

Anestezi Uygulanan Sıçanda Miyokardiyal İskemi ve Önkoşullamada Oluşan Aritmiler Üzerine Akut ve Kronik Eritropoietinin Etkileri

Effects of Acute and Chronic Administration of Erythropoietin on Arrhythmias Induced by Myocardial Ischemia and Preconditioning in Anesthetized Rats

Şeniz Demiryürek¹, Ali Fuad Kara², Cahit Bağcı¹, İbrahim Sarı³, Mehmet Tarakçıoğlu⁴
A. Tuncay Demiryürek²

¹Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı,

²Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

³Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

⁴Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Özet

Eritropoietin, eritropoiesiste hormonal stimülör olarak rol oynayan bir sitokindir. Rekombinant insan eritropoietini, kronik hemodiyaliz olan hastalarda anemi düzeltmek için kullanılır. İskemik önkoşullama, kısa süreli iskemiyi daha sonraki letal iskemiyeye karşı korumayı indükleyen güçlü bir endojen koruyucu fenomendir. Yoğun araştırmalara karşın, iskemik önkoşullamanın moleküler mekanizması henüz tam olarak belirli değildir. İskemi veya hipoksi uygulamasından sonra oluştuğundan, eritropoietinin iskemik önkoşullamanın diğer bir endojen mediyatörü olduğu ileri sürülmüştür. Kardiyoprotektif etkisini araştırmak için, bu çalışmada anesteziye sıçanlarda oklüzyon aritmileri üzerinde akut ve kronik eritropoietin uygulamasının etkileri incelenmiştir. Eritropoietin, ventriküler taşikardiye azaltması, ventriküler fibrilasyonu ortadan kaldırması ve aritmi skorunu düşürmesi ile belirgin antiaritmik etki oluşturdu. Bizim sonuçlarımız, eritropoietinin kendisinin önkoşullama oluşturabileceğini, iskemik ve karbakol ile indüklenen farmakolojik önkoşullamanın kardiyoprotektif etkilerini koruyabileceğini göstermiştir. Kronik eritropoietin uygulaması, hipertansiyon oluşturdu ve bu etki nitrik oksit sentaz inhibitörü L-NAME varlığında belirgin olarak arttı. Fakat, L-NAME, anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kardiyoprotektif etkilerini inhibe etmedi. L-NAME ile plazma NO düzeyleri anlamlı olarak azalmasına karşın, kronik eritropoietin NO düzeylerinde artmaya yol açtı. Eritropoietin, oksijen radikallerini temizleyen enzimleri upregüle ederek de koruyucu etki oluşturabilir. Dolayısıyla, bu çalışmada eritrosit süperoksit dismutaz enzim düzeyleri ölçüldü fakat anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bütün gruplarda malondialdehit ve laktat düzeylerinde belirgin azalma vardı. Bu sonuçlar, eritropoietinin kalbi ventriküler aritmilere karşı koruyabildiğini ve kardiyak önkoşullama oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Aritmiler, Eritropoietin, İskemi, Karbakol, Nitrik oksit, Önkoşullama

Abstract

Erythropoietin is a cytokine that is commonly associated with its role as a hormonal stimulator of erythropoiesis. Recombinant human erythropoietin is used to correct anemia in patients undergoing chronic hemodialysis. Ischemic preconditioning is a powerful endogenous protective phenomenon in which brief episodes of ischemia induce protection against future, lethal ischemia. Despite the intensive investigation, the exact molecular mechanisms underlying ischemic preconditioning are not well known. Erythropoietin has been suggested as another endogenous mediator of ischemic preconditioning since it is produced after ischemic or hypoxic insults. In order to determine its cardioprotective effects, we examined the effects of acute and chronic administration of erythropoietin on occlusion-induced arrhythmias in anesthetized rats in the present study. Erythropoietin produced marked antiarrhythmic effects with reduction in ventricular tachycardia, abolition of ventricular fibrillation and attenuation of arrhythmia scores. Our results showed that erythropoietin itself was able to induce preconditioning and preserved the cardioprotective effects of ischemic and carbachol-induced pharmacological preconditioning. Chronic erythropoietin administration generated hypertension and this effect was markedly augmented in the presence of NO synthase inhibitor L-NAME. However, L-NAME did not inhibit the cardioprotective effects of erythropoietin in anesthetized rats. Although plasma NO levels was markedly reduced with L-NAME, chronic erythropoietin led to an increased in NO levels. Erythropoietin could also act protectively by upregulating enzymes that scavenge oxygen radicals. Therefore, erythrocyte superoxide dismutase enzyme levels were measured in the present study, but no changes were observed. There were marked inhibitions in malondialdehyde and lactate levels in all groups when compared to control. These results suggest that erythropoietin is able to protect heart against ventricular arrhythmias and can produce cardiac preconditioning.

Keywords: Arrhythmias, Erythropoietin, Ischemia, Carbachol, Nitric oxide, Preconditioning

GİRİŞ

İskemik önkoşullama, tek veya tekrarlayan kısa süreli iskemik periyodun daha uzun süreli iskemik periyodlarda organ, doku ve hücrelerde nekroz gelişimine karşı belirgin bir direnç oluşturması ile gerçekleşen koruyucu bir mekanizmadır. İskemik önkoşullama, ilk kez Murry ve arkadaşları tarafından 1986 yılında köpek kalbinde gösterilmiştir ve bu çalışmadan sonra önkoşullama ile ilgili oldukça fazla araştırma yapılmıştır (1). Bu mekanizmanın, insanlarda da bulunduğu yapılan bazı klinik çalışmalarda ortaya konmuştur. Miyokardiyal önkoşullama, kalbin daha uzun süreli bir iskemiyeye karşı oluşturduğu koruyucu mekanizmadır ve mediyatörleri ile hücre sel sinyal ileti mekanizmaları halen araştırılmaktadır. Kardiyak iskemik önkoşullama ile görülen koruma, şimdiki kadar gözlenen en kuvvetli infarkt oluşumunu önleyici etkidir. İskemik önkoşullamanın miyokarddaki en önemli özelliği, koroner arter oklüzyonuna bağlı olarak gelişen nekrozun azalmasını sağlamasıdır. Önkoşullama, iskemi ve reperfüzyonun yol açtığı endotel disfonksiyonuna karşı da korunma sağlamakta (2) ve enerji bağımlı hücre ölümünü (apoptozis) azaltmaktadır (3). Önkoşullamanın, iskemiyin erken dönemlerinde enerji metabolizmasını yavaşlattığı, aritmileri azalttığı, post-iskemik disfonksiyonun iyileşmesini geliştirdiği, izole atrial trabekül kaslarında post-iskemik gerimi artırdığı ve iskemiyin yanısıra hipoksik hasara karşı da direnci artırdığı gösterilmiştir (4,5). Önkoşullamanın hücre sel sinyal ileti mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yoğun çalışmalar sürmektedir (6). Adenozin, bradikinin ve opioid reseptörlerinin aynı anda aktivasyonları ve kısa süreli iskemik-reperfüzyon boyunca oksijen radikallerinin ortama salınmasını iskemik önkoşullamayı tetiklemeye katkıda bulunur (7). İnsanlarda iskemik önkoşullama ile ilgili çalışmaların sayısı sınırlı olmakla beraber farklı organlardaki koruyucu etkisi gösterilmiştir (8).

Eritropoietin (epoetin), eritropoiesisin hormonal stimülör olarak rol oynayan bir sitokindir. Hipoksi, bir glikoprotein hormon olan eritropoietin salgılanmasını düzenleyen başlıca faktördür (9) ve hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktörü (HIF-1) eritropoietin geninin oksijen bağımlı düzenlenmesini kontrol eder (10-12).

Eritropoietin reseptörleri, eritroid hücreler dışında vasküler endotel hücrelerinde (13,14) ve kalpte (15,16) de bulunmaktadır. İnsanlarda akut hipoksik beyin hasarında vasküler eritropoietin ekspresyonu artmaktadır (17). Hipoksiye yanıt olarak başlıca böbreklerden sekrete edilen ve bir glikoprotein hormon olan eritropoietinin serebral iskemik hasara karşı koruyucu etki oluşturduğu (17,18) ve nöronal iskemik önkoşullamada rolü olduğu gösterilmiştir (19,20). Yapılan çalışmalar, eritropoietinin koruyucu etkisinin retina (21), iskelet kası (22) ve miyokardiyumda (23,24) da olduğu gösterilmiştir. Eritropoietinin tavşan kalbinde infarkt alanını azalttığı, bu etkide kardiyak fibroblastların rolü olduğu bildirilmiştir (24). Eritropoietin ile oluşan korumanın artmış olan hematokritten bağımsız olduğu, miyosit apoptozisini inhibe ettiği gösterilmiştir (23). Bu çalışmada, anestezi edilmiş sıçanlarda koroner arter oklüzyonu ile iskelem oluşturulması ve iskemiyle oluşan aritmiler üzerinde eritropoietinin etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca önkoşullama deneylerinde de ventriküler aritmiler üzerinde eritropoietinin etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Deney hayvanları

Deneylerde Gaziantep Üniversitesi hayvan bakım ve üretim ünitesinde üretilen, $21\pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodundaki aydınlatma ile senkronize edilen standart laboratuvar hayvan yemi ve istedikleri kadar içebilecekleri musluk suyu ile beslenen 200-320 g ağırlığındaki Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Bu çalışma için Gaziantep Üniversitesi Yerel Etik Kurulu onayı alınmıştır.

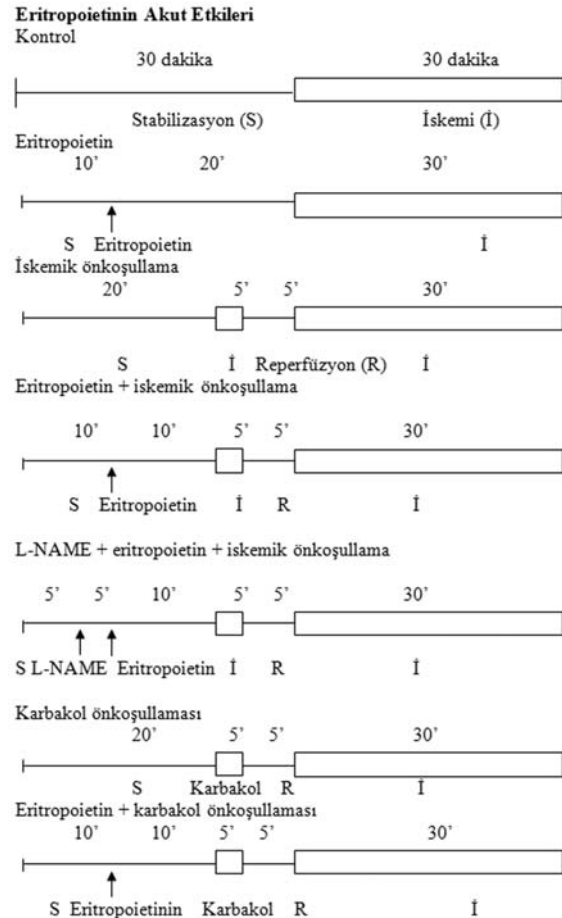
Yöntem

Erkek sıçanlar tiyopental sodyum 120 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verilerek anesteziye edilmiş ve anestezi gerektiğinde ilave tiyopental sodyum (~ 10 mg/kg, i.v.) enjeksiyonları ile devam ettirilmiştir. Cilt insizyonunun ardından bez ve yağ dokusu lateralize edilerek kas tabakaları kesilmiş ve trakea izole edilmiştir. Trakea insizyonu ile endotrakeal tüp yerleştirilmiştir. İlaçların i.v. olarak uygulanabilmesi için sol juguler ven kanüle edilmiş ve kanülün bağlı olduğu enjektör infüzyon pompasına yerleştirilmiştir. Sol karotid arter kanülasyonu yapılmış ve sisteme bağlı kan basıncı transduseri (BPT300 Blood pressure transducer) aracılığıyla ortalama arteriyel kan basıncı sürekli olarak kaydedilmiştir. Kanülasyon öncesinde kanül heparin ile yıkanmıştır. Sıçanların standart II. derivasyon EKG'si subkütan elektrodlarla bilgisayar bağlantılı Biopac MP30 Data Acquisition Sistemi aracılığıyla sürekli olarak ölçülmüş ve bilgisayara kaydedilmiştir. Sisteme bağlı rektal sıcaklık probu (TSD202A) anüsten yaklaşık 3 cm ilerletilerek yerleştirilmiş ve vücut sıcaklığı deney süresince izlenmiş ve ısıtıcı lamba ile $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de sabit olarak tutulmaya çalışılmıştır. Sıçanlara i.v. 200 IU/kg dozda heparin verilmiş ve trakea kanülü solunum pompasına (SAR-830, IITC Life Science, Kaliforniya, ABD) bağlanmıştır. Anesteziye sıçanlar solunum pompası (70 kez/dk) (80) aracılığıyla oda havası ile solutulmuştur. Sternumun yaklaşık 3 mm lateralinden olmak üzere 4. ve 5. kostalar sol torakotomi yapılarak göğüs kafesi açılmıştır. Perikardiyum uzaklaştırılmış, toraks insizyonunun iki ucu pens yardımı ile genişletilerek abdomene doğru basınç oluşturulmuş ve kalp nazikçe göğüs kafesi dışına çıkartılmıştır.

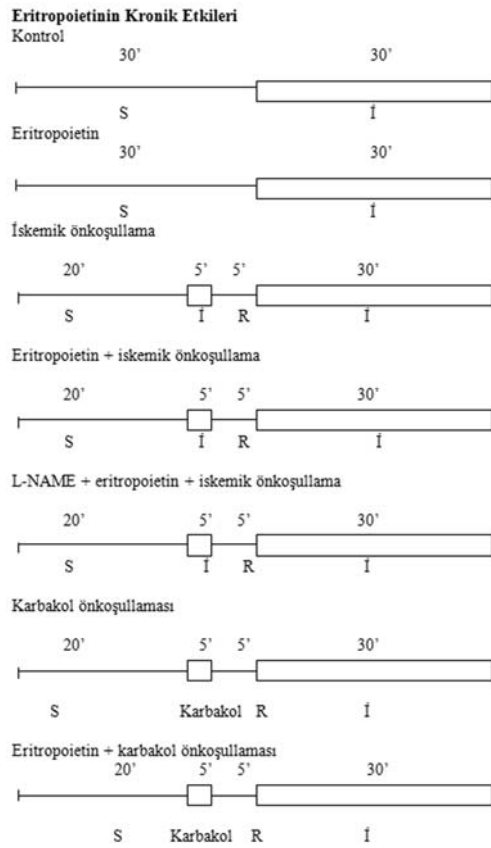
Sol inen koroner arter (left anterior descending, LAD) orjinine yakın bölgeden 10 mm'lik yuvarlak uçlu atravmatik 6/0 ipek ile sütüre edildikten sonra kalp derhal toraksa geri yerleştirilmiştir. İpek sütür materyalinin iki ucu bir polietilen borudan (10 mm uzunluğunda, 1 mm iç çapında) içerisinden geçirilerek sıkıştırılmadan bırakılmıştır. Bu aşamada cerrahi işlemlerle belirgin aritmi oluşan veya kan basıncı 60 mmHg'nin altında olacak şekilde kalıcı bir düşme gözlenen hayvanlar çalışma dışı bırakılmıştır. 15 dakikalık stabilizasyon periyodundan sonra koroner arter etrafına yerleştirilen iplik bir klips yardımıyla sıkıştırılmış ve 30 dakika süreyle geçici bölgesel iskelem yapılmıştır. İplerin gevşetilmesi ve borunun çıkarılması ile reperfüzyon yapılmıştır. Arteriyel kan basıncında iskelem öncesi değerlerle karşılaştırıldığında %20-30'luk azalma olması, başarılı bir oklüzyon yapıldığını kanıtlamaktadır. Reperfüzyonda arteriyel kan basıncının iskemi öncesi değerlere dönmesi de reperfüzyonun başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir. Stabilizasyon döneminin ardından deney protokolüne geçilmiştir.

İskelem ve önkoşullama oluşturulması

Bu çalışmada kullanılan deney protokolleri Şekil 1'de gösterilmiştir. 30 dk'lık stabilizasyon periyodunun ardından plastik tüp içerisinden geçirilmiş olan iplik bir klips yardımı ile sıkıştırılarak iskemi meydana getirilmiştir. İskelem ile birlikte arteriyel kan basıncında %20-30 civarındaki düşüş başarılı bir oklüzyonun göstergesi olarak kabul edilmiştir (25).



Şekil 1. Deneysel protokol



20 dk'lık dengeleme periyodunun ardından 5 dk iskemi periyodunu izleyen 5 dk'lık reperfüzyon periyodu ile iskemik önkoşullama oluşturulmuş ve sonra 30 dk'lık iskemi uygulanmıştır. Reperfüzyonda arteryel kan basıncının iskemi öncesindeki değerine yükselmesi başarılı bir reperfüzyonun göstergesi olarak kabul edilmiştir.

İlaç uygulaması

Eritropoietin (Eprex flakon, Santa Farma, İstanbul) daha önce sıçanlarda akut etki için kullanılan tek doz (400 U/kg) (26) ve kronik etki için uygulanan dozda (100 U/kg, sc, her iki günde bir 15 gün süreyle) (27) olmak üzere iki şekilde uygulanmıştır. Karbakol ile önkoşullamada daha önce sıçanlarda önkoşullama oluşturduğu bildirilen 4 µg/kg/dakika (28) karbakol dozu kullanılmıştır.

Deneysel protokol

Bütün deneylerde cerrahi işlemlerin bitiminin ardından deney protokollerine geçiş öncesi 15 dk beklenilmiştir (Şekil 1). Kontrol grubunda, kalpler 30 dk'lık stabilizasyon sonrası 30 dk LAD koroner arter oklüzyonuna maruz bırakılmıştır. Eritropoietinin akut uygulamasının iskemi aritmileri üzerine etkilerinin araştırıldığı deneylerde, oklüzyondan 20 dk önce 400 U/kg dozunda i.v. bolus şeklinde eritropoietin uygulanmış ve bunun iskemi aritmileri üzerindeki etkileri 30 dk boyunca incelenmiştir. İskemik önkoşullama grubunda, 20 dk'lık stabilizasyon periyodundan sonra 5 dk iskemi ve ardından 5 dk reperfüzyon ile önkoşullama yapılmış sonrasında 30 dk'lık iskemi uygulanmıştır.

Eritropoietinin önkoşullama üzerindeki etkilerinin araştırıldığı deneylerde iskemik önkoşullamadan 10 dk önce eritropoietin 400 U/kg dozunda i.v. bolus şeklinde uygulanmış ve iskemik önkoşullamanın ardından oklüzyon yapılarak 30 dk'lık iskemi döneminde aritmiler incelenmiştir (eritropoietin + iskemik önkoşullama). L-NAME'in eritropoietin + iskemik önkoşullama üzerine olan etkilerinin incelenmesi de eritropoietin uygulanmasından 5 dk önce L-NAME 10 mg/kg (29) dozunda i.v. bolus şeklinde uygulanarak araştırılmıştır (L-NAME + eritropoietin + iskemik önkoşullama). Farmakolojik önkoşullama deneylerinde, 20 dk'lık stabilizasyon periyodunun ardından karbakol 5 dk süreyle infüzyon tarzında 4 mg/kg/dk dozunda uygulanmış ve sonrasında 5 dk beklenilmiş ve ardından 30 dk'lık oklüzyon yapılmıştır (karakol önkoşullaması). Eritropoietinin karbakol önkoşullaması üzerindeki etkileri, eritropoietinin 400 U/kg dozunda i.v. bolus şeklinde karbakol infüzyonundan 10 dk önce i.v bolus olarak verilmesi ile incelenmiştir.

Eritropoietinin kronik uygulamasının iskemi aritmileri üzerine etkilerinin araştırıldığı deneylerde 100 U/kg, sc, her iki günde bir 15 gün süreyle eritropoietin uygulanmış, ertesi gün 30 dk süreyle uygulanan iskemi aritmileri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kontrol grubunda sıçanlara her iki günde bir 15 gün süreyle eritropoietin dozu için hesaplanan hacimlerde serum fizyolojik uygulaması yapılmıştır. İskemik önkoşullama grubunda sıçanlara her iki günde bir 15 gün süreyle eritropoietin dozu için hesaplanan hacimlerde serum fizyolojik uygulaması yapılmış, ertesi gün 20 dk'lık stabilizasyon periyodundan sonra 5 dk iskemi ve ardından 5 dk reperfüzyon ile önkoşullama yapılmış sonrasında 30 dk'lık iskemi uygulanmıştır. Kronik eritropoietin uygulamasının önkoşullama üzerindeki etkilerinin araştırıldığı deneylerde, her iki günde bir 15 gün süreyle eritropoietin uygulanmış ve ertesi gün iskemik önkoşullamanın ardından oklüzyon yapılarak 30 dk'lık iskemi döneminde aritmiler incelenmiştir (eritropoietin + iskemik önkoşullama). L-NAME'in kronik eritropoietin + iskemik önkoşullama üzerine olan etkilerinin incelenmesinde eritropoietin + iskemik önkoşullama grubundaki protokol uygulanmış ve 15 gün süreyle L-NAME 10 mg/kg/gün (30) dozunda i.p. şeklinde uygulanarak L-NAME'in etkileri araştırılmıştır (L-NAME + eritropoietin + iskemik önkoşullama). Farmakolojik önkoşullama deneylerinde sıçanlara her iki günde bir 15 gün süreyle eritropoietin dozu için hesaplanan hacimlerde serum fizyolojik uygulaması yapılmış, ertesi gün 20 dk'lık stabilizasyon periyodunun ardından karbakol 5 dk süreyle infüzyon tarzında 4 mg/kg/dk dozunda uygulanmış ve sonrasında 5 dk beklenilmiş ve ardından 30 dk'lık oklüzyon yapılmıştır (karakol önkoşullaması). Kronik eritropoietinin karbakol önkoşullaması üzerindeki etkileri, eritropoietinin her iki günde bir 15 gün süreyle uygulanmasından sonra ertesi gün 5 dk karbakol infüzyonu ve sonrasında 5 dk bekleme periyodu ve ardından 30 dk'lık oklüzyon yapılarak incelenmiştir (eritropoietin + karbakol önkoşullaması).

Ölçülen parametreler

Deney boyunca arteryel kan basıncı, rektal sıcaklık, standart EKG verileri bilgisayar ortamında sürekli olarak kaydedilmiştir. Bütün gruplarda kalp atım hızı EKG'den belirlenmiş ve aritmiler Lambeth kurallarına göre (31) ventriküler taşikardi (VT), ventriküler fibrilasyon (VF), ve ventriküler ektopik atım (VEA) şeklinde değerlendirilmiştir.

VEA, birbirinden ayrı ve belirlenebilir prematüre QRS kompleksi olarak tanımlanmıştır. VT, dört veya daha fazla ardışık VEA olarak, VF ise normal EKG'den daha küçük amplitüdü, kaotik aktivite gösteren EKG şeklinde belirlenmiştir. Bigemini gibi kompleks formlar ise VEA'lar içerisinde değerlendirilmiştir. Sıçanlarda VF kalıcı olabilir veya spontan olarak normal sinüs ritmine dönebilir. Başlangıcından itibaren 5 dk içerisinde normal sinüs ritmine dönmeyen irreversibil VF olarak kabul edilmiştir. İlk aritmi başlama zamanı ve aritmilerin süresi de kaydedilmiştir. Aritmi skoru daha önceden yayınlanan skalaya göre hesaplanmıştır (32):

- 0- 30 dakikalık iskemi süresince VT veya VF'nin olmaması,
- 0-50 VEA olması,
- 1- Sadece 50-500 VEA,
- 2- 500'den fazla VEA veya bir spontan olarak reversibil VT veya VF,
- 3- 2-30 arasında spontan olarak reversibil VT ve/veya VF görülmesi,
- 4- 30'dan fazla sayıda spontan olarak reversibil VT ve/veya VF görülmesi,
- 5- İrreversibil VF görülmesi.

Biyokimyasal analizler

Deneyel protokollerin bitiminin ardından sağ ventrikülden kan örneği alınmıştır. Alınan kan örnekleri 5000 rpm'de, 4°C'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiş, plazmaları ayrılmış ve -40°C'de muhafaza edilmiştir.

Laktat ölçümü

Laktat ölçümü için kan örnekleri sodyum florür/potasyum oksalat içeren tüplere alınarak santrifüj edilmiştir. Plazmadaki laktat konsantrasyonu ölçümü Vitros LAC Kiti (Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Burada ölçülebilen en düşük plazma laktat düzeyi 0.5 mM'dir.

Malondialdehid (MDA) ölçümü

Plazma MDA düzeyi ölçümü daha önce belirtilen yöntemle ölçülmüştür (33). MDA oluşumu, tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddelerin (TBARS) ölçümü ile değerlendirilmiştir. Sodyum dodesil sülfat (% 8.1) 0.2 ml, % 20'lik asetik asit solüsyonundan 1.5 ml, % 0.8 TBA (pH 3.5)'dan 1.5 ml, 90 mM butillenmiş hidroksitoluenden 0.1 ml, (in vitro TBARS oluşumunu önlemek için) ve 0.6 ml distile su eklenmesiyle; n-butanol ve piridin içine ekstrakte edilen bir kromojenik ürün elde edildi. Sonuçlar spektrofotometrede 532 nm'de okundu ve nmol/ml olarak gösterildi. TBARS'ın miktarı; 1.1.3.3-tetrametoksipropan standardı kullanılarak MDA eşdeğeri olarak hesaplandı.

NO ölçümü

Plazma örneklerini deproteinize etmek için, 1:2 v/v oranında soğutulmuş (0°C) absolu etanol eklendi ve vorteksledi. Örnekler 30 dk 0°C'de inkübe edildikten sonra 10 000 g de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant, 95°C'deki vanadyum (III) – HCl içine enjekte edilmiş ve nitrat, nitrit ve S-nitroso bileşiklerinin NO'ya indirgenmesi sonucu oluşan NO'nun ölçümü için kullanıldı. NO ile ozon arasındaki gaz fazı kemiluminesans reaksiyonu ile NOA 280i (Sievers Instruments, Boulder, CO, ABD) analizörü kullanılarak NO ölçümü yapıldı.

SOD düzeyleri

Deney sonunda EDTA'lı tüplere alınan kandan eritrosit paketi hazırlandı ve üretici firmanın tarif ettiği şekilde SOD düzeyleri kit kullanılarak belirlendi (RANSOD, Randox, İrlanda).

İmmunohistokimyasal analiz

Apoptozis

Deney sonunda çıkarılan kalpler %10 formalin solüsyonuna konularak patolojiye gönderildi ve üretici firmanın tarif ettiği şekilde kit kullanılarak belirlendi (DeadEnd, Colorimetric TUNEL System, Promega, Madison, WI, ABD).

İstatistiksel analiz

Sonuçlar ortalama ortalamanın standart hatası olarak veya % insidans olarak verilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad InStat (version 3.05, GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. İki grup arasında karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış, anlamlılık tesbit edildiğinde analize Student-Newman-Keuls testi ile devam edilmiştir. Ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyon insidanslarındaki anlamlı farklılığı saptamada Fisher'in kesin ki kare testi kullanılmıştır. Aritmi skorlarının istatistiksel değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Bütün testlerde 0.05'den küçük P değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Hemodinamik parametreler

Yapılan deneylerde ölçülen hemodinamik parametrelerle ilgili elde edilen sonuçlar Tablo 1-4'de sunulmuştur. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin akut uygulaması ile yapılan deney gruplarında ölçülen ortalama arteriyel kan basıncı (mm Hg) ve kalp atım hızı (atım/dk) değerleri Tablo 1-2'de verilmektedir. Başlangıç stabilizasyon dönemi ortalama kan basıncı değerleri arasında istatistiksel analiz yapıldığında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Yapılan kontrol grubu deneylerinde ortalama arteriyel kan basıncının koroner arter oklüzyonundan sonra belirgin olarak düşmesi başarılı bir iskemi yapıldığını göstermektedir. İskemik önkoşullama grubunda hem 5 dakikalık hem de 30 dakikalık koroner arter oklüzyonu ile kan basıncı belirgin olarak düşmüştür. L-NAME uygulaması anlamlı olarak kan basıncı artışına yol açmıştır. Karbakol önkoşullamasında da 5 dakikalık karbakol infüzyonu ve sonrasında dönemlerde kan basıncı düşük olarak seyretmiştir. Eritropoietin bu düşüşü etkilememiştir (Tablo 1).

Kalp atım hızları değerlendirildiğinde, stabilizasyon döneminde gruplar arasında belirgin bir farklılık bulunmamaktadır. Karbakol uygulamasında kalp atım hızında belirgin azalma olduğu gözlenirken diğer gruplarda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Tablo 2). Kronik eritropoietin uygulaması kan basıncında artışlara yol açmıştır fakat gruplar arasında istatistiksel değerlendirme yapıldığında bu anlamlılık düzeylerine erişmemiştir. Anlamlı kan basıncı artışı L-NAME uygulanan grupta saptanmıştır (Tablo 3). Kronik eritropoietin ile birlikte iskemik önkoşullama uygulanan gruplarda koroner oklüzyonla oluşan kan basıncındaki anlamlı düşme ortadan kalkmıştır.

Tablo 1. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin akut uygulaması ile yapılan deney gruplarında ölçülen ortalama arteriyel kan basıncı (mm Hg) değerleri.

	n	Stabilizasyon#	i.v. bolus eritropoietin		Onkoşullama veya ilaç infüzyonu		Reperfüzyon veya infüzyonsuz dönem		İskemi	
			1. dk	20. dk	1. dk	5. dk	1. dk	5. dk	1. dk	30. dk
Kontrol	11	145±5	-	-	-	-	-	-	114±3*	104±4*
Eritropoietin (400 U/kg, iv)	6	141±8	146±9	139±7	-	-	-	-	113±8*	104±8*
İskemik önkoşullama	8	141±4	-	-	112±5*	104±7*	118±4*	126±4	104±7*	94±6*
Eritropoietin (400 U/kg, iv) + iskemik önkoşullama	6	135±4	130±6	120±4+	111±4*	101±4*	113±8*	123±6	100±4*	85±3*
L-NAME (10 mg/kg, iv) + Eritropoietin (400 U/kg, iv) + iskemik önkoşullama	6	148±7	204±9*	191±10*	161±9	145±10	162±13	169±12	139±6	146±11
Karbakol önkoşullaması	8	145±5	-	-	118±9*	109±7*	113±7*	117±4*	103±7*	90±7*
Eritropoietin (400 U/kg, iv) + karbakol önkoşullaması	6	138±6	136±10	128±12+	119±11*	100±3*	103±4*	100±5*	94±4*	84±5*

İskemi veya ilaç uygulamasından 5 dk önce.

+ i.v. bolus eritropoietin uygulamasından 10 dk sonra.

* P<0.05 stabilizasyon dönemi değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı.

Tablo 2. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin akut uygulaması ile yapılan deney gruplarında ölçülen kalp atım hızı (atım/dk) değerleri.

	n	Stabilizasyon#	i.v. bolus eritropoietin		Onkoşullama veya ilaç infüzyonu		Reperfüzyon veya infüzyonsuz dönem		İskemi	
			1. dk	20. dk	1. dk	5. dk	1. dk	5. dk	1. dk	30. dk
Kontrol	11	382±8	-	-	-	-	-	-	393±7	382±12
Eritropoietin (400 U/kg, iv)	6	376±13	382±14	369±9	-	-	-	-	365±12	368±14
İskemik önkoşullama	8	369±13	-	-	353±7	361±11	373±13	386±11	383±9	376±8
Eritropoietin (400 U/kg, iv) + iskemik önkoşullama	6	364±7	360±5	379±19	368±6	352±14	383±10	396±15	376±9	354±13
L-NAME (10 mg/kg, iv) + Eritropoietin (400 U/kg, iv) + iskemik önkoşullama	6	381±15	335±5	352±11	344±3	388±17	339±7	372±10	366±9	374±11
Karbakol önkoşullaması	8	397±7	-	-	370±11	218±20*	220±21*	305±13*	310±10*	317±20*
Eritropoietin (400 U/kg, iv) + karbakol önkoşullaması	6	351±12	352±11	367±15+	350±20	248±9*	259±23*	298±21*	313±26*	319±20*

İskemi veya ilaç uygulamasından 5 dk önce.

+ i.v. bolus eritropoietin uygulamasından 10 dk sonra.

* P<0.05 stabilizasyon dönemi değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı.

Tablo 3. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kronik uygulaması ile yapılan deney gruplarında ölçülen ortalama arteriyel kan basıncı (mm Hg) değerleri.

	n	Stabilizasyon#	Onkoşullama veya ilaç infüzyonu		Reperfüzyon veya infüzyonsuz dönem		İskemi	
			1. dk	5. dk	1. dk	5. dk	1. dk	30. dk
Kontrol	10	147±7	-	-	-	-	122±5*	106±7*
Eritropoietin (100 U/kg, sc)	7	161±5	-	-	-	-	137±5*	135±8*
İskemik önkoşullama	8	139±4	116±6*	111±8*	122±3	125±2	112±5*	113±7*
Eritropoietin (100 U/kg, sc) + iskemik önkoşullama	6	164±7	140±5	149±7	148±6	156±6	140±4	142±4
L-NAME (10 mg/kg, ip) + Eritropoietin (100 U/kg, sc) + iskemik önkoşullama	6	169±10*	143±7	156±12	150±8	150±8	136±9	130±14
Karbakol önkoşullaması	8	142±5	110±8*	101±8*	106±9*	110±5*	96±6*	86±6*
Eritropoietin (100 U/kg, sc) + karbakol önkoşullaması	6	162±3	157±5	117±5*	120±5*	134±5*	123±6*	130±9*

İskemi veya ilaç uygulamasından 5 dk önce.

*P<0.05 stabilizasyon dönemi değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı.

**P<0.05 iskemik önkoşullama değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı.

Tablo 4. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kronik uygulaması ile yapılan deney gruplarında ölçülen kalp atım hızı (atım/dk) değerleri.

	n	Stabilizasyon#	Önkoşullama veya ilaç infüzyonu		Reperfüzyon veya infüzyonsuz dönem		İskemi	
			1. dk	5. dk	1. dk	5. dk	1. dk	30. dk
Kontrol	10	381±9	-	-	-	-	410±11	382±17
Eritropoietin (100 U/kg, sc)	7	362±15	-	-	-	-	367±11	378±10
İskemik önkoşullama	8	373±15	355±9	348±10	366±14	379±12	376±11	372±16
Eritropoietin (100 U/kg, sc) + iskemik önkoşullama	6	377±13	367±15	363±11	402±18	365±10	363±8	373±10
L-NAME (10 mg/kg, ip) + Eritropoietin (100 U/kg, sc) + iskemik önkoşullama	6	406±15	399±18	392±24	438±13	409±13	406±17	371±18
Karbakol önkoşullaması	8	397±11	365±12	197±17*	205±20*	291±12*	274±24*	291±29*
Eritropoietin (100 U/kg, sc) + karbakol önkoşullaması	6	417±15	414±16	207±31*	216±27*	329±14*	311±22*	330±9*

İskemi veya ilaç uygulamasından 5 dk önce.

*P<0.05 stabilizasyon dönemi değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı.

Karbakol uygulaması hem kan basıncında hem de kalp atım hızında belirgin düşmeler oluşturmuştur. Diğer gruplarda kalp atım hızlarında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir (Tablo 4).

Aritmi parametreleri

Yapılan deneylerde oluşan aritmilerle ilgili elde edilen sonuçlar Tablo 5-8'de sunulmuştur. Yapılan deneylerde kontrol grubunda irreversibil ventriküler fibrilasyon gözlenmezken tüm sıçanlar VT'ye girmiştir. Eritropoietinin akut uygulandığı gruplarla önkoşullama gruplarında kontrol ile karşılaştırıldığında ventriküler ektoşik atım sayısı ve %VT anlamlı olarak azalmıştır. Karbakol önkoşullamasında %VT azalmasına karşın anlamlı düzeye erişmemiştir. VF sadece kontrol grubunda 3 sıçanda görülmüştür (Tablo 5).

Yapılan deneylerde, aritmi başlama zamanı da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gecikmiş fakat sadece L-NAME + eritropoietin + iskemik önkoşullama grubunda anlamlı gecikme bulunmuştur. VT sürelerinde belirgin bir değişiklik saptanmazken, kontrol grubu dışında VF görülmediğinden gruplarda anlamlı azalma hesaplanmıştır. Aritmi skoru da anlamlı olarak azalmış, en belirgin azalma iskemik önkoşullama grubunda gözlenmiştir (Tablo 6).

Tablo 5. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin akut uygulaması ile yapılan deney gruplarında oluşan aritmiler.

	n	Stabilizasyon#	Önkoşullama veya ilaç infüzyonu		Reperfüzyon veya infüzyonsuz dönem		İskemi	
			1. dk	5. dk	1. dk	5. dk	1. dk	30. dk
Kontrol	10	381±9	-	-	-	-	410±11	382±17
Eritropoietin (100 U/kg, sc)	7	362±15	-	-	-	-	367±11	378±10
İskemik önkoşullama	8	373±15	355±9	348±10	366±14	379±12	376±11	372±16
Eritropoietin (100 U/kg, sc) + iskemik önkoşullama	6	377±13	367±15	363±11	402±18	365±10	363±8	373±10
L-NAME (10 mg/kg, ip) + Eritropoietin (100 U/kg, sc) + iskemik önkoşullama	6	406±15	399±18	392±24	438±13	409±13	406±17	371±18
Karbakol önkoşullaması	8	397±11	365±12	197±17*	205±20*	291±12*	274±24*	291±29*
Eritropoietin (100 U/kg, sc) + karbakol önkoşullaması	6	417±15	414±16	207±31*	216±27*	329±14*	311±22*	330±9*

İskemi veya ilaç uygulamasından 5 dk önce.

*P<0.05 stabilizasyon dönemi değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı.

Tablo 6. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin akut uygulaması ile yapılan deney gruplarında oluşan aritmi süreleri ve aritmi skoru.

	n	Aritmi Başlama Zamanı (saniye)	VT süresi (saniye)	VF süresi (saniye)	Aritmi Skoru
Kontrol	11	27.5±5.4	70.2±20.6	18.0±5.7	3.2±0.1
Eritropoietin (400 U/kg, iv)	6	230.5±85.8	28.7±10.9	0*	1.5±0.6*
İskemik önkoşullama	8	214.9±77.3	2.5±0.5	0*	0.5±0.3*
Eritropoietin (400 U/kg, iv) + iskemik önkoşullama	6	145.5±28.4	0	0*	0.2±0.2*
L-NAME (10 mg/kg, iv) + Eritropoietin (400 U/kg, iv) + iskemik önkoşullama	6	291.8±74.1*	0	0*	0.2±0.2*
Karbakol önkoşullaması	8	139.8±66.7	52.4±32.4	0*	2.0±0.3*
Eritropoietin (400 U/kg, iv) + karbakol önkoşullaması	6	118.8±33.7	42.7±9.7	0*	1.8±0.4*

*P<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı.

Eritropoietinin kronik uygulandığı gruplarda kontrol ile karşılaştırıldığında total ventriküler ektoptik atım sayısının belirgin olarak azaldığı görülmüştür. VT insidansı ise sadece iskemik önkoşullama uygulanan gruplarda belirgin olarak azalmıştır. VF ise sadece kontrolde gözlenmiştir (Tablo 7). Aritmi başlama zamanı ve VT süresi sadece iskemik önkoşullama uygulanan gruplarda anlamlı olarak değişmiştir. VF süresi de kontrole göre anlamlılık göstermiş ve aritmi skoru eritropoietin grubu dışındakilerde belirgin olarak azalmıştır. Aritmi skorunda en belirgin azalma, iskemik önkoşullama grubunda gözlenmiştir (Tablo 8).

Tablo 7. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kronik uygulaması ile yapılan deney gruplarında oluşan aritmiler.

	n	Total Ventriküler Ektoptik Atım Sayısı	% Ventriküler Taşikardi (VT)	% Total Ventriküler Fibrilasyon (VF)
Kontrol	10	623±110 (10)	100 (10)	30 (3)
Eritropoietin (100 U/kg, sc)	7	353±81* (7)	85.7 (6)	0 (0)
İskemik önkoşullama	8	17±5* (8)	37.5* (3)	0 (0)
Eritropoietin (100 U/kg, sc) + iskemik önkoşullama	6	23±10* (4)	0* (0)	0 (0)
L-NAME (10 mg/kg, ip) + Eritropoietin (100 U/kg, sc) + iskemik önkoşullama	6	25±13* (6)	12.5* (1)	0 (0)
Karbakol önkoşullaması	8	318±101* (8)	75 (6)	0 (0)
Eritropoietin (100 U/kg, sc) + karbakol önkoşullaması	6	189±51* (6)	66.7 (4)	0 (0)

*P<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. Aritmi görülen hayvan sayısı parantez içinde belirtilmiştir.

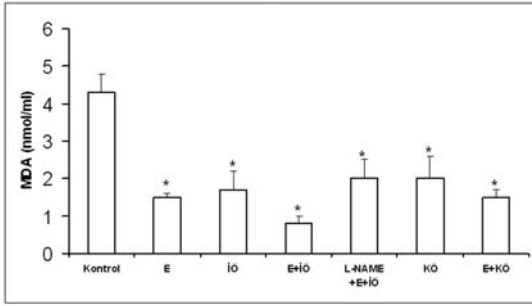
Biyokimyasal analizler

Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin akut uygulaması ile yapılan deney gruplarındaki plazmada ölçülen biyokimyasal parametreler Şekil 2-5'de gösterilmiştir. MDA düzeyleri kontrole göre tüm gruplarda anlamlı azalma göstermiş, laktat düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı azalma sadece iskemik önkoşullama uygulanan gruplarda saptanmıştır. L-NAME uygulanan grupta plazma NO düzeyleri belirgin olarak azalmış, diğer gruplar arasında bir fark ortaya çıkmamıştır. Eritrosit SOD düzeylerinde ise belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir.

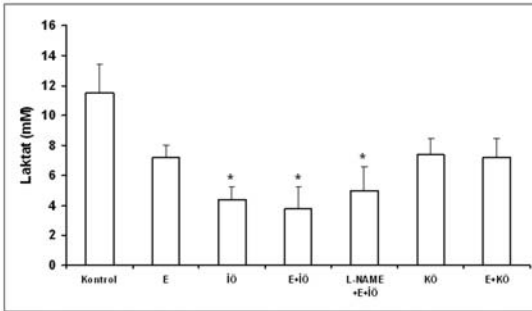
Tablo 8. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kronik uygulaması ile yapılan deney gruplarında oluşan aritmi süreleri ve aritmi skoru.

	n	Aritmi Başlama Zamanı (saniye)	VT süresi (saniye)	VF süresi (saniye)	Aritmi Skoru
Kontrol	10	18.2±4.4	68.1±19.5	22.7±6.3	3.2±0.1
Eritropoietin (100 U/kg, sc)	7	169.3±59.4	39.1±8.9	0*	2.9±0.1
İskemik önkoşullama	8	233.4±80.1*	3.0±1.5*	0*	0.8±0.4*
Eritropoietin (100 U/kg, sc) + iskemik önkoşullama	6	270.0±75.6*	0*	0*	0.2±0.2*
L-NAME (10 mg/kg, ip) + Eritropoietin (100 U/kg, sc) + iskemik önkoşullama	6	294.8±85.4*	10*	0*	0.3±0.3*
Karbakol önkoşullaması	8	45.6±14.7	39.0±23.7	0*	2.0±0.5*
Eritropoietin (100 U/kg, sc) + karbakol önkoşullaması	6	70.5±52.0	11.8±3.5	0*	1.7±0.6*

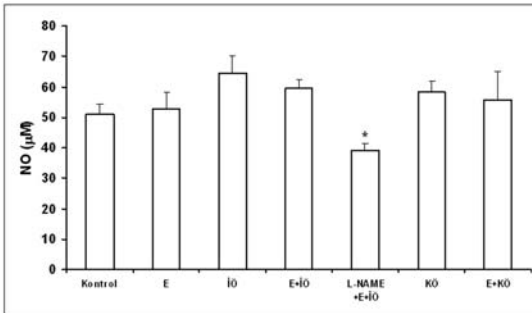
*P<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı.



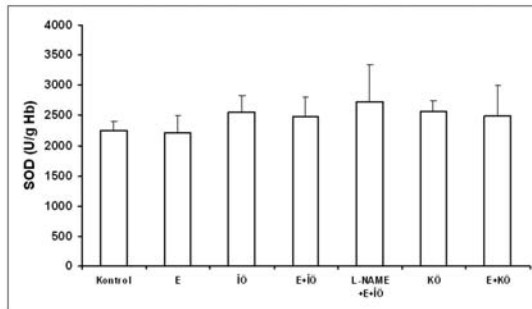
Şekil 2. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin akut uygulaması ile yapılan deneylerde plazma MDA düzeyleri. E, eritropoietin; İÖ, iskemik önkoşullama; KÖ, karbakol önkoşullaması. *P<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.



Şekil 3. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin akut uygulaması ile yapılan deneylerde plazma laktat düzeyleri. E, eritropoietin; İÖ, iskemik önkoşullama; KÖ, karbakol önkoşullaması. *P<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin akut uygulaması ile yapılan deneylerde plazma NO düzeyleri. E, eritropoietin; İÖ, iskemik önkoşullama; KÖ, karbakol önkoşullaması. *P<0.05 diğer gruplarla karşılaştırıldığında.

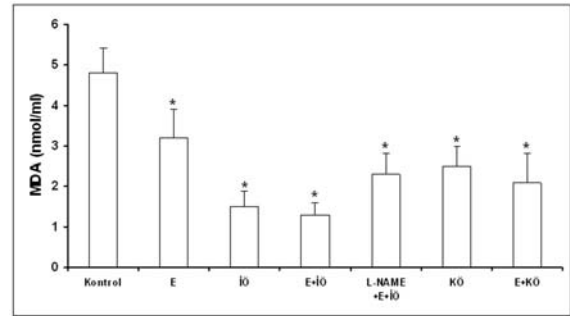


Şekil 5. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin akut uygulaması ile yapılan deneylerde eritrosit SOD düzeyleri. E, eritropoietin; İÖ, iskemik önkoşullama; KÖ, karbakol önkoşullaması.

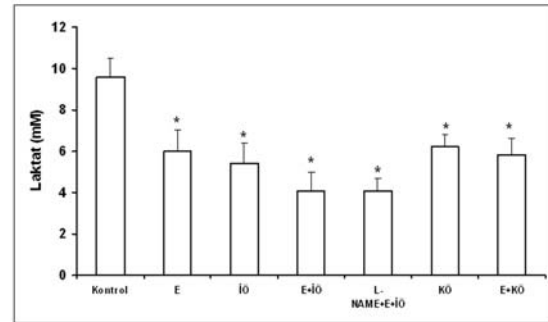
Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kronik uygulaması ile yapılan deney gruplarındaki plazmada ölçülen biyokimyasal parametreler Şekil 6-9'da gösterilmiştir. MDA ve laktat düzeylerinde kontrole göre tüm gruplarda anlamlı azalma gözlenmiştir. NO düzeylerinde ise eritropoietin uygulanan gruplarda belirgin artma saptanırken, L-NAME uygulanan grupta anlamlı azalma gözlenmiştir. Eritrosit SOD düzeylerinde ise belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir.

İmmünohistokimyasal analiz

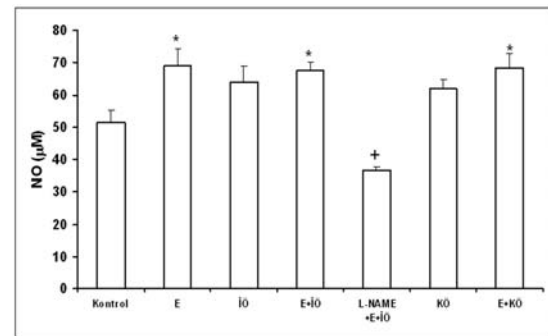
Sol ventrikülden alınan kesitlerde kit aracılığıyla yapılan immünohistokimyasal boyamada kontrol grubu ve diğer gruplarda apoptozise rastlanmamıştır (Şekil 10).



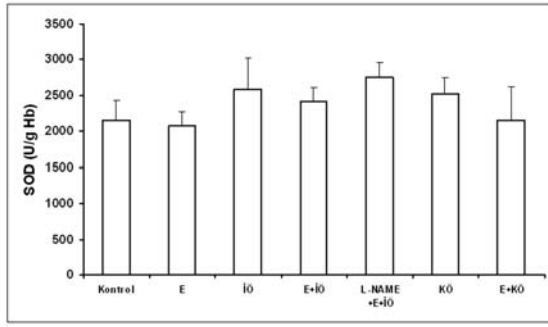
Şekil 6. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kronik uygulaması ile yapılan deneylerde plazma MDA düzeyleri. E, eritropoietin; İÖ, iskemik önkoşullama; KÖ, karbakol önkoşullaması. *P<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.



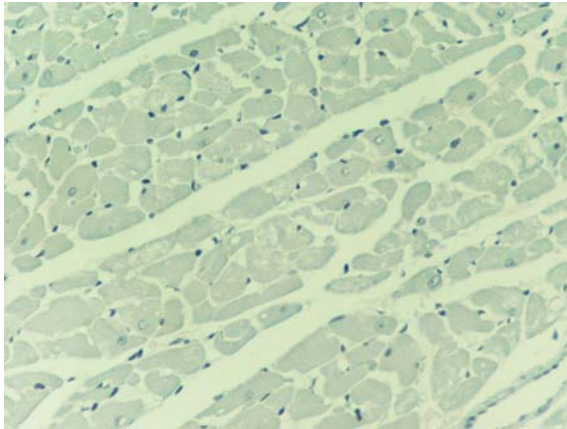
Şekil 7. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kronik uygulaması ile yapılan deneylerde plazma laktat düzeyleri. E, eritropoietin; İÖ, iskemik önkoşullama; KÖ, karbakol önkoşullaması. *P<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.



Şekil 8. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kronik uygulaması ile yapılan deneylerde plazma NO düzeyleri. E, eritropoietin; İÖ, iskemik önkoşullama; KÖ, karbakol önkoşullaması. *P<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. +P<0.05 diğer gruplarla karşılaştırıldığında.



Şekil 9. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kronik uygulaması ile yapılan deneylerde eritrosit SOD düzeyleri. E, eritropoietin; İÖ, iskemik önkoşullama; KÖ, karbakol önkoşullaması.



Şekil 10. Anesteziye sıçanlarda eritropoietinin kronik uygulaması ile yapılan deneylerde immunohistokimyasal olarak boyamada apoptotik hücre görülmektedir (x400 büyütme).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, akut ve kronik olarak uygulanan eritropoietinin iskemide, iskemik önkoşullamada ve karbakol ile oluşturulan farmakolojik önkoşullamadaki etkileri incelenmiştir. Akut ve kronik uygulamada eritropoietin kardiyoprotektif etki oluşturmuş, ventriküler aritmileri inhibe etmiş, iskemik ve farmakolojik önkoşullamanın etkilerini korumuştur. Eritropoietin, lipid peroksidasyonunu ve laktat oluşumunu da azaltmıştır.

Kronik eritropoietin uygulaması, sıçanlarda hipertansiyon oluşturmuştur. Bu sonuç, diğer deneysel çalışmalarla uyumludur. 6 hafta boyunca haftada iki kez eritropoietin uygulamasının sıçanlarda hipertansiyon oluşturmada ve bu etki sirküle eden endotelin ve atriyal natriüretik peptid düzeyleri ile ilişkili bulunmamaktadır (34).

Eritropoietinin NO düzeylerine etkisi ilgili çalışmaların sonuçları çelişkilidir. 1 hafta süreyle tavşanlara eritropoietin uygulaması, muhtemelen NO sentaz inhibisyonuyla endotel-bağımlı vazodilatörlerin etkilerini azalttığı bildirilmiştir (35). Ayrıca, eritropoietin vasküler sistemde indüklenebilir NOS aktivitesini de inhibe edebilmektedir (36). Sığır endotel hücre kültürünün eritropoietin ile inkübe edildiğinde, NO ve ET-1 sentezinin modifiye edilmediğini gösteren çalışma da mevcuttur (37).

Endotel hücre kültürüne eritropoietin uygulamasından sonra NO düzeylerinin arttığını (38,39), değişiklik olmadığını (37) ve azaldığını (40) bildiren araştırmalar bulunmaktadır. Del Castillo ve ark. (1995) eritropoietinin hipertansif etkisinin endojen NO sistemi aktivitesinde azalma sonucu olmadığını ortaya koydular (41). Bizim sonuçlarımız kronik eritropoietin uygulamasının NO düzeylerini arttırdığını gösteren çalışmaların sonucunu desteklemektedir. Eritropoietin ile artan hematokrit, eritrosit kütle, kan hacmi, kan viskozitesi ve shear stres ile in vivo olarak NOS ekspresyonunun stimüle olması ve NO oluşumunun artması muhtemeldir. Normal sıçanlarda üriner NO atılımı da artmaktadır (41, 27). Farelerde eritropoietinin kardiyoprotektif etkili olduğunu ve kardiyomyosit eNOS protein ekspresyonu ile NO oluşumunu artırdığını göstermiştir (42). Kronik eritropoietin kullanımı sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu artırmakta ve NO rezistansına yol açtığı ileri sürülmesine karşın (43,44), sıçanlarda yapılan çalışmada eritropoietinin vasküler eNOS ekspresyonunu, plazma NO konsantrasyonunu ve NO bağımlı vazodilatasyonu artırdığı gösterilmiştir (45). Eritropoietinin ventriküler aritmilere karşı koruyucu etkisinin nöronal NOS aracılıklı olduğu da gösterilmiştir (46).

Bu çalışmada, L-NAME ile NO oluşumunun inhibe edilmesi, eritropoietinin koruyucu etkisini ortadan kaldırmamıştır. Bu sonuç, izole infant tavşan kalbinde eritropoietinin kardiyoprotektif etkilerinin L-NAME veya L-NMA ile önlemediğinin gösterildiği çalışmayı (47) desteklemektedir. L-NAME ile eritropoietin uygulanan sıçanlarda hipertansiyonun daha da artmış olması, eritropoietinin NO'yu artırmasının bir göstergesi olabilir. Bizim bulgumuza benzer olarak eritropoietin uygulanan üremik sıçanlarda kontrol grubuna göre L-NAME kan basıncında daha fazla artış oluşturmuştur (48).

Yaptığımız çalışmada MDA düzeylerinde eritropoietin ile belirgin azalma gözlenmiştir. Bu sonuç, Akisu ve ark. (2001) yaptığı klinik araştırmadaki eritropoietin uygulanan preterm infantlarda serum MDA düzeylerinde bulunan düşme ile uyumludur (49). Hidroksil radikali ile oluşan eritrosit lipid peroksidasyonunun, eritropoietin tarafından önlendiği bilinmektedir (50). Bu bulgular, eritropoietinin lipid peroksidasyonunu inhibe edebildiğini göstermektedir.

Sıçanlarda hem akut hem de kronik eritropoietin uygulaması SOD düzeylerinde belirgin bir değişiklik yapmamıştır. Eritropoietin uygulanan preterm infantlarda eritrosit SOD aktivitesinde bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (49).

Eksojen olarak uygulanan eritropoietin, vasküler endotel hücrelerini apoptozisten korur (51). H9c2 kardiyak miyoblast hücrelerinin 22 saat oksidatif strese veya 12 saat anoksiye maruz kaldığında oluşan apoptotik ölümünü, eritropoietin azaltır (23). Cai ve ark (2003) sıçanlara 5000 U/kg dozda eritropoietini i.p. olarak uygulamışlar ve 24 saat sonra kalbi izole ederek 30 dk iskemi ve 45 dk reperfüzyon protokolü uygulamışlar ve eritropoietinin apoptozisi azalttığını gösterdiler (15). Sıçanlarda eritropoietin 60 dakikalık iskemiden sonra da apoptotik hücre sayısında anlamlı azalma oluşturmaktadır (16). Mudalagiri ve ark. (2008), insan atriyal trabekül kasları ile yaptıkları çalışmada, eritropoietinin önemli derecede apoptozisi azalttığını gösterdiler (52).

Bizim deneylerimizde apoptozis görülmemesinin nedeni deneysel protokolün apoptozis oluşturacak kadar uzun olmaması ile ilgili olabilir. Tramontano ve ark. (2003) eritropoietinin iskemiden sonra uygulandığında da koruyucu etki oluşturduğunu ortaya koydular (16).

Sonuç olarak, bu projeden elde edilen veriler anesteziye sıçanda eritropoietinin antiaritmik etki gösterebileceğini, iskemik ve farmakolojik önkoşullamaya katkısının olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, eritropoietinin farmakolojik önkoşullamada kullanılabilecek bir ajan olabileceğini göstermekte ve miyokardiyal önkoşullamanın hücrel mekanizmasının aydınlatılmasında katkıda bulunmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TF.03.03 no'lu proje ile desteklenmiştir.

REFERANSLAR

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124-1136.
2. Richard V, Kaeffer N, Tron C, Thuillez C. Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1994;89:1254-1261.
3. Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC, Sievers RE, Wolfe CL. Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo. *Circulation*. 1997;96:1598-1604.
4. Altug S, Demiryürek AT, Kane KA, Kanzik I. Evidence for the involvement of peroxynitrite in ischaemic preconditioning in rat isolated hearts. *Br J Pharmacol*. 2000;130:125-131.
5. Eisen A, Fisman EZ, Rubenfire M, Freimark D, McKechnie R, Tenenbaum A, Motro M, Adler Y. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review. *Atherosclerosis*. 2004;172:201-210.
6. Demiryürek S, Ceylan H, Demiryürek AT. İskemik önkoşullama ve etki mekanizması. *Genel Tıp Derg*. 2003;13:187-194.
7. Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res*. 2001;89:273-278.
8. Demiryürek S, Ceylan H, Demiryürek AT. İskemik önkoşullamanın klinik uygulamaları. *Genel Tıp Derg*. 2004;14:31-34.
9. Kendall RG. Erythropoietin. *Clin Lab Haematol*. 2001;23:71-80.
10. Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C. Neuroprotection and Angiogenesis: Dual Role of Erythropoietin in Brain Ischemia. *News Physiol Sci*. 2000;15:225-229.
11. Lin JS, Chen YS, Chiang HS, Ma MC. Hypoxic preconditioning protects rat hearts against ischaemia-reperfusion injury: role of erythropoietin on progenitor cell mobilization. *J Physiol*. 2008;586:5757-5769.
12. Wasserfuhr D, Cetin SM, Yang J, Freitag P. Protection of the right ventricle from ischemia and reperfusion by preceding hypoxia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2008;378:27-32.
13. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:3974-3978.
14. Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem*. 1996;239:494-500.
15. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2003;108:79-85.
16. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV, El-Sherif N. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;112:990-994.
17. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2001;101:271-276.
18. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:4635-4640.
19. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*. 2001;412:641-647.
20. Dawson TM. Preconditioning-mediated neuroprotection through erythropoietin? *Lancet*. 2002;359:96-97.
21. Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, Reme CE. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med*. 2002;8:718-724.
22. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido SM, Liu C, Rugg UT, Noguchi CT. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*. 2000;275:39754-39761.
23. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest*. 2003;112:999-1007.

24. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem.* 2004;279:20655-20662.
25. Carbonin P, Di Gennaro M, Valle R, Beranbei R, Habed A. Intracellular calcium and electrogram in ischemic isolated rat heart. *Am J Physiol.* 1980;239:380-390.
26. Vaziri ND, Zhou XJ, Smith J, Oveisi F, Baldwin K, Purdy RE. In vivo and in vitro pressor effects of erythropoietin in rats. *Am J Physiol.* 1995;269:838-845.
27. Tsukahara H, Hiraoka M, Hori C, Hata I, Okada T, Gejyo F, Sudo M. Chronic erythropoietin treatment enhances endogenous nitric oxide production in rats. *Scand J Clin Lab Invest.* 1997;57:487-493.
28. Yamaguchi F, Nasa Y, Yabe K, Ohba S, Hashizume Y, Ohaku H, Furuhashi K, Takeo S. Activation of cardiac muscarinic receptor and ischemic preconditioning effects in situ rat heart. *Heart Vessels.* 1997;12:74-83.
29. Kawai Y, Hayashi Y, Ito I, Kamibayashi T, Takada K, Kagawa K, Yamatodani A, Mashimo T. Nicorandil prevents epinephrine-induced arrhythmias in halothane-anesthetized rats by nitric oxide-dependent mechanism. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 2002;366, 522-527.
30. Yargicoglu P, Yaras N, Agar A, Gumuslu S, Abidin I, Bilmen S. Effects of N-nitro L-arginine methyl ester (L-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on visual evoked potentials of rats exposed to different experimental stress models. *Acta Physiol Scand.* 2004;180:307-316.
31. Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RWF, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1988;22:447-455.
32. Demiryürek AT, Yıldız G, Eşiyok S, Altuğ S. Protective effects of poly (ADP-ribose) synthase inhibitors on digoxin-induced cardiotoxicity in guinea-pig isolated hearts. *Pharmacol Res.* 2002;45:189-194.
33. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-358.
34. Zhou XJ, Pandian D, Wang XQ, Vaziri ND. Erythropoietin-induced hypertension in rat is not mediated by alterations of plasma endothelin, vasopressin, or atrial natriuretic peptide levels. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:901-905.
35. Noguchi K, Yamashiro S, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Miyagi K, Sakanashi M. Effect of 1-week treatment with erythropoietin on the vascular endothelial function in anaesthetized rabbits. *Br J Pharmacol.* 2001;133:395-405.
36. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Quartarone C, Saitta A, Caputi AP. Recombinant human erythropoietin inhibits iNOS activity and reverts vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock. *Br J Pharmacol.* 1999;127:482-488.
37. Lopez Ongil SL, Saura M, Lamas S, Rodriguez Puyol M, Rodriguez Puyol D. Recombinant human erythropoietin does not regulate the expression of endothelin-1 and constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Exp Nephrol.* 1996;4:37-42.
38. Wu XC, Johns EJ, Richards NT. Relationship between erythropoietin and nitric oxide in the contraction of rat renal arcuate arteries and human umbilical vein endothelial cells. *Clin Sci.* 1999;97:413-419.
39. Banerjee D, Rodriguez M, Nag M, Adamson JW. Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity. *Kidney Int.* 2000; 57:1895-1904.
40. Wang XQ, Vaziri ND. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension.* 1999;33:894-899.
41. del Castillo D, Raij L, Shultz PJ, Tolins JP. The pressor effect of recombinant human erythropoietin is not due to decreased activity of the endogenous nitric oxide system. *Nephrol Dial Transplant.* 1995;10:505-508.
42. Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M, Dale Abel E, Xenocostas A, Kvietys PR. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res.* 2005;65:719-727.
43. Vaziri ND, Zhou XJ, Naqvi F, Smith J, Oveisi F, Wang ZQ, Purdy RE. Role of nitric oxide resistance in erythropoietin-induced hypertension in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol.* 1996;271:113-122.
44. Ni Z, Wang XQ, Vaziri ND. Nitric oxide metabolism in erythropoietin-induced hypertension: effect of calcium channel blockade. *Hypertension.* 1998;32:724-729.
45. Kanagy NL, Perrine MF, Cheung DK, Walker BR. Erythropoietin administration in vivo increases vascular nitric oxide synthase expression. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;42:527-533.
46. Burger DE, Xiang FL, Hammoud L, Jones DL, Feng Q. Erythropoietin protects the heart from ventricular arrhythmia during ischemia and reperfusion via neuronal nitric-oxide synthase. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;329:900-907.
47. Shi Y, Rafiee P, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Baker JE. Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. *Basic Res Cardiol.* 2004;99:173-182.

48. Moreau C, Lariviere R, Kingma I, Grose JH, Lebel M. Chronic nitric oxide inhibition aggravates hypertension in erythropoietin-treated renal failure rats. *Clin Exp Hypertens*. 2000;22:663-674.
49. Akisu M, Tuzun S, Arslanoglu S, Yalaz M, Kultursay N. Effect of recombinant human erythropoietin administration on lipid peroxidation and antioxidant enzyme(s) activities in preterm infants. *Acta Med Okayama*. 2001;55:357-362.
50. Chattopadhyay A, Choudhury TD, Bandyopadhyay D, Datta AG. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:419-425.
51. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation*. 2002;106: 2973-79.
52. Mudalagiri NR, Mocanu MM, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Keogh B, Yellon DM, *Br J Pharmacol*. 2008;153:50-56.