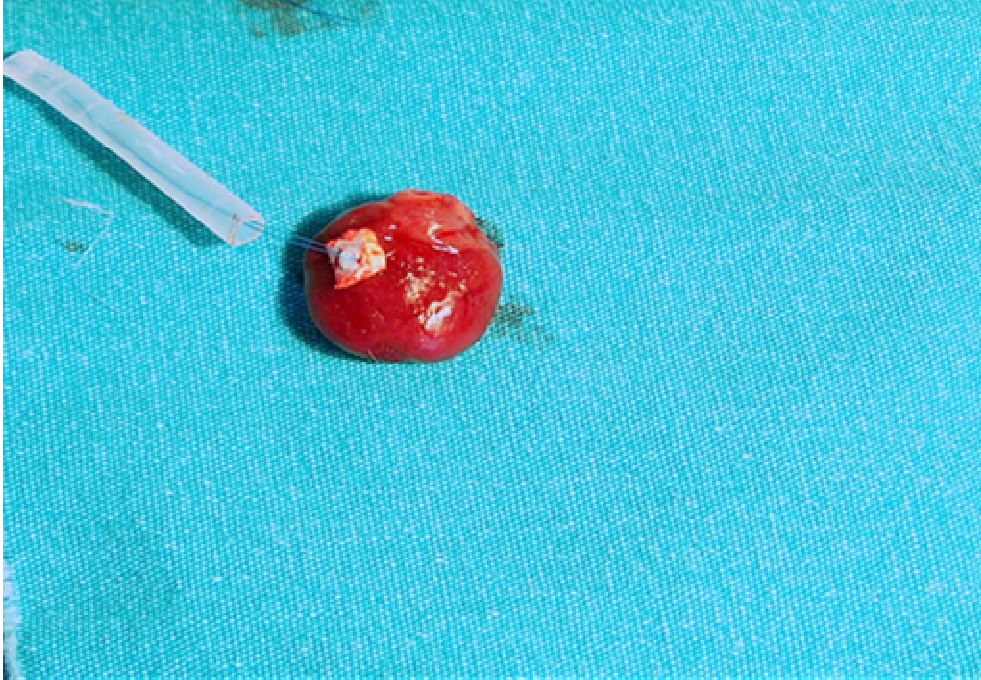
Kalbe ulaşmak için sol torakotomi yapıldı. Toraksa 4.interkostal aralıktan girildi. Mini toraks ekartörü ile cerrahi manüplasyon sahası genişletildi ve perikard kesilerek kalbe ulaşıldı.(Resim 1) 6-0 10mm'lik atravmatik iğneli prolen sütün; sol ana koroner arterin interventriküler septumda devam eden LAD dalı, diagonal yan dalı vermeden proksimalinden, intramiyokardiyal geçildi.

15dk'lık dengelenme döneminin başlangıcında koroner arterde tromboz oluşumunu önlemek amacıyla 600İÜ/kg heparin (Nevparin® flakon 5000İÜ/ml Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş.) intravenöz verildi. Bu sürenin sonunda sütün iğneleri plejittan geçirildi ve üzerinden sner yardımıyla, LAD tavmasını engellemek ve tam oklüzyonu sağlamak için sütün ipleri sıkıldı ve iskemi sağlandı.(Resim 2) Sner sıkmadan önce kardiyak enzim (CK-MB) için 0,5ml kan alındı. Sıvı uygulaması, işlem sırasında kaybedilen kanın 3 katı olacak biçimde Ringer laktat ile replase edildi. 45 dk iskemi döneminde ortaya çıkan aritmiler kaydedildi. Bu sürenin sonunda sner gevşetilerek iskemik bölgenin reperfüzyonu sağlandı. Reperfüzyonla birlikte grup-4'de 100µgr/kg tacrolimus (Prograf® amp Fujisawa Pharmaceutical Co. Japan) infüzyonu, grup 3'de aynı hacimde serum fizyolojik infüzyonu verildi.

Deney havyanı 3 saat respiratöre bağlı kalarak reperfüzyonda tutuldu. Bu süre içerisinde insensibl kaybı azaltmak için torakotomi insizyonu geçici prolen sütünle birbirine yaklaştırıldı. Üç saatin sonunda sıçanın kalbi çıkarılarak boş patoloji kabına kondu. Patoloji kabı soğuk su-buz karışımı içerisinde zaman kaybetmeden (3-4dk içerisinde) Patoloji Anabilim Dalı Laboratuarına götürüldü.



Resim 1 Trakeostomisi ve Torakotomisi yapılmış denek.



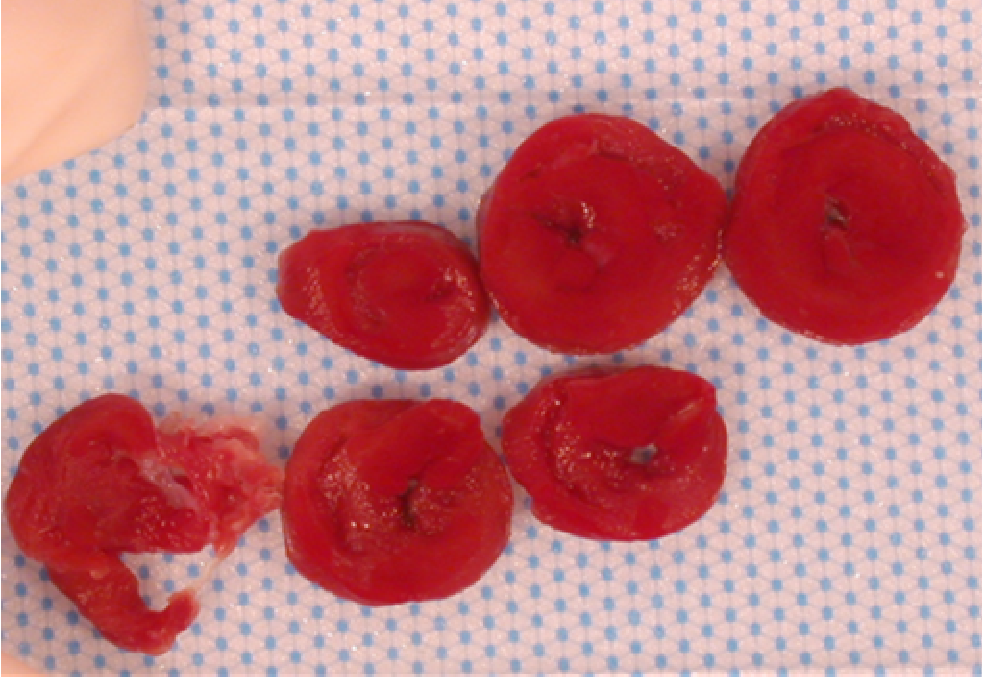
Resim 2 Reperfüzyon sonrasında ana damar ve perikard bağlantıları kesilerek çıkartılan denek kalbi.

5.4 Enfarkt Alanının Hesaplanması

Patoloji laboratuvarında kalp semifrozen hale gelmesi için buzdolabında -20°C 'de 30dk bekletildi. Bu süre içerisinde %1'lik, pH'sı 7.4 olan TTC fosfat tampon solüsyonu hazırlandı. Bu şekilde solüsyonun enzimatik aktivitesi korunmuş oldu.

Enfarkt alanının hesaplanması amacıyla Klein ve ark. bildirdiği triphenyltetrazolium chloride (TTC) boyama tekniği kullanıldı(54). Miyokardiyal enfarkt alanının gross incelemesinde 12 saatten önce bir değişiklik görülmezken bu yöntemle nekrotik alan 2-3 saat sonra doku kesitlerinde görünür hale geldi. Canlılığını sürdüren hücreler dehidrogenez aktivitesine sahip olduğu için TTC ile reaksiyon girerek doku koyu kırmızıya boyanır. İskemik nekrotik alanlarda dehidrogenaz enzimi, hücre membran hasarından dolayı hücre dışına sızar ve enzim aktivitesi azalır. Enfarkt alanında TTC ile enzimetik reaksiyon gerçekleşmediğinden doku renksiz kalır.

Sağ ventrikülden atrioventiküler groovea paralel olacak biçimde kalp apekten tabana doğru 3mm kalınlıkta dilimlendi. Bu dilimler serum fizyolojik içerisinde 15 dk bekletilerek dokudan kanın uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra SF'de bekletilen kesitler alınarak TTC fosfat tampon solüsyonda 37°C 'de 30dk inkübe edildi. İnkübasyon sırasında dokularda renk farkı yavaş yavaş ortaya çıktı. İşlem sonrası kesitlerdeki renk farkını fikse etmek için 20dk'da %10 formalin solüsyonda bekletildi ve fotoğrafları çekildi. Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji Laboratuvarında bilgisayar ortamında planimetri programı ile alan hesaplamaları yapıldı.



Resim 3 Enfarkt alanı içermeyen miyokard kesitleri.



Resim 4 Enfarkt alanı olan (okla gösterilmiş) miyokard kesitleri.

5.5 Biyokimyasal Ölçümler

Kardiyak enzim kreatinin kinaz-MB (CK-MB) ölçümü için, koroner arter oklüzyonundan önce (0.dk) ve sonra (45.dk), reperfüzoyunu takiben birinci ve üçüncü saatlerde denekten kan alındı.

Kan 4°C'de 2400g'de 15dk santirfüj edildi. Serum kısmı alınarak -71°C'de saklandı. Tüm hayvan gruplarından biyokimyasal çalışma için örnekler alındıktan sonra Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında Immulite® Turbo CK-MB (EURO/DPC Ltd. UK) kiti kullanılarak ölçümler yapıldı.

5.6 Histopatolojik İnceleme

Enfarkt alan hesaplamaları için apeksten tabana doğru 4 parçaya dilimlenen ve %10 formol solüsyonunda bekleyen kesitler hematoksilin-eozin boyasında boyanarak ışık mikroskopunda miyokardiyal ödem, myositolizis, fokal hemoraji ve PNL infiltrasyonu incelendi.

Patolojik skorlama

0-yok

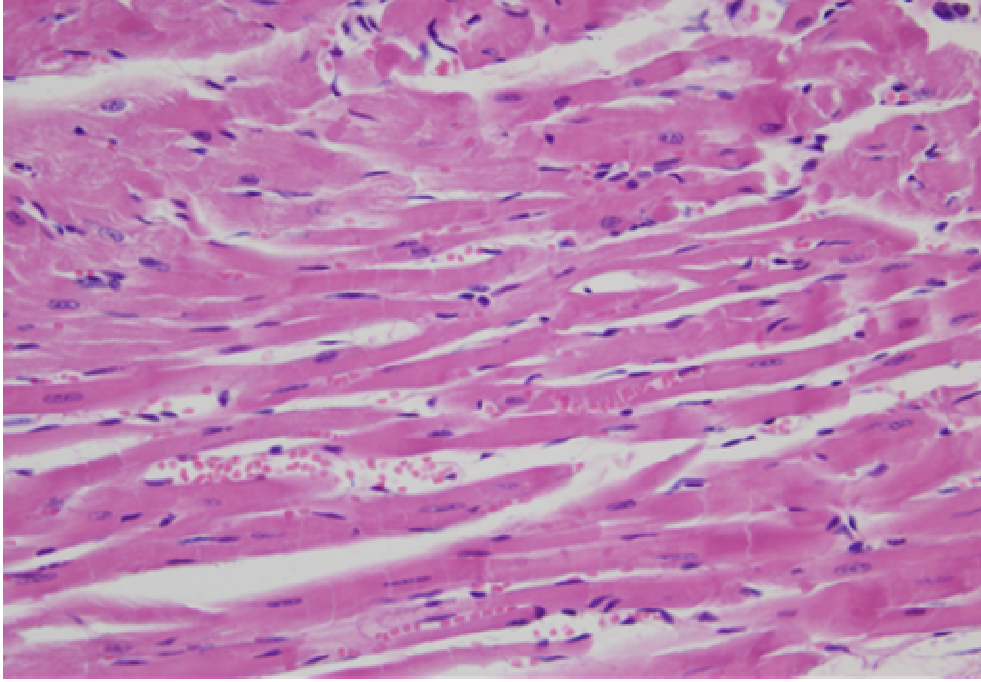
1-hafif

2-orta

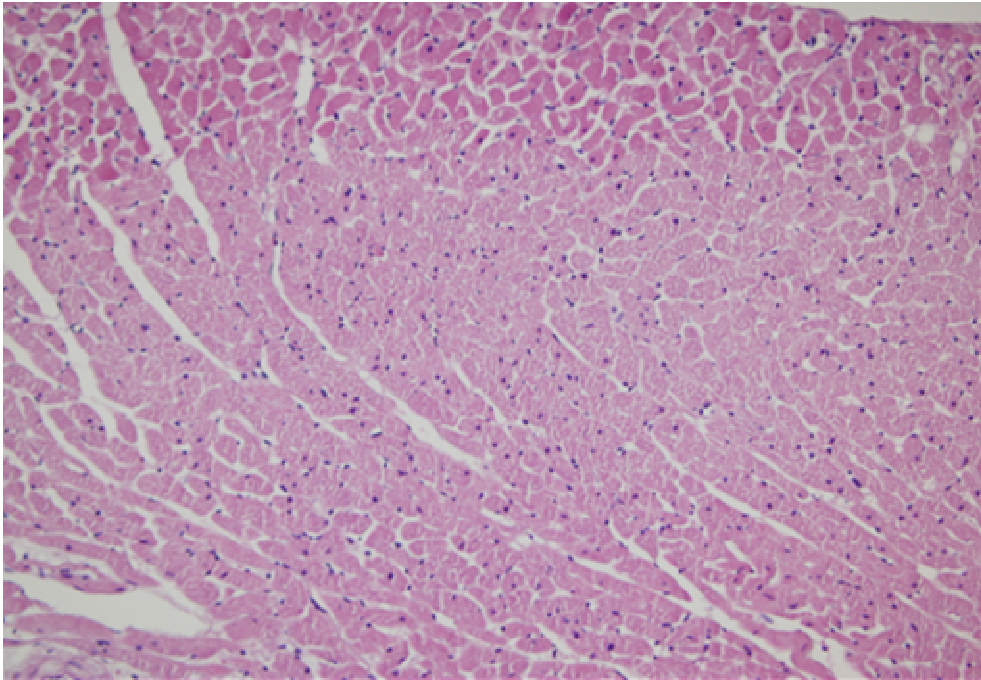
3-şiddetli

5.7 İstatistiksel Yöntem

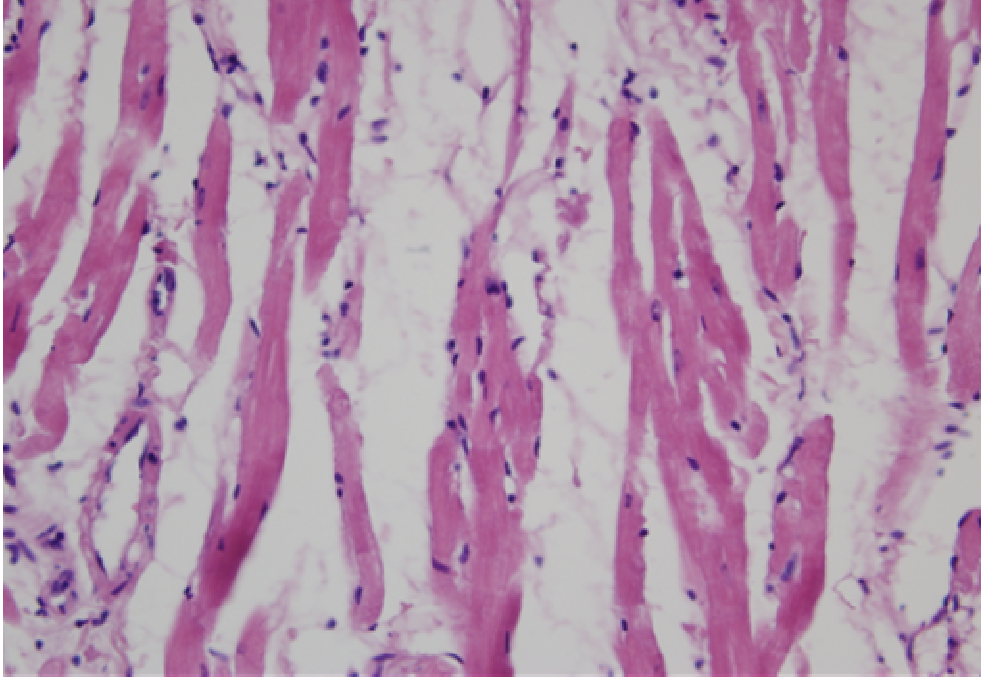
İstatistiksel analizin yapılmasında SPSS 13.0 for Windows programı kullanıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma için Kruskal-Wallis Testi, istatistiksel fark çıktığında Mann-Whitney U Testi ve grup içi değerlerin bazal değere göre farklarını karşılaştırmada Wilkcoxon Signed Ranks Testi kullanıldı. $p < 0.05$ (%95 güven aralığı) olan istatistiksel sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.



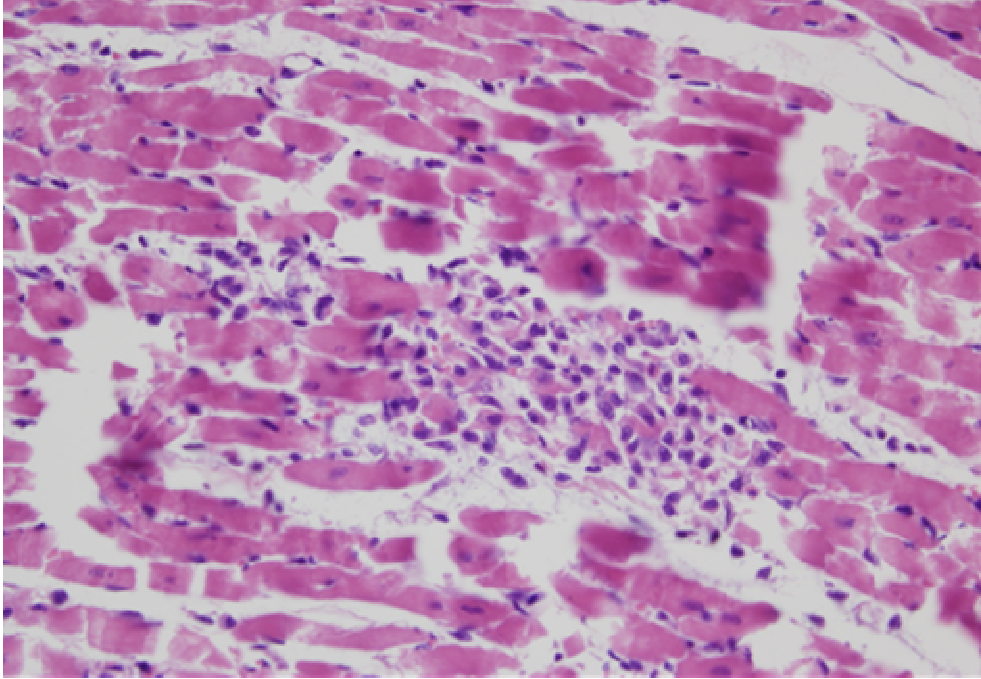
Resim 5 Miyokardiyal hafif hemoraji.



Resim 6 Miyositolizis.



Resim 7 Miyokardiyal ödem.



Resim 8 Polimorfonükleer lenfosit(PNL) infiltrasyonu.

6. BULGULAR

Tablo 2 Gruplara göre hemodinamik parametreler.

	İskemi 0.dk		İskemi 45.dk		Reper.60.dk		Reper.10.dk	
	KB(mmHg)	KH(dk)	KB	KH	KB	KH	KB	KH
İskemi-1	90/50	220	70/45	210				
İskemi-2	80/50	170	80/50	220				
İskemi-3	90/70	170	75/45	190				
İskemi-4	90/60	240	65/40	230				
Sham -1	80/60	180	65/40	250	80/40	240	75/50	280
Sham-2	70/45	250	70/45	260	75/40	275	70/40	290
Sham-3	80/45	170	65/50	190	60/40	250	70/50	260
Sham-4	90/50	200	65/40	220	60/40	260	65/40	275
kontrol-1	90/65	240	70/45	210	70/40	300	60/40	320
Kontrol-2	95/60	175	80/50	260	60/50	275	55/35	280
Kontrol-3	70/50	185	65/45	210	55/40	240	50/30	215
Kontrol-4	85/55	150	75/45	250	75/40	250	75/50	290
Kontrol-5	80/60	170	60/40	220	50/30	240	50/30	280
Kontrol-6	90/70	200	65/45	195	55/30	250	50/35	290
Kontrol-7	90/60	240	65/50	240	50/30	280	70/30	230
Tacrolimus-1	75/45	150	75/40	155	85/50	170	75/45	195
Tacrolimus-2	80/50	200	75/40	180	80/40	200	65/40	230
Tacrolimus-3	90/60	286	60/40	260	90/40	270	55/30	260
Tacrolimus-4	100/60	220	70/45	234	70/35	250	60/35	240
Tacrolimus-5	90/70	230	70/50	230	100/50	235	60/35	250
Tacrolimus-6	100/80	170	85/55	220	100/80	235	90/70	230
Tacrolimus-7	97/60	170	90/70	195	80/40	210	75/50	230

Tüm gruplar da iskeminin 0.dk ve 45.dk sistolik / diyastolik kan basıncı ve kalp hızı değerleri açısından anlamlı fark yoktu. (Kruskal-Wallis Testi)

p (sistol 0.dk KB)=0.830

p (diyastol 0.dk KB)= 0.243

p (sistol 45.dk KB)=0.244

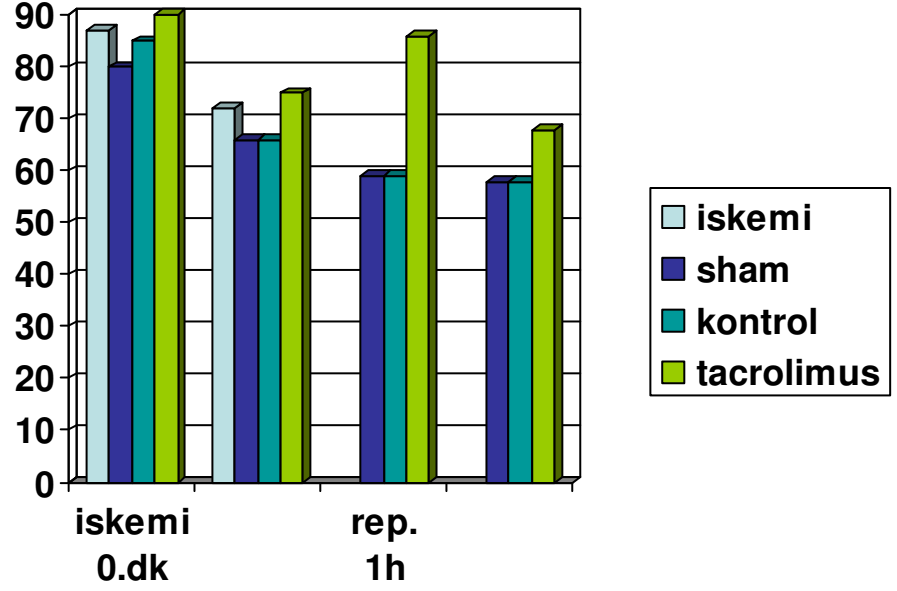
p (diyastol 45.dk KB)=0.885

Sham, kontrol ve tacrolimus grubunda reperfüzyonun 60.dk ve 180.dk sistolik / diyastolik kan basıncı ve kalp hızı değerleri açısından anlamlı fark 60.dk da vardı. (Kruskal-Wallis Testi)

p (sistol 60.dk KB)=0.004

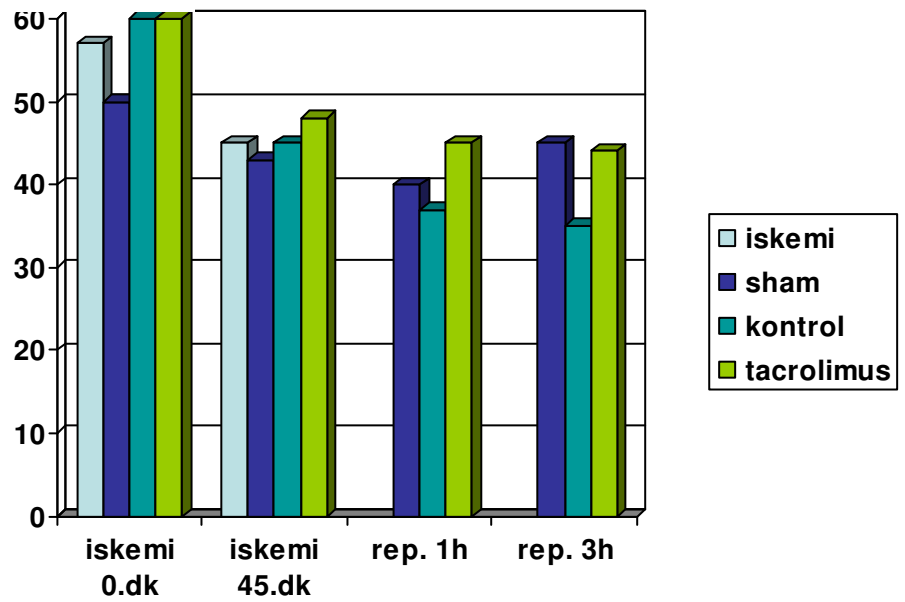
p (diyastol 60.dk KH) =0.047

**Ortalama Sistolik KB
(mmHg)**



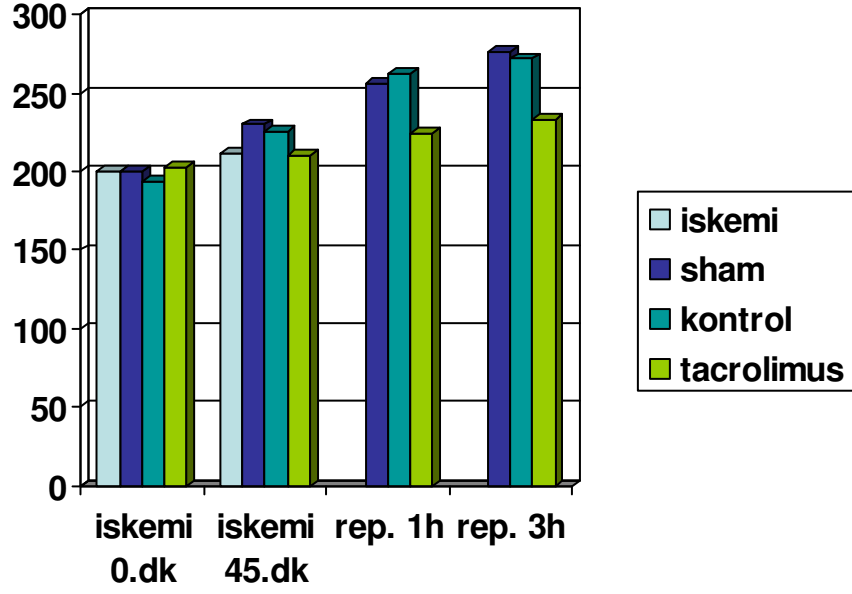
Grafik-1 Çalışma gruplarının hemodinamik sistolik KB ortalaması

**Ortalama Diyastolik KB
(mmHg)**



Grafik-2 Çalışma gruplarının hemodinamik diyastolik KB ortalaması.

Ortalam Kalp Hızı
(dk)



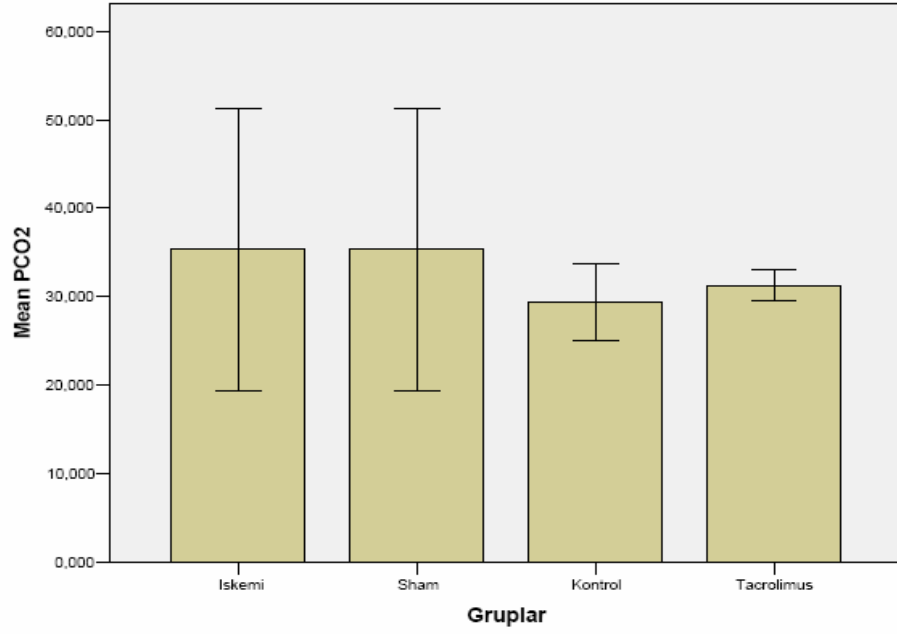
Grafik-3 Çalışma gruplarının hemodinamik kalp hızı ortalaması

Tablo 3 Gruplara göre kan gazı değerleri.

	pH	PCO2	PO2	Htc	O ₂ satüras.(%)
Iskemi-1	7.35	38	120	26	97.5
Iskemi-2	7.38	40	200	39	99
Iskemi-3	7.52	28	250	33	-
Iskemi-4	-	-	-	-	-
Sham-1	7.44	28	168	27	-
Sham-2	7.35	40	110	37	95
Sham-3	7.35	38	106	35	95
Sham-4	-	-	-	-	-
Kontrol-1	7.47	24	230	24	99
Kontrol-2	7.50	25	110	35	98
Kontrol-3	7.52	28	220	31	-
Kontrol-4	7.43	29	217	34	99
Kontrol-5	7.41	38	90	34	97
Kontrol-6	7.34	32	290	31	-
Kontrol-7	7.43	30	224	32	99
Tacrolimus-1	7.37	30	134	43	99
Tacrolimus-2	7.55	28	260	34	-
Tacrolimus-3	7.54	32	110	32	98
Tacrolimus-4	7.51	31	200	32	99
Tacrolimus-5	7.42	32	212	28	99
Tacrolimus-6	7.35	34	145	28	99
Tacrolimus-7	7.48	32	127	30	98

Tüm gruplarda kan gazı parametreleri olarak pH=7.3-7.5 arasında, PCO₂ < 45mmHg ve PO₂ > 90mmHg değerleri sağlandı. (İskemi ve Sham grubunun 4. deneklerinden alınan kan gazı örnekleri ölçüm sırasında kan gazı ölçüm cihazı kalibrasyona girdiği için ölçülemedi)

Tüm gruplarda kan gazı parametreleri pH, PCO₂, PO₂ ve O₂ satürasyonu değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.(Sırayla p=0.486, p=0.307, p=0.360, p=0.104) (Kruskal-Wallis Testi)



Grafik-4 Tüm çalışma grubunda kan gazı PCO2 (ortalama) değerleri.

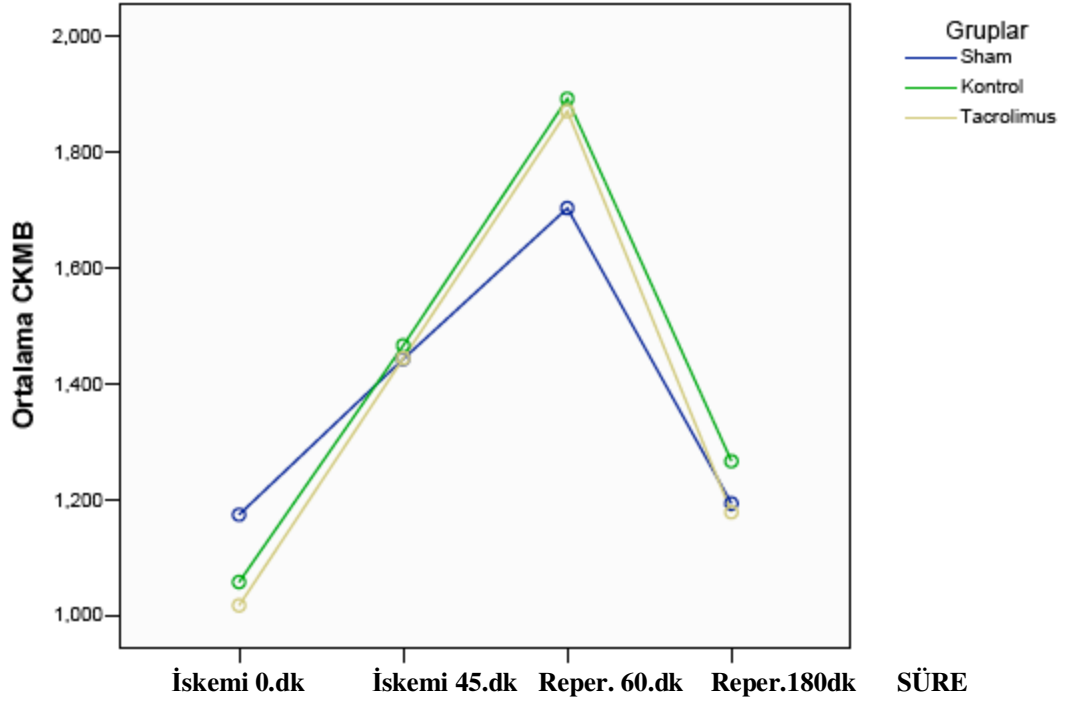
Tablo 4 Gruplara göre kardiyak enzim (CK-MB) değerleri

İskemi 0.dk İskemi 45.dk Reper. 60.dk Reper.180.dk

İskemi-1	0.86	1.28	-	-
İskemi-2	0.948	1.48	-	-
İskemi-3	0.84	1.18	-	-
İskemi-4	0.993	0.894	-	-
Sham-1	1.50	1.62	2.14	1.54
Sham-2	1.49	1.77	2.20	1.32
Sham-3	0.983	1.60	1.08	0.85
Sham-4	0.72	0.778	1.39	1.06
Kontrol-1	1.11	1.65	1.93	1.42
Kontrol-2	0.99	1.82	2.32	1.26
Kontrol-3	1.12	1.45	2.14	1.03
Kontrol-4	1.16	1.25	1.54	1.14
Kontrol-5	0.809	0.839	1.69	1.12
Kontrol-6	1.17	2.18	2.22	1.81
Kontrol-7	1.04	1.07	1.40	1.08
Tacrolimus-1	0.580	0.713	1.20	0.904
Tacrolimus-2	0.997	1.26	2.31	0.805
Tacrolimus-3	1.49	2.31	2.05	0.853
Tacrolimus-4	0.830	1.56	1.61	1.44
Tacrolimus-5	1.07	1.19	2.07	1.80
Tacrolimus-6	1.02	1.55	2.09	1.20
Tacrolimus-7	1.13	1.52	1.76	1.24

Tüm gruplar da iskeminin 0.dk ve 45.dk da ölçülen CK-MB değerleri açısından anlamlı fark yoktu.(Sırayla $p=0.439$, $p=0.645$) (Kruskal WallisTesti)

Sham, kontrol ve tacrolimus grubunda reperfüzyonun 60.dk ve 180.dk da CK-MB değerleri açısından anlamlı fark yoktu.(Sırayla $p=0.800$, $p=0.830$) (Kruskal WallisTesti)



Grafik-5 Zamana göre ortalama CK-MB düzey değişimi

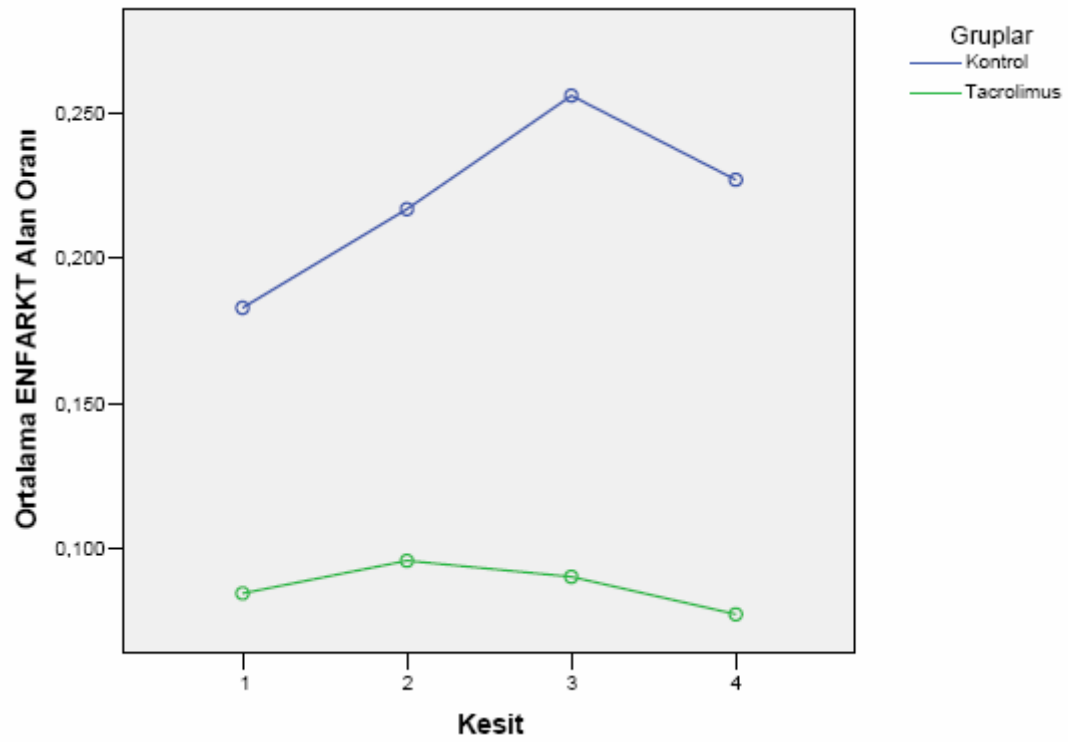
Tablo 5 Gruplara göre miyokard kesitlerinde enfarkt alanı (piksel),

	Tüm alan				Enfarkt alanı			
	Kesit-1	Kesit-2	Kesit-3	Kesit-4	Kesit-1	Kesit-2	Kesit-3	Kesit-4
İskemi 1	69.563	56.612	40.801	16.737	-	-	-	-
İskemi 2	65.566	53.739	44.586	37.188	-	-	-	-
İskemi 3	47.482	43.602	33.908	14.880	-	-	-	-
İskemi 4								
Sham 1	35.220	33.209	26.598	7.454	-	-	-	-
Sham 2	50.365	49.643	47.895	16.542	-	-	-	-
Sham 3	36.088	35.218	29.308	14.129	-	-	-	-
Sham 4	71.447	54.848	54.063	29.002	-	-	-	-
Kontrol 1	41.787	34.557	26.021	12.863	8.951	6.893	2.789	1.776
Kontrol 2	52.399	44.811	26.494	14.337	6.511	11.354	6.722	4.012
Kontrol 3	75.235	72.775	62.713	32.301	3.688	10.742	6.806	6.342
Kontrol 4	68.415	64.789	45.965	22.714	15.620	12.939	21.438	9.292
Kontrol 5	79.745	65.083	30.927	-	14.083	11.199	9.820	-
Kontrol 6	50.279	53.758	45.895	39.787	17.829	18.257	17.249	9.632
Kontrol 7	84.280	80.648	60.224	36.591	10.711	13.046	13.515	3.539
Tacrolimus1	73.256	67.684	54.415	25.978	1.974	1.655	1.569	260
Tacrolimus2	63.628	59.314	45.782	31.588	2.644	1.581	2.105	1.024
Tacrolimus3	67.364	53.339	61.047	35.929	3.908	3.653	6.577	2.872
Tacrolimus4	61.320	47.552	47.261	26.668	7.549	3.872	2.632	752
Tacrolimus5	43.798	39.356	35.522	18.699	2.899	4.632	3.595	3.069
Tacrolimus6	41.784	35.595	31.095	21.261	6.462	10.981	4.864	3.034
Tacrolimus7	54.129	47.898	18.880	4.992	6.591	2.085	2.571	421

Tablo 6 Kontrol ve tacrolimus grubunda miyokard kesitleri **enfarkt alanı/tüm alan oranları**.

	Kesit-1	Kesit-2	Kesit-3	Kesit-4
Kontrol-1	0.214	0.199	0.107	0.138
Kontrol-2	0.124	0.253	0.254	0.280
Kontrol-3	0.049	0.148	0.109	0.196
Kontrol-4	0.228	0.200	0.466	0.409
Kontrol-5	0.117	0.172	0.318	0.242
Kontrol-6	0.355	0.340	0.376	0.097
Kontrol-7	0.117	0.162	0.224	-
Tacrolimus-1	0.027	0.024	0.029	0.010
Tacrolimus-2	0.042	0.027	0.046	0.032
Tacrolimus-3	0.058	0.068	0.108	0.080
Tacrolimus-4	0.123	0.081	0.056	0.028
Tacrolimus-5	0.066	0.118	0.101	0.164
Tacrolimus-6	0.155	0.308	0.156	0.143
Tacrolimus-7	0.122	0.136	0.136	0.084

Kontrol ve tacrolimus grubunda miyokard kesitlerinde **enfarkt alanı/tüm alan oranı** karşılaştırıldığında, tacrolimus grubunda oran kontrol grubuna göre daha düşüktü, istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. (Sırayla Kesit-1 $p=0.025$, Kesit-2 $p=0.018$, Kesit-3 $p=0.013$, Kesit-4 $p=0.015$) (Mann-Whitney U Testi)



Tablo 7 Tüm grupların histopatolojik derecelendirilmesi.

	Miyokar.ödem	Miyositolizis	Fokal hemoraji	Pnl infiltrasyonu
İskemi-1	1	0	0	0
İskemi-2	1	0	0	0
İskemi-3	1	0	0	0
İskemi-4	2	1	0	0
Sham-1	0	0	0	0
Sham-2	1	0	0	0
Sham-3	1	0	0	0
Sham-4	1	0	0	0
Kontrol-1	1	0	0	0
Kontrol-2	1	0	0	3
Kontrol-3	1	1	0	1
Kontrol-4	1	0	0	2
Kontrol-5	2	2	0	2
Kontrol-6	1	0	2	1
Kontrol-7	2	0	0	2
Tacrolimus-1	1	0	0	1
Tacrolimus-2	1	0	0	0
Tacrolimus-3	1	0	0	1
Tacrolimus-4	1	0	1	2
Tacrolimus-5	1	0	0	1
Tacrolimus-6	0	0	0	0
Tacrolimus-7	1	0	1	0

İskemi grubu, Sham grubu, Kontrol grubu ve Tacrolimus gruplarında;

Miyokardiyal ödem (p=0.303)

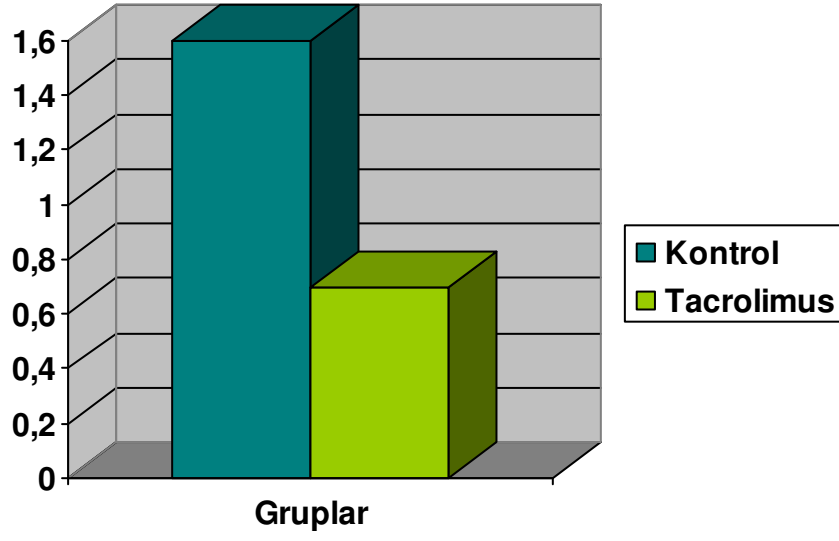
Miyositolizis (p=0.458)

Fokal hemoraji (p=0.300)

PNL infiltrasyonu (p=0.045)

İstatistiksel olarak anlamlı fark sadece PNL infiltrasyonunda bulundu.
(MannWhitney U Testi)

Ortalama PNL
infiltrasyon Derecesi



Grafik-7 Kontrol ve tacrolimus grubunda ortalama PNL infiltrasyon derecesi.

7. SONUÇLAR-TARTIŞMA

Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı için geçici iskemik ataklar; ciddi koroner arterlerin spazmı esnasında, aterosklerotik plak rüptürü veya eforda karşılanamayan O₂ ihtiyacı sırasında ortaya çıkabilmektedir(2). Trombolitik tedavi, eforun durdurulması, kardiyopulmoner bypass sonrası kardiyak dolaşımın sağlanması veya koroner arter spazmının çözülmesi durumlarında olduğu gibi miyokardın sistolodiyastolik fonksiyonunun saatler hatta günler içerisinde eski durumuna dönmeye "miyokardiyal stunning" denir. Miyokardiyal stunning uzayan düşük debili kalp sendromlarıyla ilişkilidir ve kalp yetmezliğini presipite eder(10,12,13).

İskemi reperfüzyon hasarının moleküler olayları kompleks ve multifaktöriyeldir. Bir çok çalışmada serbest oksijen radikalleri, hücre içi aşırı kalsiyum birikimi ve nötrofil başta olmak üzere inflamatuvar cevap kaskadı olası mekanizmalar olarak gösterilmektedir(5,15,17,18).

Miyokard iskemi reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik deneysel çalışmalarda birçok ajan kullanılmıştır. Bunlardan başlıcaları; Ca kanal blokerleri, ACE inhibitörleri, prostoglandinler, glutatyon, N-asetilsistein, pentoksifilin, anestezi ajanlarıdır.

İmmünosupresif ajanların, iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkisiyle ilgili daha önce yapılmış çalışmalar vardır. İmmünosupresif ajanların son yıllarda apoptosis ve iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesi ile ilgili konuların araştırılmasında kullanımı giderek artmaktadır. Tavşanlarda miyokardiyal iskemi yapılan bir çalışmada 45 dk 'lık iskemi ve 6 saat reperfüzyonda tutulan deneklere tacrolimus reperfüzyondan 5 dk sonra verilmiştir.

Wakabayoshi ve ark.'nın karaciğer iskemi modelinde, sıcak iskemiden 30dk önce verilen tacrolimusun perihepatik mikrosirkülasyonu çok hızlı düzelttiğini lazer doppler ve histolojik çalışmalarla gösterdi. Bu çalışmada, tacrolimus etkisini potent bir vazokonstrüktör olan endotelin 1 ekspresyonunu inhibe ederek yaptığı gösterildi(55).

Sarc ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada sıçanlarda karaciğer iskemi ve hepatektomi modelinde iskemiden önce verilen tacrolimusun surviyi uzattığı ve hepatik ATP içeriğinin restorasyonunu düzelttiğini bildirmiştir(56).

Zini ve ark. sıçan beyin iskemi modelinde mitokondri üzerinde yapılan araştırmalarda tacrolimusun elektron transport zincirinde iki farklı kompleksi (kompleks 3 ve kompleks 5) inhibe ettiğini gösterdi. Bunlar serbest oksijen radikal oluşumundan sorumludur(57).

İskemi sırasında hücre ATP içeriğinin hızla azalması intrasellüler ve ekstrasellüler kompartmanlar arasındaki elektrolit gradiyentini tehlikeye sokar. İnasellüler Ca^{+2} kritik bir göstergedir. Dhar ve ark. yaptıkları çalışmada köpek karaciğer iskemi modelinde reperfüzyon sonrası tacrolimus vererek, intrasellüler Ca^{+2} birikiminin ve hepatosellüler hasarın azaldığını gösterdi(58).

Bir kalsinörün inhibitörü olan tacrolimus; hücre ATP içeriğinin restorasyonunu sağlaması, NF-kB' nin erken aktivasyonunu inhibe ederek sitokinlere bağlı inflamatuvar cevabı baskılaması, intersellüler adhezyon moleküllerinin gen ekspresyonunu azaltması iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etki oluşturmaktadır.

Çalışmada 250-300gr arasında değişen Wistar Albino tipi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanı olarak sıçanların seçilmesinin nedeni; Dokuz Eylül Multi Disiplin laboratuvarında yetiştiriliyor olması, miyokardiyal koroner kollateral kan akımının az olması ve iskemi reperfüzyon modellerinde kullanılıyor olmasından dolayıdır.

Çalışmada tacrolimus 100µgr/kg dozunda reperfüzyonun ilk 15 dakikasında İV infüzyonla verildi. Kontrol grubunda ise, tacrolimus ile eşit hacimde %0.9 NaCl solüsyonu verildi. Hemodinamik parametreler (kan basıncı, kalp hızı) iskemi ve reperfüzyonun belirli aşamalarında kaydedildi. Tacrolimus grubunda 60. dakikada ortalama sistolik KB (86.4mmHg) kontrol grubuna göre daha yüksekti. Aynı şekilde 60. dakikada ortalama kalp hızı (224/dk) kontrol grubuna göre düşüktü. Bu sonuç tacrolimusun erken dönem miyokardiyal fonksiyonu koruduğu veya tacrolimus verildiğinde hipertansif yan etkisinin ortaya çıktığıyla ilişkili olabilir.

Biyokimyasal incelemeler için iskemi ve reperfüzyonda, hipovolemiye neden olmamak için olan en az hacimle (0.5cc) kan belirli zamanlarda alındı. Bu eksilen kan hacmi İV olarak Ringer laktat ile karşılandı. Sham, kontrol ve tacrolimus grubunda reperfüzyonun 60.dk da kardiyak enzim CK-MB düzeyi pik değerlere ulaştı. Sırayla ortalama pik CK-MB değerleri 1.7ng/ml, 1.89ng/ml, 1.87ng/ml idi. Bununla beraber tüm zamanlarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Miyokard enfarktüsünde morfolojik değişiklikler en az 4-12 saatte belirgin hale gelirken, TTC boyama tekniğiyle enfarkt alanı 2-3 saat sonrasında doku kesitlerinde görünür hale gelerek ölçülmesi mümkün oldu. Kontrol grubunda miyokardiyal kesitlerde enfarkt alanı/tüm alan oranı sırayla $K1=0.182$, $K2=0.210$, $K3=0.264$, $K4=0.227$ iken bu oran tacrolimus grubunda sırayla $K1=0.084$, $K2=0.095$, $K3=0.090$, $K4=0.077$ ölçüldü ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Miyokard kesitleri hematoksilin-eosin boyasında boyanarak, ışık mikroskopunda miyokardiyal ödem, miyositolizis, fokal hemoraji ve pnl infiltrasyonu derecelendirildi. Kontrol grubunda pnl infiltrasyon derecesi 1.6, tacrolimus grubunda 0.7 ölçüldü. İstatistiksel olarak sadece pnl infiltrasyonunda anlamlı fark bulundu.

Tacrolimus ile yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda miyokardiyal iskemi, reperfüzyon hasarında tacrolimusun koruyucu etkisi ilgili yolaklarda biyokimyasal veriler ağırlıklıdır. Bu çalışmada tacrolimus reperfüzyon aşamasında verilerek kan basıncı hemodinamik değerleri koruması, mikroskopik incelemede PNL infiltrasyonunu azaltması ve makroskopik görüntüde enfarkt alanı/tüm alan oranını azaltması iskemi reperfüzyon hasarında tacrolimusun koruyucu etkisi olabileceğini göstermiştir. Yaptığımız çalışmanın bu konudaki verilere mikroskopik ve makroskopik verileri ekleyerek ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

İskemi reperfüzyon hasarı oluşumu birbiri içine geçen, birbirini tetikleyen kompleks bir mekanizma olduğu için tacrolimus ve diğer etken maddelerle daha fazla ve detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

- 1) Steenberger C, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anearobic, and ischemic myocardium in vitro. *Circ Res* 1987;57:864-75
- 2) Boersma E, Maas AC, Deckers JW. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet* 2996;348:771-75
- 3) Ohmori M, Kobayashi E, Harada k, Kitoh Y. Do immunosuppresants affect neutrophils, resulting in protection of the liver against ischemia-reperfusion injury? *Transplantation* 1998;66:940-941
- 4) Garcia-Craido FJ, Lozano-Sanchez F, Fernandez-Regalado J. Possible tacrolimus action mechanisms in its protector effects on ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 1998;66.942-43
- 5) Hooks MA. Tacrolimus, anew immunosupresant- A review of the literature. *Ann Pharmacy* 1994;28:501–510
- 6) McDiarmid SV, Busuttil RW, Ascher NL, Burdick J. FK506(tacrolimus) compared with cyclosporine for primary immunosuppression after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 1995;59:530-536
- 7) Shaw LM, Kaplan B, Kaufman D. Toxic effects of immunosuppressivedrugs: Mechanism and strategies for controlling them. *Clin Chem* 1996;42:1316-1321
- 8) Plosker GL and Foster RH. Tacrolimus: A further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000;59:323-389
- 9) Teagtmeyer H, King LM, Jones BE. Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets of pharmacotherapy. *Am J Cardiol* 1998;82:54-60
- 10)Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implication of stunning, hibernation, and precondition: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998;97(18):1848-1867
- 11)Kloner RA, Jenning RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001;104(24):2981-89

- 12)Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning and their clinical implications: part 2. *Circulation*. 2001;104(25):3158-67
- 13)Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res*. 1990;66(4):913-931
- 14)Lemasters JJ.V. Necrapopyosis and mitochondrial permaeability transition:Shared pathways to necrosis and apoptosis.
- 15)Downey JM, Cohen MV, Mitochondrial K channel opening during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic rat hearts. *J.Mol.Cell Cardiol*. 2001;33:651-3
- 16)Yellon DM, Dana A, The preconditioning phenomenon: Atol for the scientist or a clinical reality? *Circ Res*. 2000;87:543-50
- 17)Thomsan JA, Hess ML. The oxygen free radical system: A fundemantal mechanism in the production of myocardial necrosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1986;28:449-462
- 18)Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. 1. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc* 1998;63:381-89
- 19)Kontos HA, Wei EP, Povlishock JT, Dietrich WD, Magiera CJ, Ellis EF. Cerebral Anterior damage by arachidonic acid and prostoglandinG₂ . *Science* 1980;209:1242-45
- 20)Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargoni A, Medici D. Oxygen free radicals and reperfusion injury: effect of ischemia and reperfusion on the cellular abylity to neutralise oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18(Suppl. 4):67-69
- 21)McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N Eng J Med* 1985;312:159-163
- 22)Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986;59:612-619
- 23)Flamm ES, Demopoulos HB, Pietronigro D. The free radikal pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1980;492:91-119

- 24) Pryor WA. Free radical mechanisms of tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15
- 25) Scott C, Mark F.M, Andrew P. Ischemia/Reperfusion induces the recruitment of leucocytes from whole blood under flow conditions. *Free radical biology&medicine* 2004;36:1102-11
- 26) Reilly PM, Schiller HJ. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The American Journal of Surgery*. 1990,161:488-503
- 27) Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ Res* 2000;86:541-548
- 28) Dennis SC, Coetzee WA, Cragoe EJ Jr, Opie LH. Effect of proton buffering and of amiloride derivatives on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. Possible evidence of arrhythmogenic role of Na^+/H^+ -exchange. *Circ Res* 1990;66:1156-59
- 29) Hartman M, Decking UK. Blocking Na^+/H^+ exchange by cariporide reduces Na^+ overload in ischemia and is cardioprotective. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1985-95
- 30) Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *N. Engl.J. Med.* 1986;314:1670-76
- 31) Tani M, Mechanisms of Ca^{+2} overload in reperfusion ischemic myocardium. *Annu Rev Physiol* 1990;52:543-48
- 32) Abbasi O, Kishimoto T, McTire L, Anderson D, Smith C. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *Journal of Clinical Investigation* 1993;92:2719-2730
- 33) Sha W, Liou H, Toemanen E, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B lead to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995;80:321-330
- 34) Yeong-Hau L, Li-Wen L, Silva A. Pathogenesis of ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sciences* 2003;74:543-552
- 35) Suzuki S, Toledo-Pereyra lh, Rodriguez F. Role of Kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion. *CircShock* 1994;42:204-209

- 36) Suzuki S, Toledo-Pereyra lh, Rodriguez F. Role of neutrophils during the first 24 hours after liver ischemia and reperfusion injury. *Transplant Proc* 1994;26:3695-3700
- 37) Mathur S, Karmazyn M. Interaction between anesthetics and sodium-hydrogen Exchange inhibitor HOE 642 (cariporide) in ischemic and reperfused rat hearts. *Anesthesiology* 1997;87:1460-69
- 38) Hooks MA. Tacrolimus, a new immunosuppressant- A review of the literature. *Ann Pharmacy* 1994;28:501–510
- 39) McDiarmid SV, Busuttill RW, Ascher NL, Burdick J. FK506(tacrolimus) compared with cyclosporine for primary immunosuppression after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 1995;59:530-536
- 40) Shaw LM, Kaplan B, Kaufman D. Toxic effects of immunosuppressive drugs: Mechanism and strategies for controlling them. *Clin Chem* 1996;42:1316-1321
- 41) Plosker GL and Foster RH. Tacrolimus: A further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000;59:323-389
- 42) Kincaid R, Higuchi S, Tamura J, Giri P, Polli JW. Calmodulin-dependent protein phosphatase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and expression of recombinant catalytic subunit. *J Biol Chem* 1991;266:18104–112
- 43) Morris RE. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. *Kidney Internat* 1996;79:26–38
- 44) Cameron AM, Nucifora FC, Fung ET, Livingston DJ. FKBP12 binds the inositol 1, 4, 5- triphosphate receptor at leucine- proline (1400- 1401) and anchors calcineurin to this FK506- like domain. *J Biol Chem* 1997;272:27582-88
- 45) Cameron AW, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM. Calcineurin associated with the inositol 1, 4, 5- trisphosphate receptor- FKBP12 complex modulates Ca^{+2} flux. *Cell* 1995; 83:463- 472
- 46) Venkataraman R, Jain A, Cadoff E, Warty W, Iwasaki K. Pharmacokinetics of FK506: Preclinical and clinical studies. *Transplant Proc* 1990;22:52-56
- 47) Undre NA, Stevenson P, Schafer A. Pharmacokinetics of tacrolimus: Clinically relevant aspects. *Transplant Proc* 1999;31:21-24

- 48) Shen WW. The metabolism of psychoactive drugs: A review of enzymatic biotransformation and inhibition. *Biol Psychiatry* 1997;41: 814-826
- 49) Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet J, Besse T. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus(FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: A report of the European tacrolimus multicenter renal study group. *Transplantation* 1997;64: 436-443
- 50) Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 kidney transplant study group. *Transplantation* 1997;63: 977-983
- 51) Weir MR, Fink JC. Risk for posttransplant diabetes mellitus with current immunosuppressive medications. *Am J Kidney Diseases* 1999;34:1-13
- 52) Diethard P, Ute B, Markus k, Manfred D. Cardioprotective effects of the serine protease inhibitor aprotinin after regional ischemia and reperfusion injury. *Jour. Thoracic and Card.Surg.* 2002;124:5:942949
- 53) Chiara M, Daniela G, Maria M, Shiela L. Further evidence that melanocortins prevent myocardial reperfusion injury by activating melanocortin MC3 receptors. *Eur. Jour.Pharm.* 2003;447:227-234
- 54) Klein HH, Pushmann S, Shaper J, Schaper W. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Arch Pathol. Anat.*1981;393:287-297
- 55) Wakabayashi H, Karasawa Y, Tanaka S, Kokudo Y. The effect of FK506 on warm ischemia and reperfusion injury in the rat liver. *Surg Today.* 1994;24:994-1002
- 56) Sark MF, Zetti GM, Farghali H, Nalessic FH. FK506 ameliorates the hepatic injury associated with ischemia and reperfusion in rats.
- 57) Zini R, Simon N, Morin C, Tillement JR. Tacrolimus decreases in vitro oxidative phosphorylation of mitochondria from rat forebrain. *Life Sci.* 1998;63:257368
- 58) Dhar DK, Takemoto Y, Uchida M, Ono T. FK506 maintains cellular calcium homeostasis in ischemia-reperfusion injury of the canine liver. *J Surg. Res* 1996;60:142-146