

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı**

**DENEYSEL HİPERTANSİYONUN KALPTE
OLUŞTURDUĞU ELEKTROFİZYOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE MAGNEZYUM
TEDAVİSİNİN ETKİSİ**

Nihal ÖZTÜRK

Doktora Tezi

Antalya, 2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı**

**DENEYSEL HİPERTANSİYONUN KALPTE
OLUŞTURDUĞU ELEKTROFİZYOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE MAGNEZYUM
TEDAVİSİNİN ETKİSİ**

Nihal ÖZTÜRK

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No:2011.03.0122.006)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayın ve diğer yayınlar aşağıdadır.

1. Nihal Ozturk, Yusuf Olgar, Semir Ozdemir. Trace elements in diabetic cardiomyopathy: An electrophysiological overview. World J Diabetes 2013 August 15; 4(4): 92-100.
2. Nihal Ozturk, Nazmi Yaras, Asli Ozmen, Semir Ozdemir. Long-term administration of rosuvastatin prevents contractile and electrical remodeling of diabetic rat heart. J Bioenerg Biomembr, 2013, DOI 10.1007/s10863-013-9514-z
3. Ceren Kencebay, Narin Derin, Ozlem Ozsoy, Dijle Kipmen-Korgun, Gamze Tanriover, Nihal Ozturk, Goksun Basaranlar, Piraye Yargicoglu-Akkiraz, Berna Sozen, Aysel Agar. Merit of quinacrine in the decrease of ingested sulfite-induced toxic action in rat brain. Food and Chemical Toxicology 52 (2013) 129–136
4. Deniz Akpınar, Nihal Ozturk, Sukru Ozen, Aysel Agar, Piraye Yargicoglu. The effect of different strengths of extremely low-frequency electric fields on antioxidant status, lipid peroxidation, and visual evoked potentials. Electromagnetic Biology and Medicine, 31(4): 436–448, 2012.
5. Aydemir M, Ozturk N, Dogan S, Aslan M, Olgar Y, Ozdemir S. Sodium Tungstate Administration Ameliorated Diabetes-Induced Electrical and Contractile Remodeling of Rat Heart without Normalization of Hyperglycemia. Biol Trace Elem Res. 2012.
6. Dogan S, Unal M, Ozturk N, Yargicoglu P, Cort A, Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Aslan M. Manganese porphyrin reduces retinal injury induced by ocular hypertension in rats. Exp Eye Res. 2011.
7. Ozturk N, Y argicoglu P, Derin N, Akpınar D, Agar A, Aslan M. Dose-dependent effect of nutritional sulfite intake on visual evoked potentials and lipid peroxidation. Neurotoxicol Teratol. 2011,33(2):244-54.
8. Ercan S, Oztürk N, Celik-Ozenci C, Gungor NE, Yargicoglu P. Sodium metabisulfite induces lipid peroxidation and apoptosis in rat gastric tissue. Toxicol Ind Health. 2010 Aug;26(7):425-31.
9. Cort A, Ozturk N, Akpınar D, Unal M, Yucel G, Ciftcioglu A, Yargicoglu P, Aslan M. Suppressive effect of astaxanthin on retinal injury induced by elevated intraocular pressure. Regul Toxicol Pharmacol. 2010 Oct;58(1):121-30,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma, j¼rimiz tarafından Biyofizik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 23 /06/2014

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Biyofizik Anabilim Dalı

ye : Prof. Dr.Piraye YARGIOğLU
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Biyofizik Anabilim Dalı

ye : Prof.Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ye : Prof.Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Biyofizik Anabilim Dalı

ye : Doç. Dr. Nazmi YARAş
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Onay:

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun /..... /..... tarih ve /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstit¼ M¼d¼r¼

ÖZET

Hipertansiyon kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliği gelişiminde majör risk faktörlerinden birisidir ve bu süreçlerin gelişiminde Mg^{2+} 'un önemli olduğu iddia edilmektedir. Bu çalışmada L-NAME kullanılarak oluşturulan hipertansiyon modelinde kardiyak miyositlerde meydana gelen elektrofizyolojik değişiklikler belirlenerek, hücre içi serbest Mg^{2+} seviyelerinin bu değişikliklerle olan ilişkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Hipertansiyon ve MgO tedavisi uygulanan hipertansiyon gruplarına 40 mg/kg dozunda L-NAME 6 hafta boyunca içme suyu ile verilirken, Mg^{2+} tedavisi alan gruplar aynı zaman periyodunda 1 g/kg dozunda MgO içeren yem ile beslenmiştir. L-NAME uygulaması ile yükselen kan basıncı değerleri MgO tedavisi ile kontrol seviyelerine dönmüştür ve hipertansiyona sekonder olarak gelişen hipertrofi önlenmiştir. Hipertansif sıçan ventrikül miyositlerinde azalan hücre içi serbest Mg^{2+} seviyeleri, 6 haftalık MgO tedavisi ile normal seviyelere dönmüştür. Hipertansiyonun kardiyomiyositlerde fraksiyonel kısalma miktarını anlamlı seviyede azalttığı, kasılma kinetiklerinde yavaşlamaya sebep olduğu, Ca^{2+} transientlerinin genliklerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamasına karşılık, zaman sabitinin uzamasına neden olduğu görülmüştür. Altı haftalık MgO tedavisi hipertansiyona bağlı olarak meydana gelen kasılma bozukluğunu düzeltmiştir. Aksiyon potansiyelinin repolarizasyon süresinin ventrikül miyositlerinde hipertansiyona bağlı olarak uzadığı, buna karşılık MgO uygulamasının bu değerleri kontrol seviyesine yaklaştırdığı görülmüştür. Hipertansiyon, I_{to} ve I_{ss} akımlarını baskımlarken MgO tedavisi, I_{to} akımlarını kontrol seviyelerine getirmiş, ancak I_{ss} akımlarında anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Hipertansiyonda meydana gelen intrasellüler serbest Mg^{2+} seviyesindeki azalma L-tipi Ca^{2+} akımları, SR Ca^{2+} içeriği ve NCX aktivitesi üzerinde önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır. Ayrıca hipertansif sıçan kalplerinde görülen oksidatif stres ve protein oksidasyonu artışının MgO tedavisi ile düzeldiği belirlenmiştir.

Özetle, Mg^{2+} 'un hipertansiyona bağlı olarak sıçan ventriküler miyositlerinin elektriksel ve mekanik aktivitesinde meydana gelen değişikliklerde etkili olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar hipertansif sıçanlardaki Mg^{2+} eksikliğinin oksidatif stres artışına ve kardiyak fonksiyon bozukluklarına neden olduğunu, MgO tedavisinin ise antioksidan yolları aktive ederek hipertansiyona bağlı değişiklikleri düzelttiğini göstermektedir. Sonuç olarak, çalışmamızda Mg^{2+} dengesindeki değişimlerin kronik kalp hastalıklarının patofizyolojisine katkıda bulunan önemli faktörlerden biri olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Hipertansiyon, L-NAME, Mg, Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi, ROS

ABSTRACT

Hypertension is one of the major risk factors of cardiac hypertrophy and heart failure and Mg^{2+} is suggested to be a contributing factor in the progression of these diseases. In this study, we aimed to unravel the electrophysiological changes produced in the cardiac myocytes and to establish the relationship between intracellular free Mg^{2+} levels with these changes in L-NAME induced hypertension model.

Hypertension was induced by administration of 40 mg/kg of L-NAME in drink water for six weeks, while MgO treated rats fed with a diet supplemented with 1 g/kg of MgO. Elevated blood pressure, with application of L-NAME for six weeks, was reversed to control levels with MgO treatment, thereby cardiac hypertrophy developing secondary to hypertension was prevented. Cytosolic free Mg^{2+} levels of ventricular myocytes were significantly decreased with hypertension and MgO treatment restored these changes to control levels. Hypertension significantly decreased the fractional shortening with slowing of contraction kinetics and elicited prolonged Ca^{2+} transient decay time, despite unchanged Ca^{2+} transient amplitudes in left ventricular myocytes. Thus 6 week MgO treatment was capable of restoring hypertension-induced contractile dysfunction in ventricular myocytes. Hypertension prolonged repolarization phase of action potential and Mg^{2+} significantly restored repolarization duration in ventricular myocytes from MgO-treated hypertensive rats. In addition, L-NAME induced hypertension suppressed I_{to} and I_{ss} currents. Though magnesium treatment corrected I_{to} currents to control levels; it did not affect I_{ss} currents significantly. On the other hand, hypertension dependent decrement in intracellular Mg^{2+} level did not result in a significant change in L-type Ca^{2+} currents, SR Ca^{2+} content and NCX activity. Moreover, hypertension mediated increase in oxidative stress and protein oxidation mitigated with MgO treatment.

In summary, it is likely that Mg^{2+} affects electrical and mechanical changes observed in hypertensive rat ventricular myocytes. Accordingly hypertension induced Mg^{2+} deficiency leads to upregulated oxidative stress and functional abnormalities in myocardium while MgO treatment ameliorates that electrophysiological changes via activation of enzyme-linked antioxidant mechanisms. As a result, changes in intracellular Mg^{2+} balance may contribute to the pathophysiology of chronic heart diseases.

Key Words: Hypertension, L-NAME, Mg^{2+} , Excitation-Contraction Coupling, ROS

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılması için gerekli tüm olanakları sağlayan, doktora eğitimim süresince üstün bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın **Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR**'e,

Biyokimyasal parametrelerin yapılmasındaki katkıları ve doktora eğitimimin her aşamasındaki desteklerinden dolayı sayın **Prof. Dr. Mutay ASLAN**'a,

Doktora eğitimim boyunca büyük desteğini gördüğüm sayın **Doç.Dr. Nazmi Yaraş**'a

Çalışmalarımda maddi ve manevi katkıları olan ve her zaman desteğini gördüğüm değerli çalışma arkadaşım **Yusuf OLĞAR**'a,

Manevi desteğini hep yanımda hissettiğim sevgili eşim **Bilgin ERBOĞA**'ya,

Teknik olanakları ile bu çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleşmesini sağlayan **Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına** ve **Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline**

çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hipertansiyon	4
2.1.1. Hipertansiyonun Tanımı ve Sınıflandırılması	4
2.1.2. Hipertansiyonun Epidemiyolojisi	4
2.1.3. Hipertansiyonun Etiyolojisi ve Etiyolojik Sınıflandırması	5
2.1.4. Deneysel Hipertansiyon Modelleri	6
2.1.5. Deneysel Hipertansiyonda Hipomagnezemi	8
2.2. Magnezyum Homeoastazi	8
2.2.1. Mg ²⁺ Emilimi	9
2.2.2. Böbreklerin Mg Homeostazisindeki Rolü	10
2.2.3. Böbreklerin Mg ²⁺ Dengesini Etkileyen Faktörler	10
2.2.4. Transselüler Mg ²⁺ transportu	11
2.2.4.1. Magnezyum çıkışının regülasyonu	11
2.2.4.2. Magnezyum girişinin regülasyonu	11
2.2.5. Hücre içi Mg ²⁺ regülasyonu	12
2.2.6. Hipertansiyonda Vasküler Değişimlerde Mg ²⁺ Rolü	13
2.2.7. Vasküler Tonus Regülasyonu ve Mg ²⁺ Reaktivasyonu	15
2.3. Kardiyak Kasın Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi	15
2.3.1. Genel Şema	15
2.3.2. Ventriküler Aksiyon potansiyeli	16
2.3.3. L-tipi Ca ²⁺ Kanalları (LTCC)	17
2.3.4. Na ⁺ /Ca ²⁺ Değiş-Tokuşucusu (Exchanger) Yoluyla Ca ²⁺ Girişi	17
2.3.5. Sarkoplazmik Retikulum (SR) ve Riyanodin Reseptörü	19
2.3.6. Sarkoplazmik Redikulum Ca ²⁺ ATPaz (SERCA)	19
2.3.7. Kasılmada Ca ²⁺ 'nin Rolü	20

2.4.	Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri	20
2.4.1.	Serbest Radika Tanımı	20
2.4.2.	Serbest Radikal Oluşumu	20
2.4.3.	Reaktif Oksijen Türleri ve Kaynakları	21
2.4.4.	Reaktif Nitrojen Türleri ve Kaynakları	22
2.4.5.	Nitrik Oksit ve Oksijen Radikaller Arasındaki Etkileşim	23
2.5.	Antioksidan Savunma Sistemi	23
2.5.1.	Antioksidan Enzimler ve Bileşikler	23
2.6.	Protein Oksidasyonu	24
GEREÇ VE YÖNTEMLER		25
3.1.	Deney gruplarının oluşturulması	25
3.2.	Kan Basıncı Ölçümü	25
3.3.	Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu	26
3.4.	Hücre İçi Serbest Mg ²⁺ konsantrasyonunun Ölçümü	26
3.5.	Hücre İçi Bazal Ca ²⁺ konsantrasyonunun Ölçümü	27
3.6.	Kontraktıl Parametreler	28
3.7.	Hücre İçi Serbest Ca ²⁺ Derişimi Ölçümü	28
3.8.	Aksiyon Potansiyelinin Kaydedilmesi	29
3.9.	Potasyum akımlarının kaydedilmesi	30
3.10.	Eşzamanlı Ca ²⁺ Akımı ve Hücre İçi Serbest Ca ²⁺ Derişimi Ölçümü	30
3.11.	SR Ca ²⁺ İçeriğinin ve NCX Akımının Ölçülmesi	31
3.12.	Biyokimyasal parametreler	31
3.12.1.	Nitrit/Nitrat Ölçümü	31
3.12.2.	Kardiyomiyositlerde Süperoksit Anyon Salınımının ve Hücre içi Hidrojen Peroksit Konsantrasyonunun Belirlenmesi	32
3.12.3.	Okside-Redükte Glutatyon Seviyelerinin Belirlenmesi	32
3.12.4.	Protein Karbonil Gruplarının Ölçümü	33
3.13.	Kullanılan kimyasallar	34
3.14.	İstatistiksel Analizler	34
BULGULAR		35
4.1.	Hayvanların Genel Durumu	35
4.2.	Kan Basıncı ve Kardiyak Hipertrofi Parametreleri	35
4.3.	Hücre İçi Bazal Mg ²⁺ ve Ca ²⁺ Konsantrasyonları	37
4.4.	Kasılma ve Hücre İçi Ca ²⁺ ile İlgili Parametreler	40

4.4.1.	Fraksiyonel Kısılma	40
4.4.2.	Hücre içi Ca^{2+} Transientleri	40
4.5.	Aksiyon Potansiyeli Parametreleri	43
4.6.	K^+ ve Ca^{2+} Akımları	43
4.6.1.	Hipertansiyonun ve Mg^{2+} Tedavisinin K^+ Akımları Üzerine Etkisi	45
4.6.2.	Hipertansiyonun ve Mg^{2+} Tedavisinin Ca^{2+} Akımları Üzerine Etkisi	47
4.7.	SR'daki Ca^{2+} miktarı	47
4.8.	Biyokimyasal parametreler	50
4.8.1.	Nitrit/nitrat seviyeleri	50
4.8.2.	O_2^- Salınımı ve Hücre içi H_2O_2 Konsantrasyonunu	50
4.8.3.	Glutatyon seviyeleri	52
4.8.4.	Protein Karbonil İçeriği	53
TARTIŞMA		54
SONUÇLAR		63
KAYNAKLAR		64
ÖZGEÇMİŞ		81

SİMGELER ve KISALTMALAR

[Ca²⁺]_i	: İntrasellüler serbest kalsiyum seviyesi
[Mg²⁺]_i	: İntrasellüler serbest magnezyum seviyesi
AKB	: Arteryel kan basıncı
AP	: Aksiyon potansiyeli
APD	: Aksiyon potansiyeli süresi
AVP	: Arjinin vazopressin hormon
Ca²⁺	: Kalsiyum
CaMKII	: Ca ²⁺ -Kalmodülün bağımlı protein kinaz
CICR	: Kalsiyum uyarımlı kalsiyum salınımı
DKB	: Diyastolik kan basıncı
DOCA	: Deoksikortikositeron-Asetat
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızı
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
I_{K1}	: İçeri doğrultucu potasyum akımı
I_{to}	: Geçici dışarı doğru potasyum akımı
KAT	: Katalaz
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
L-NAME	: N-nitro-L-arjinin metil ester hidtoklorid
L-NNA	: NG-nitro-L-arjinin
LTCC	: L-tipi Ca ²⁺ kanalları
Mag T1	: Magnezyum transporter
Mg²⁺	: Magnezyum
Mrs 2p	: Mitokondriyal RNA splicing 2 protein
NCX	: Na ²⁺ -Ca ²⁺ değştokuşcusu
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PKA	: cAMP-bağımlı protein kinaz A
PLB	: Fosfolamban
PMCA	: Sarkolemmal Ca-ATPaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RyR	: Riyanodin reseptörü
SERCA	: Sarkoplazmik retikulum Ca ²⁺ -ATPaz
SHR	: Spontan hipertansif rat
SKB	: Sistolik kan basıncı

SLC41A1	: İnsan solute carrier family 41 üyesi 1
SLC41A2	: İnsan solute carrier family 41 üyesi 2
SOD	: Süperoksit dismutaz
SR	: Sarkoplazmik retikulum
TRPM6	: Transient reseptör potansiyel melastatin katyon kanalı 6
TRPM7	: Transient reseptör potansiyel melastatin katyon kanalı 7

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1-a.	İntestinal Mg^{2+} Emilimi,	9
2.1-b	Doymamış paraselüler ve doyurulabilir transselüler taşıma fonksiyonu eğrileri	9
2.2.	Transselüler Mg^{2+} transportu	10
2.3.	Mg^{2+} 'un plazma membranı, hücre içi organeller ve intraselüler tamponlar tarafından regülasyonu	13
2.4.	Memeli hücresinde selüler Mg^{2+} homeostazının regülasyonu	14
2.5.	Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca düzenlenmesi	16
2.6.	Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve onlara karşılık gelen iyon akımları	18
2.7.	Antioksidan enzim sistemleri	24
3.1.	Sıçan kalbi izolasyonunun temel basamakları	27
3.2.	Elektrik alan altında kasılma parametrelerinin alınması	28
3.3.	Sol ventrikül miyositlerinden kaydedilen bir aksiyon potansiyeli eğrisi üzerinde ölçülen parametreler	29
4.1.	Kan basıncı ve fizyolojik parametreler	36
4.2.	Mag-fura2-AM ile yüklü sol ventrikül miyositlerinden elde edilen floresans şiddetinin Mg^{2+} 'ya ve fura2-AM ile yüklenmiş olan sol ventrikül miyositlerinden elde edilen floresans şiddetlerinin Ca^{2+} 'ya spesifik olduğunun teyidi	38
4.3.	Hücre içi serbest Mg^{2+} ve bazal Ca^{2+} seviyeleri	39
4.4.	Farklı frekanslarda uygulanan elektrik alan uyarısı ile uyarılan kardiyomiyositlerden elde edilen kasılma yanıtları	41
4.5.	0.5 Hz frekanslı elektrik alan uyarısı ile uyarılan kardiyomiyositlerden elde edilen $[Ca^{2+}]_i$ transientleri	42
4.6.	Deney gruplarına ait örnek aksiyon potansiyeli kayıtları ve ortalama APD değerleri	44
4.7.	Gruplara ait örnek potasyum akımları ve akım yoğunluğu-zar potansiyeli değişim eğrileri	46
4.8.	Deney gruplarından elde edilen L-tipi Ca^{2+} akımları ve akımlara karşılık gelen Ca^{2+} transientleri	48

4.9.	SR'de depolanan Ca^{2+} miktarı, sitoplazmadan Ca^{2+} 'nın geri taşınmasında görev alan NCX ve SERCA aktiviteleri	49
4.10.	Kalp dokusunda ölçülen Nitrit/Nitrat seviyeleri	51
4.11.	İzole edilen kardiyomiyositlerden ölçülen süperoksit anyon salınımı miktarı	51
4.12.	Kardiyomiyosit H_2O_2 aktivitesi	52
4.13.	Gruplara ait kalp dokusu örneklerinden elde edilen GSH/GSSG oranları	52
4.14.	Kalp dokusunda protein karbonil düzeyi	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		<u>Sayfa</u>
2.1.	JNC VII. Raporuna göre 18 yaş ve üzeri erişkinlerde kan basıncı sınıflandırması	5
2.2.	Günlük Mg ²⁺ alımının yaşlara göre dağılımı	9
2.3.	Kardiyovasküler ve renal hücrelerde Mg ²⁺ taşıyıcıları	12
4.1.	Vücut ağırlığı, su tüketimi ve yem tüketimi	35

GİRİŞ

Arteriyel kan basıncının (AKB) normal sınırlar üzerine çıkmasına “sistemik arteriyel hipertansiyon “veya kısaca “hipertansiyon“ adı verilir. Hipertansif hastalarda sistolik kan basıncı (SKB), diastolik kan basıncı (DKB) veya her ikisi birden yükselmiş olabilir. Sık görülen durum hem SKB hem de DKB'nin birlikte yükselmesidir (1, 2). Kan basıncının birçok faktörden etkilenmesine bağlı olarak dengeyi bozan çeşitli patolojik olaylar hipertansiyonun ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Kan basıncının düzenlenmesini etkileyen çeşitli faktörler arasında genetik yatkınlık, hücre zarı kusurları, bazı katyonların düzeylerinin değişmesi, renin-angiotensin sistemi, katekolaminler, prostaglandinler, baroreseptörler, natriüretik peptidler ve nitrik oksit (NO) gibi endotel hücrelerden kaynaklanan ajanlar yer almaktadır. Ayrıca, serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarları gibi halen araştırma safhasında olan etkenlerin de kan basıncının düzenlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (3-10).

Arteriyel sistemik hipertansiyon kalpte ön yük artışına sebep olur ve sol ventrikülde basınç artışı meydana gelir. Bu basınç artışı da kardiyak yeniden modellenme kapsamında ventriküler hipertrofiyi tetikleyebilir (11). Hipertansiyona bağlı olarak gelişen sol ventrikül hipertrofisi sonucunda iyon kanallarında, uygulanan deneysel modele bağlı olarak farklı sonuçlara ulaşılmış olmakla birlikte, aksiyon potansiyeli süresinin (APD) uzaması genel ve karakteristik bir değişikliktir (12). Yapılan çalışmalarda aksiyon potansiyelindeki (AP) bu uzamaya neden olan mekanizmalara ilişkin çeşitli varsayımlar bulunmaktadır. Birçok çalışmada hipertansif hayvanlardan elde edilen kardiyomiyositlerde özellikle K^+ akımlarının azalmasının bu faktörlerin başında geldiği iddia edilmektedir (11-13). Kardiyak AP uzamasına neden olabilecek bir diğer iyon akımı da L-tipi Ca^{2+} akımlarıdır (I_{Ca}). Ancak, hayvan modellerinin kullanıldığı farklı çalışmalarda L-tipi Ca^{2+} kanal kinetiklerinin ve akım genliklerinin değişmediği, arttığı ya da azaldığı şeklinde çelişkili bulgulara rastlanmaktadır (11, 12, 14).

Öte yandan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar magnezyum (Mg^{2+}) eksikliğinin kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyon gelişiminde önemli bir risk faktörü olabileceğini işaret etmektedir (15-17). Birçok epidemiyolojik çalışma Mg^{2+} tüketimi ile kan basıncı arasında ters bir ilişki bulunduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra deneysel ve klinik çalışmalar da Mg^{2+} eksikliğinin hipertansiyon patogenezinde rol oynadığı tezini desteklemektedir (18-20). Sıçan ventrikül miyositlerinde hücre içi Mg^{2+} iyonlarının özellikle pozitif potansiyellerde L-tipi Ca^{2+} kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir (21). Ekstrasellüler Mg^{2+} seviyelerinin akut değişimi intrasellüler magnezyum konsantrasyonunu ($[Mg^{2+}]_i$) etkilemediği halde hücre kasılmasını büyük oranda değiştirmektedir. Elinor J. Griffiths ve arkadaşları (22) yaptıkları çalışmada Mg^{2+} eksikliğinin Ca^{2+} transient genliklerini değiştirmede, fakat hücre kasılmasını anlamlı seviyede artırdığını gözlemişlerdir.

Magnezyum eksikliği bazı elektrokardiyografik değişikliklere de neden olmaktadır. T dalgasında düzleşme, QT segmentinin kısalması, PR'nin ve QRS intervalinin uzaması Mg^{2+} eksikliğinde görülen değişikliklerdir (23). Magnezyum, AP sırasında hücre içi K^+ 'un aktif taşınmasından sorumlu olan Na^+/K^+ -ATPaz pompası için gereklidir (24, 25). Mg^{2+} eksikliği, miyosit Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin azalmasına yol açtığından kardiyak miyositte Na^+ birikimine neden olur. Yüksek seviyede Na^+ , Na^+-Ca^{2+} değiştokuşçusunun aktivitesini artırır ve böylece intrasellüler Ca^{2+} seviyesi yükselir. Ayrıca miyokardiyal Mg^{2+} eksikliği sonucunda Na^+/K^+ ATPaz pompasının daha az etkili olması nedeniyle intrasellüler K^+ azalması söz konusu olabilir. Buna bağlı olarak dinlenim membran potansiyeli daha az negatif olacak ve QT intervali uzayacaktır (24, 25). Ayrıca yapılan çalışmalarda düşük $[Mg^{2+}]_i$ 'nin kendisinin kardiyomiyosit disfonksiyonlarına neden olduğu sonucuna varılmıştır (22).

Reaktif oksijen türleri (ROS), ateroskleroz, diyabet, kardiyak hipertrofi, kalp yetmezliği, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi kardiyovasküler hastalıkların yanında hipertansiyon gelişiminde de önemli rol oynar. Bu durum, damar sistemi ve böbreklerde antioksidan kapasitenin azalması, NO'nin biyo-yararlılığının azalması ve oksidanların aşırı üretiminden kaynaklanır. Kardiyovasküler hücrelerde ROS üretiminde özellikle süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) önemlidir. Bu iki radikal farklı yolları aktive eder. Artmış $O_2^{\cdot-}$ seviyesi, NO'yu inaktive ederek endotelial disfonksiyon ve vasokonstriksiyona yol açar (26). Bu durum hipertansiyonu da içeren bazı vasküler hastalıklar için karakteristiktir. Hipertansiyon ve vasküler hastalıklarda ROS'un enzimatik kaynakları ksantin oksidaz, NOS ve NAD(P)H oksidazdır (27, 28). Spontan hipertansif sıçanlar (SHR)'da ksantin oksidaz ve ROS üretiminin arttığı ve bunun arteriyel tonus artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (26). Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda Mg^{2+} eksikliğinin de kardiyovasküler hastalıklarda oksidatif stres hasarını ve fonksiyon kayıplarını arttırdığı tespit edilmiştir (29, 30). Mg^{2+} , antioksidan enzim aktivitesini artırmanın yanında intrasellüler Ca^{2+} aşırı yüklenmesini engelleyerek oksijen radikallerinin üretimini baskılar (30). Kalpte Mg^{2+} eksikliği ile süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktivitesinin azaldığı ve H_2O_2 indüklü lipid peroksidasyonun arttığı gösterilmiştir (31, 32). Ayrıca, H_2O_2 'nin kardiyomiyositlerde direkt olarak $I_{Ca,L}$ üzerine etkileri olduğu da bildirilmiştir (33).

Vücuttaki NO üretiminin, hipertansif hastalarda bozulduğu, biyo-yararlanımının azaldığı, yıkımının ise arttığı gösterilmiş, ayrıca hastaların NO uyarıcılarına verdikleri vazodilatör yanıtları da genelde bozuk bulunmuştur (34, 35). NO'daki azalmanın hipertansiyon gelişimine katkısı olduğu fikrini destekleyen bulgular çeşitli hayvan çalışmalarıyla da ortaya konmuştur (36, 37). Yaygın olarak kullanılan "nitrik oksit sentaz (NOS) Blokajıyla Oluşan Hipertansiyon Modeli", NO'nun esansiyel hipertansiyonda rol oynayabileceği görüşü temelinde L-arginin analogları kullanılarak oluşturulan bir modeldir (37, 38). Sıçanlarda hipertansiyon oluşturmak için kullanılan ilk NOS inhibitörü, bir L-arginin analogu olan N-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)'dir (37-39). Bu alışmada L-NAME kullanılarak oluşturulan hipertansiyon modelinde kardiyak miyositlerde meydana gelen elektrofizyolojik değişiklikler belirlenerek, ROS'un ve hücre içi Mg^{2+} seviyelerinin bu değişikliklerle olan ilişkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Ayrıca, uzun süreli MgO tedavisinin hipertansiyonun kalpte

oluşturduğu elektriksel, mekanik ve biyokimyasal değişikliklere etkisi incelenerek, Mg^{2+} un hipertansiyondaki rolü ve terapötik potansiyeli kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Hipertansiyon

2.1.1. Hipertansiyonun Tanımı ve Sınıflandırılması

Kan basıncı kalbin kanı sistemik dolaşıma pompalaması sırasında arteriyel sisteme giren kanın arterler üzerinde oluşturduğu basıncı anlatır ve kardiyak atım ile periferik vasküler direnç çarpımı olarak ifade edilir. Sistemik arteriyel kan basıncının normal kabul edilen sınırların üzerinde seyretmesine hipertansiyon denir (40, 41).

Kan basıncı sistolik (büyük tansiyon) ve diyastolik (küçük tansiyon) olarak iki değerden oluşur. İnsanlarda kabul edilen normal değerler; SKB için 120 mmHg ve DKB için 80 mmHg'dır. Diğer yönden SKB için 140 mmHg'dan, DKB için de 90 mmHg'dan büyük değerler yüksek kan basıncı değerleri olarak kabul edilir. Hem SKB hem de DKB'nin arttığı durum kombine hipertansiyon olarak tanımlanırken, DKB'nin 90 mmHg altında olduğu fakat SKB'nin yüksek olduğu (SKB>140 mmHg) duruma ise izole sistolik hipertansiyon denir (42).

Erişkinlerde kan basıncı değerlerinin sınıflandırılması nitel olmakla birlikte, pratikte hekimlerin tedaviye yaklaşımına kolaylık sağlamak için kan basıncı seviyelerinin dikkate alınması yararlıdır. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Birleşik Komite (JNC, Joint National Committee) VII. Raporu'nda 18 yaş ve üzeri erişkinlerde kan basıncı dört sınıfa ayrılmıştır (Tablo 2.1). Bu sınıflandırma anti-hipertansif ilaç almayan ve akut olarak hasta olmayanlar için kullanılır. Sınıflandırmada kullanılan kan basıncı değerleri, ölçme tekniklerine uygun olarak en az iki farklı muayenede alınan iki ölçüm sonucunun ortalamasıdır. Sistolik ve diyastolik kan basınçları farklı sınıflara düşerse, kişinin kan basıncı durumunu değerlendirmek için daha yüksek olan kan basıncı derecesi dikkate alınmaktadır (43).

2.1.2. Hipertansiyonun Epidemiyolojisi

Hipertansiyon, insanların çoğunun yaşamlarının bir sürecinde karşı karşıya kaldıkları tıbbi ve toplumsal önemi giderek artan bir hastalık haline gelmektedir. Hipertansiyonun ülkeden ülkeye prevalansı değişmekle birlikte tüm dünyada morbidite ve mortalite nedenleri arasında en önde gelen sorunlardan biridir. 2000 yılında dünyada erişkin nüfusun % 26,4'ünde (erkeklerde %26,6 ve kadınlarda %26,1) hipertansiyon olduğu ve bu oranın 2025 yılı itibariyle % 29,2'ye çıkacağı öngörülmektedir (44). Dünyada yaklaşık olarak 1 milyar kişinin hipertansiyon hastası olduğu ve yılda 7,1 milyon kişinin hipertansiyon ve hipertansiyona bağlı sebeplerden öldüğü tahmin edilmektedir (45).

Tablo 2.1. JNC VII. Raporuna göre 18 yaş ve üzeri erişkinlerde kan basıncı sınıflandırması

Sınıf	SKB(mmHg)	DKB(mmHg)
Normal	<120	<80
Prehipertansiyon	120-139	80-89
Evre 1 Hipertansiyon	140-159	90-99
Evre 2 Hipertansiyon	≥160	≥100

Ülkemizde 2003-2004 yıllarında yapılan TEKHARF (Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri) çalışması 33 yaşını aşkın katılımcılardan anti-hipertansif ilaç kullanan, ya da kan basıncı >140 ve/veya 90 mmHg olanların oranının erkeklerde %38, kadınlarda ise %46 olduğunu göstermiştir. Buna göre, ülkemizde halen 5.2 milyon erkek ile 6.6 milyon kadında hipertansiyonun var olduğu tahmin edilmektedir (46). Ülkemizde yapılan bir diğer çalışma ise Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği'nin 2003-2004 yılları arasında yaptığı PatenT (Turk Hipertansiyon Prevalans Çalışması, Prevalence, awareness and treatment of hypertension in Turkey) çalışmasıdır. Bu çalışma Türkiye'de 7 bölge ve 26 ilde, 18 yaş üzeri 4910 kişi ile yapılmış olup, hipertansiyon prevalansı % 31,8 bulunmuştur. PatenT çalışmasında hipertansiyon prevalansı kadınlarda % 36,1 iken erkeklerde % 27,7 olarak saptanmıştır. Hipertansiyonlu bireylerin sadece % 40,7'sinin hastalıklarının farkında olduğu, hastaların sadece % 31,1'inin anti-hipertansif tedavi aldığı, tedavi alanların ise sadece % 20,7'sinde kan basıncının kontrol altında olduğu tespit edilmiştir (47).

2.1.3. Hipertansiyonun Etiyolojisi ve Etiyolojik Sınıflandırması

Hipertansiyon bir çeşit kan basıncı düzenlenmesi bozukluğudur ve birçok nedenden dolayı ortaya çıkar. Hipertansiyonun etiopatolojisi hakkındaki bilgiler hala tam olarak netleşmemiştir. Bununla beraber kan basıncı yüksekliği temelde primer ve sekonder hipertansiyon olarak ikiye ayrılır. Hipertansiyon olgularının yaklaşık %95'nin nedeni tam olarak bilinmez. Bu tip hipertansiyona 'primer' veya 'idiyopatik' veya en sık kullanılan terimle 'esansiyel hipertansiyon' da denilmektedir (48). Kan basıncının oluşmasını sağlayan iki ana bileşenden birincisi kalbin pompalama gücü, ikincisi ise periferik arter direncidir. Bu komponentlere birçok faktörün katkısının olduğu bilinmektedir. Bu iki ana komponentin birisinde veya her ikisinde oluşan patolojiler hipertansiyona neden olmaktadır (42). Primer hipertansiyonun patogenizinde rol oynadığı ileri sürülen bazı faktörler şunlardır (7, 42, 45, 49):

- Genetik faktörler
- Fazla sodyum alımı, renal sodyum atılımında defekt
- Periferik direnç artışı

- Kalp debisi artışı
- Obezite
- İnsülin direnci ve hiperinsülinemi
- Renin-anjiyotensin sisteminin rolü
- Stress ve aşırı sempatik aktivite
- Hücre zarı değişiklikleri
- Endotelyal disfonksiyon
- Serbest oksijen radikalleri
- Olası diğer mekanizmalar

Sekonder hipertansiyon ise belirli bir nedene bağlı olarak gelişen hipertansiyondur ve mevcut olguların %5'i bu gruptadır. Bu durumda hipertansiyon başka bir hastalığa ikincil olarak gelişen kan basıncı artışından kaynaklanmaktadır. Başlıca nedenleri arasında renal, kalp, endokrin, nörolojik ve vasküler anomaliler sayılabilir. Neden olan hastalık tedavi edildiğinde bu hastalarda hipertansiyon düzelebilir. Günümüzde hipertansiyon tedavisinde çok çeşitli ilaçlar yaygın olarak kullanılmakla birlikte, hastanın beslenmesi ve yaşam tarzı ile ilgili önlemler de alınmalıdır.

2.1.4. Deneysel Hipertansiyon Modelleri

Günümüzde yaygın bir sağlık problemi olan hipertansiyon ve hipertansiyona bağlı komplikasyonların birçok ülkede etkilediği popülasyon yüzdesi ve uzun vadedeki mortalite ve morbiditeye etkisi hipertansiyon üzerine yapılan araştırmaların önemini ortaya koymaktadır. Bu nedenle hipertansiyonun mekanizmasını aydınlatmak ve tedavi yöntemleri geliştirmek amacıyla çeşitli klinik ve deneysel yaklaşımlar uygulanmaktadır. Hipertansiyon ile ilgili araştırmalarda yüksek kan basıncı değerleri olan insanların yanı sıra daha detaylı girişimsel araştırmaların yapılabilmesi için deney hayvanlarından da sıklıkla yararlanılmaktadır. Bu tür çalışmalarda insandaki esansiyel hipertansiyonun karşılığı olan SHR modeli veya çeşitli girişimsel yollarla oluşturulan deneysel hipertansif modeller kullanılmaktadır.

Spontan hipertansif sıçanlar: Bu hayvanlar normalin üzerinde kan basıncı değerlerine sahip sıçanların en az birkaç nesil boyunca kendi aralarında çiftleştirilmesiyle elde edilir. Bir aydan fazla sürede sistolik kan basınçları devamlı 150 mmHg'nın üzerinde seyrettiği takdirde spontan hipertansiyon tanımlanır (50). İlk bir iki haftada sistolik kan basınçları 100-120 mmHg arasındadır ve sonrasında 12-14 haftalardan itibaren hipertansiyon gelişir (50). Genetik predispozisyon nedeniyle sıçanlardaki kendiliğinden gelişen bu hipertansiyon, insanlardaki esansiyel hipertansiyon oluşumunu andırır.

Dahl-Tuz Hipertansiyon Modeli: Dahl ve arkadaşları tarafından, genetik özellikleri farklı olan; tuza dirençli ve tuza duyarlı iki ayrı sıçan soyu geliştirilmiştir. Tuza duyarlı olan sıçanlarda normalin üzerinde tuz alımı hipertansiyon oluşumunu uyarmaktadır (51, 52).

DOCA-Tuz Hipertansiyon Modeli: DOCA-tuz hipertansiyonu farmakolojik olarak oluşturulan hipertansiyon modelidir. Tek böbreği alınmış sıçanlara iyileşme sürecini takiben cilt altından periyodik olarak DOCA'nın (deoxycorticosterone- Acetate)

enjeksiyonu ve içme suyu olarak %1'lik sodyum klorür çözeltisi verilmesi kaydıyla hayvanların kan basıncında artış gözlenir (53). Bu deneysel hipertansiyon modelinin en büyük avantajı hipertansiyonun gelişim evreleri sırasında tuzun oynadığı rolün araştırılmasında önemli yarar sağlamasıdır (54).

Renal Hipertansiyon Modelleri: Sıçanlarda hipertansiyon oluşturmak için kullanılan diğer bir yöntem böbrek arterlerinin gümüş klipslerle daraltıldığı Goldblatt hipertansiyon modelidir. Hayvanın iki böbreği de sağlamken tek böbrekteki renal arter gümüş klipsle daraltılırsa "iki böbrek bir klips" deney modeli olarak adlandırılır (55). Şayet hayvanın bir böbreği alındıktan sonra diğer böbreğe giren renal arter gümüş klips yardımıyla daraltılırsa "bir böbrek bir klips" deney modeli oluşturulur ve her iki modelde de kan basıncı artar (54, 56).

NOS Blokajıyla Oluşan Hipertansiyon Modeli

1992 yılında iki farklı araştırma grubunun yapmış olduğu çalışmaya göre kronik olarak oral NOS inhibitörü uygulamasının hipertansiyona neden olduğu gösterilmiş ve bu uygulamanın arteriyel hipertansiyon modeli olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (38). Hayvanlara NOS inhibitörünün yüksek dozlarda verilmesi daha ağır hipertansiyona yol açarken ilerleyen dönemlerde böbrek hasarına da neden olmaktadır (38, 57). Periferik arteriyel direncin artması ile NO arasında bir ilişkinin olduğu ve kan basıncının uzun vadede düzenlenmesinde NO'nun katkısının olduğu bilinmektedir (58, 59). Bununla ilişkili olarak NOS enziminin kronik olarak inhibisyonu ile periferik arteriyel direnç artışı ve dolayısıyla sistemik hipertansiyon gelişimi saptanmıştır (59, 60)

Bu yöntemde NG–nitro-L-Arjinin (L-NNA), L-NAME gibi L-arginin analoglarının uygulanmasıyla NOS enzimlerinin kronik kompetitif inhibisyonu sağlanır ve bunun sonucunda arteriyel kan basıncı artar (61). L-NAME, esterazlarla L-NNA'ya metabolize olur ve dokulara bu şekilde geçer (62). Bir L-arginin analogu olan L-NAME sıçanlarda hipertansiyon oluşturmak için kullanılan ilk NOS inhibitörüdür (37-39). L-NAME'in suda çözünebilmesi ve içme suyuyla birlikte hayvanlara verilebilmesi, bu modelin kolaylıkla ve yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Sıçanlarda L-NAME'nin intraperitoneal enjeksiyonu da hipertansiyon oluşturmak için kullanılan diğer bir uygulamadır.

Kronik NOS inhibisyonuyla oluşturulan hipertansiyonun gelişimine katkısı olduğu ileri sürülen mekanizmalar arasında total periferik direnç artışı, sempatik sistem aktivasyonu, çeşitli vazoaaktif maddeler ve artmış renal sodyum tutulumu sayılmaktadır (38, 63). Yüksek doz L-NAME ve L-NNA uygulaması ile yapılan uzun süreli NOS inhibisyonunda dokularda hasar oluşmakla birlikte böbreklerde tübüler nekroz ve glomeruloskleroz, damarlarda media tabakasında kalınlaşma ve kalpte fokal nekroz odakları oluşabilmektedir (38). Mevcut veriler ışığında düşük doz NOS inhibitörleri ile oluşturulan hipertansiyondan esasen sodyum tutulumunun, yüksek doz NOS inhibitörleri ile oluşturulan hipertansiyondan ise total periferik direnç artışının sorumlu olduğu kabul edilmektedir (64).

Deneysel L-NAME hipertansiyon modelinin uygulandığı sıçan çalışmalarında, bu inhibitörün değişen dozlardaki ve uygulama sürelerindeki etkisi incelendiğinde farklı kan basıncı artışları gözlenmiştir (39, 61, 65). Farklı soylardaki

sıçanlara aynı dozda L-NAME uygulanmasının kan basıncını farklı düzeylerde değiştirdiği belirtilmektedir (37).

2.1.5. Deneysel Hipertansiyonda Hipomagnezemi

Hipertansiyonda hemodinamik anormalliklerin temelini arterlerde lümen genişliğinin azalması nedeniyle periferik rezistans artışı oluşturur. Lümen genişliğinin daralması ve periferik direnç artışı küçük arterlerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olabilir. Bu değişimler, ekstrasellüler matriks içeriğinin değişmesi ve hücre büyümesinden dolayı ortamın kalınlaşması ile kontraksiyon artışı ve/veya vasodilatasyonun azalmasından dolayı vasküler tonus değişimleridir. Bu süreçlerde birçok faktörler etkili olmakla birlikte magnezyum da bu süreçlerde kilit rol oynayabilir (66).

Magnezyum genel olarak vücutta en çok bulunan dördüncü, hücre içinde ise (potasyumdan sonra) ikinci katyondur. Kardiyovasküler sistemde önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Kontraktil proteinlerin regülasyonu, Ca^{2+} , Na^{+} ve K^{+} 'un membran boyunca taşınması, ATPaz aktivitesi için temel kofaktör olması, enerji bağımlı sitoplazmik ve mitokondriyal yolların regülasyonu, DNA ve protein sentezi gibi önemli fonksiyonların gerçekleşmesinde Mg^{2+} sellüler seviyelerde etkilidir (67, 68). Sistemik olarak Mg^{2+} kan basıncını düşürür ve periferik damar direncini düzenler. Magnezyum seviyesindeki anormallikler neredeyse tüm organları etkileyebilir ve hatta ventriküler aritmi, koroner arter vazospazmı, ani ölüm gibi ölümcül komplikasyonlarla da sonuçlanabilir (66).

Çeşitli deneysel hipertansiyon modellerinde doku Mg^{2+} içeriğinin azaldığı gösterilmiştir (69-74). SHR, DOCA-tuzu hipertansiyon ve NOS blokajına bağlı hipertansiyon modellerinde $[Mg^{2+}]_i$ konsantrasyonunun hem kardiyak miyositlerde, hem de çizgili ve vasküler düz kas hücrelerinde normotensif kontrollere göre azaldığı gösterilmiştir (74-79). Hipomagnezemiye Mg^{2+} absorpsiyonunun azalması ve üriner Mg^{2+} atılımının artması katkıda bulunan süreçlerdir. Mg^{2+} metabolizmasını etkileyen bir başka süreç de plazma membranındaki bir yapısal değişiklik dolayısıyla Mg^{2+} 'a geçirgenliğin azalmasıdır (80).

2.2. Magnezyum Homeostazi

Ortalama kiloya sahip bir erişkin bireyin vücudundaki toplam Mg^{2+} miktarı 25 gram, yani 1000 mmol'dür. Yaklaşık olarak, bunun % 60'ı kemiklerde bulunurken, % 20'si kasta, diğer %20'si yumuşak dokularda ve karaciğerdedir. Toplam vücut Mg^{2+} 'ın % 99'u hücre içinde, sadece % 1'i hücre dışındadır (81). Plazma Mg^{2+} 'unun da % 80 i iyonizedir veya hücre zarından geçebilecek okzalate, fosfat ve sitrat gibi iyonlarla kompleks haldedir. Bu % 80'lik iyonize kısım böbreklerde glomerüler filtrasyona uğrar. Diğer % 20lik kısım proteinlere bağlıdır. Normal plazma Mg^{2+} konsantrasyonu 1.7-2.1 mg/dl dir. Mg^{2+} homeostazını kontrol eden ana faktörler gastrointestinal sistemden Mg^{2+} emilimi ve renal atılımdır (82). Tablo 1'de yaşlara göre günlük Mg^{2+} alımı verilmiştir. Mg^{2+} doğada bol miktarda bulunur ve özellikle yeşil sebzeler temel kaynakların başında yer alırlar. Tahıllarda, kuruyemişte, hububatta, baklagillerde ve çikolatada da bol miktarda bulunur. Et ve balıkta orta derecede bulunmasına rağmen bu besinlerin işlenmesi ve pişirilmesi Mg^{2+} içeriğini azaltır.

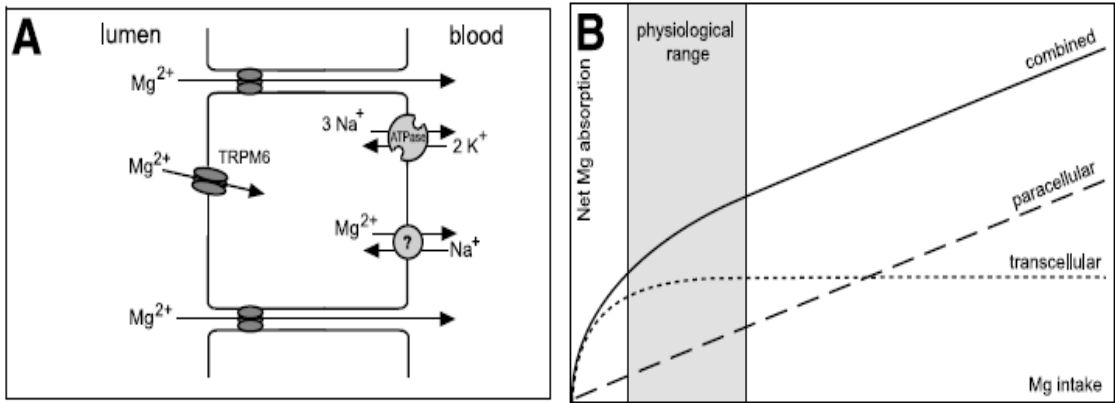
Tablo 2.2. Günlük Mg²⁺ ihtiyacının yaşlara göre dağılımı (83)

YAŞ	ERKEK	KADIN	HAMİLE
0-6 ay	30 mg	30mg	
7-12 ay	75 mg	75 mg	
1-3 yaş	80 mg	80 mg	
4-8 yaş	130 mg	130 mg	
9-13 yaş	240 mg	240 mg	
14-18 yaş	410 mg	360 mg	400 mg
19-30 yaş	400 mg	310 mg	350 mg
31-50 yaş	420 mg	320 mg	360 mg
51+ yaş	420 mg	320 mg	

2.2.1. Mg²⁺ Emilimi

İntestinal Mg²⁺ absorpsiyonu iki farklı yol aracılığıyla gerçekleştirilir: transselüler transport sistemi ve parasellüler pasif transport sistemi (84, 85) (Şekil 2.1A). Düşük intralüminal konsantrasyonlarda birincil olarak aktif transport yoluyla ve konsantrasyon artışıyla birlikte parasellüler yolakla absorpsiyon gerçekleşir (Şekil 2.1B).

Mg²⁺ emilimi besinden alınan miktara bağlıdır. Ortalama bir Mg²⁺ alımında vücuda giren miktarın yaklaşık % 30-40'ı emilir. Daha açık bir ifadeyle günde 1 mmol düzeyinde Mg²⁺ alınması halinde % 80'i emilirken, 25 mmol düzeyinde yüksek Mg²⁺ alınırsa bunun yaklaşık olarak % 25'i emilir. Büyük oranda sadece iyonize Mg²⁺ emilir. Lümende fosfat ve yağ düzeyleri artarsa bu durum Mg²⁺ emilimini azaltır.



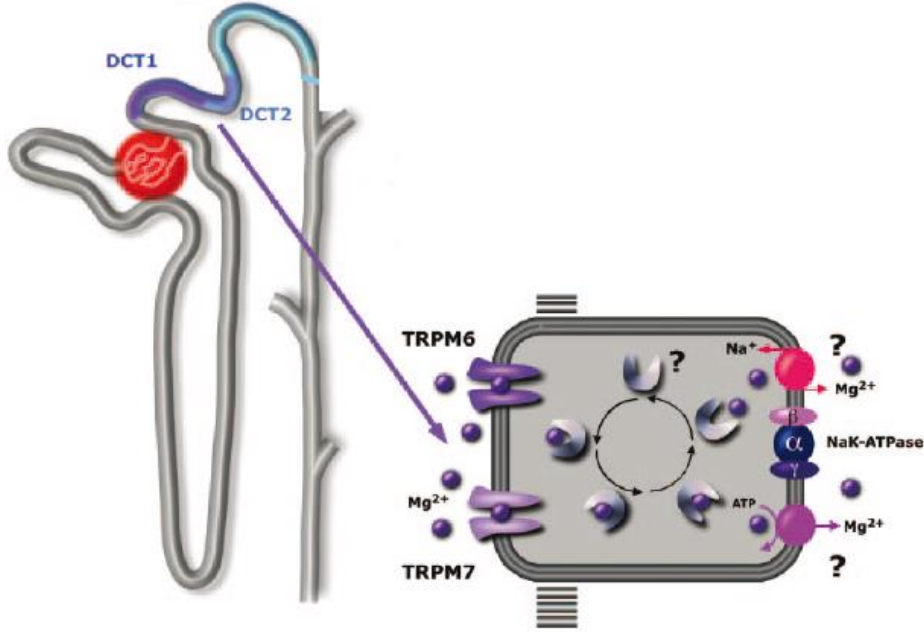
Şekil 2. 1. A: İntestinal Mg²⁺ emilimi, B: Doymamış paraselüler ve doyurulabilir transselüler taşıma fonksiyonu eğrileri (86)

- Yüksek Ca²⁺ alımı, Mg²⁺ emilimini azaltabilir.
- Düşük Mg²⁺ alımı, Ca²⁺ emilimini yükseltir.
- Paratireod hormonun, Mg²⁺ emilimini artırıcı etkisi vardır.

- Ca^{2+} emilimini azaltan glukokortikoidler (ki hiperkalsemi de glukokortikoid tedavisinin yeri vardır) jejunumda Mg^{2+} transportunu artırır.
- Vitamin D'nin de Mg^{2+} emilimini artırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir.

2.2.2. Böbreklerin Mg^{2+} Homeostazisindeki Rolü

Böbreklerin Mg^{2+} dengesinde önemli bir rolü vardır. Plazma Mg^{2+} 'unun % 80'i iyonize durumdadır ve bu % 80'lik kısmı kolayca glomerüler filtrasyona uğramaktadır. Filtre olan Mg^{2+} 'un yaklaşık olarak % 95'i nefronun değişik bölümlerinden geri emilir. Mg^{2+} geri emilimi en çok Henlenin çıkan kalın segmentinden olmaktadır (geri emilimin % 50-70'i). Proksimal tübülden, geri emiliminin sadece % 15-25'i ve distal tübülden ise % 5-10'u olmaktadır (87, 88). Distal tübüdeki geri emilim ise aktiftir ve bir katyon kanalı olan TRPM-6 aracılığıyla olur. Mg^{2+} 'un hücreden interstisyuma basolateral kenardan transportu Na-K ATPaz aracılığıyla olmaktadır (Şekil 2.2) (88-90).



Şekil 2.2. Transselüler Mg^{2+} transportu (91)

2.2.3. Böbreklerin Mg^{2+} Dengesini Etkileyen Faktörler

Vücut sıvı miktarı, serum Mg^{2+} düzeyi, hormonlar ve birçok faktör Mg^{2+} reabsorpsiyonunu etkiler.

- **Ekstra sellüler sıvı hacmi:** Ekstrasellüler sıvı hacmindeki artış böbreklerden Ca^{2+} , Na^{2+} ve Mg^{2+} atılımını artırır (Henle kulbundan Mg^{2+} geri emilimini azaltır).

- **Glomerüler Fitrasyon Hızı (GFR):** Kronik böbrek yetmezliğinde GFR düşerken, fraksiyonel Mg^{2+} geri emilimi de haliyle azalır. Fakat hasta son dönem böbrek yetmezliğine erişinceye kadar plazma Mg^{2+} değeri normal sınırlarda kalır.
- **Plazma Mg^{2+} ve Ca^{2+} konsantrasyonu:** Hiperkalsemi ve hipermagnezemi, Ca^{2+} 'ya duyarlı reseptör aracılığıyla gerçekleşen Mg^{2+} geri emilimini inhibe eder. Ayrıca fosfat azlığı da üriner Mg^{2+} atılımını artırır.
- **Asit ve baz durumu:** Kronik metabolik asidoz böbreklerden Mg^{2+} kaybıyla sonuçlanır. Kronik metabolik alkaloz ise, tam tersi etki yaratır.
- **Hormonlar:** Renal Mg^{2+} geri emiliminin kontrolü birçok hormon tarafından kontrol edilir. Henlenin çıkan kolundaki Mg^{2+} transportunu etkileyen birkaç hormon gösterilmiştir: PTH, kalsitonin, glukagon, arjinin vazopressin hormon ve beta adrenerjik agonistler.

2.2.4. Transselüler Mg^{2+} transportu

2.2.4.1. Magnezyum çıkışının regülasyonu

Magnezyum çıkışı, Na^+ -bağımlı ve Na^+ -bağımsız sistemler içerir. Sodyum bağımlı Mg^{2+} transportu Na^+/Mg^{2+} değiş-tokuşçusu aracılığıyla gerçekleştirilirken, Na^+ -bağımsız mekanizmalar Ca^{2+}/Mg^{2+} değiş-tokuşçusu, Mn^+/Mg^{2+} antiporter ve Cl^-/Mg^{2+} ko-transporterlerini içerir ve ekstrasellüler iyonlarla Mg^{2+} 'u değiştirir (92-94). Na^+/Mg^{2+} değiş-tokuşçusu, vasküler düz kas hücreleri ve kardiyak miyositleri de içeren bazı hücrelerde gösterilmiştir ve Ang II, vasopressin, isopreterenol, endotelin-1 ve insülin tarafından regüle edilir. Sodyum bağımsız Mg^{2+} atılım yolları ise eritrosit ve hepatik hücrelerde gösterilmiştir (95-98).

2.2.4.2. Magnezyum girişinin regülasyonu

Fonksiyonel çalışmalarda katyon kanalları boyunca ve Na^+ 'un elektrokimyasal gradiyentinden yararlanan karşıt-taşıma (counter-transport) yolları yoluyla Mg^{2+} /anyon eş-taşıma (co-transport) ile hücrelere Mg^{2+} girişinin olduğu ileri sürülmüştür. Farklı dokularda en az yedi adet transselüler Mg^{2+} kanalı klonlanmıştır. Bu kanallar:

- **Mitokondriyal RNA splicing 2 protein (Mrs 2p);** yüksek kapasitede bir Mg^{2+} girişine aracılık eder ve ana mitokondriyal taşıyıcıdır (99).
- **İnsan solute carrier family 41 üyeleri 1 ve 2 (SLC41A1, SLC41A2) kanalları;** genel iki değerlikli iyonların geçişine izin veren katyon kanallarıdır ve voltaj-bağımlı bir mekanizmada Mg^{2+} taşınmasına aracılık eder (100, 101).
- **Ancient conserved domain proteoin 2 (ACDP2);** ACDP2 aracılığıyla Mg^{2+} alımı voltaj bağımlıdır ve Na^+ ya da Cl^- ilişkili değildir (101).
- **Magnezyum transporter 1 (Mag T1);** diğer iki değerlikli katyonlara düşük bir permeabiliteyle birlikte büyük Mg^{2+} akımı ortaya çıkarır. Ekstrasellüler Mg^{2+}

konsantrasyonu aracılığıyla regüle edilir ve önemli bir memeli Mg^{2+} taşıyıcısıdır (101).

Bu taşıyıcıların çoğu renal dokuda lokalizedirler ve vücudun Mg^{2+} homeostazında çok önemlidirler (Tablo 2.3).

- **Transient reseptör potansiyel melastatin katyon kanalı 6 ve 7 (TRPM6, TRPM7);** Magnezyum transportunda TRPM 6 ve TRPM 7 de çok önemli bir yere sahiptir (102, 103). TRPM 6 primer olarak intestinal epitelde ve böbrek tübüllerinde eksprese edilirken, TRPM 7 kan damarlarında, kalpte, beyinde, akciğerde, karaciğerde, dalakta ve intestinal sistemde eksprese edilir (102, 104, 105). TRPM 7 iki değerlikli katyonlara geçirendir, esansiyel izmetaller olan Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} elementlerini ve fizyolojik olarak dominant olan Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarını geçirmektedir (103, 105-107). TRPM 6 gastrointestinal sistemde ve böbrekler boyunca toplam vücut Mg^{2+} regülasyonunda görev alırken, TRPM 7 intrasellüler Mg^{2+} homeostazında önemlidir (108, 109). TRPM 7 sitozolük Mg^{2+} ya da Mg^{2+} -ATP'deki değişim ile regüle edilmektedir. İntrasellüler Mg^{2+} yeterli seviyeye geldiği zaman Mg^{2+} alımını azaltmak için negatif bir geri besleme mekanizması gibi davranarak intrasellüler Mg^{2+} TRPM 7 kanalını inhibe eder. Düşük Mg^{2+} konsantrasyonlarında bu inhibisyon ortadan kalkar, kanal açılır ve sitozolük Mg^{2+} normal seviyelerine döner. Mg^{2+} ve Mg^{2+} -ATP'nin modülatör etkisi kanalın protein kinaz domaini ile ilişkili olabilir (110-112). Vasküler düz kas hücrelerinde Ang II ve aldosteronun TRPM 6 ve TRPM 7 ekspresyonunu modüle ettiği ve TRPM 7 bağımlı Mg^{2+} transportunu etkilediği gösterilmiştir (113).

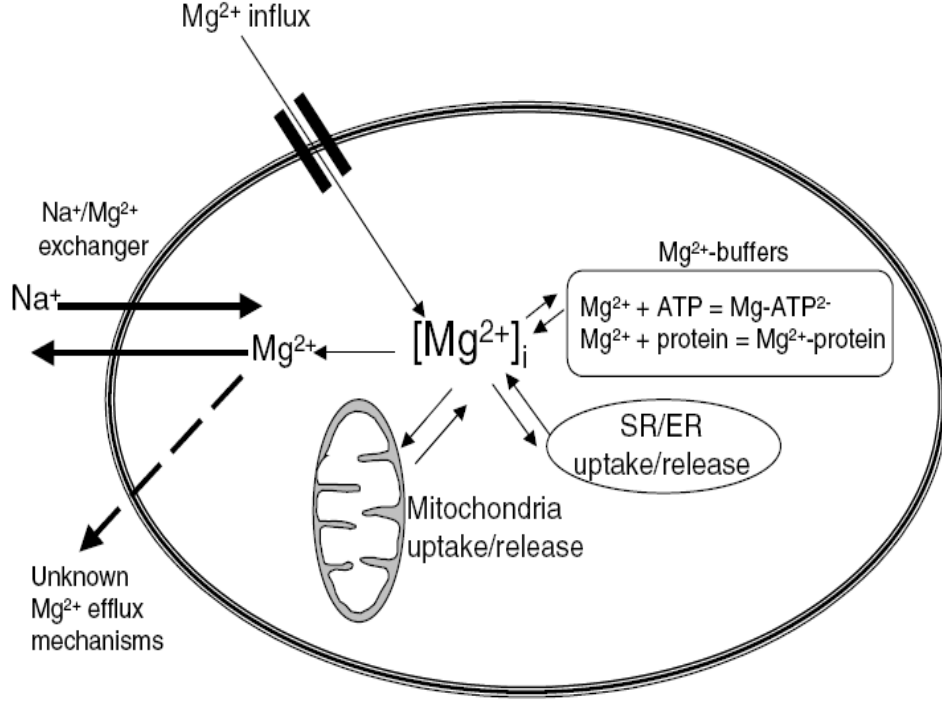
Tablo 2.3. Kardiyovasküler ve renal hücrelerde Mg^{2+} taşıyıcıları (19)

Taşıyıcı	Hücre/doku
TRPM6	Böbrek tübülleri Vasküler düz kas hücreleri
TRPM7	Vasküler düz kas hücreleri Kardiomyositler
SLC41A1	Böbrek Kalp
SLC41A2	Böbrek
MagT1	Distal tübüler hücreler
ACDP2	Böbrek Korteksi
Paraselin-1	Henle kulpu
Mrs2p	İç mitokondrial membran

2.2.5 Hücre içi Mg^{2+} regülasyonu

Birçok biyokimyasal reaksiyonda kritik bir bileşen olması nedeniyle Mg^{2+} 'un hücre içi konsantrasyonu çok sıkı regüle edilir. Kardiyovasküler hücrelerde Mg^{2+} 'un hücre dışına atılmasından sorumlu taşıyıcılar hala kesin olarak bilinmemekle birlikte hem düz kas, hem de kardiyak hücrelerde Na^+/Mg^{2+} antiporterları olduğu ileri sürülmektedir. Na^+/Mg^{2+} değiş-tokuşucu ilk olarak mürekkep balığı akzonunda gösterilmiş ve elektrokimyasal gradientle Na^+ hücre içine alınırken Mg^{2+} 'un hücre

dışına atıldığı iddia edilmiştir. Ayrıca, Na^+ bağımlı Mg^{2+} taşınımının amiloride, quinidine, imipramine ve mangenez ile inhibe olduğu gösterilmiştir (114-116). Hücre içerisinde Mg^{2+} çekirdek, mitokondri ve ER/SR'da depolanır ve regülasyonu intraselüler tamponlar, hormonlar ve vasoaktif ajanlarla sağlanır. Phorbol esterler, isoproterenol, glutatyon (GSH) ve endotelin-1 (ET-1) intraselüler Mg^{2+} konsantrasyonunu artırır; buna karşılık Ang II, vasopressin, aldosteron, norepinefrin ve epinefrin Mg^{2+} çıkışını stimüle eder ve $[\text{Mg}^{2+}]_i$ azalır. (Şekil 2.3) (66).



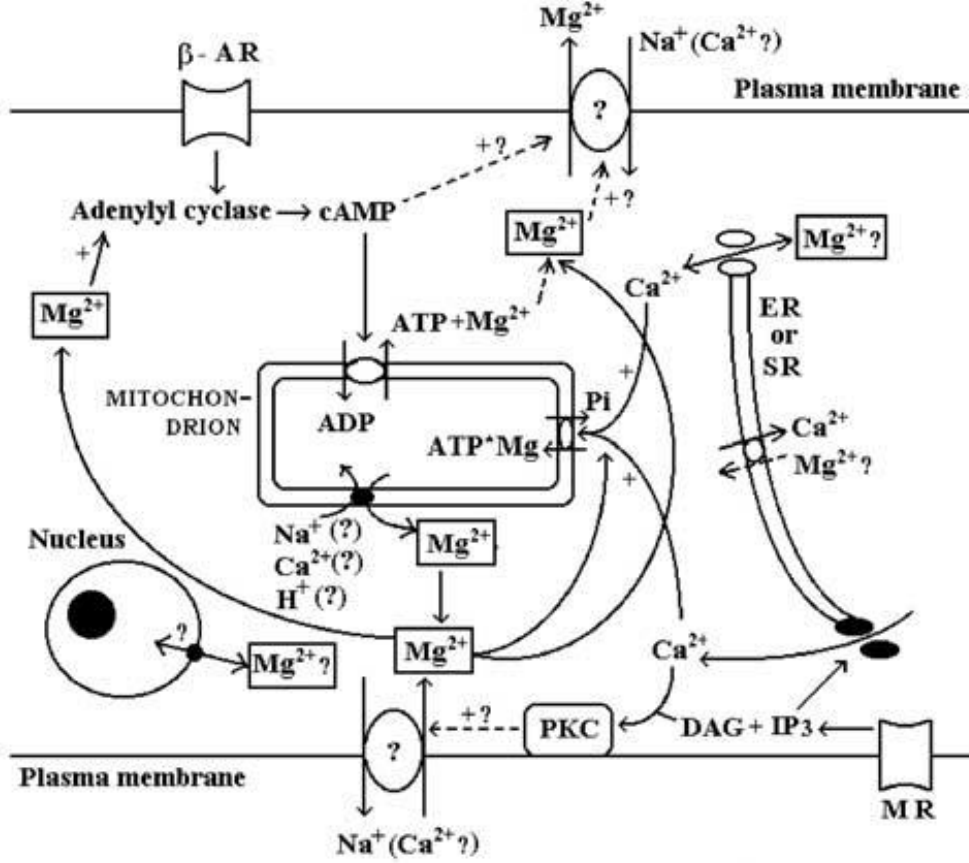
Şekil 2. 3. Mg^{2+} 'un plazma membranı, hücre içi organeller ve intraselüler tamponlar tarafından regülasyonu (66)

2.2.6. Hipertansiyonda Vasküler Değişimlerde Mg^{2+} Rolü

Hipertansiyon primer olarak periferel damar sistemindeki fonksiyonel, yapısal ve mekaniksel değişikliklerle bağlantılı olarak, periferel vasküler direnç artışıyla ilişkilidir (117, 118). Periferel direnci arttıran fonksiyonel değişiklikler, vazokonstriktör ajanlara karşı vasküler reaktivitenin artması, vazodilatasyonun bozulması ve hücrelerin elektriksel özellikleri ile uyarılma-kasılma çiftlenimindeki değişiklikleri içerir. Magnezyum bu süreçlerde çok önemli bir rol oynar (119-121).

Ekstraselüler Mg^{2+} konsantrasyonundaki artış vazodilatasyona sebep olur ve agonist indüklü vazokonstriksiyonu zayıflatır, buna karşılık konsantrasyon düşüşü kontraksiyona neden olur. Mg^{2+} 'un kontraktiliteye etkisinin moleküler temeli tam olarak bilinmemesine rağmen, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regülasyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir (122, 123). Vasküler düz kas hücresinde, Mg^{2+} hücre dışında Ca^{2+} girişini ve Ca^{2+} 'un membrandan taşınmasını inhibe ederek vazokonstriktör ajanların kontraktıl etkisini azaltır, ya da intraselüler olarak Ca^{2+} antagonisti gibi davranarak artmış $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 'de vazokonstriktör etkileri modüle eder. Vasküler tonus üzerine Mg^{2+} 'un etkileri Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi üzerine etkilerinden dolayı olabilir. Na^+/K^+

ATPaz pompası, Na^+ ve K^+ transportunu ve vazodilatasyonun modülasyonu için önemli faktörler olan cAMP ve cGMP fosforilasyonunu regüle eder (124, 125).



Şekil 2.4. Memeli hücresinde selüler Mg^{2+} homeostazının regülasyonu (23).

Vasküler kontraksiyonda rolü olan sinyal iletim yollarındaki bazı enzimler üzerine etkilerinden dolayı Mg^{2+} seviyesinin düşmesi önemli sonuçlara yol açar. Bazı çalışmalarda hipertansiyonda vasküler Mg^{2+} seviyelerinin belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir (124-126). Hipertansiyonda görülen selüler Mg^{2+} eksikliğinin altında yatan mekanizmalar bilinmiyor olsa da, Mg^{2+} eksikliği durumunda membran geçirgenliği azalmakta, Na^+ - Mg^{2+} değiş tokuşu ve hücrelerin yanıtı değişmektedir. Ayrıca, damar düz kas hücrelerinde hiperplazi, hipertrofi, elangasyon tespit edilmiş ve arterlerde lümen çevresindeki hücrelerde reorganizasyon olduğu gösterilmiştir (125, 126).

Mg^{2+} hücre büyümesi ve farklılaşmasını da düzenlemektedir. Çoğalabilen hücrelerde, diğerlerine göre daha fazla Mg^{2+} bulunmakta ve yüksek ekstraselüler Mg^{2+} enerji metabolizmasını, protein sentezini ve DNA'yı stimüle etmektedir. Mg^{2+} , DNA yapısının stabilizasyonunu, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu, RNA translasyonunu ve iyon kanallarının açılıp-kapanmasını etkiler. Aynı zamanda Mg^{2+} , mitojen aktivated protein kinaz, Rho/Rho kinaz, PI3K ile tirozin kinaz aktivitelerini etkileyerek hücre büyümesini düzenler (127-130). Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğu vasküler olmayan hücrelerle ilişkili olmakla birlikte, yakın

dönemde genetik hipertansif sıçanlarda Mg^{2+} metabolizmasındaki değişikliklerin vasküler düz kas hiperplazisi ve hipertrofisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (66).

2.2.7. Vasküler Tonus Regülasyonu ve Mg^{2+} Reaktivasyonu

Mg^{2+} tuzu infüzyonu ile periferik vasküler dirençteki azalma yoluyla kan basıncının düştüğü ve böylece akut Mg^{2+} uygulamasının vasodilatör etkisi nedeniyle hipotansiyona yol açtığı gösterilmiştir (131, 132). Ekstraselüler Mg^{2+} konsantrasyonunun artması, kan basıncını düzeltirken, vasküler direnci düşürmektedir. Ekstraselüler Mg^{2+} eksikliğinde ise bu etkilerin tersi gözlenmektedir (80, 133).

Hipermagnezemi venüllerde, venlerde, arterlerde ve arteriyollerde spontan tonusu inhibe eder, kan akışına karşı arteriyel direnci azaltır (134). Ekstraselüler Mg^{2+} konsantrasyonundaki artışın vasküler direnci düşürmesinin mekanizması anlaşılammış olmakla birlikte, Mg^{2+} ilişkili vazorelaksasyonun doz bağımlı olarak hızlı bir şekilde meydana gelmesi damar sistemi üzerine direkt etkisiyle ortaya çıktığını göstermektedir. İn vitro çalışmalarda ekstraselüler Mg^{2+} konsantrasyonundaki artışın, izole edilen damarların Ca^{2+} indüklü kontraksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ekstraselüler Mg^{2+} konsantrasyonundaki artış ile spontan mekanik aktivitenin ve bazal vasküler tonun azalması ekstraselüler Ca^{2+} 'un doz bağımlı artışı ile geri döndürülür. Bu veriler, Mg^{2+} 'un Ca^{2+} ile yarışmalı olarak vasküler düz kas hücrelerinin aktivitesini regüle ettiğini ve intraselüler toplam ve serbest Ca^{2+} seviyelerini modüle ettiğini gösterir. 1.2 mmol/L bazal seviyenin üzerinde Mg^{2+} konsantrasyonundaki bir artış vazokonstriktör etkiyi zayıflatır ve bazı vazoaaktif ajanların vazorelaksan özelliklerini etkili hale getirir (66).

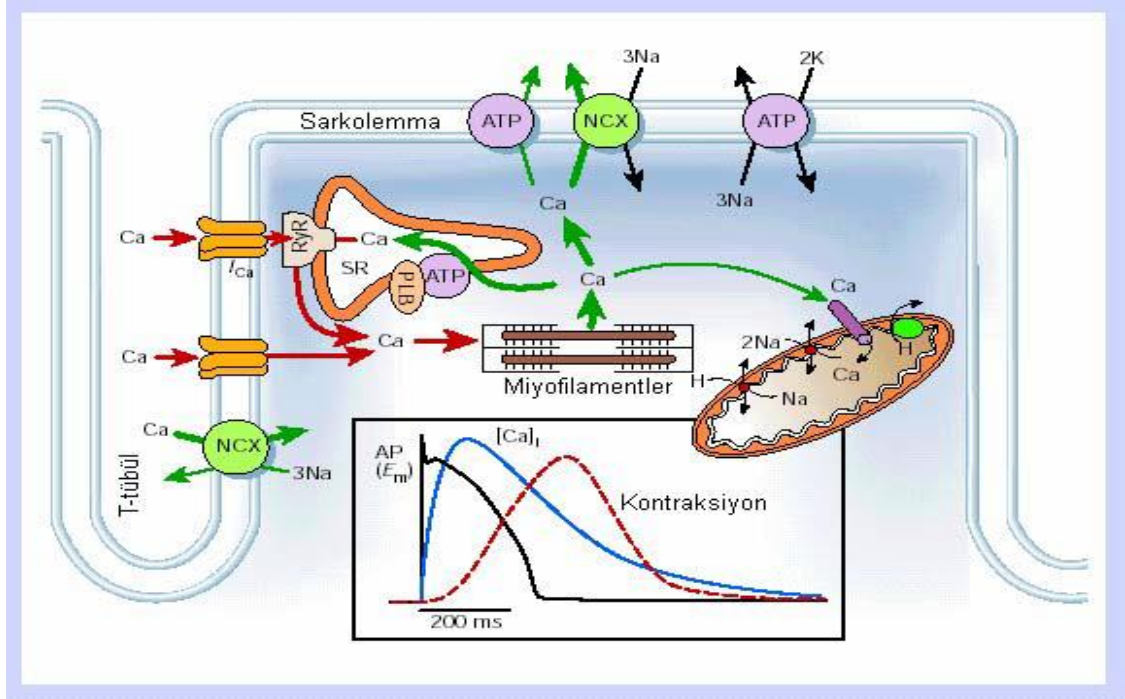
2.3. Kardiyak Kasın Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

2.3.1. Genel Şema

Kardiyomiyositleri saran hücre zarı (sarkolemma) depolarizasyonu ile başlayan ve kalbin kasılmasına kadar süren olaylar zincirine uyarılma-kasılma çiftlenimi (excitation-contraction coupling) adı verilir. Miyositlerin senkronizasyonu, komşu hücreler arasındaki interkale disklerde lokalize olan oyuk-kavşaklar (gap junction) boyunca elektriksel iletim yoluyla mümkündür. Kalp kasının kasılması diğer kaslarda da olduğu gibi kası oluşturan hücrelerin zarlarının depolarizasyonu ile tetiklenir. Hücrelerin birbiriyle bağlantılı olmalarından dolayı oluşan AP bir hücreden diğerine geçer. Böylece, başlangıçta bir hücrenin uyarılması diğer bütün hücrelerin uyarılmasıyla sonuçlanır.

Sarkoplazmik retikulum (SR), ventriküler miyositlerde uyarılma-kasılma çiftlenimi sırasında intraselüler ortamda Ca^{2+} 'un yükselmesinden sorumludur. SR üzerinde bulunan ve Ca^{2+} salınım kanalı olarak bilinen ryanodin reseptörlerinin (RyR) yakınlarındaki lokal $[Ca^{2+}]_i$ artışı, SR'dan bu kanal aracılığıyla Ca^{2+} salınımını tetikler. Bu süreç ilk olarak Fabiato ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve Ca^{2+} -uyarımli Ca^{2+} salınımı (CICR) olarak isimlendirilmiştir (135, 136). CICR, ventriküler miyositlerde uyarılma-kasılma çiftleniminin temel mekanizmasını oluşturur. Sitolitik ortamda artan Ca^{2+} , Ca^{2+} -bağlayıcı protein olan Troponin C'ye

bağlanır ve hücre kasılması gerçekleşir. Relaksasyon için Ca^{2+} 'nın Troponin C'den ayrılması ve $[Ca^{2+}]_i$ 'nin ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Ca^{2+} 'un sitozolik ortamdaki uzaklaştırılması dört yolla gerçekleştirilir; SR Ca^{2+} -ATPaz (SERCA), sarkolemmal Na^+/Ca^{2+} değiş-tokuşucusu (NCX), sarkolemmal Ca^{2+} -ATPaz (PMCA) ve mitokondriyal Ca^{2+} unipoter (137). Şekil 2.5'de uyarılma kasılma çiftlenimi boyunca meydana gelen olaylar özetlenmiştir.



Şekil 2.5. Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca düzenlenmesi (137)

2.3.2. Ventriküler Aksiyon Potansiyeli

AP geçici depolarizasyon durumu olarak tanımlanabilir. AP oluşmasının altında zar geçirgenliklerindeki değişimler yatmaktadır. Dinlenme durumunda hücre zarı potasyum iyonlarına (K^+) daha geçirgen olduğu için dinlenme zar potansiyeli K^+ denge potansiyeline (Nernst Potansiyeli) yakın bir değerdedir (138).

Kalp AP'nin konfigürasyonu çeşitli fazlara bölünebilir. Şekil 2.6'da ventrikül hücresi AP'nin 5 fazı ve temel olarak her fazdan sorumlu olan akımlar görülmektedir. Faz 0 AP'nin sıçraması; faz 1 erken repolarizasyon evresi; faz 2 plato evresi; faz 3 asıl repolarizasyon fazı; ve faz 4 dinlenme potansiyeli evresidir.

Faz 0: AP'nin Na^+ akımlarına bağlı olan hızlı sıçrama evresidir. Bu akımın hızlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri vardır. 1 ms'de tepe değerine ulaştıktan sonra kendiliğinden azalır (inaktivasyon). Ufak bir depolarizasyonla Na^+ kanalları açılmaya başladığında, elektrokimyasal gradyentten dolayı Na^+ hücre içine girmeye başlar. Bu durum hücrenin daha fazla depolarize olmasına ve depolarize oldukça da yeni Na^+ kanallarının açılmasına neden olur.

Faz 1: AP'nin çıkışını hemen takip eden geçici ve bağıl olarak küçük repolarizasyon evresidir. Büyük oranda depolarizasyonla hızla açılan bir tip K^+ kanalının geçici dışarı doğru (transient outward (I_{to})) akımına bağlıdır. Daha az olmakla birlikte klor akımının da katkısı vardır.

Faz 2: Plato evresi olarak bilinen bu faz erken repolarizasyon fazını takip eden ve zar potansiyelinin göreceli sabit olduğu süreci kapsar. Kalp hücrelerinde görülen uzun AP'nin nedenidir. Platonun nedeni içeri doğru pozitif akımların dışarı doğru pozitif akımları neredeyse dengelemesidir. L-tipi Ca^{2+} kanallarından içeri doğru Ca^{2+} girişine karşılık, yavaş aktive olan K^+ (gecikmiş doğrultucu akım (I_K)) kanallarından K^+ dışarı çıkar. Buna ek olarak, I_{to} 'da platonun erken evresine katkıda bulunmaktadır.

Faz 3: Platoyu takip eden son repolarizasyon evresidir. İnaktivasyon nedeniyle I_{Ca} zamanla azalırken, yavaş aktive olan I_K artar ve baskın hale gelir. Bu akımın inaktivasyonu olmadığından, uzun sürelidir.

Faz 4: Ventrikül hücrelerinde 4. faz dinlenme potansiyelidir. Zar K^+ iyonlarına yüksek geçirgenlik gösterdiğinden potasyum denge potansiyeline yakın bir değer almaktadır. Dinlenme potansiyeli büyük oranda içeri doğrultucu (I_{K1}) da denenen bir tip K^+ akımı tarafından belirlenmektedir.

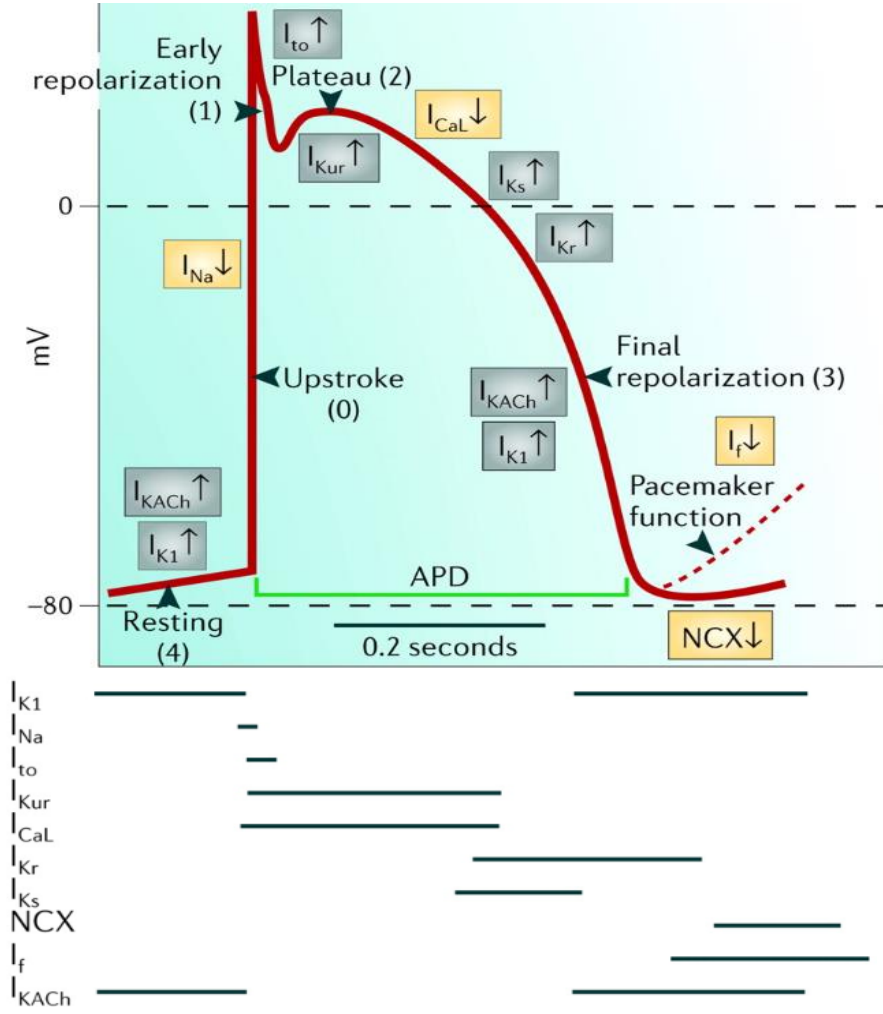
2.3.3. L-tipi Ca^{2+} Kanalları (LTCC)

L-tipi Ca^{2+} kanalları, tüm kardiyak miyositlerde eksprese edilen ve ventriküler miyositlerde baskın olan Ca^{2+} kanallarıdır. Büyük bir kondüktans, uzun sürede açılma ve aktivasyon için eşik değerin -40 mV olması LTCC için karakteristik özelliklerdir. İnaktivasyon yavaştır ve iki bileşen tarafından gerçekleştirilir; voltaj bağımlı inaktivasyon yavaş meydana gelirken, Ca^{2+} girişi ve SR'dan Ca^{2+} salınımı hızlı bir inaktivasyonu tetikler ve Ca^{2+} girişini sınırlar (139, 140).

Ca^{2+} girişi, transmembran iyonik akım olarak ölçülür (I_{CaL}) ve SR'dan Ca^{2+} salınımı tetikler. Repolarizasyonda I_{CaL} 'nin "kuyruk akımları" da SR Ca^{2+} salınımını tetikler(141, 142). Miyosit pozitif potansiyellere kenetlendiği zaman (örneğin +50 mV), Ca^{2+} 'un hücre içine girişi ile ilgili sürücü kuvvet çok küçüktür. Bu nedenle Ca^{2+} kanalları açık olmasına rağmen içeri doğru I_{CaL} oluşmaz ve dolayısıyla $[Ca^{2+}]_i$ transienleri meydana gelmez. Repolarizasyonda daha negatif potansiyellerde (-70 mV civarında) Ca^{2+} için sürücü kuvvet büyüktür ve kanallar kapanmadan önce kanallar boyunca Ca^{2+} girişi gerçekleşir. Bu akım I_{CaL} "kuyruk akımları" olarak tanımlanır ve kasılmaya katkıda bulunur.

2.3.4. Na^+/Ca^{2+} Değiş-Tokuşucusu (Exchanger) Yoluyla Ca^{2+} Girişi

Na^+/Ca^{2+} değiş-tokuşucusu (NCX), elektrojenik bir taşıyıcı proteindir ve sarkolemma boyunca Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının taşınmasını sağlar. Aktivasyonu, konsantrasyon gradiyenti ve voltaj bağımlıdır. Üç farklı izoformu vardır ve NCX1



Şekil 2.6. Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve onlara karşılık gelen iyon akımları (143).

kardiyak dokudaki baskın izoformudur. Kardiyak izoformunun aktivasyonu, diğer izoformlarına göre 10 kat daha fazladır. NCX'in lokalizasyonunun T-tübüllerinde olduğunu gösteren çalışmaların (144, 145) yanında sarkolemmaya dağılmış olduğunu gösteren çalışmalar da (146) mevcuttur. Ayrıca Scriven ve arkadaşları(147), NCX'in RyR ile ko-lokalize olmadığını göstermiştir. Bu sonuç, NCX'in SR Ca^{2+} salımında rolü varsa bunun çok küçük bir etkiye sahip olduğunu gösterir.

NCX, 3 Na^{+} 'a karşılık 1 Ca^{2+} iyonu değişimi yaparken elektrojenik bir akım (I_{NCX}) oluşturur (148, 149). İki farklı modda çalışır; ileri mod (forwardmod; Ca^{2+} hücre dışına atılır ve içeri doğru akım oluşur) ya da tersine mod (reverse mod; Ca^{2+} hücre içine alınır ve dışarı doğru akım oluşur). Değiş tokuşunun zıtlanma potansiyeli oldukça negatiftir (-30mV ile -80mV arası) ve bu potansiyellerde ölçülen akım dışarıya doğrudur. Çok pozitif potansiyellerde LTCC aracılığıyla Ca^{2+} girişi yoktur ve Ca^{2+} girişinin NCX aracılığıyla olduğu ayrıca bu giren Ca^{2+} un, SR'dan Ca^{2+} salımını tetiklediği gösterilmiştir (150-152). Ancak NCX'in verimliliği ve oluşturduğu $[Ca^{2+}]_i$ transienleri çok küçük ve yavaştır (153). NCX'in en önemli görevi salımın modülasyonu ve Ca^{2+} salımını için eşik değeri kaydırmasıdır (152,

154)). Ek olarak dinlenme durumunda bazal Ca^{2+} seviyesinin korunmasında ve SR Ca^{2+} içeriğinin modülasyonunda da etkilidir.

2.3.5. Sarkoplazmik Retikulum (SR) ve Riyanodin Reseptörü

Kardiyak kasında, SR ana Ca^{2+} deposudur. RyR, SR'daki Ca^{2+} salınım kanalıdır ve üç farkı izoformu mevcuttur. RyR1 baskın olarak iskelet kasında bulunmaktadır (155, 156), RyR2 izoformu ise kalp kası izoformu olarak bilinmektedir (157, 158). RYR3 (159) ise her yerde bulunur. RyR'ler büyük bir sitoplazmik domain ve küçük bir transmembran domain olmak üzere iki kısımdan oluşur. Sitoplazmik domain regülasyon proteinleri ile bağlantılıdır ve kanal kapı modülasyonundan sorumludur.

RyR'nin açılması sitozolik serbest Ca^{2+} miktarına bağlıdır ve $[Ca^{2+}]_i$ konsantrasyonu mikromolar seviyelerdeyken aktivasyona, milimolar seviyelerdeyken inhibisyona sebep olur (160). Sitozolik Ca^{2+} 'ya ek olarak SR içerisinde depolanan Ca^{2+} miktarı da RyR'nin geçirgenliğini ve açılma olasılığını arttırabilir. Ayrıca RyR, çeşitli fizyolojik ve farmakolojik ajanlar tarafından da regüle edilir. ATP (ve diğer adenin nükleotidler) RyR'yi aktive ederken, Mg^{2+} ve asidosis aktivitesini inhibe eder (161). Kafein ve diğer metilksantinazlar, RyR'nin Ca^{2+} -bağımlı açılma özelliğini değiştirerek düşük Ca^{2+} konsantrasyonlarında açılmasını sağlar. Kafein düşük konsantrasyonlarda (<1 mM) büyük $[Ca^{2+}]_i$ transientlerini tetiklerken, yüksek konsantrasyonlarda SR'da depolanan Ca^{2+} 'nın tamamen boşaltılmasına sebep olur. Ek olarak RyR'nin, cAMP-bağımlı protein kinaz A (PKA) ve Ca^{2+} -Kalmodülün bağımlı protein kinaz (CaMKII) tarafından fosforilasyonu da regülasyonu açısından oldukça önemlidir (162, 163). Marks ve ark tarafından yapılan çalışmalarda RYR2 nin PKA ile fosforilasyonu sonucu FKBP12.6'nın kanal oluşturan kompleksten ayrılmasını sağladığı ve bunun sonucunda kanalın açılma olasılığının arttığı ileri sürülmektedir (164).

Junctin, triadin ve calsequestrin, RyR ilişkili proteinlerdir ve SR Ca^{2+} salınımında görev alırlar. Calsequestrin, Ca^{2+} 'ya afinitesi düşük fakat Ca^{2+} bağlama kapasitesi yüksek olan bir proteindir. SR lümeninde lokalizedir ve lümenal Ca^{2+} tamponlama özelliğine sahiptir. Calsequestrin ve RyR arasındaki fizyolojik çiftlenim için triadin ve junction proteinleri gereklidir (165).

2.3.6. Sarkoplazmik Redikulum Ca^{2+} ATPaz (SERCA)

SERCA, fizyolojik bir uyararla intraselüler ortamda yükselmiş olan Ca^{2+} 'un SR'a yeniden taşınmasından sorumlu protein yapısında bir pompadır. SERCA, P-tipi iyon taşıyıcı ATPaz ailesindedir ve bir ATP molekülünü ADP'ye hidrolize ederek 2 Ca^{2+} iyonunu SR lümenine taşır (166). Kalpte SERCA2a izoformu yüksek seviyelerde eksprese edilir ve immünohistokimyasal çalışmalarda, T-tübülüne komşu Z-bandlarında lokalize olduğu gösterilmiştir (167). SERCA2a, fosfolamban (PLB) proteini tarafından regüle edilir(168). PLB fosforile olmadığı zaman, SERCA2a ile fizyolojik etkileşim içindedir ve SERCA'nın Ca^{2+} a afinitesini düşürerek aktivitesini azaltır (169). PLB'nin fosforilasyonu, proteinde konformasyonel değişikliğe sebep olur ve SERCA üzerindeki inhibe edici etkisi hafiflemiş olur (170). Fosfolamban, PKA, PKC ve CaMKII tarafından farklı bölgelerinden fosforile olabilir. β -adrenerjik stimülasyon sırasında PLB'nin Ser¹⁶ bölgesinden PKA aracılı

fosforilasyonu, SERCA'nın Ca^{2+} affinitesini arttırarak Ca^{2+} pompalama hızını arttırır, böylece gevşeme hızı artar (171). PLB'nin CaMKII tarafından fosforilasyonu da benzer etkiler oluşturur (172). Ancak bu fosforilasyon yolağının daha çok miyosit gevşemesi ve SR'a Ca^{2+} 'nin geri alınmasının frekans-bağımlı hızlanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (173).

2.3.7. Kasılmada Ca^{2+} 'nin Rolü

Miyofilamentlerin aktivasyonu Ca^{2+} 'ya bağlı olduğundan kasılma dereceli olarak meydana gelir ve sitozolik Ca^{2+} ile diğer faktörlere bağlıdır. İntrasellüler ortamda Ca^{2+} serbest ve bağlı olmak üzere iki formda bulunur. Bağlı Ca^{2+} 'nin serbest Ca^{2+} 'ya oranı yaklaşık 100:1'dir ve sitozolün Ca^{2+} tamponlama özelliği vardır. Kasılmanın yarı maksimum aktivasyonu (half maximal activation) için sitosolde 70 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} olmalıdır ve $[Ca^{2+}]_i$ 600 nM seviyelerine kadar yükselir (174).

Fizyolojik kasılma, kanı fırlatmak için kuvvet üretir. Kardiyak kontraksiyon iki yolla değişebilir; birincisi, Ca^{2+} transientlerinin süresinin ya da genliğinin değişmesi diğeri ise miyofilament Ca^{2+} duyarlılığının değişmesidir. Miyofilament Ca^{2+} duyarlılığı, miyofilamentlerin gerimi aracılığıyla dinamik olarak yükselir ve kuvvetli bir kasılma ile sonuçlanır. Miyofilament duyarlılığı asidozis ile azalırken, fosfat ve Mg^{2+} iyonları ile artar. Ayrıca Ca^{2+} duyarlılığı β -adrenerjik aktivasyon ile azalırken kafein ve inotropik ilaçlar ile yükselir (175, 176).

2.4. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri

2.4.1. Serbest Radika Tanımı

Moleküllerin dış yörüngelerinde biri diğeri zıt yönde hareket eden elektron çiftleri bulunmaktadır. Bu elektron çiftleri, moleküllerin kararlı kalmasını sağlar. Dış yörüngelerinde en az bir adet eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir (177-179). Serbest radikaller metabolizmanın yan ürünü olarak veya belli bir amaca yönelik olarak (ör: fagositoz) hücre içerisinde sürekli üretilirler.

2.4.2. Serbest Radikal Oluşumu

Radikaller hücrede başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur.

1. *Normal bir molekülün kovalent bağının homolitik ayrılmasıyla:* Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de eşleşmemiş elektron kalır.
2. *Normal bir molekülün elektron kaybetmesiyle:* Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün elektron kaybetmesinin ardından dış orbitalde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur.
3. *Normal bir moleküle elektron eklenmesiyle:* Radikal özelliği taşımayan moleküle bir elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgeme radikal oluşumuna neden olur (180).

Bir radikal radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, başka bir serbest radikal oluşur. Bu özellik serbest radikallerin zincirleme reaksiyonlara girmesine olanak sağlar (180).

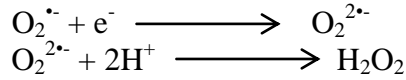
2.4.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Kaynakları

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, aerobik koşullar altında süren yaşam ile fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında üretilen reaktif araçlar ile ilgilidir (181). Reaktif oksijen türleri DNA, karbonhidratlar ya da proteinler gibi biyolojik makromoleküllere hasar verebilme yeteneğine sahiptir. Bu oksijen metabolitleri ya hidroksil radikali (OH[·]), peroksil radikali (ROO[·]) gibi radikal ya da tekil oksijen, peroksinitrit (ONOO⁻) ya da hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif radikal olmayan bileşiklerdir (182).

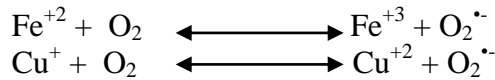
Süperoksit hücre içerisinde moleküler oksijen redüksiyonu ile oluşan başlıca serbest radikaldir (181).



Süperoksit anyonu elektron fazlasını bir başka elektron alıcısına vererek tekrar moleküler oksijene (O₂) oksitlenebilir. Ya da bir elektron daha alarak peroksil anyonunu (O₂²⁻) oluşturur, bu da ortamdan iki proton alarak (H⁺) H₂O₂ oluşumuna neden olur (183).



İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu O₂^{·-} meydana getirebilir.



Geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü reaksiyonlardır. Süperoksit radikal anyonunun ondan meydana gelen diğer reaktif ara ürünlerin oluşumunda merkezi rol oynadığı görülmektedir. Mitokondrideki solunum zincirinde O₂^{·-} oluşumunun devamında O₂^{·-} dismutasyonunun bir ürünü olarak meydana gelen H₂O₂, ROS'un güçlü bir kaynağıdır (184). Bu durum mitokondriyal elektron taşıma zincirinin spesifik bir bölgesinde oksijenin O₂^{·-}'e uygunsuz redüksiyonu ile sonuçlanan olası eşleşmemiş elektron sızıntısından kaynaklanır (185). Bir diğer önemli ROS kaynağı inflamatuvar reaksiyonlardır. Aktive olmuş makrofajlar ve nötrofiller gibi inflamatuvar hücreler çeşitli ROS'ları (H₂O₂, NO, O₂^{·-}) ve hipokloriti (HOCl) serbest bırakırlar (186). Nötrofiller membrana bağlı çok bileşenli NADPH oksidaz olarak bilinen bir enzim kompleksine sahiptirler. NADPH oksidaz aktive edildiğinde büyük miktarlarda ROS üretir (187).

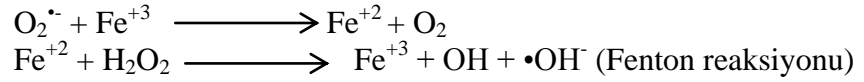
Süperoksit anyonu, hücre membranlarından kolay geçemediği için kendisi doğrudan zarar vermemektedir (188). Süperoksitin önemi, geçiş metal iyonlarının

indirgeyicisi ve H₂O₂ kaynağı olmasıdır. Hidrojen peroksit üretimi SOD tarafından katalizlenen O₂^{•-} dismutasyonu ile oluşmaktadır.

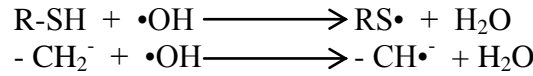


Hidrojen peroksit düşük elektriksel yükü ve noniyonize özelliklerinden dolayı hücre membranından hızlı bir şekilde geçer. Geçiş grubu metal iyonlarının varlığında yüksek derecede reaktif serbest radikaller oluşur (188, 189) .

Dış çevrede ısı, UV ışık, terapötik ilaçlar, χ - ve γ - radyasyon gibi birçok kaynaktan ROS üretilebilir (190). Demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır. Fakat geçiş metalleri, metal şelatörler veya hemoproteinlerin varlığında bu reaksiyon hızlı bir şekilde oluşur. Bu durum Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Bu reaksiyonlarla O₂^{•-} radikali ferrik (Fe⁺³) demiri, ferröz (Fe⁺²) demire indirgerken H₂O₂, hidroksil radikaline dönüşür (191).



Hidroksil radikali oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS[•]), karbon merkezli organik radikaller (R[•]), organik peroksitler (RCOO[•]) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.



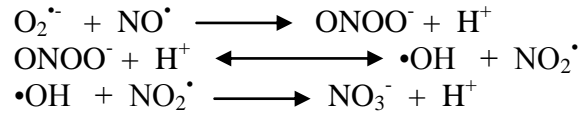
Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (poly unsaturated fatty asid- PUFA) oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin PUFA'nın yan zincirlerindeki metillenmiş karbonlardan hidrojen atomu koparmasıyla başlar. PUFA'nın oksidasyonu, bir oksijen alarak çabucak peroksil radikaline (LOO[•]) dönüşebilen yağ asidi radikalinin (L[•]) oluşmasına yol açar (179, 192). Peroksil radikali, membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını koparıp peroksidatif zincir reaksiyonunu başlatmaktadır (192). Lipid peroksil radikalleri diğer lipidler, proteinler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek elektron transferinin artmasına ve substratların oksidasyonuna sebep olur. Biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonu, membran akışkanlığının azalmasına, membran potansiyellerinin düşmesine, H⁺ ve diğer iyonların geçirgenliğinin artmasına ve sonuçta hücre membranının parçalanarak organellerin dışarı sızmasına neden olur (193).

2.4.4. Reaktif Nitrojen Türleri ve Kaynakları

Nitrik oksit (NO[•]), yararlı bir metabolit olduğuna inanılan bir serbest radikaldir. Lipit peroksidazlarla reaksiyona girebilir ve antioksidan olarak fonksiyon görebilir (194). Nitrik oksit sentaz, L-arginini L-sitrüline çevirerek NO'yu meydana getirir (195). Nitrik oksitin kontrolsüz üretimi sonucu proteinlerin nitrolizasyonu,

DNA kırılmaları ve diğer moleküler etkileşimler ile doku hasarına sebep olabilir (196).

NO[•] ve nitrit (NO₂[•]), tek sayıda e⁻ içerdikleri için serbest radikal tanımına uymaktadır. Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türlerinin en önemlisi NO[•]'dur. İn vivo ortamda salınan NO[•], NO₂[•] veya nitrat (NO₃⁻)'a otookside olabilir. NO₂[•] zayıf bir redükte edicidir. Fizyolojik pH'da NO[•], bir reaktif ara ürün olan ONOO⁻'yu oluşturmak üzere O₂^{-•} ile reaksiyona girebilir. Radikal olmayan ONOO⁻, güçlü bir oksidandır. Tiyol gruplarının oksidasyonu yoluyla direkt sitotoksik etki gösteren ONOO⁻, çeşitli nitrojen oksit radikallerini ve [•]OH oluşturarak dekompoze olabilir (197).



2.4.5. Nitrik Oksit ve Oksijen Radikaller Arasındaki Etkileşim

Süperoksit radikalının NO[•]'ya karşı affinitesi yüksektir. Nitrik oksit ve O₂^{-•} arasındaki reaksiyon, ONOO⁻ olarak adlandırılan yeni bir molekülü meydana getirir (197). Peroksinitrit oldukça reaktif bir moleküldür ve protein, lipid ve özellikle DNA'da yoğun hasara neden olabilir. Tiyol gruplarının oksidasyonu yoluyla direkt sitotoksik etki gösteren ONOO⁻, çeşitli nitrojen oksit radikallerini ve [•]OH radikalini oluşturarak dekompoze olabilir (197). Nitrik oksitin metalloproteinler, protein sülfhidriller ve oksijen kaynaklı serbest radikaller ile reaksiyonu inflamasyon ve oksidatif strese aracılık etmesini sağlar (198)

Peroksinitritin konjuge asidi peroksinitröz asit (ONOOH) iki yolla reaksiyon verir. İlk yol güçlü oksidan ara ürünler oluşturmaksızın nitrat üretmesi diğer yol ise güçlü bir oksidan olan, yağ asidi oksidasyonunu ve aminoasit nitrasyonunu başlatabilen [•]OH ve nitrojen dioksit (NO₂) oluşturmaktadır (197).

Oksidazlar ve oksijenazlar, oksijen radikal üretiminde kritik kaynaktır ve metalloproteinlerin ve vazoaktif bir molekül olan NO'nun serbest radikal aracılı tüketimi yolu ile NO sinyalizasyonundaki bozukluklara neden olabilir. Oksidazlar ve oksijenaz aktiviteleri bu sebepten prooksidatif çevre ve kronik inflamasyona neden olan NO'nun fonksiyonel inaktivasyonundan sorumlu olabilir (199).

2.5. Antioksidan Savunma Sistemi

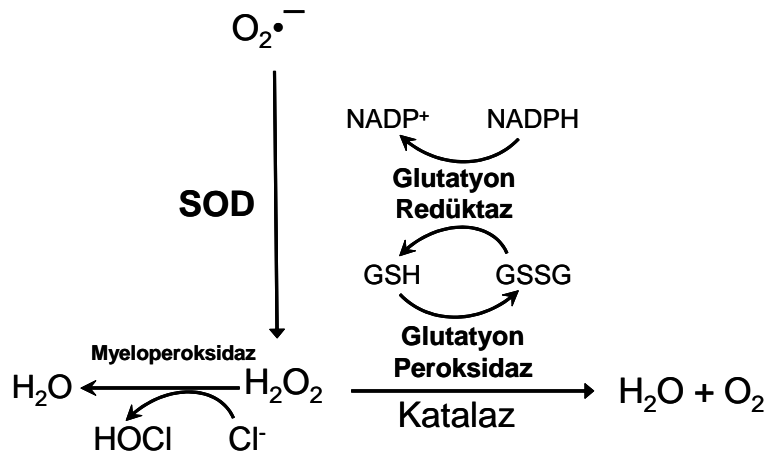
Antioksidan sistem, serbest radikallere karşı organizmanın en önemli silahıdır. Hem hücre içinde hem de hücre dışında oluşan radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemi öğelerinin ortaklaşa çalışmaları sonucu ortadan kaldırılır.

2.5.1. Antioksidan Enzimler ve Bileşikler

Hücrede oluşan ROS'un sitotoksik etkisinin ortadan kaldırılabilmesi veya azaltılabilmesi antioksidan enzim sistemleri ile mümkün olabilmektedir (200) Bu

enzimler, sitoplazmik, mitokondriyal ve SOD glutatyon peroksidaz, katalaz ve fagositik hücrelerde mevcut olan miyeloperoksidaz enzim sistemleridir (Şekil 2.7)

Antioksidan moleküller ve iyonlar ekzojen ve endojen kaynaklı olarak organizmada bulunur ve oksidanlara karşı enzimatik olmayan bir savunma gösterirler. GSH, çeşitli vitaminler, melatonin, niasin, triptofan, riboflavin, α -lipoik asit, biyoflavonoidler, koenzim Q, ürik asit, seruloplazmin ve sistein, bu grup içinde sayılabilirler.



Şekil 2.7. Antioksidan enzim sistemleri

2.6. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, ROS (OH^{\bullet} , H_2O_2 gibi) ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu dolaylı olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (201). Protein oksidasyonu birçok mekanizmayla gerçekleşebildiği ve amino asit yan zincirlerinin hepsi oksidatif olarak modifiye olabildiği için çok farklı tipte oksidatif protein modifikasyonları vardır. Serbest radikal ya da radikal olmayan bir oksidan ile gerçekleşen oksidatif protein modifikasyonlarının biyokimyasal sonuçları; yan zincir gruplarının oksidasyonu, omurganın fragmentasyonu, yeni reaktif türlerin oluşumu, fazla miktarda radikal oluşumu ve zincir reaksiyonu şeklinde devam ettirilmesi, protein ya da aminoasitlerde dimerleşme, çökme, proteinin normal katlanmasının bozulması veya konformasyon değişimi, yapısal bozulmaya bağlı işlevsel kayıp, enzim gibi işlevsel proteinlerin çevirim sayısının değişmesi, gen düzenlenmesinin ve ifadesinin değişimi, hücre sinyal yollarında modifikasyon, apoptoz ve nekrozun uyarılması, çapraz bağlanmalar, yanlış katlanmalar, konformasyon ve hidrofobik yapıda değişiklikler ve proteolitik enzimlerde aktivite kaybı olarak sıralanabilir (202). ROS'un proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen hasar sonucunda protein karbonil ürünleri meydana gelir (203)

GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney gruplarının oluşturulması

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ve Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmada 8 haftalık genç erişkin Wistar cinsi toplam 100 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesinden temin edilen sıçanlar sıcaklığı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ olan ve 12 saat gün ışığı 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada tutulmuş ve ticari sıçan yemi ile suya herhangi bir kısıtlama olmaksızın ulaşmaları sağlanmıştır.

Sıçanlar çalışmanın başlangıcında rastgele olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Her grupta 25 hayvan olmak üzere gruplandırma aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır:

- 1- Kontrol grubu (K, n=25)
- 2- Hipertansif grup (HT, n=25)
- 3- MgO tedavisi alan hipertansif grup (HT-Mg, n=25)
- 4- MgO tedavisi alan grup (Mg, n=25)

DeneySEL L-NAME hipertansiyon modeli oluşturmak amacıyla hayvanların içme sularına spesifik olmayan bir NOS inhibitörü olan L-NAME ($40 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{gun}^{-1}$) ilave edilmiştir. Hayvanların günlük su tüketimi belirlenerek amaçlanan L-NAME dozunun alınması sağlanmıştır. Suda çözülmüş L-NAME'nin zamanla aktivitesini yitirmesi ihtimaline karşı, L-NAME eklenen içme suyu iki günde bir taze hazırlanmış ve önceden artan L-NAME'li içme suyu tekrar kullanılmamıştır. Bu şekilde hipertansif ve MgO tedavisi alan hipertansif gruplardaki sıçanlar, 6 hafta boyunca içme sularıyla L-NAME almıştır.

Mg tedavisi alan gruplara 1 g/kg dozunda MgO içeren yem hazırlanmış ve 6 hafta süresince bu yem ile beslenmeleri sağlanmıştır. MgO uygulaması L-NAME uygulamasıyla eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kan Basıncı Ölçümü

Deneydeki hayvanların kan basınçları invazif olmayan tail cuff yöntemiyle kuyruk arterlerinden ölçülmüştür. Kuyruğa takılan halka şeklindeki basınç probuyla alınan sinyaller MP 150 veri toplama sistemi (BIOPAC Systems, CA-USA) ve MAY-BPHR 9610-PC (Commat LTD., Ankara, Türkiye) ünitesi aracılığıyla bilgisayara aktarılmış ve ölçümler Acknowledge paket programıyla çizdirilen basınç traseleri üzerinden yapılmıştır. Tüm hayvanların deney öncesi bazal değerleri saptandıktan sonra kan basıncı takibine 3 haftada bir yapılan ölçümlerle deney sonuna kadar devam edilmiştir.

Bu ölçüm yönteminde kuyruktaki arterlerden geçen kan akımının kısa bir süreliğine kesilmesi için havayla şişirilebilen, halka şeklindeki bir manşet (cuff) kullanılmıştır. Belli basınç sağlayacak düzeyde şişirilen manşetin otomatik olarak yavaşça söndürülmesiyle kan akımının tekrar başlaması sağlanmıştır. Bu sırada, yine halka şeklindeki basınç probuyla belirlenebilen pulsasyonun basınç değeri saptanmıştır. Bu yöntemdeki kan basıncının ölçüm prensibi insandaki kan basıncını kol arterinden ölçme yöntemindekiyle benzerdir. Periyodik ölçümler sırasında her sıçan için en az beş basınç trasesi kaydedilmiş ve belirlenen değerlerin ortalamasından o günkü kan basıncı değeri hesaplanmıştır.

3.3. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu

Deney gruplarında bulunan hayvanlar hafif anestezi altındayken (50 mg/kg sodyum pento barbital) kalpler hızlı bir şekilde çıkarılmış ve Langendorff sistemine bağlanmıştır (Şekil 3.1). Daha önce Özdemir ve ark., kullandıkları enzimatik yöntem takip edilerek (204), asılı kalpler önce içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 5,8 HEPES; 20 glukoz olan ve pH 7.2 dengesinin sağlanması için % 5 CO₂ -% 95 O₂ ile gazlanan, kalsiyumsuz perfüzyon solüsyonu ile 5 dakika yıkanmıştır. Arkasından, kalbin üzerinden 20-25 dakika süresince aynı solüsyon içinde hazırlanmış kollajenaz (Roche, Collagenase A type) (0,7 mg/ml) ve proteaz (0.06 mg/ml) karışımı enzim geçirilip uygun kıvama ulaşıldığında, kalp küçük bir kabın içine alınmış ve sol ventrikülü ayrıştırılarak, makasla ince bir şekilde dilimlenmiştir. Daha sonra, ince bir filtreden geçirilen hücreler birkaç yıkama işleminden geçirilmiştir. Ortamdaki hücrelerin Ca²⁺ adaptasyonu kademeli olarak sağlanmıştır. Tüm deneylerde sol ventrikül miyositleri kullanılmıştır.

3.4. Hücre İçi Serbest Mg²⁺ konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen kardiyomiyositler Mag-fura-2 AM (3 µM) ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildikten sonra, 340 ve 380 nm’de eksite edilerek 510 nm’ ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile [Mg²⁺]_i değişimleri bilgisayara kaydedilip değerlendirilmiştir. Mag-Fura2-AM ile elde edilen floresans ışıma şiddeti;

$$[Mg^{2+}]_i = K_d (R-R_{min}) / (R_{max}-R) S_{f2} / S_{b2}$$

formülü aracılığıyla konsantrasyona dönüştürülmüştür. Hücre geçirgenliğini değiştirmek için % 0,05’lik TritonX kullanılmıştır. Eksternal ortamda 20 mM Mg²⁺ varlığında maksimum floresans (R_{max}) ve 30 mM EGTA varlığında ise minimum floresans (R_{min}) elde edilmiştir

Ayrıca ortamda aşırı miktarda Mg²⁺ mevcut iken 380 nm dalga boyunda elde edilen floresans ışık yoğunluğu (S_{b2}) ve ortamda aşırı miktarda EGTA mevcut iken 380 nm dalgaboyundaki floresans ışık yoğunluğu (S_{f2}) değerleri hesaplanmıştır. Magnezyum için daha önce belirlenmiş olan K_d=1,5 değeri kullanılmıştır (205).

Kullanılan floresans indükatör Mag-Fura2-AM’in Ca²⁺ iyonuna da affinitesi olmasından dolayı elde edilen ışımının Mg²⁺ iyonlarından kaynaklandığını teyit edebilmek için 20-25 V genliğindeki 0.5 Hz frekanslı pulsar uygulanmış ve kasılmaya karşılık transient elde edilip edilmediğine bakılmıştır. Ayrıca ATP intrasellüler ortamda iyi bir Mg²⁺ tamponlayıcısı olduğundan dolayı poli-lisin kaplı

banyo içerisine konulan Mag-fura2-AM yüklü olan miyositler üzerine 10 µM ATP uygulanmış ve floresans ışına şiddetindeki değişim gözlenmiştir. Kayıtlar IonOptix LLC sistemi ile (Milton USA) kaydedilmiştir. Analizler Ionwizard yazılım (IonOptix, USA) programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir (206).



Şekil 3.1. Sıçan kalbi izolasyonunun temel basamakları. Sıçanlar anestezi verilerek bayıldıktan sonra göğüs kafesi hızlı bir şekilde açılarak kalp alınmıştır. Kalp daha sonra Langendorff sistemine bağlanarak retrograd şekilde perfüze edilmiştir. Enzimatik uygulama (kollajenaz ve proteaz) sonrası kollajen doku ve hücreleri bir arada tutan diğer yapılar parçalanarak kardiyomiyositler elde edilmiştir.

3.5. Hücre İçi Bazal Ca^{2+} konsantrasyonunun Ölçümü

İzole edilen kardiyomiyositler fura-2 AM (4 µM) ile oda sıcaklığında 15-20 dakika inkübe edildikten sonra, 340 ve 380 nm’de eksite edilerek 510 nm’ ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile bazal $[Ca^{2+}]_i$ derişimi elde edilmiştir. Fura2-AM ile elde edilen floresans ışına şiddeti;

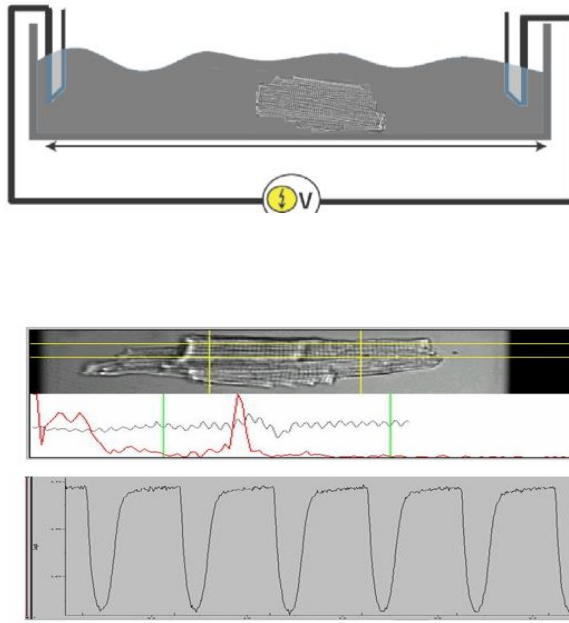
$$[Ca^{2+}]_i = Kd (R-R_{min}) / (R_{max}-R) S_{f2} / S_{b2}$$

formülü aracılığıyla konsantrasyona dönüştürülmüştür. Hücre geçirgenliğini değiştirmek için % 0,05’lik TritonX kullanılmıştır. Eksternal ortamda 35 mM Ca^{2+} varlığında maksimum floresans (R_{max}) ve 30 mM EGTA varlığında ise minimum floresans (R_{min}) elde edilmiştir. Ayrıca ortamda aşırı miktarda Ca^{2+} mevcut iken 380 nm dalga boyunda elde edilen floresans ışık yoğunluğu (S_{b2}) ve ortamda aşırı miktarda EGTA mevcut iken 380 nm dalgaboyundaki floresans ışık yoğunluğu (S_{f2}) değerleri hesaplanmıştır. Kalsiyum için daha önce belirlenmiş olan $K_d=225$ nM değeri kullanılmıştır (207)

Yukarıda Mag-fura2-AM ile yüklü olan miyositlere uygulanmış olan 0.5 Hz frekanslı elektrik alan uyarısı ve 10 µM ATP uygulaması aynı şekilde fura2-AM yüklü miyositlerde de yapılmış ve floresans oranları (IonOptix LLC, Milton USA) kaydedilmiştir. Analizler Ionwizard (IonOptix, USA) programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

3.6. Kontraktıl Parametreler

İzole edilen hücreler, içinden Tyrode solüsyonu [(mM): 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 11,8 Na-Hepes, 10 glukoz, pH:7.35)] geçen ve iki ucunda elektrot yerleştirilmiş küvet içine alınmıştır. Bu hücrelerden uyarılabilir olanlar seçilerek 20-25 V genliğindeki 0.5 Hz frekanslı pulsların oluşturduğu kasılma miktarları kaydedilmiştir (Şekil 3.2) (IonOptix LLC, Milton USA). Alınan kayıtların, Ionwizard (IonOptix, USA) programı aracılığıyla % kasılma oranı (L/L_0), gerimin tepesine çıkış süresi (TP) ve gevşemenin % 50'sine (RT_{50}), gevşemenin % 75'ine (RT_{75}), gevşemenin % 90'nına (RT_{90}) iniş süreleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Elektrik alan altında kasılma parametrelerinin alınması. Üstte, stimulator kullanılarak istenilen genlikte ve frekansta uyarı oluşturabilen elektrotlar varlığında uyarılacak kardiomyosit görülmektedir. Ortada, uyarı verildikten sonra hücrenin kasılıp gevşeme işlemi ve sarkomer boyu video tabanlı kameralar yardımıyla eş zamanlı takip edilmekte ve bilgisayar ortamına (altta) aktarılmaktadır.

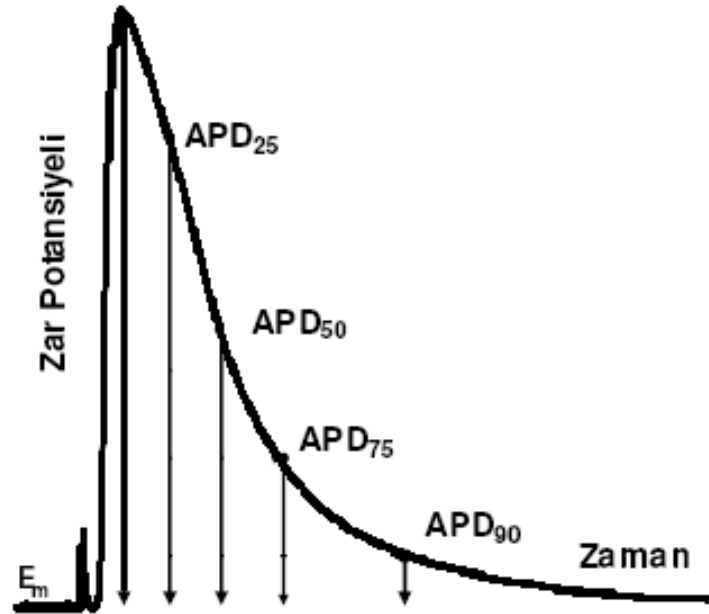
3.7. Hücre İçi Serbest Ca²⁺ Derişimi Ölçümü

İzole edilen kardiomyositler fura-2 AM (4 μ M) ile oda sıcaklığında 15-20 dakika inkübe edildikten sonra, 340 ve 380 nm'de eksite edilerek 510 nm' ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile hücre içi Ca²⁺ değişimleri ölçülmüştür ($[Ca^{2+}]_i$) hesaplanmıştır (208). Hücre içi serbest Ca²⁺ ölçüm deneylerinde kullanılan banyo çözeltisinin içeriği şu şekildedir; (mM): 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 11,8 Na-HEPES, 10 glukoz (pH:7.35). İki ucuna elektrot yerleştirilmiş küvet içine alınan hücrelerden uyarılabilir olan seçilerek bir pencere içine alınmıştır. Önce 100 s'lik bazal Ca²⁺ sinyali kaydedilmiş, sonra hücreler 20-30 V'luk pulslar ile 0.5 Hz frekansında uyarılarak 200 s süreyle geçici Ca²⁺ değişimleri (Ca²⁺transientleri) kaydedilmiştir. Arkasından aynı pencere, banyonun hücre bulunmayan bir bölgesine

odaklanarak belli bir süre kayıt alınıp hücre içi sinyalden çıkarılmıştır. Böylece banyo ortamının floresansından kaynaklanabilecek gürültünün ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Gözlenen Ca^{2+} değişimine ait sinyallerin ölçümü bilgisayara kaydedilip (IonOptix, USA) Ionwizard (IonOptix, USA) programı ile değerlendirilmiştir. Her hücre 200 s süresince kaydedilen transienlerin parametrelerinin ortalamasından elde edilen değer ile temsil edilmiştir. $[Ca^{2+}]_i$ sinyallerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen maksimum değeri ($\Delta FFI_{340/380}$) ve üssel fonksiyon uygulanarak maksimum değerinin %37'sine iniş süresi (τ_{decay}) ölçülerek karşılaştırılmıştır.

3.8. Aksiyon Potansiyelinin Kaydedilmesi

Çalışmamızda sol ventrikül miyositlerinden AP kayıtları da alınmıştır. Tüm kayıtlar direnci 2-2.5 M Ω 'luk elektrotlar yardımıyla 1 Hz'lik frekansta yapılmıştır. Pipet içi solüsyon içeriği (mM): 120 K-aspartat; 20 KCl; 6.8 MgCl₂; 5 Na₂ATP; 5; 0.4 Na₂GTP; 10 EGTA; 4.7 CaCl₂; 20 HEPES (pH=7,4) olacak şekilde hazırlanmıştır. Aksiyon potansiyeli için akım kenetleme konfigürasyonunda; hücre içine küçük depolarize edici pulslar enjekte edilerek hücrenin uyarılmasıyla membranda oluşan potansiyel değişimleri kaydedilmiştir. Elde edilen AP'nin repolarizasyon fazlarının % 25, 50, 75, 90 (APD₂₅, 50, 75, 90) süreleri değerlendirilmiştir (Şekik 3.3).



Şekil 3.3. Sol ventrikül miyositlerinden kaydedilen bir aksiyon potansiyeli eğrisi üzerinde ölçülen parametreler. Kalın çizginin eğriyi kestiği nokta tepe değeri ve E_m dinlenme potansiyeli olmak üzere, çizgiden sağa doğru repolarizasyon evresinin maksimum değerinin %25, 50, 75 ve 90'ına düşmesi için geçen süreler gösterilmektedir.

3.9. Potasyum akımlarının kaydedilmesi

Bütün akımlar voltaj kenetleme yönteminin tüm-hücre konfigürasyonunda alınmıştır. Bunun için hücrenin $G\Omega$ düzeyinde direnç oluşturacak şekilde elektrod ucuna yapışması sağlandıktan sonra elektrik pulsu uygulanarak hücre zarı kırılmıştır. Kenetlemeden sonra zar potansiyeli -70 mV düzeyinde tutulan hücrelere 3 sn'lik pulslar 4 s'lik aralıklarla ve 10 mV'luk basamaklar şeklinde transient outward potasyum akımları için -60 mV'tan $+60$ mV'a kadar 13 defa uygulanmıştır. Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Molecular Devices, USA) voltaj kenetleme modunda 3 kHz'lik filtreden geçirilen potasyum akımları, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme hızında pClamp 10 yazılımı (Axon Instrument, Foster City CA, USA) ile kaydedilmiştir.

Kayıt için $1.5-2.5$ M Ω 'luk elektrodlar kullanılırken, kenetleme sonrası giriş (access) direncinin 4 M Ω ve altında olmasına özen gösterilmiştir. Akım kayıtları için gerekli hücre dışı ortam, solüsyonların kapiller borular aracılığıyla ve yer çekimi yardımıyla direk hücre üzerine uygulanması aracılığıyla sağlanmıştır. Bu akımlar için kullanılan çözeltiler banyo için (mM): 137 NaCl; $5,4$ KCl; $1,5$ CaCl₂; $0,5$ MgCl₂; 10 Glukoz; $11,8$ HEPES (pH=7.35), pipet için ise (mM): 120 K-aspartat; 20 KCl; 10 NaCl; 5 MgATP; 10 K-HEPES (pH=7,2) olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca Ca²⁺ akımlarını bloke etmek için kapiller içi ortama CdCl₂ (250 μ M) eklenmiştir. Transient potasyum akımları, akımların tepe değerlerinden 3 sn'lik pulsun son bölümündeki akım değerleri (I_{ss}) çıkarılarak hesaplanmıştır. Daha sonra, akımlar için ölçülen tepe değerleri hücreler arası büyüklük değişiminden kaynaklanabilecek sapmaları önlemek amacıyla hücre sığasına bölünerek akım yoğunluğu cinsinden değerlendirilmiştir (209, 210).

3.10. Eşzamanlı Ca²⁺ Akımı ve Hücre İçi Serbest Ca²⁺ Derişimi Ölçümü

Çalışmanın bu bölümünde I_{Ca} ve $[Ca^{2+}]_i$ eşzamanlı olarak ölçülmüştür. Bu akımlar tüm hücre voltaj kenetleme konfigürasyonunda $1-1,5$ M Ω 'luk elektrotlar kullanılarak kaydedilmiştir. Ölçümler için pipet solüsyonu olarak (mM): 120 L-aspartate, 20 CsCl, 10 NaCl₂, 5 MgATP, 10 HEPES ve 0.05 fura-2 potassium tuzu (pH = 7.2), banyo solüsyonu ise (mM): 137 NaCl; $5,4$ KCl; $1,5$ CaCl₂; $0,5$ MgCl₂; 10 Glukoz; $11,8$ HEPES (pH=7,35) içermektedir. Öncelikle hücre, büyüklüğüne uygun olarak bir pencere içine alınmıştır. Belli bir süre hücre üzerinden kayıt alınıp banyo ortamının floresansından kaynaklanabilecek gürültünün ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Simultane ölçümü gerçekleştirebilmek için voltaj kenetlemenin tüm hücre konfigürasyonunda hücrelerde "giga-seal" sağlandıktan ve pipet içerisindeki zar parçası küçük bir elektrik pulsu ile parçalandıktan sonra Ca²⁺ duyarlı boyanın hücre içine geçebilmesi için 10 dakika beklenmiştir. Boyanın hücre içine geçişini kolaylaştırmak amacı ile küçük pozitif akım pulsları kullanılmıştır. Kayıt için, -70 mV düzeyinde kenetlenmiş hücrelere -45 mV'luk ön-puls uygulanarak bu seviyede bir süre tutulmuş ve sodyum (Na⁺) akımları inaktif duruma getirilmiştir. Sonra -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla $+80$ mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 14 farklı voltaj seviyesinde akım kayıtları alınırken, akıma karşılık oluşan Ca²⁺ transientleri de Fura-2 340 ve 380 nm'de eksite edilerek 510 nm'ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile kaydedilmiştir. Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Molecular Devices, USA) voltaj kenetleme modunda 3 kHz'lik filtreden geçirilen kalsiyum akımları, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme hızında pClamp 10 yazılımı (Axon

Instrument, Foster City CA, USA) ile kaydedilmiş ve Clampfit 10.2 yazılımı ile analiz edilmişlerdir. Tepe değerleri ölçülüp 300 ms'nin sonundaki kuyruk akımlarından çıkarılmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım değeri ölçüm yapılan hücrenin sığasına bölünerek değerlendirilmiş ve tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak verilmiştir.

Gözlenen Ca^{2+} değişimine ait sinyallerin ölçümü bilgisayara kaydedilip değerlendirilmiştir (IonOptix, USA). Transientlerin kinetik analizi IonWizard 6.0 programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. $[Ca^{2+}]_i$ sinyallerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen maksimum değerleri ($\Delta F_{340/380}$) karşılaştırılmıştır.

3.11. SR Ca^{2+} İçeriğinin ve NCX Akımının Ölçülmesi

Kafein yanıtı alınmadan hemen önce SR'nin Ca^{2+} ile tam yüklenebilmesini sağlamak amacıyla -70 mV düzeyinde kenetlenmiş hücrelere arka arkaya 10 defa 0 mV'luk ön-puls uygulanmış ve bu işlemin devamında kapiller borular aracılığıyla 10 μM 'lık kafein 10 s süreyle miyosit üzerine uygulanmıştır. Bu işlem gerçekleşirken intrasellüler Ca^{2+} miktarındaki artış ile ortaya çıkan içeri doğru (inward) I_{NCX} akımları da kafein yanıtıyla eş zamanlı olarak kaydedilmiştir.

3.12. Biyokimyasal parametreler

3.12.1. Nitrit/Nitrat Ölçümü

Nitrit/nitrat miktarı ticari bir kit (Cat.#780001. Cayman Chemical Ann Arbor, MI) ile yapılmıştır.

Prensip: NO, son ürünleri olan nitrit veya nitrate dönüşür ancak nitrat doğrudan ölçülemez. Bu yöntemde nitrat, nitrat redüktaz yardımıyla nitrite indirgenir. Sonuçta örnekteki nitrat nitrite dönüştüğünden ortamdaki total nitrit miktarı ölçülerek nitrit ve nitrat saptanmış olur.

Reaktifler

- 1- Nitrit/nitrat ölçüm tamponu
- 2- Nitrat redüktaz enzim ve kofaktörü
- 3- Nitrit/nitrat standartı
- 4- Greess reaktifleri (R1 ve R2)

İşlemler: Dondurulmuş halde bulunan sol ventrikül dokuları PBS tamponunda buz üzerine homojenize edilip (PRO 200Homogenizater, PRO Scientific Inc., Connecticut, USA) $4^{\circ}C$ 'de 10,000g'de 20 dak santrifüj edilerek süpernatantları alınmıştır. Elde edilen doku süpernatantları milipore marka (UFC503096) 30kD'luk cut off filtreler kullanılarak 30 000g'de 30 dak santrifüj edilerek filtre edilmiştir. Böylece proteinden arındırılmış numuneler ölçüm için hazır hale getirilmiştir. Ölçümlerin öncesinde ölçüm tamponu, nitrat redüktaz, enzim kofaktörü, nitrat standartı kit prosedürüne uygun olarak hazırlanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 80 μL doku süpernatantı konulmuş ve tüm kuyucuklara 10 μL enzim kofaktörü ve 10 μL nitrat redüktaz karışımı ilave edilmiştir. Örnekler 3 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben tüm kuyucuklara 50 μL R1 reaktif ve hemen sonrasında 50 μL R2 reaktif eklenmiştir. 10 dk'luk oda

sıcaklığında inkübasyonun ardından örneklerin absorbanları 540 nm dalga boyunda plate reader kullanılarak ölçülmüştür.

Nitrit/nitrat miktarının hesaplanması: Nitrit/nitrat standardı aynen numune gibi çalışılarak standart grafiği oluşturulmuştur. Dokulardaki nitrit/nitrat miktarı bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.12.2. Kardiyomiyositlerde $O_2^{\cdot-}$ Salınımının ve Hücre içi H_2O_2 Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Süperoksit anyon salınımı, CuZn SOD ile inhibe edilen sitokrom c redüksiyonu ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Salınan $O_2^{\cdot-}$ miktarı redükte sitokrom c'nin 550 nm'deki extinction coefficienti ($2,1 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır.

Hidrojen peroksit ise KAT enziminin aminotriyazol ile inhibisyon kinetiğine bakılarak tayin edilmiştir. Katalaz enziminin inhibisyon hızı, ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonu ile orantılı şekilde gerçekleşmiştir. Kardiyomiyositlerdeki intraselüler H_2O_2 miktarı %CAT inh/mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.12.3. Okside-Redükte GSH Seviyelerinin Belirlenmesi

Okside-redükte GSH miktarı ticari bir kit (Cat.K006-H1.Arbor Assays) ile yapılmıştır.

Prensip: Ölçüm prensibi; GSH'nun serbest thiol gruplarının kolorimetrik bir substrat ile reaksiyona girmesine dayanmaktadır.

Reaktifler

- 1- %5'lik 5-sulfo-salicylic acid dihydrate
- 2- Dilüsyon tamponu (pH>6)
- 3- 2-Vinilpidin
- 4- Kolorimetrik deteksiyon reaktifi
- 5- Reaksiyon karışım solüsyonu

İşlemler: Dokular 100 mM PBS tamponunda (pH=7) homojenize edilmiştir. Daha sonra 4 °C'da 10 dakika 14 000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatantlar alınmıştır. Süpernatantlara eş hacimde %5'lik 5-sulfo-salicylic acid dihydrate (SSA) solüsyonu eklenerek 4 °C'da 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemi takiben 14 000 rpm'de, 10 dakika 4 °C'da santrifüj yapılmış ve süpernatantlar toplanmıştır. Toplam GSH seviyesini belirlemek için örnekler 1:2.5 oranında ölçüm tamponu ile dilüe edilmiştir daha sonra 50 µl örnek ve standartlar kuyucuklara yüklenmiştir. Örnek dilüsyon tamponu 0 standart olarak kullanılacağı için 50µl örnek dilüsyon tamponunda kuyucuğa yüklenmiştir. Tüm kuyucuklara 25 µl kolorimetrik deteksiyon reaktifi ve hemen arkasından 25 µl reaksiyon karışım solüsyonu eklenmiştir. Reaktiflerin karıştığından emin olmak için plate hafifçe sallanmış ve oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda 405 nm'de okuma yapılmıştır.

GSSG tayini için 250 µl'lik SSA uygulanmış örnek, standart ve örnek dilüsyon tamponu üzerine 5 µl 2-VP'nin (serbest GSH'yı bloke eder) etanolik solüsyonundan

eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemden sonra GSH ölçümündeki basamaklar aynen takip edilmiştir.

GSH ve GSSG Miktarlarının Hesaplanması: GSSG standardı aynen numune gibi çalışılarak standart grafiği oluşturulmuştur. Dokulardaki GSH ve GSSG miktarları bu grafikler yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/mg protein olarak ifade edilmiştir.

3.12.4. Protein Karbonil Gruplarının Ölçümü

Protein Karbonil ölçümleri ticari bir kit (Cat.#10005020. Cayman Chemical Ann Arbor, MI) ile yapılmıştır.

Prensip: Protein karboniller DNPH ile reaksiyona girerek Schiff bazı oluştururlar ve son ürün olarak gösterilen protein hidrazon bileşikleri meydana gelir (şekil). 360-385 nm'de absorbands veren bu bileşikler aracılığı ile protein karboniller spektrofotometrik olarak tayin edilir.

Reaktifler

- 1- Hidroklorik asit
- 2- DNPH
- 3- TCA Solusyonu
- 4- Guanidin Hidroklorit
- 5- Etanol
- 6- Etil Asetat

İşlemler: Dondurulmuş halde bulunan sol ventrikül dokuları 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K_2HPO_4 (pH=7) tamponunda buz üzerine homojenize edilip (PRO 200Homogenizater, PRO Scientific Inc., Connecticut, USA) 4 C⁰'de 10,000g'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatantları alınmıştır. Her numuneden alınan 200'er µl olacak şekilde bir tüp numune tüpü, diğer tüp kontrol tüpü olmak üzere iki ayrı tüpe aktarılmıştır. Numune tüpüne 800 µl DNPH, kontrol tüpüne 800 µl HCl ilave edilerek 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bütün tüpler sırası ile %20 ve %10 TCA eklenerek 5 dak inkübe edilmiştir ve her basamağın ardından 4 C⁰'de 10,000g'de 15 dak santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Pelet (1:1) etanol/etil asetat karışımı içerisinde resüspanse edilerek 4 C⁰'de 10,000g'de 15 dak santrifüj edilmiştir. Bu basamak iki kere daha tekrarlanıp son yıkamadan sonra protein peletleri 500 µl guanidin hidroklorit içerisinde vortekslenerek resüspanse edilmiş ve 4 C⁰'de 10,000g'de 15 dak santrifüj edilmiştir. Absorbanslar, 360-385 nm arasında bir dalga boyunda plate reader kullanılarak ölçülmüştür.

Protein Karbonil miktarının hesaplanması: Kontrol örneklerinin ortalama absorbandsı numune örneklerinin ortalama absorbandsından çıkarılarak absorbands değeri elde edilmiş ve bu değer dilüsyon faktörü ile çarpılıp dinitrofenilhidrazin için 370 nm'de molar absorblama katsayısı ve (mg/ml) protein miktarına bölünerek karbonil miktarı (nmol/mg) olarak ifade edilmiştir.

3.13. Kullanılan kimyasallar

NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄, HEPES, glukoz, Cs-aspartat, CsCl, MgCl₂, Mg-ATP, CdCl₂, L-NAME (Fluka, 51298-62-5 n5751), MgO (Sigma-

Aldrich, 288667) kimyasal malzemeleri kullanılmıştır. Ayrıca Collagenasa A Roche firmasından (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), Fura2-AM, Fura2-K₅ ve MagFura2-AM ise Molecular Probes'tan (Molecular Probes, USA) satın alınmıştır.

3.14. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. Her değişken için normallik testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uyan veriler için parametrik olan Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey Post Hoc Testi, uymayanlarda ise nonparametrik olan Kruskal Wallis Varyans Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. Hayvanların Genel Durumu

Grupların deney başlangıcındaki ve feda edilmeden hemen önce ölçülen vücut ağırlıkları Tablo 4.1.'de sunulmuştur. Grupların ortalama vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Hipertansif gruplardaki sıçanların 6 hafta boyunca günde 40 mg/kg dozunda L-NAME almalarını sağlamak amacıyla, hayvanların günlük içme suyu miktarları takip edilmiştir. Su tüketimleri yönünden gruplar arasında fark saptanmamıştır. Ayrıca Mg²⁺ tedavisi alan gruplar 1g/kg dozunda MgO içeren yem ile beslendikleri için tüm grupların günlük yem tüketimleri belirlenmiş ve MgO'nun hayvanların yem tüketimi üzerinde değişikliğe yol açmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Vücut ağırlığı, su tüketimi ve yem tüketimi

GRUPLAR	Vücut ağırlığı (g)		Su tüketimi (ml/gün)	Yem tüketimi (g/gün)
	Başlangıç	Son		
KON (n=25)	202,27 ± 8,45	302,80±8,33	36,25 ± 1,32	24,68±0,44
HT (n=25)	227,38 ± 8,43	322,44±10,04	37,46 ± 0,63	26,20±0,93
HT-Mg (n=25)	210,50±5,70	301,88±8,17	37,81 ± 0,87	26,39±0,75
Mg (n=25)	209,06±6,84	294,50±9,92	36,57 ± 0,36	24,30±1,66

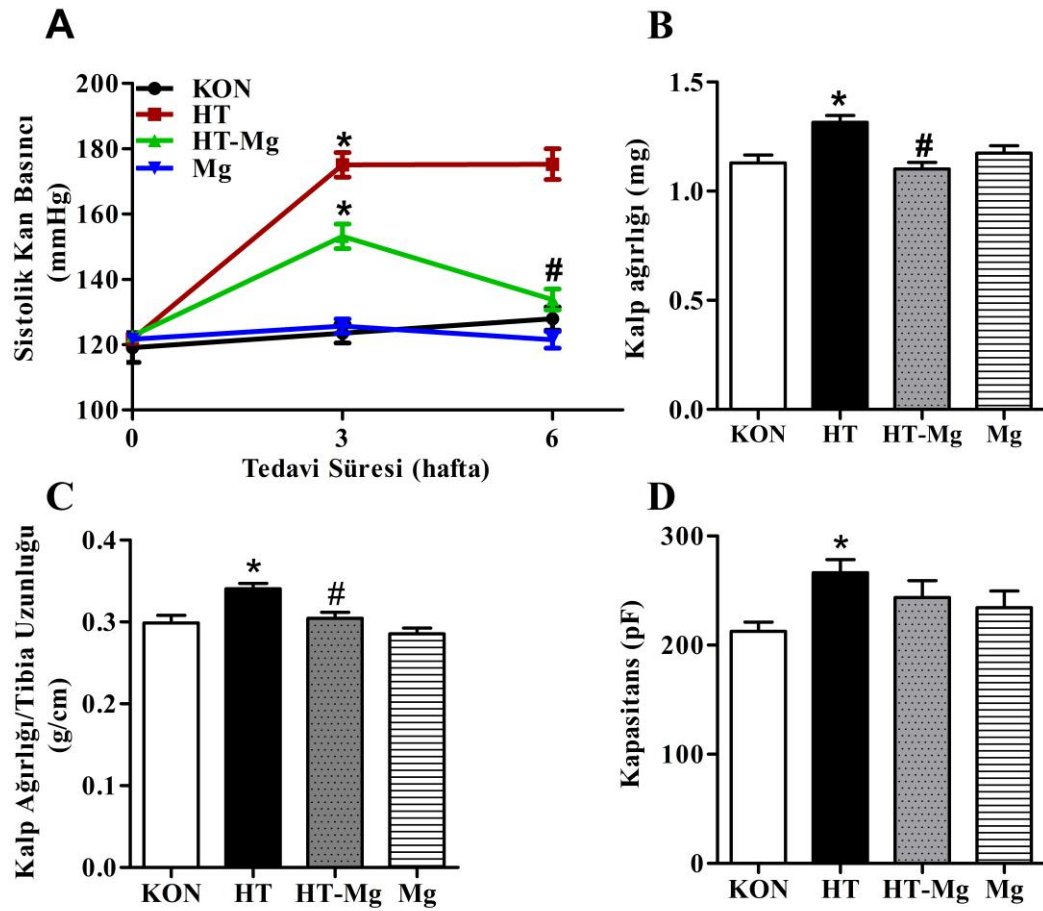
Yukarıdaki kısaltmalar; kontrol grubu (KON), hipertansif grup (HT), MgO verilen hipertansif grup (HT-Mg) ve MgO verilen grup (Mg) olarak kullanılmıştır. Grupların deney sürecinin başlangıcında ve sonunda ölçülen ağırlıkları (g), günlük su tüketimleri (ml/gün) ve günlük yem tüketimleri (g/gün). Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

4.2. Kan Basıncı ve Kardiyak Hipertrofi Parametreleri

6 haftalık deney periyodunun başlangıcında, ortasında ve sonunda ölçülen kan basıncı değerleri Şekil 4.1A'da gösterilmiştir. Başlangıçtaki kan basıncı değerleri gruplar arasında farklı olmamakla birlikte, hipertansif gruptaki değerler 3. haftadan

itibaren deney sonuna kadar KON grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0.001$). Magnezyum tedavisi uygulanan hipertansif grupta 3. haftanın sonunda ölçülen yüksek kan basıncı değeri ($p<0.001$) deney sonunda kontrol seviyelerine dönmüştür. Deney süresince KON ve Mg grupları arasında fark gözlenmemiştir.

L-NAME indüklü hipertansiyonun kalpte hipertrofiye sebep olup olmadığını anlamak amacıyla kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranları değerlendirilmiştir. HT grubunda KON grubuna göre kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranlarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.1B, C). Bunun yanında kapasitans değişimleri incelenerek L-NAME indüklü hipertansiyonun hüresel boyutta da hipertrofiye sebep olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Mg^{2+} tedavisinin doku boyutunda hipertrofiyi düzelttiği, ancak hücre boyutunda etkili olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1.D).



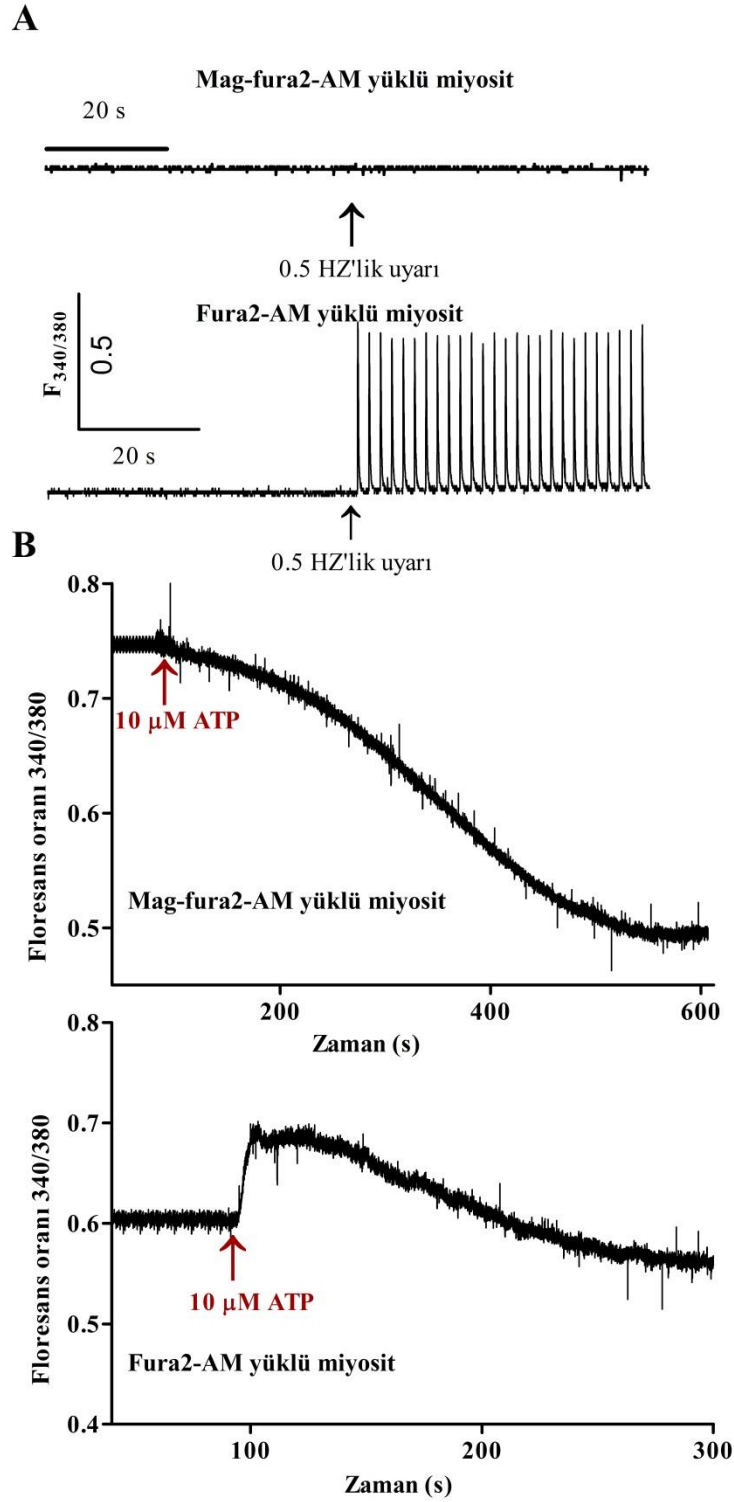
Şekil 4. 1. Kan basıncı ve fizyolojik parametreler. A Sistolik kan basıncı değerleri (mmHg), B. Kalp ağırlığı (mg), C. Kalp ağırlığı/Tibia uzunluğu (mg/cm), D. Kapasitans değişimi (pF). Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $n=25$, KON grubundan fark, * $p<0.001$; HT grubundan fark, # $p<0.001$.

4.3. Hücre İçi Bazal Mg²⁺ ve Ca²⁺ Konsantrasyonları

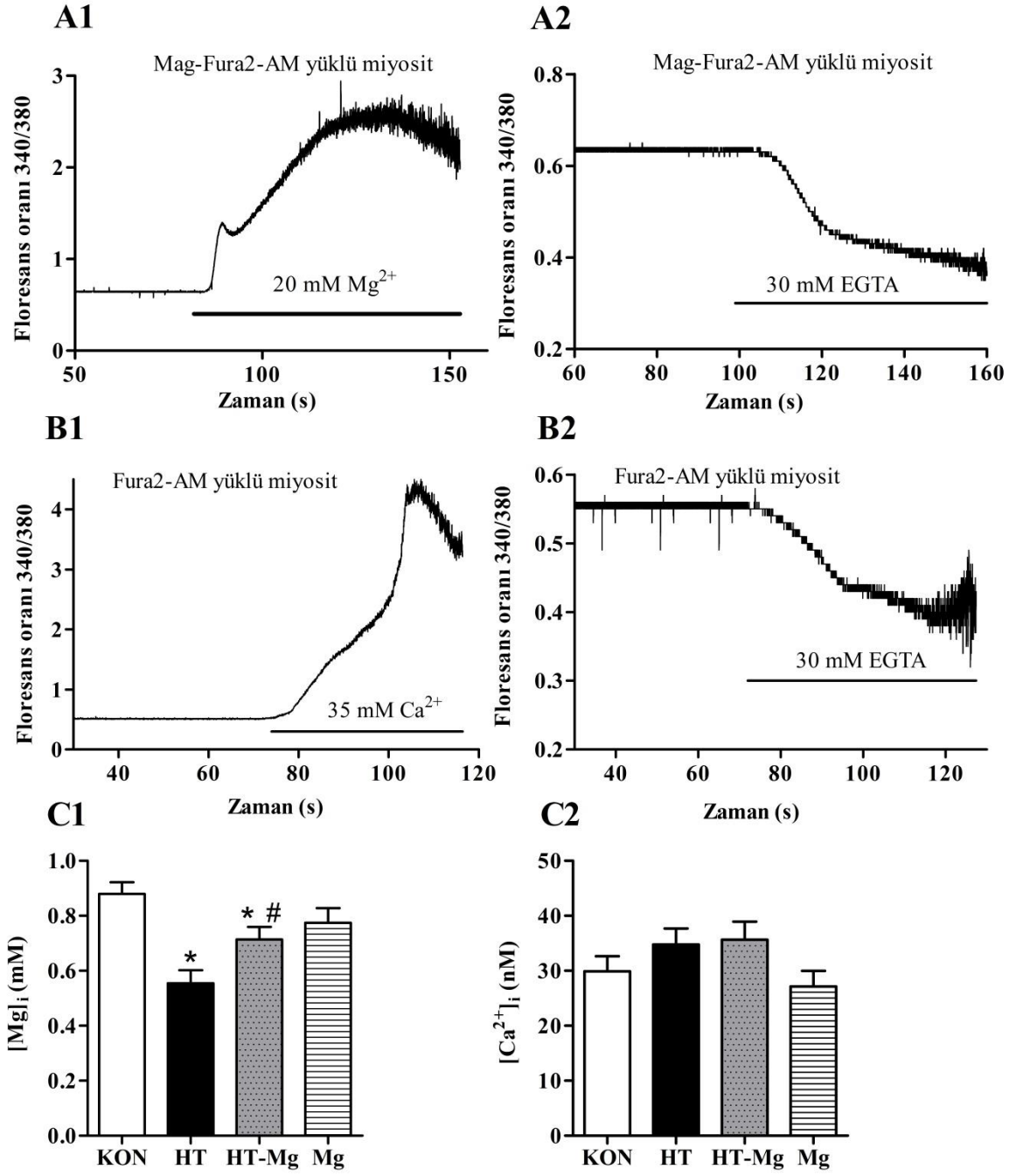
Hücre içi serbest Mg²⁺ seviyesi ve dinlenme durumunda ölçülen bazal Ca²⁺ floresans ışına şiddetlerinin bu iyonlara spesifikliğini teyid etmek gereklidir. Çünkü Mg²⁺ indikatörü olan Mag-fura2-AM'in Ca²⁺ iyonunada affinitesi olduğu bilinmektedir. Bu ayırımı yapabilmek için iki farklı deneysel düzenek oluşturulmuştur. İlk olarak Mag-fura2-AM ve Fura2-AM ile yüklenmiş olan hücrelerde bazal floresans ışınması kaydedilmiş daha sonrasında 0.5 Hz frekansta elektrik alan uygulanarak transient oluşumu incelenmiştir. Şekil 4.2A'da görüldüğü üzere Mg²⁺ indikatörü ile yüklü olan miyositlerde uyarı, transientleri tetiklemezken Ca²⁺ indikatörü ile yüklü olan hücrelerde uyarı, Ca²⁺ transientlerinin gözlenmesini sağlamıştır. İkinci ayırt edici yöntem olarak; bir seri deneyde sitozolük Mg²⁺ tamponlayıcı olan ATP kullanılmıştır. Mag-fura2-AM ile yüklü olan hücrelerde, 10 µM ATP uygulaması ile birlikte zaman bağımlı olarak floresans şiddetinde azalma gözlenirken, Fura2-AM ile yüklü miyositlerde floresans şiddetinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.2B). Sonuç olarak elde edilen floresans şiddetlerinin iyon spesifik ve Mag-fura-2'nin hücre içi Mg²⁺ değişimini tayin etmede kullanılabileceği belirlenmiştir.

Sistemik olarak Mg²⁺ kan basıncını düşürür ve periferik damar direncini düzenler. Bu nedenle hipertansiyonun kardiyomiyositlerde hücre içi serbest Mg²⁺ seviyeleri üzerine etkisini anlamak için Mag-fura2-AM (3 µM) ile yüklenen miyositlerde hücre içi bazal Mg²⁺ derişimi belirlenmiştir. Elde edilen floresans ışına şiddeti konsantrasyona dönüştürülmüştür. Eksternal ortamda 20 mM Mg²⁺ varlığında maksimum floresans (R_{max}=2,23) ve 30 mM EGTA varlığında ise minimum floresans (R_{min}=0,41) elde edilmiştir (Şekil 4.3A1 ve A2). Ayrıca ortamda aşırı miktarda EGTA mevcut iken 380 nm dalgaboyundaki floresans ışık yoğunluğu ve ortamda aşırı miktarda Mg²⁺ mevcut iken 380 nm dalga boyunda elde edilen floresans ışık yoğunluğu değerleri (S_{f2}/S_{b2}=2,92) hesaplanmıştır. Magnezyum için daha önce belirlenmiş olan K_d=1,5 mM değeri kullanılmıştır. Bu değerler ile gruplar için elde edilen bazal Mg²⁺ konsantrasyonları Şekil 4.3C1' de verilmiştir.

Kardiyomiyositlerde [Ca²⁺]_i değişimi kalbin mekanik aktivitesini düzenleyen mekanizmalarda çok önemli rollere sahiptir. Bu nedenle hipertansiyonun bazal Ca²⁺ iyon seviyesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Kardiyomiyositler Ca²⁺ indikatörü olan Fura2-AM ile yüklenerek eksternal ortamda 35 mM Ca²⁺ varlığında maksimum floresans (R_{max}=3,49) ve 30 mM EGTA varlığında ise minimum floresans (R_{min}=0,27) elde edilmiştir (Şekil 4.3B1 ve B2). Ayrıca ortamda aşırı miktarda EGTA mevcut iken 380 nm dalgaboyundaki floresans ışık yoğunluğu ve ortamda aşırı miktarda Ca²⁺ mevcut iken 380 nm dalga boyunda elde edilen floresans ışık yoğunluğu değerleri (S_{f2}/S_{b2}=3,65) hesaplanmıştır. Kalsiyum için daha önce belirlenmiş olan K_d=225 nM değeri kullanılmıştır. Bu değerler ile gruplar için elde edilen bazal Ca²⁺ konsantrasyonları Şekil 4.3C2' de verilmiştir.



Şekil 4.2. Mag-fura2-AM ile yüklü sol ventrikül miyositlerinden elde edilen floresans şiddetinin Mg^{2+} ya ve fura2-AM ile yüklenmiş olan sol ventrikül miyositlerinden elde edilen floresans şiddetlerinin Ca^{2+} ya spesifik olduğunun teyidi. A. Mag-fura2-AM ve fura2-AM ile yüklü miyositlerin 0.5 Hz frekanslı elektrik uyarana karşı verdikleri yanıtlar, B. Mag-fura2-AM ve fura2-AM ile yüklü miyositlerin 10 μ M ATP'ye karşı verdikleri zıt yönlü yanıtlar.



Şekil 4.3. Hücre içi serbest Mg²⁺ ve bazal Ca²⁺ seviyeleri. A1.20 mM Mg²⁺ bulunan ortamda maksimum Mg²⁺ floresans oranı, A2.30 mM EGTA bulunan ortamda minimum Mg²⁺ floresans oranı, B1. 35 mM Ca²⁺ bulunan ortamda maksimum Ca²⁺ floresans oranı, B2. 30 mM EGTA bulunan ortamda minimum Ca²⁺ floresans oranı, C1. Hücre içi serbest Mg²⁺ konsantrasyonu, C2. Hücre içi bazal Ca²⁺ konsantrasyonu. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir n=22, KON grubundan fark, *p<0.05; HT grubundan fark, #p<0.05.

4.4. Kasılma ve Hücre İçi Ca^{2+} ile İlgili Parametreler

4.4.1. Fraksiyonel Kısalma

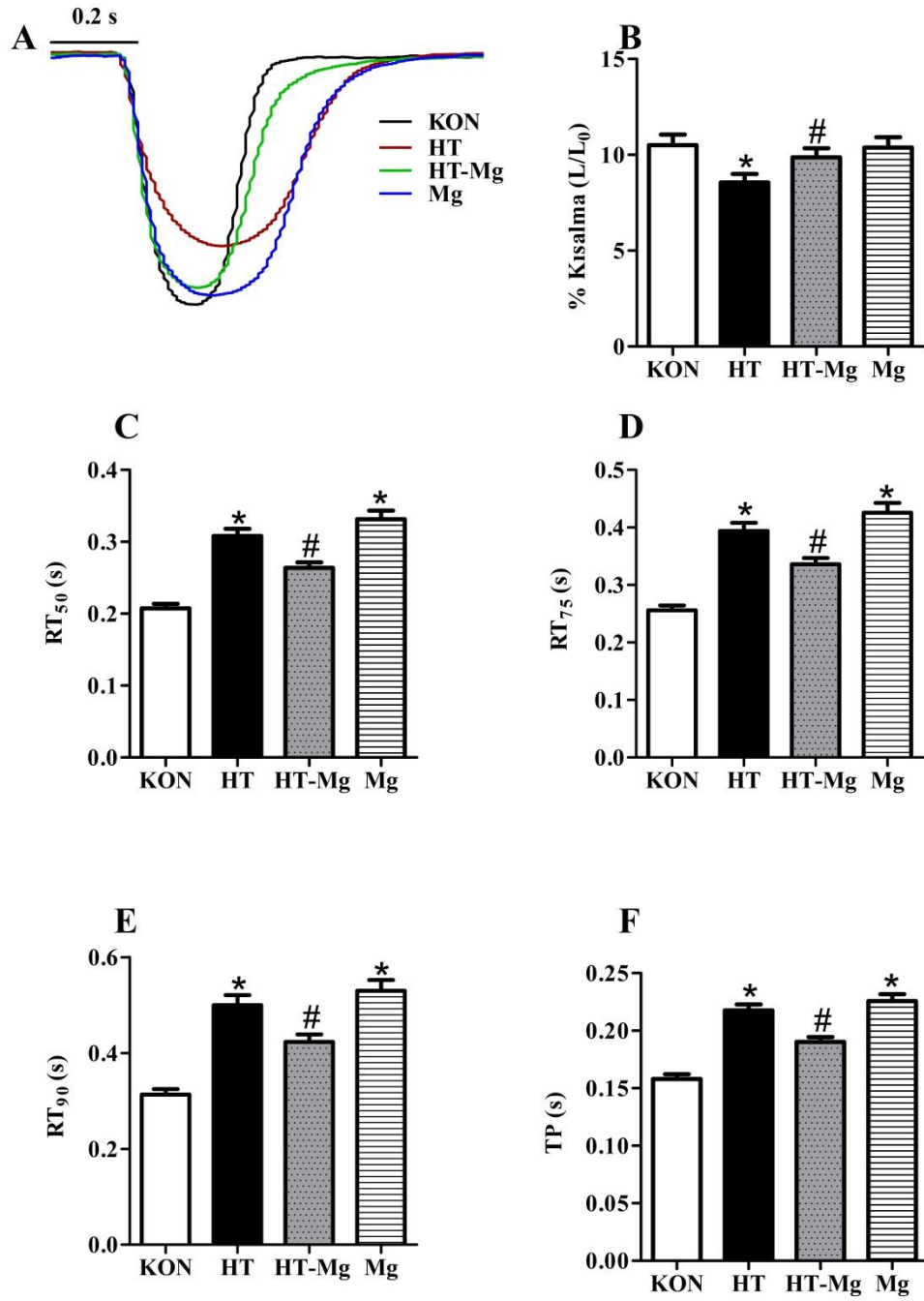
Hipertansiyonun sıçan kalbinin yol açtığı değişikliklerin fonksiyonel parametrelere etkisini ve Mg^{2+} 'un bu değişikliklere etkisini belirlemek amacıyla kasılma cevaplarına bakılmıştır. Bunun için elektrik alan uyarısı altında 0,5 Hz'lik elektriksel alan uyarısı sırasında kardiyomiyosit boyundaki kısalmanın başlangıç boyuna oranı (fraksiyonel kısalma) ölçülmüştür. Kalbin mekanik aktivitesine bakıldığında, hipertansiyonun miyositin fraksiyonel kısalma miktarını anlamlı düzeyde azalttığı ve 6 haftalık MgO uygulamasının bu değişiklikleri düzelttiği belirlenmiştir. Sadece MgO uygulanan normal sıçanlarda ise ventrikül miyositlerinin fraksiyonel kısalma miktarında bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Şekil 4.4 B).

Aynı kayıtların tepeye çıkış (TP), gevşemenin %50, %75 ve %90'nına ulaşma (RT_{50} , RT_{75} , RT_{90} sırasıyla) süreleri hesaplanarak ortalama değerleri karşılaştırıldığında HT grubunda KON grubuna göre TP, RT_{50} , RT_{75} , RT_{90} sürelerinin anlamlı derecede uzadığı görülmüştür. HT-Mg grubunda, MgO tedavisinin hipertansiyondan dolayı ortaya çıkan bozukluklar üzerinde anlamlı düzeyde iyileştirici etki gösterdiği görülmüştür. Sadece MgO uygulana normal sıçanlarda ise, değerlendirilen parametrelerde KON grubuna kıyasla anlamlı uzama olduğu belirlenmiştir (Şekil 4C, D, E ve F).

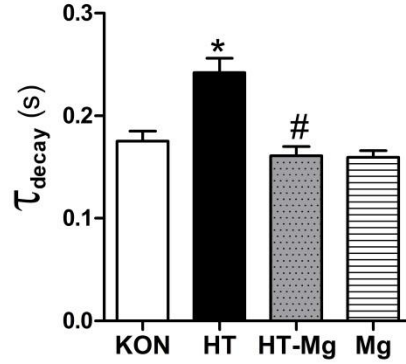
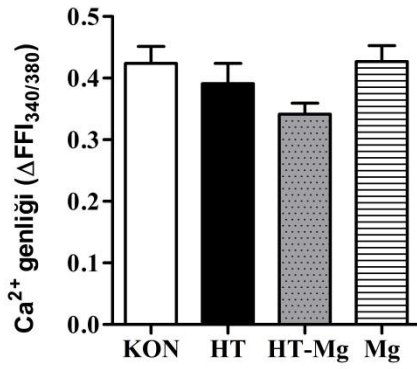
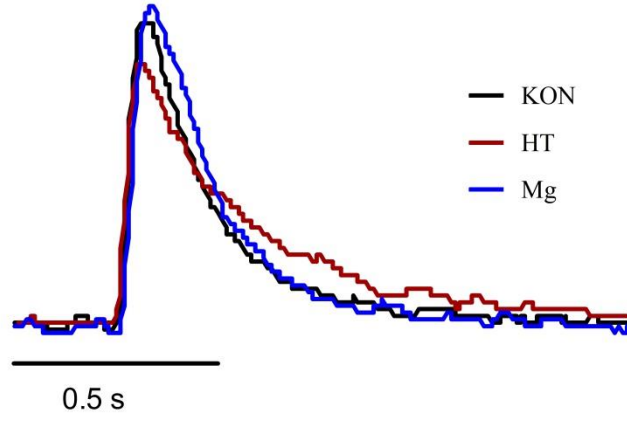
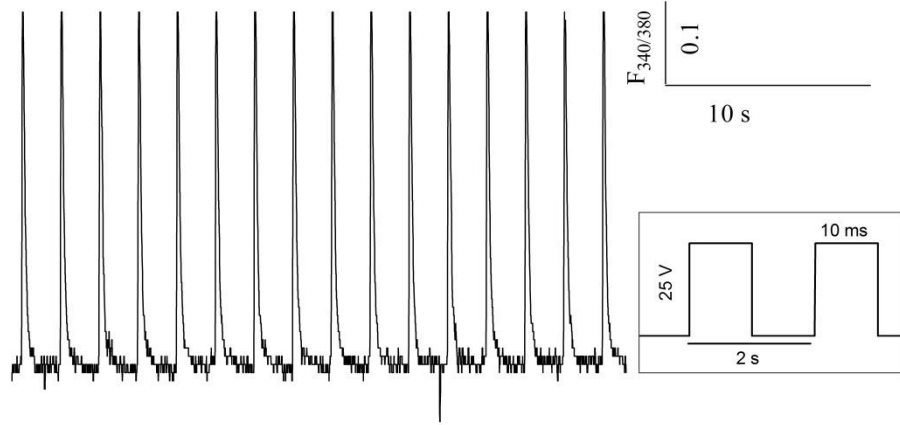
4.4.2. Hücre içi Ca^{2+} Transientleri

Hipertansiyonun sebep olduğu mekanik yanıtların Ca^{2+} regülasyonu ile ilişkisini ortaya koymak ve MgO tedavisinin bu değişikliklere etkisini değerlendirmek için Fura2-AM ile yüklenmiş olan kardiyomiyositlerde intrasellüler ortama salınan ve geri alınan Ca^{2+} miktarını ve kinetiğini belirlemek için $[Ca^{2+}]_i$ transientleri kaydedilmiştir. Fraksiyonel kasılmada olduğu gibi miyositler, 0,5 Hz frekanslı elektrik alan uyarısı ile uyarılarak kayıtlar elde edilmiştir. HT grubunda $[Ca^{2+}]_i$ transientlerinin anlamlı düzeyde değişmediği, ayrıca MgO tedavisinde hipertansif sıçanların $[Ca^{2+}]_i$ transientlerinin genliğine anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.5.B).

İzole edilen kardiyomiyositlerde kaydedilen $[Ca^{2+}]_i$ transientlerinin azalma sürecinin %37'sine ulaşma süresinin (τ_{decay}) HT grubunda KON grubu miyositlerine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı gözlemlenmiştir. Altı haftalık MgO tedavisinden sonra hipertansiyonda uzamış olan $[Ca^{2+}]_i$ transienti zaman sabitinin KON seviyelerine döndüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.5C)



Şekil 4.4. 0.5 Hz frekansta uygulanan elektrik alan uyarısı ile uyarılan kardiyomiyositlerden elde edilen kasılma yanıtları. A. 0.5 HZ frekanslı uyarı için miyosit kasılma örneği, B. Miyosit kısılma oranı, C. Tepeden relaksasyonun %50'sine iniş zamanı, D. Tepeden relaksasyonun %75'ine iniş zamanı, E. Tepeden relaksasyonun %90'nına iniş zamanı, F. Tepeye çıkış süresi. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. n=40-45, KON grubundan fark, *p<0.05; HT grubundan fark, #p<0.05.



Şekil 4.5. 0.5 Hz frekanslı elektrik alan uyarısı ile uyarılan kardiyomyositlerden elde edilen $[Ca^{2+}]_i$ transiyentleri. A. 0.5 Hz frekanslı uyarı için miyosit $[Ca^{2+}]_i$ transiyent örneği, B. $[Ca^{2+}]_i$ transiyentlerinin genlik değerleri. C. $[Ca^{2+}]_i$ transiyentlerinin zaman sabiti. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. $n=20-25$, KON grubundan fark, $*p<0.001$; HT grubundan fark, $\#p<0.001$.

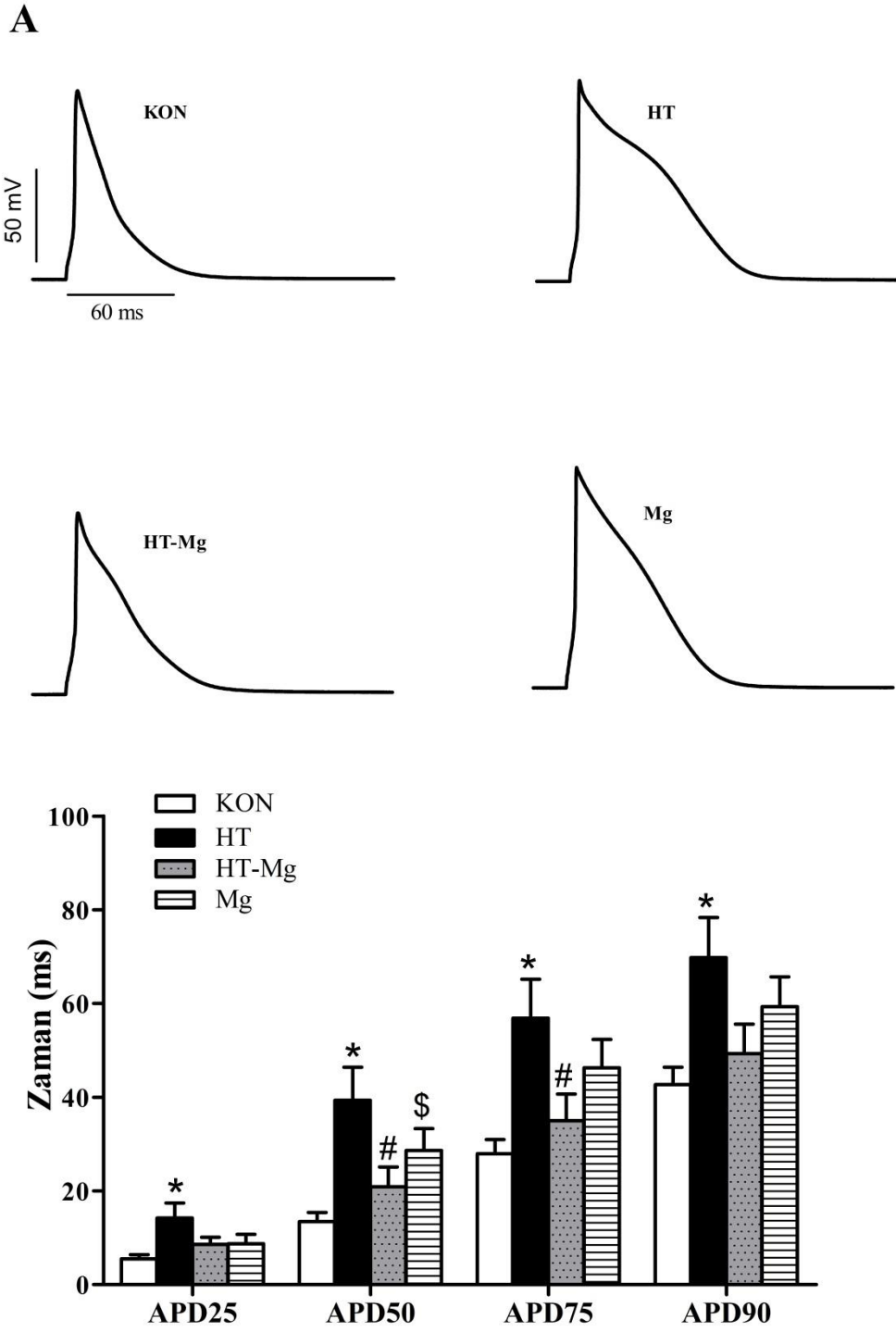
4.5. Aksiyon Potansiyeli Parametreleri

AP ile ilgili ölçülen parametreler; dinlenim zar potansiyeli (RMP), AP tepe değeri ve repolarizasyonun dört evresine ulaşma süreleridir. Bu süreler AP'nin tepe değerinden repolarizasyon fazının % 25, 50, 75 ve 90'ına ulaşma zamanı olarak seçilmiş ve APD₂₅, APD₅₀, APD₇₅ ve APD₉₀ olarak temsil edilmişlerdir. Gruplardan elde edilen AP'lere ilişkin örnek kayıtlar Şekil 4.6A'da verilmiştir. Altı haftalık deney sürecinin sonunda deney grubu sıçanlarından izole edilen miyositlerden elde edilen AP kayıtlarının RMP değerleri arasında bir farka rastlanmamıştır (KON: -71,5 ± 0,7 mV; HT: -73,2 ± 0,8 mV; HT-Mg: -69,74 ± 1,4 mV; Mg: -70,5 ± 0,9 mV). Ayrıca ölçülen AP'lerin maksimum depolarizasyon değerleri arasında da bir fark bulunamamıştır (KON: 29,3 ± 3,3 mV; HT: 30,9 ± 2,4 mV; HT-Mg: 28,3 ± 4,4 mV Mg: 32,1 ± 4,2 mV).

Kayıtların analizinden hipertansif grubun repolarizasyon sürelerinin (14,2 ± 3,2 ms; 39,4 ± 7,0 ms; 56,8 ± 8,3 ms; 69,8 ± 8,5 ms), kontrol değerlerine (5,5 ± 0,9 ms; 13,4 ± 1,9 ms; 27,9 ± 4,9 ms; 42,7 ± 3,7 ms) göre anlamlı düzeyde uzun olduğu görülmüştür (Şekil 4.6). Bunun yanında, altı haftalık MgO uygulamasının hipertansiyon grubunun uzamış olan repolarizasyon süresini kısalttığı (8,6 ± 1,5 ms; 20,9 ± 4,2 ms; 35,0 ± 5,6 ms; 49,3 ± 6,3 ms) ve bu değişimin istatistiksel anlamlılık taşıdığı görülmüştür (Şekil 4.6). Şekil 4.6A'daki gruplara ait AP örneklerinde ve parametrelerin ortalama değerlerini gösteren histogramda görüldüğü gibi magnezyum hipertansiyonun yol açtığı AP bozukluklarını önemli ölçüde ortadan kaldırmaktadır. Repolarizasyon fazının ölçülen dört noktasında da hipertansiyonun süreyi uzattığı, buna karşılık MgO uygulamasının her noktada bu değerleri kontrol seviyesine yaklaştırdığı görülmüştür. Ancak, altı hafta boyunca MgO uygulanan normal sıçanlarda APD'nin repolarizasyon fazı ile ilgili parametrelerde dikkat çeken bir uzama olduğu (8,7 ± 2,1 ms; 28,6 ms; 4,3 ± 6,1 ms; 59,3 ± 6,9 ms), fakat bu uzamanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

4.6. K⁺ ve Ca²⁺ Akımları

Kalp kası hücrelerinde AP kasılmayı tetiklemenin yanında kasılma boyunca varlığını sürdürerek kasılmayı kontrol eder, dolayısıyla uyarılma-kasılma çiftlenimi ile AP arasında sıkı bir bağlantı vardır. Ayrıca AP'nin şekli hücre zarından geçen iyon akımlarının miktarına ve bunların zamansal değişimlerine sıkı bir şekilde bağlıdır. Bu nedenle, deney gruplarında izole edilen miyotlerden elde edilen kasılma ve AP'lerde oluşan değişikliklerin altında yatan iyonik mekanizmaları açığa çıkarmak amacıyla izole kardiyomiyositlerden geçici dışarı doğrultucu potasyum akımları (I_{to}), karalı durumdaki potasyum akımları (I_{sus}) ve I_{Ca} kaydedilmiştir.



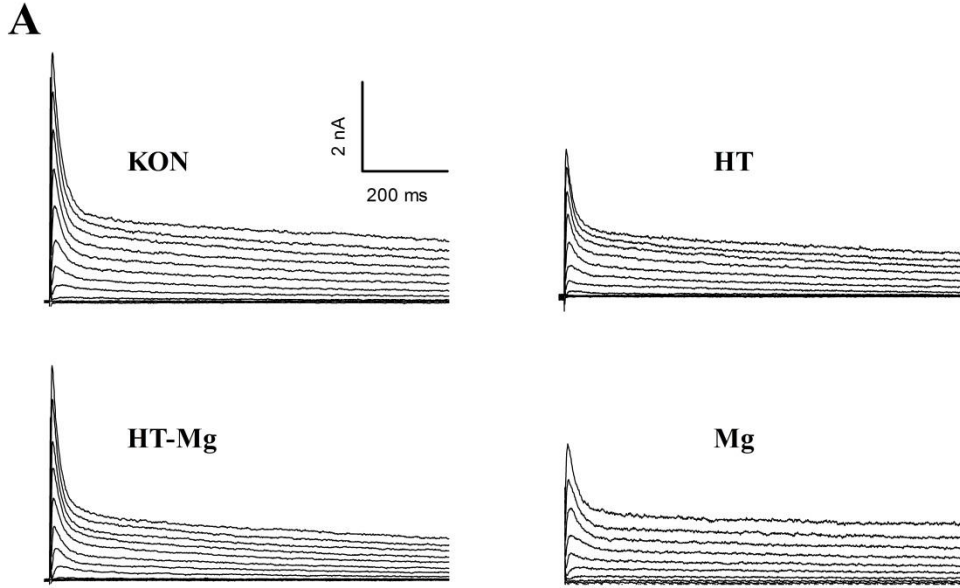
Şekil.4.6. Deney gruplarına ait örnek aksiyon potansiyeli kayıtları ve ortalama APD değerleri. A. Deney grupları için örnek AP kayıtları, B.Miyosit hücresi AP repolarizasyon evresinin %25, 50, 75 ve 90 (APD25, APD50, APD75, APD90)'ne inme süreleri. n=18-20, KON grubundan fark, *p<0.05; HT grubundan fark, #p<0.05.

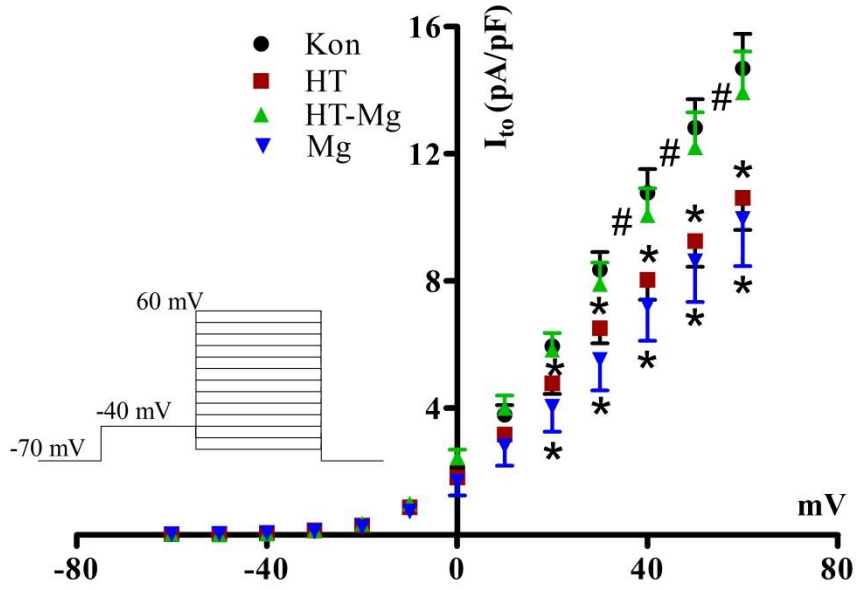
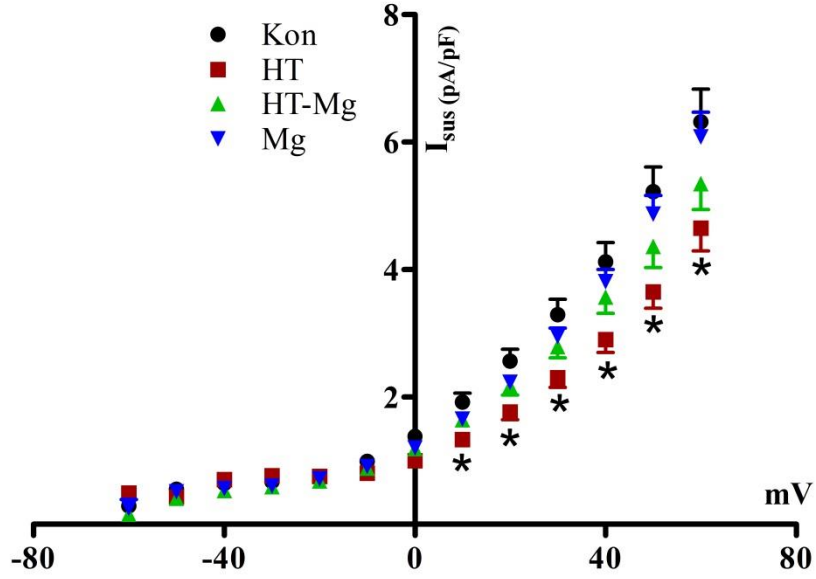
4.6.1. Hipertansiyonun ve Mg²⁺ Tedavisinin K⁺ Akımları Üzerine Etkisi

Potasyum akımları, AP'nin repolarizasyon fazının oluşmasında rol oynayan iyonik akımların başında gelir. Bu nedenle çalışmamızda I_{to} ve I_{sus} ölçülmüştür. Gruplara ait ortalama akım yoğunluklarının zar potansiyeline göre değişim eğrileri ve örnek akım kayıtları Şekil 4.7'de görülmektedir.

Deneysel verilerin analizi sonucunda kontrol grubuna kıyasla HT grubunda I_{to} tepe değerinin anlamlı seviyede farklı olduğu, yani hipertansiyonun bu akımları baskıladığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, HT-Mg grubunda anlamlı bir düzelmeye gerçekte olduğu ve akım yoğunluğu değerlerinin kontrol seviyelerine yaklaştığı görülmüştür. Ancak MgO uygulanan kontrol grubunda da I_{to} akımları hipertansiyonla benzer değişim göstermiştir (KON: 15,9 ± 1,0 pA/pF; HT: 10,2 ± 0,9 pA/pF; HT-Mg: 13,9 ± 1,3 pA/pF; Mg: 9,0 ± 1,2 pA/pF, +60 mV için elde edilen değerler).

Hipertansiyon, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında I_{sus} akımlarının yoğunluklarında da anlamlı bir azalmaya sebep olmuştur. Fakat 6 haftalık MgO tedavisi bu akımdaki baskılanmayı anlamlı düzeyde ortadan kaldıramamıştır. Magnezyum oksit verilen kontrol grubunda I_{to} akımlarının aksine I_{sus} akımları kontrolle paralel sonuçlar sergilemiştir (KON: 6,3 ± 0,5 pA/pF; HT: 4,7 ± 0,4 pA/pF; HT-Mg: 5,4 ± 0,4 pA/pF; Mg: 6,08 ± 0,4 pA/pF, +60 mV için elde edilen değerler).



B**C**

Şekil 4.7. Gruplara ait örnek potasyum akımları ve I-V değişim eğrileri. A. Gruplara ait örnek potasyum akımları B, C. I_{to} ve I_{sus} için I-V grafikleri. K^+ akımları -60 mV ille +60 mV arasında 10 mV'luk artışlarla 5 s süreli test pulsları uygulanarak elde edilmiştir. I_{to} , K^+ akımının tepe değerlerinden kuyruk kısmının (I_{sus}) çıkarılması ile elde edilmiştir. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. n=20-25, KON grubundan fark, * p <0.05; HT grubundan fark, # p <0.05.

4.6.2. Hipertansiyonun ve Mg²⁺ Tedavisinin Ca²⁺ Akımları Üzerine Etkisi

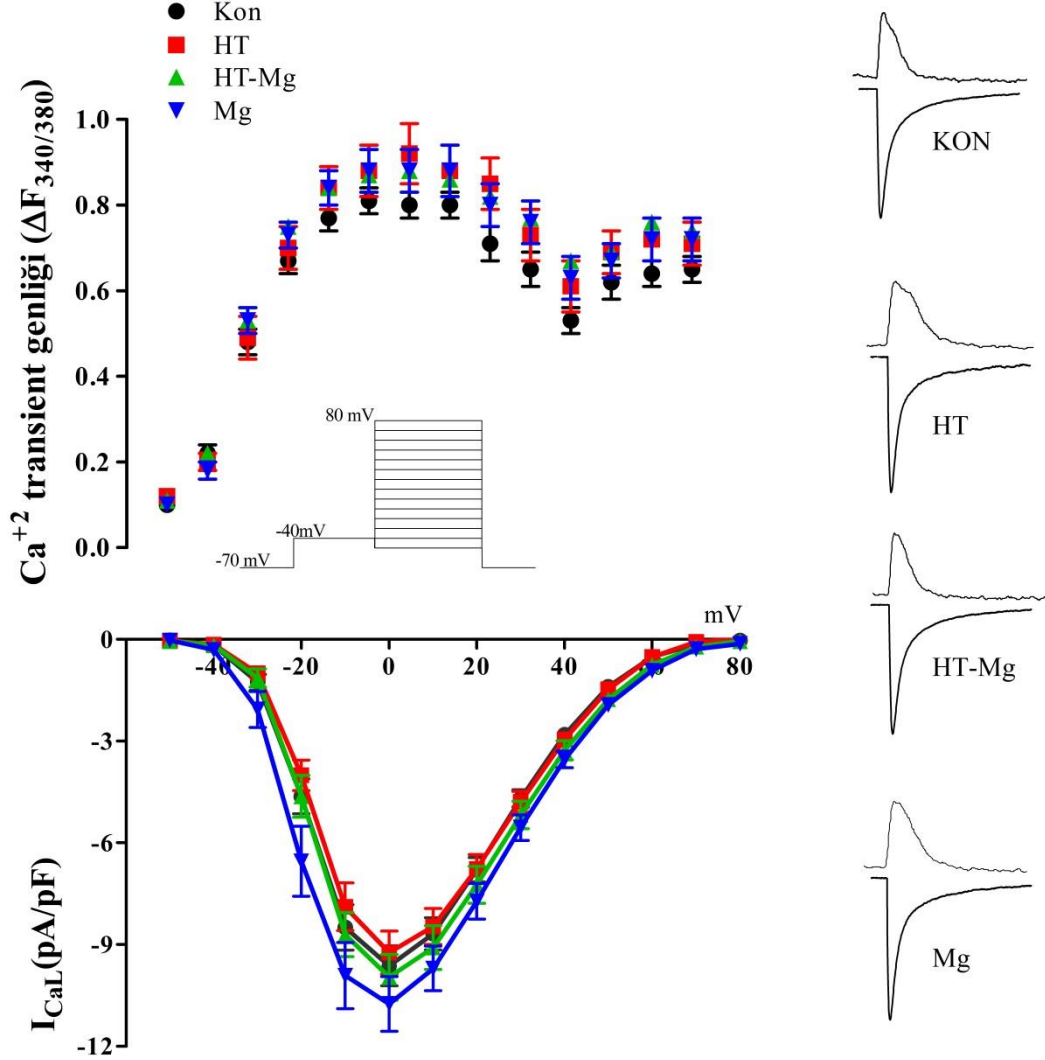
Aksiyon potansiyelinin plato fazında L-tipi Ca²⁺ kanallarının açılması ile Ca²⁺ geçirgenliği artar ve hücre dışından hücre içine Ca²⁺ girişi olur. Fakat Ca²⁺ kanallarından geçen iyonların miktarı uyarılma-kasılma çiftlenimi için yeterli değildir. Bu Ca²⁺ girişinin önemi, Ca²⁺ deposu olan SR'dan RyR aracılığıyla intraselüler ortama yüksek miktarda Ca²⁺,un difüze olmasını sağlayarak global bir Ca²⁺ artışına yol açmasıdır. Böylece sitozolik ortamda, Ca²⁺ konsantrasyonu 10⁻⁷ M seviyelerinden 10⁻⁵ M seviyelerine yükselir ve kasılma için gerekli olan Ca²⁺ sağlanmış olur. Dolayısıyla L-tipi Ca²⁺ kanalları AP'nin şeklini etkilemenin yanında, SR'dan RyR aracılığıyla Ca²⁺ salınımını tetikleyerek uyarılma-kasılma çiftlenimini düzenleyen primer hücrel mekanizmaların başında gelir.

Bu nedenle çalışmamızda hipertansiyonun Ca²⁺ regülasyonu üzerine olan etkilerini araştırmak amacıyla Fura-2 yüklü miyositlerde eş zamanlı olarak Ca²⁺ akımları ve bu akımlara karşılık gelen Ca²⁺ transienleri voltajın bir fonksiyonu olarak kaydedilmiştir(Şekil 4.8). Sonuçlara bakıldığında, hipertansiyonun ve Mg²⁺ uygulamasının Ca²⁺ akımları üzerinde etkili olmadığı (KON: -9,6 ± 0,6 pA/pF; HT: -9,2 ± 0,6 pA/pF; HT-Mg: -9,9 ± 0,7 pA/pF; Mg: -10,8 ± 0,8 pA/pF, 0 mV için elde edilen değerler) görülmüştür. Ca²⁺ transienlerinin analizi hem [Ca²⁺]_i değişim kinetikleri hakkında hem de SR fonksiyonları hakkında bilgi verir. Şekil 4.8'de görüldü gibi deney gruplarında, Ca²⁺ akımları ile paralel olarak Ca²⁺ transienleri arasında da anlamlı fark elde edilmemiştir (KON: 0,82 ± 0,03; HT: 0,90 ± 0,06; HT-Mg: 0,87 ± 0,05; Mg: 0,88 ± 0,05, 0 mV için elde edilen ΔF_{340/380} oranları).

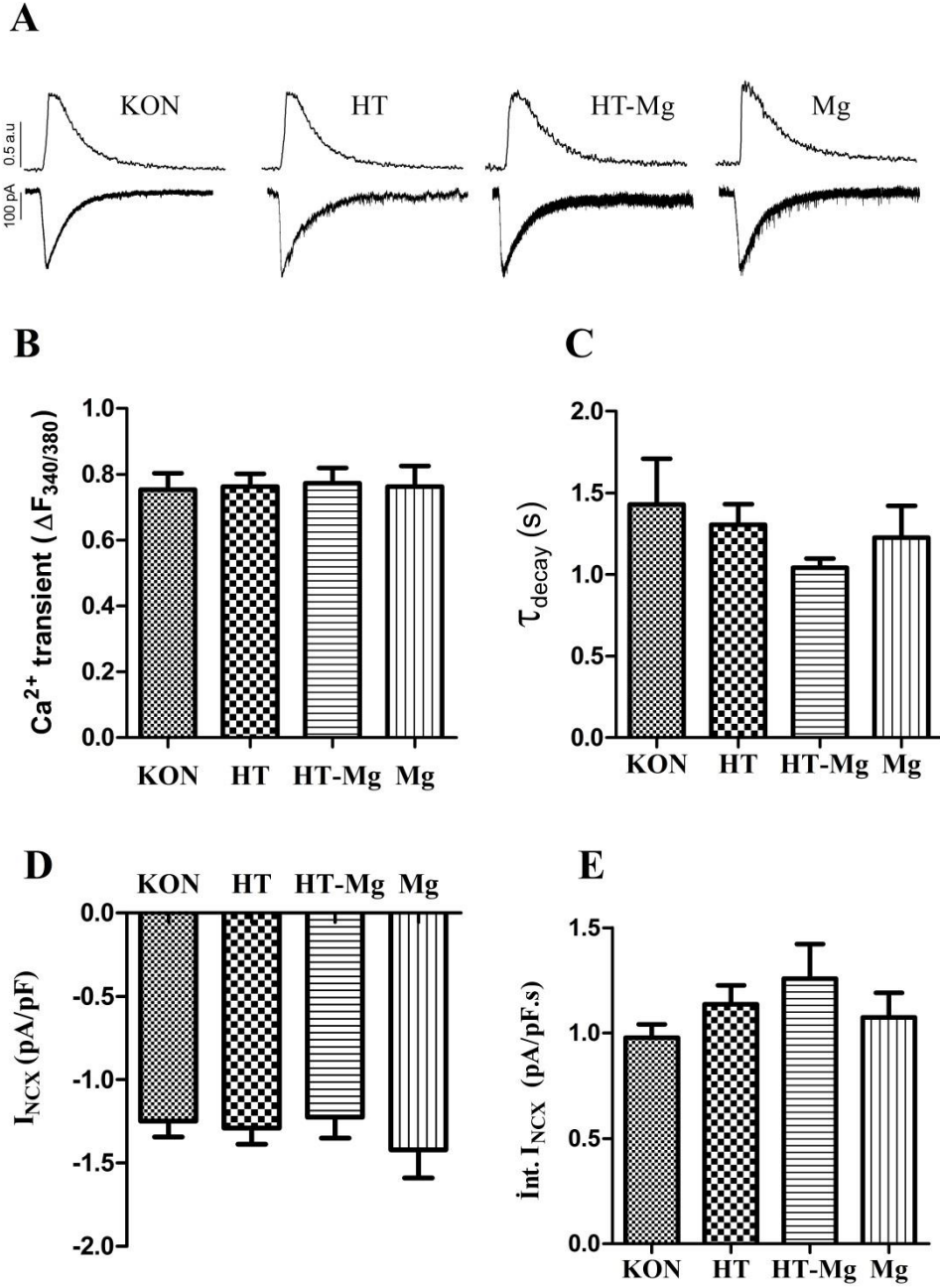
4.7. SR'daki Ca²⁺ miktarı

Kardiyomiyositlerde uyarılma-kasılma çiftlenimi SR'dan salınan Ca²⁺ iyonu aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, kasılma sonunda intraselüler ortamda yükselmiş olan Ca²⁺ yine SR tarafından geri alınarak (reuptake) ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Özet olarak SR, [Ca²⁺]_i regülasyonunda çok önemli bir role sahiptir. Hipertansiyonun ve Mg²⁺,un SR Ca²⁺ içeriği ve sitozolik Ca²⁺ regülasyonu üzerine etkilerini araştırmak için eş zamanlı olarak kafein-indüklü Ca²⁺ transienti ve I_{NCX} akımlarının ölçümü yapılmıştır. Şekil 4.9A'da gruplara ait kafein yanıtları ve I_{NCX} akımlarına ilişkin örnek kayıtlar verilmiştir.

SR'daki Ca²⁺ miktarını belirleyebilmek için öncelikle miyosite küçük depolarize edici pulslar uygulanmış ve devamında 10 sn boyuca 10 mM'lık kafein uygulaması yapılmıştır. Gruplar arasında SR'da depolanan Ca²⁺ miktarında fark olmadığı (KON: 0,75 ± 0,05; HT: 0,76 ± 0,04; HT-Mg: 0,77 ± 0,05; Mg: 0,76 ± 0,06,



Şekil 4.8. Deney gruplarından elde edilen L-tipi Ca²⁺ akımları ve akımlara karşılık gelen Ca²⁺ transientleri. Solda Ca²⁺ akımlarının I-V grafiği ve Ca²⁺ transientleri, sağda, 0 mV için kaydedilen Ca²⁺ akımı ve akıma karşılık gelen Ca²⁺ transientlerine ilişkin kayıt örnekleri. Kayıtlar -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla +80 mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 14 farklı voltaj seviyesinde alınırken akımlara karşılık gelen Ca²⁺ transientleri de Fura-2 340 ve 380 nm'de eksite edilerek 510 nm' ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile kaydedilmiştir. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.



Şekil 4.9. SR'de depolanan Ca²⁺ miktarı, sitoplazmadan Ca²⁺'nın geri taşınmasında görev alan NCX ve SERCA aktiviteleri. A. 10 s'lik kafein uygulaması boyunca Ca²⁺ transienleri ve membran akımları ile ilgili örnek kayıtlar, B. Ca²⁺ transient genlikleri, C. Ca²⁺ transienlerinin iniş zamanı, D. I_{NCX} akımı, E. I_{NCX} akımının integrali, Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. n=13, KON grubundan fark, *p<0.05.

a.u) tespit edilmiştir (Şekil 4.9B). Ayrıca Şekil 4.9C’de görüldüğü üzere intraselüler ortama SR’dan kafein aracılı salınan Ca^{2+} , un geri alınma hızları arasında da fark bulunamamıştır (KON: $1,17 \pm 0,11$ s; HT: $1,20 \pm 0,07$ s; HT-Mg: $1,04 \pm 0,06$ s; Mg: $1,05 \pm 0,10$ s).

Ca^{2+} , un sitoplazmadan uzaklaştırılmasında iki önemli yoldan biri olan Na^+/Ca^{2+} değiş-tokuşçusunun oluşturduğu akım miktarı ve toplam taşıdığı yük miktarını belirlemek için akımın alanının integrali alınmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, ne I_{NCX} ’in integralinde (KON: $-0,98 \pm 0,06$ pA/pF; HT: $-1,14 \pm 0,09$ pA/pF; HT-Mg: $-1,26 \pm 0,06$ pA/pF; Mg: $-1,08 \pm 0,12$ pA/pF) ne de NCX akım yoğunluğunda da gruplar arasında anlamlı fark (KON: $-1,25 \pm 0,10$ pA/pF; HT: $-1,29 \pm 0,10$ pA/pF; HT-Mg: $-1,23 \pm 0,13$ pA/pF; Mg: $-1,42 \pm 0,17$ pA/pF) gözlenmemiştir (Şekil 4.9.D, E).

4.8. Biyokimyasal parametreler

4.8.1. Nitrit/nitrat seviyeleri

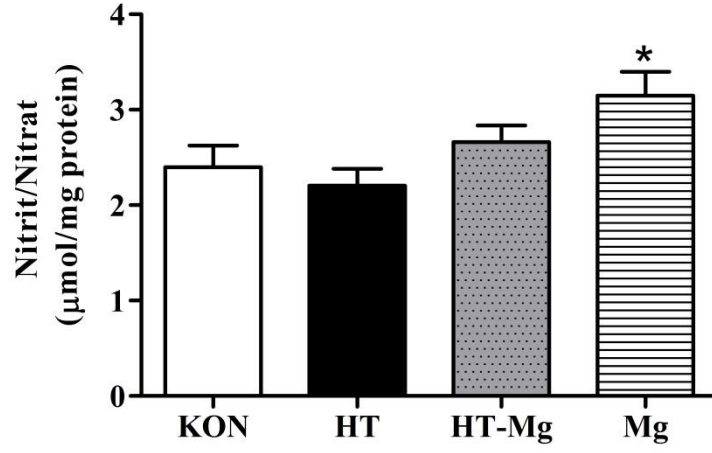
Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türlerinin en önemlisi NO^* ’dur. Nitrik oksitin kontrolsüz üretimi sonucu proteinlerin nitrozilasyon ve DNA kırılmaları gibi hasarlara yola açabilmektedir. İn vivo ortamda salınan NO^* , NO_2^* veya NO_3^* ’e otookside olabilir. Çalışmamızda NO^* ’in yarılanma ömrünün çok kısa olması ve düşük konsantrasyonlarının ölçümünün zor olması nedeniyle onun daha kararlı olan metabolitleri nitrit/nitrat ölçümü Griess reaksiyonu metodu ile ölçülmüştür.

Deney grupları incelendiğinde hipertansif grupta nitrit/nitrat seviyelerinde azalma olduğu, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu durumun aksine MgO uygulaması yapılan kontrol grubunda ise bu parametrenin artış eğiliminde olduğu ve bu artışın da anlamlı düzeyde olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.10).

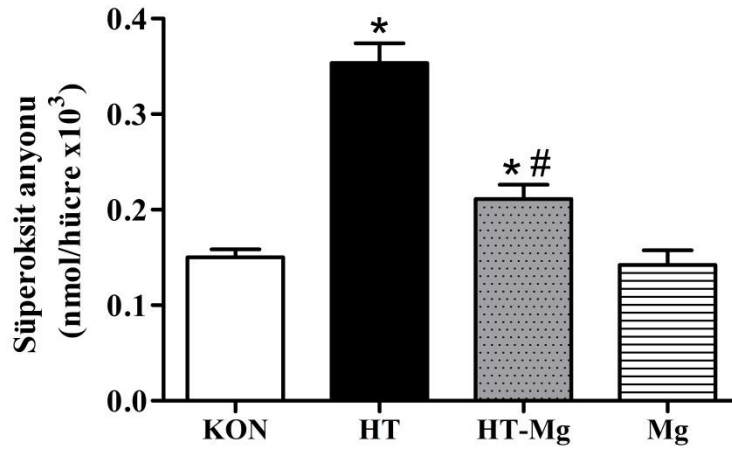
4.8.2. O_2^* Salınımı ve Hücre içi H_2O_2 Konsantrasyonunu

İzole edilen sol ventrikül kardiyomiyositlerinde spektrofotometrik olarak O_2^* salınımı ölçülmüştür. Ölçülen O_2^* salınımı miktarları bakımından hipertansif grupta kontrole kıyasla yaklaşık 2.5 katlık bir artış gözlenmiştir. Buna karşılık MgO tedavisi uygulanan hipertansif grupta O_2^* alınımları düzeyleri hipertansif gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmüştür (Şekil 4.11).

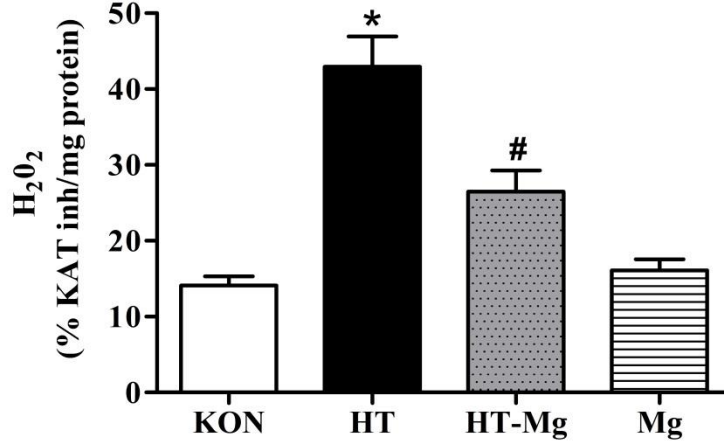
İzole edilen sol ventrikül kardiyomiyositlerinde H_2O_2 seviyelerine de bakılmıştır. Hipertansif grupta H_2O_2 salınımının kontrole göre oldukça yüksek olduğu ve MgO tedavisinin H_2O_2 seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürdüğü görülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.10. Kalp dokusunda ölçülen Nitrit/Nitrat seviyeleri. Değerler, ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. n=10, KON grubundan fark, *p<0.05.



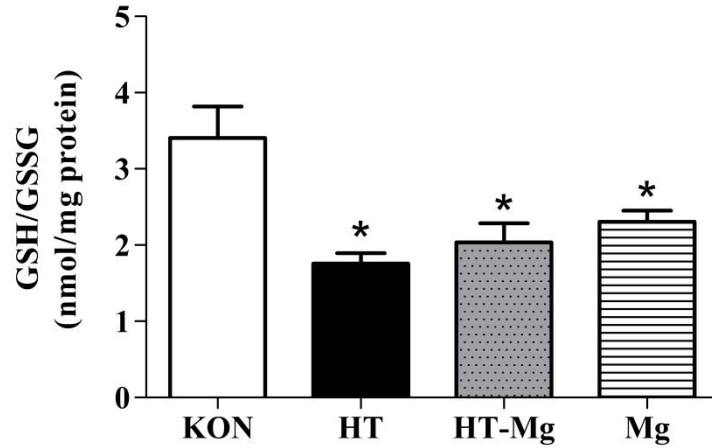
Şekil 4.11. İzole edilen kardiyomyositlerden ölçülen süperoksit anyon salınımı miktarı. Değerler, ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. n=9-10, KON grubundan fark, *p<0.001, HT grubundan fark #p<0.01



Şekil 4.12. Kardiyomiyosit H₂O₂ aktivitesi. Değerler, ortalama ± SEM olarak verilmiştir. n=8-10, KON grubundan fark, *p<0.001, HT grubundan fark #p<0.01.

4.8.3. Glutasyon seviyeleri

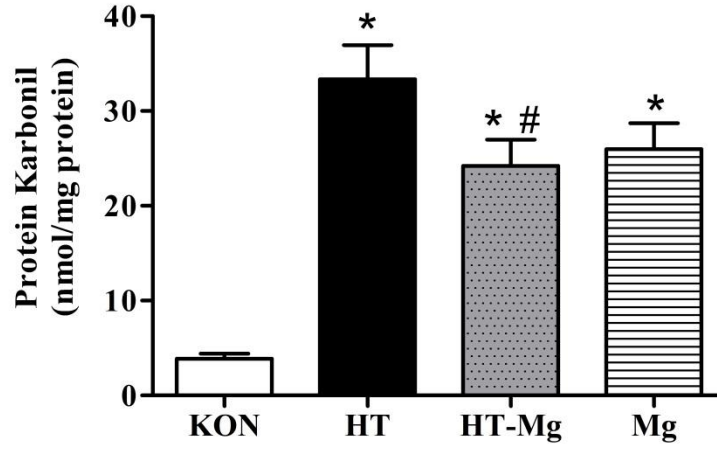
GSH, O₂^{•-}, •OH ve H₂O₂ gibi bileşiklerle etkileşerek indirgeyici görev görür, böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Dolayısıyla GSH/GSSG oranındaki değişimler dokudaki oksidatif hasar ya da antioksidan kapasite durumları ile ilgili bilgi verir. Çalışmamızda grupların GSH/GSSG oranları değerlendirilmiştir ve KON grubu ile kıyaslandığında diğer tüm gruplarda GSH/GSSG oranları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Gruplara ait kalp dokusu örneklerinden elde edilen GSH/GSSG oranları. Değerler, ortalama ± SEM olarak verilmiştir. n=10, KON grubundan fark, *p<0.05.

4.8.4. Protein Karbonil İçeriği

Hipertansiyonun kalpte oluşturduğu değişikliklerde protein oksidasyonunun rolünün olup olmadığı araştırmak amacıyla protein karbonil seviyeleri incelenmiştir. Altı haftalık deney periyodunun sonunda hipertansif grupta protein oksidasyonunun KON grubuna göre yaklaşık on katlık bir artış gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.14). MgO verilen HT grubunda protein oksidasyonunun anlamlı düzeyde düştüğü, ancak kontrol seviyelerine göre yine de anlamlı seviyede yüksek olduğu görülmüştür. Sadece MgO uygulanan grupta da protein oksidasyonu yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla Mg^{2+} , HT grubunda antioksidan özellik gösterirken, herhangi bir patolojik durum söz konusu değilse ilginç bir şekilde protein oksidasyonuna neden olmaktadır.



Şekil 4.14. Kalp dokusunda protein karbonil düzeyi. Değerler, ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. n=5-6, KON grubundan fark, *p<0,05, HT grubundan fark, #p<0,05.

TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü 2002 Raporuna göre dünya genelinde kalp ve damar hastalıklarına yol açan nedenlerin içinde ilk sırada hipertansiyon yer almaktadır (45). Kardiyovasküler mortalite ve morbidite hem sistolik, hem de diyastolik kan basıncı ile sürekli bir korelasyon göstermektedir. Hipertansiyonun koroner kalp hastalıklarına, kalp yetmezliğine, böbrek hasarına, serebrovasküler hastalıklara zemin hazırladığı çok iyi bilinmekte ve kan basıncı yüksekliği toplum genelinde son derece yaygın görülmektedir (211). Bu nedenle kan basıncının uygun tedavi yöntemleriyle kontrol edilmesi son derece önemlidir. Hipertansiyonun mekanizmasının, yan etkilerinin ve tedavisinin araştırıldığı çalışmalarda etik kaygılar nedeniyle insanlarda çok detaylı incelemeler yapılamamaktadır. Bu zorluğu aşmak için çeşitli deneysel hipertansiyon modelleri kullanılmaktadır. Kendiliğinden hipertansif sıçan türlerinin yanında, çeşitli girişimlerle hipertansif hale getirilen sıçanlar (Dahl-tuz hipertansiyon modeli, DOCA-tuz hipertansiyon modeli, Goldblatt hipertansiyon modelleri) uzun yıllardan beri çok sayıda çalışmada hipertansiyonun mekanizmasını çözebilmek amacıyla kullanılmıştır. Araştırmamızda kullandığımız NOS-inhibisyonuna dayalı hipertansiyon modeli ise son yıllarda sık kullanılan ve diğerlerine göre oldukça yeni bir modeldir (38).

NO, nöronal iletim, immün yanıt, platelet agregasyonunun inhibisyonu, düz kas ve periferik sinirler arasındaki kimyasal iletim, kan damarlarının endotelium bağımlı relaksasyonu gibi bazı sellüler süreçler için önemli bir araçtır (212, 213). Nitrik oksit, büyük arterlerden en küçük kapiller damarlara kadar bütün endotelial dokularda vardır ve sağlam damar endotelinden bazal bir hızla üretilmektedir. Endotelden düşük bir seviyede salınan NO damar tonusunun ve arteriyel kan basıncının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. NO'nun bu etkileri guilat siklazı (GS) ve cGMP yolağını aktive ederek vazodilatasyon yapmasına bağlıdır ve NO salınımındaki azalma kan basıncının yükselmesine neden olmaktadır (212, 214). NO'nun kalp üzerine etkileri çok iyi tanımlanmamış olmasına rağmen uyarılma-kasılma çiftleniminde önemli bir role sahip olduğu da gösterilmiştir (215). NO yüksek konsantrasyonlarda, cGMP aracılı olarak miyofilamentlerin Ca^{2+} duyarlılığını azaltarak kontraktilite yanıtını azaltırken düşük konsantrasyonlarda GS/cGMP yolağından bağımsız olarak cAMP seviyelerinde artışa yol açarak kontraktilite yanıtını artırır (216, 217).

Bu çalışmada L-NAME kullanılarak oluşturulan hipertansiyon modelinde kardiyak miyositlerde meydana gelen elektrofizyolojik değişiklikler belirlenmiş, ROS'un ve hücre içi Mg^{2+} seviyelerinin bu değişikliklerle olan ilişkileri araştırılmıştır. Ayrıca, uzun süreli MgO tedavisinin hipertansiyonun kalpte oluşturduğu elektriksel, mekanik ve biyokimyasal değişikliklere etkisi incelenerek, Mg^{2+} 'un hipertansiyondaki rolü ve terapötik potansiyeli kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır.

NOS blokörü L-NAME'in kronik etkilerinin araştırıldığı birçok çalışmada, yüksek dozlarda (40-250 mg/kg/gün) miyokardiyal ve vasküler yeniden modellenme, kardiyak iskemik nekroz ve mekanik disfonksiyonlarla birlikte hipertansiyon gözlenen genel bulgulardır. Düşük dozda (<25 mg/kg/gün) yapılan çalışmalarda sonuçlar net değildir (218). Mojiminiyi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (219) 100 mg/kg/gün dozunda 4 hafta boyunca içme suyu ile uygulanan L-NAME ile oluşturulan hipertansiyonda, kardiyak ağırlık, sol ve sağ ventriküler ağırlıkta anlamlı fark gözlenmemiştir. Diğer yandan yapılan bir başka çalışmada 2, 4, 6 ay sürelerle 7,5 mg/kg/gün dozunda L-NAME uygulanmış ve kronik L-NAME uygulaması vücut ağırlığının % 15 azalmasına sebep olmuştur. Kalp ağırlığı % 13-20 ve ventriküler ağırlık % 20-34 oranlarında azalmıştır. Kardiyomiyosit büyüklüğü subendokardiyal, subepikardiyal ve midmiyokardiyal bölgelerde zaman bağımlı olarak azalmıştır (220). Ayrıca benzer dozlar ve benzer sürelerin kullanıldığı çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Pechanova ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (221), 4 hafta boyunca içme suyu ile verilen 20 mg/kg/gün dozundaki L-NAME'in hipertansif grupta sol ventrikül ağırlığı/vücut ağırlığı oranını artırdığı ve ventriküler hipertrofiyi tetiklediği gösterilirken, Bell ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (218) ise aynı doz 4 ve 8 hafta için uygulanmış ve ventriküler hipertrofi oluşturmadığı sonucuna varılmıştır. NOS blokajıyla oluşturulan hipertansiyon modelinde yukarıda bahsedilen farklı dozlara karşın bugüne kadar yapılan çalışmalarda en yaygın kullanılan dozun 40 mg/kg/gün olduğu tespit edilmiştir. Bu modelde genel olarak gözlenen bulgular; kan basıncının yükselmesi, hayvanlarda kilo kaybına yol açmaması, kalp hızında yavaşlamaya sebep olması, NOS aktivitesinde düşüş ve sol ventriküler hipertrofisidir (221-226). Bu model bağlamında ortaya çıkan arteriyel sistemik hipertansiyon kalpte ön yük artışına sebep olur ve sol ventrikül basınç artışı meydana gelir. Bu basınç artışı da kardiyak yeniden modellenmesi kapsamında ventriküler hipertrofiyi indükleyebilir (11). Hipertansiyonun kalpte oluşturabileceği etkiler ve hayvan çalışmalarında NOS blokajıyla oluşturulan hipertansiyon modelinde elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda 40 mg/kg/gün L-NAME dozunun çalışılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir. Deney hayvanlarımızın kan basıncı non-invazif bir yöntem olan kuyruktan ölçümle takip edilmiş ve hipertansiyonun indüklendiği hayvanlarda ölçülen kan basıncı değerlerinin literatürle uyumlu olduğu (218, 225, 227, 228) ve kontrole göre yaklaşık %36 arttığı tespit edilmiştir. Yine daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak grupların kilo kazanımları arasında fark tespit edilmemiştir (224, 229). Ayrıca, kardiyak hipertrofiyi değerlendirmek amacıyla kalp ağırlığı, kalp ağırlığı/tibia uzunluğu ve miyosit büyüklükleri incelenmiş ve 40 mg/kg/gün L-NAME dozunun tetiklediği hipertansiyonun, kardiyak hipertrofiye sebep olduğu belirlenmiştir.

Öte yandan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar Mg^{2+} eksikliğinin kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyon gelişiminde önemli bir risk faktörü olabileceğini işaret etmektedir (15-17). Birçok epidemiyolojik çalışma, Mg^{2+} tüketimi ile kan basıncı arasında ters bir ilişki bulunduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra deneysel ve klinik çalışmalar da Mg^{2+} eksikliğinin hipertansiyon patogeneğinde önemli rol oynadığı tezini desteklemektedir (18-20). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda MgO tedavisinin, NOS blokajıyla oluşturulan hipertansiyon modelinde kalpte meydana gelen değişiklikler üzerine etkisi

olabileceği düşünülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde 25 mg/kg'dan 10 g/kg MgO dozuna kadar geniş bir spektrumda doz uygulamasının mevcut olduğu görülmüştür (73, 230-234). Çalışmamızda, Mg²⁺ iyonunun diğer iyonlarla olan ilişkisi de göz önünde bulundurularak 1 g/kg MgO dozunun uygun olduğuna karar verilmiştir. Altı haftalık MgO uygulaması normal sıçanlarda kan basıncı üzerine herhangi bir etki oluşturmazken, HT-Mg grubunda sistolik kan basıncının yükselmesini engelleyerek, kontrol seviyelerine çekmiştir. Ayrıca kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/tibia uzunluğu sonuçları incelendiğinde hipertrofiyi kısmen engellemiş olduğu görülmektedir. Bu elde ettiğimiz sonuçlar daha önce yapılan farklı hipertansiyon modellerinde elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir (73, 232).

Magnezyum, kontraktıl proteinlerin regülasyonu, Ca²⁺, Na⁺ ve K⁺ un hücre zarından taşınması, ATPaz aktivitesi için temel kofaktör olması, enerji-bağımlı sitoplazmik ve mitokondriyal yolların regülasyonu, oksidatif fosforilasyon sürecinin düzenlenmesi, DNA ve protein sentezi gibi önemli fonksiyonların gerçekleşmesinde subselüler seviyelerde etkilidir (68). Ekstrasellüler Mg²⁺ ve/veya [Mg²⁺]_i seviyelerindeki küçük bir değişiklik kardiyak uyarılma, vasküler tonus ve kasılma değişikliklerine neden olmaktadır (125). Bu nedenle Mg²⁺, kan basıncının regülasyonunda fizyolojik bir role sahiptir ve Mg²⁺ seviyesindeki değişimler hipertansiyonda patofizyolojik süreçlere katkıda bulunur. Nitekim çeşitli deneysel hipertansiyon modellerinde doku Mg²⁺ içeriğinin azaldığı da gösterilmiştir (70, 235). Kardiyak miyositlerde ve vasküler düz kastan izole edilen hücrelerde [Mg²⁺]_i'un NOS blokajıyla oluşturulan da dahil olmak üzere farklı hipertansiyon modellerinde normotensif kontrollere göre azaldığı belirlenmiştir (66). Ayrıca kan basıncı ve Mg²⁺ arasındaki ters korelasyon göz önünde bulundurulduğunda intrasellüler ortamdaki serbest Mg²⁺ seviyesinin belirlenmesi büyük bir önem arz etmektedir. Ancak, [Mg²⁺]_i'yi hücre içinde ölçmek oldukça zordur. Son yıllarda [Mg²⁺]_i ölçümünde farklı teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Farklı hücrelerde [Mg²⁺]_i'yi ölçmek için mikroelektrotlar, absorbans, floresan indikatörler, NMR spektroskopisi gibi birçok teknik kullanılmıştır (236-240). NMR ve mikroelektrod yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarda kardiyomiyositlerde sitozolik Mg²⁺ seviyeleri ile ilgili olarak 0,4-3,5 mM arasında değişen değerler bildirilmiş olmasına karşın (240-242), farklı ölçüm yöntemlerinin kullanıldığı diğer bazı çalışmalarda da 0,4-0,8 mM arasında değiştiği bildirilmiştir (243, 244). Çalışmamızda, izole edilen miyositlerde dinlenme durumunda intrasellüler serbest Mg²⁺ seviyeleri floresan indikatör Magfura2-AM kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol grubunda 0,88 mM olarak tespit edilen [Mg²⁺]_i hipertansiyon grubunda 0,55 mM seviyelerine kadar düşmüştür ve Mg²⁺ tedavisinin bu azalmayı önlediği belirlenmiştir.

L-NAME indüklü hipertansiyon modelinin kullanıldığı çalışmamızda, kasılmanın azaldığı görülmüştür. Doggrel ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (245), sol ventrikül hipertrofisi gözlenen spontan hipertansif sıçanlarda da bizim bulgularımızla paralel olarak kasılmanın azaldığı sonucuna varılmıştır. Mertens ve arkadaşları ile Li ve arkadaşlarının da SHR'ler ile yapmış oldukları çalışmalarda kasılmada azalma olduğu teyit edilmiştir (246, 247). Kasılmanın relaksasyon parametrelerinde ve Ca²⁺ transient kinetiklerinde anlamlı uzamanın elde edildiği bulgularımız önceki bulguları teyit etmektedir (247, 248). Ancak, SHR'lerde yapılan

bazı çalışmalarda kontraktıl fonksiyonların arttığı yönünde bilgiler de mevcuttur (249, 250). Ayrıca Bartunek ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 50 mg/kg/gün dozunda L-NAME'nin 6 hafta boyunca uygulandığı hipertansiyon modelinde de miyosit kontraksiyonunun arttığı gösterilmiştir (251).

Hipertansiyonda hemodinamik anormallikler, vasküler tonus ve fonksiyon değişikliklerinden dolayı periferel rezistansın artmasıdır. Bu değişiklikler arteryel duvarın kalınlaşması, vasküler tonusun değişmesi ve endotelial fonksiyonların bozulmasını içerir ve bu olaylar Mg^{2+} u içeren multifonksiyonel durumlardan etkilenir. Mg^{2+} seviyesindeki düzensizlik bu süreçlerde önemli rol oynayabilir. Çünkü kontraktıl proteinlerin regülasyonunda, iyonların membrandan taşınmasında, enerji bağımlı yolların metabolik regülasyonunun kontrolünde ve oksidatif fosforilasyon süreçlerinin düzenlenmesinde çok önemli bir role sahiptir. Mg^{2+} seviyesindeki küçük değişiklikler vasküler tonus ve kardiyak uyarılma üzerinde büyük etkilere sahiptir (66). Çalışmamızda hipertansiyon grubunda $[Mg^{2+}]_i$ seviyesinin anlamlı derecede düşmüş olması ve hipertansif hayvanlarda meydana gelen kontraktıl anormalliklerin MgO tedavisi ile geri dönmesi, hipertansiyonda ortaya çıkan kardiyak anormalliklerde Mg^{2+} 'un rolü olduğu tezimizi desteklemektedir.

Hipertansiyona bağılı olarak gelişen sol ventrikül hipertrofisi sonucunda iyon kanallarında, uygulanan deneysel modele bağılı olarak farklı sonuçlar ileri sürülmüş olmakla birlikte APD uzaması genel ve karakteristik bir değişikliktir (12). Özellikle SHR modelinde AP süresinin uzadığı birçok çalışmada gösterilmiştir (13, 250, 252, 253). Ayrıca hipertansiyona bağılı olarak kasılmada meydana gelen değişikliklerin APD'deki uzamadan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (13). DOCA-tuzu hipertrofik sıçan kalbinde yapılan çalışmada, AP plato genliği ve süresinin arttığı gözlenmiştir (254). Transgenik hipertansiyon modelinin (adrenal renin-angiotensin-aldosteron sisteminin aşırı eksprese edildiği bir model) kullanıldığı bir başka çalışmada AP süresi yine anlamlı seviyede uzadığı gösterilmiştir (11). Bizim deneylerimizde de L-NAME indüklü hipertansiyonun ventriküler miyositlerde AP'nin repolarizasyon fazını anlamlı düzeyde uzattığı görülmüş, 6 haftalık MgO tedavisi bu değişikliği önemli ölçüde geri çevirmiştir.

Hipertansif kalplerden izole edilen miyositlerde AP süresindeki uzamalara neden olan mekanizmalara ilişkin çeşitli varsayımlar bulunmaktadır. Birçok çalışmada hipertansif kardiyomiyositlerde özellikle K^+ akımlarının azalmasının AP'deki uzamaya neden olan faktörlerin başında geldiği önerilmektedir (11, 13, 254). Brooksby ve arkadaşlarının (13) yaptıkları çalışmada, I_{to} ve gecikmiş doğrultucu potasyum kanalı akımlarında (I_K) değişiklik olmadığı, fakat içeri doğrultucu potasyum kanalı akımlarının (I_{K1}) genliğinin azaldığı gözlenmiştir. Bu nedenle, APD'nin uzamasının altında yatan sebebin I_{K1} 'larındaki azalma olabileceği ileri sürülmüştür. DOCA-tuzu hipertrofik sıçan kalbinde ve TGR27 transgenik modelin kullanıldığı bir başka çalışmada I_{to} akımlarının önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (11, 254). Ayrıca Michailova ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, $[Mg^{2+}]_i$ artışının APD'nin kısalmasına neden olduğu gösterilmiştir (255). Çalışmamızın sonuçları, literatür bulgularıyla uyumlu bir şekilde hipertansiyonun I_{to} ve I_{sus} akımlarını azalttığını göstermiştir. Altı haftalık MgO tedavisi I_{to} akımlarını kontrol seviyelerine çekmiştir

ve I_{sus} akımlarında da düzelleme sağlamıştır, ancak anlamlı düzeylere gelmemiştir. Ayrıca sonuçlarımız incelendiğinde MgO uygulanan grupta da I_{to} akımlarının hipertansiyonla paralel olarak azaldığı görülmüştür. Magnezyum, AP boyunca hücre içi K^+ 'un aktif transportundan sorumlu Na^+/K^+ ATPaz pompası için gereklidir. Mg^{2+} eksikliği, miyosit Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azalmasına yol açar ve bu durum intrasellüler K^+ azalması ile sonuçlanabilir (256, 257).

Kardiyak AP süresinin uzamasına neden olabilecek bir diğer iyon akımı da I_{Ca} akımıdır. L-tipi Ca^{2+} akımları ile ilgili olarak literatürde çelişkili sonuçlara ulaşılmıştır. Li ve Jiang'ın (12) yaptıkları çalışmada $I_{Ca,L}$ genliğinin SHR'de arttığı fakat membran kapasitansına oranlandığında akım yoğunluğunun değişmediği, inaktivasyon zaman sabitinin ise uzadığı gösterilmiştir. Yine yapılan bir başka çalışmada $I_{Ca,L}$ akım genliklerinin yanı sıra kalsiyum akımlarının aktivasyon, inaktivasyon ve reaktivasyon kinetiklerinin de değişmediği gösterilmiştir (11). Buna karşılık Keung ve arkadaşlarının (14) yaptıkları çalışmada ise $I_{Ca,L}$ genliklerinin Goldblatt renovasküler hipertansif sıçanlarda kontrole göre 2,5 kat arttığı görülmüştür. Deneylerimiz sonucunda 6 haftalık hipertansiyon sürecinin $I_{Ca,L}$ akımını etkilemediği gözlenmiştir. Böylece, AP'nin repolarizasyon fazının süresindeki uzamanın bu akımdaki bir değişikliğin sonucu olmadığı görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda $I_{Ca,L}$ ile eş zamanlı olarak ve bu akımlara karşılık gelen Ca^{2+} transienleri kaydedilmiştir ve anlamlı fark olmadığı görülmüştür. 4-6 haftalık ve 8-12 haftalık SHR'lerin kullanıldığı bir çalışmada, 4-6 haftalık SHR'lerde $I_{Ca,L}$ 'ye karşılık gelen Ca^{2+} transienlerinde fark görülmezken, 8-12 haftalık grupta transienlerin anlamlı düzeyde yükseldiği görülmüştür (250). Shorofsky ve arkadaşlarının (258) 6 aylık SHR'lerde yaptıkları çalışmada yine Ca^{2+} transienlerinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür.

L-tipi Ca^{2+} kanalı akımları üzerine Mg^{2+} 'nin regülatör etkileri, kanal kinetiklerinin modülasyonu ya da iyon permeabilite hızının değişimi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu nedenle fizyolojik konsantrasyonlarda kanal kinetiklerindeki değişim aracılığıyla $I_{Ca,L}$ 'nin modülasyonunda sitozolik Mg^{2+} 'nin predominant olduğu düşünülmektedir (259). Kurbağa ventriküler miyositlerinde, $[Mg^{2+}]_i$ seviyelerindeki azalmanın $I_{Ca,L}$ genliğini arttırdığı, buna karşılık sıçan ventriküler miyositlerinde 1,8 mM $[Mg^{2+}]_i$ konsantrasyonunun Ca^{2+} akımlarını azalttığı görülmüştür (21, 260). Wei ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise 1,2 mM ve 0,1 mM hücre içi serbest Mg^{2+} seviyelerinin Ca^{2+} akım pikleri üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Bu bilgiler doğrultusunda sitozolik Mg^{2+} seviyelerinin fizyolojik sınırların (0,1-1,2 mM) altında ya da üstünde olması durumunda Ca^{2+} akımları üzerinde değişikliğe sebep olabileceği sonucuna varılabilir. L-NAME indüklü hipertansiyon modeline dayalı çalışmamızda sitozolik serbest Mg^{2+} seviyelerinin kontrole göre anlamlı derecede azaldığı, ancak bu azalmanın Ca^{2+} akımlarını etkileyebilecek düzeye gelmediği düşünülmektedir.

Çalışmamızda uyarılma-kasılma çiftlenimindeki bozuklarla ilişkili olarak miyositlerde SR Ca^{2+} miktarı belirlenmiş ve hipertansif sıçanların ventrikül miyositlerinin SR Ca^{2+} içeriğinde herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar Ca^{2+} transienlerinin değişmediğini gösteren bulgularımızı desteklemektedir. Daha önce 4-6 haftalık ve 8-12 haftalık SHR'ler de yapılan

çalışmalarda (250) ve sol ventrikül hipertrofisi oluşturulan tavşanlarda SR Ca^{2+} içeriği değişmediği gibi (261), yaş ve hipertrofinin de SR Ca^{2+} içeriğini değiştirmedeği ve bunun kalbi koruyucu hipertrofinin bir sonucu olduğu belirtilmiştir. SR Ca^{2+} içeriğinin belirlenmesinde iki temel bileşen; SERCA ve RyR'dir. SHR'lerde yapılan bir çalışmada RyR protein ekspresyonunda fark olmadığı gösterilirken (250) bir başka çalışmada RyR nin Ca^{2+} duyarlılığında fark olmadığı ancak RyR protein yoğunluğunda %30 oranında azalma olduğu görülmüş ve hipertrofiye görülen değişiklikleri SR'dan salınan Ca^{2+} 'daki yavaşlamanın tetikleyebileceği öne sürülmüştür (261). Diğer yandan miyokard hipertrofinin erken evrelerinde SERCA protein seviyelerinde fark görülmezken ilerleyen aşamalarda SERCA protein seviyesinde azalma ve bunun sonucu olarak SR Ca^{2+} geri alımının da azaldığı belirtilmiştir (262, 263). Bir başka çalışmada SHR'lerde, SR Ca^{2+} salınımında ve SERCA ekspresyonunda azalma olduğu ve bu durumun kasılmadaki azalmanın ve relaksasyon zamanının uzamasının sebebi olabileceği sonucuna varılmıştır (247). Dolayısıyla, bizim çalışmamızda görülen Ca^{2+} geri-alım hızındaki azalmanın kasılmada relaksasyonun yavaşlamasından sorumlu olduğu ve bunun SERCA ekspresyonundaki veya aktivitesindeki azalmayla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

SERCA ve RyR'nin açılma özelliklerinin serbest Mg^{2+} 'un sitozolik konsantrasyonlarına bağlı olduğu gösterilmiştir (264). RyR için modülatör olarak tanımlanan bazı moleküller vardır ve bunlardan en dikkat çeken ATP ve Mg^{2+} dur. RyR üzerinde Mg^{2+} bağlayıcı iki bölge mevcuttur ve bu bölgelere Ca^{2+} ya da Mg^{2+} bağlanır. RyR'ye Ca^{2+} 'un bağlandığı ve aktive edici bölgenin (A-bölgesi) Mg^{2+} 'a olan affinitesi 40 kat daha düşüktür. Bu bölgeye Mg^{2+} bağlandığı zaman kanalın Ca^{2+} aracılığıyla aktivasyonu engellenir. RyR'nin inhibitör bölgesinin (I-bölgesi) Ca^{2+} 'a affinitesi çok düşük ve Mg^{2+} 'a olan affinitesi ile benzerdir. Mg^{2+} 'un yüksek konsantrasyonlarda RyR'nin inhibitör bölgesine bağlanarak onu inhibe edebileceği ileri sürülmektedir. Ayrıca, Mg^{2+} düşük konsantrasyonlarda Ca^{2+} 'un intrasellüler ortamdan geri alınmasını sağlayan SERCA2 ve PMCA için kofaktör rolü oynar. Kardiyomiyositlerde Ca^{2+} regülasyonunda görev alan bir başka önemli yapı da Na^+ - Ca^{2+} deşitokuşçusudur ve sitozolik serbest Mg^{2+} 'un $INCX$ 'i regüle ettiği düşünülmektedir. Hem düşük hem de yüksek diyastolik Ca^{2+} konsantrasyonlarında düşük $[Mg^{2+}]_i$ 'nin, $INCX$ 'i artırdığı gösterilmiştir. Sitozolik Mg^{2+} , deşitokuşçuya bağlanmak için Ca^{2+} ile yarışmaz fakat geri ve ileri modlarında regülasyon bölgelerinde rol oynar. Sitozolik Mg^{2+} 'un 1.2'den 0.12 mM'a düşürülmesi hem içeri doğru, hem de dışarı NCX akımları üzerinde anlamlı bir artış ile sonuçlanmıştır (265). Bunun yanında SHR'lerin kullanıldığı bir çalışmada $INCX$ akımlarının değişmediği de gösterilmiştir (250). Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda 6 haftalık deney periyodu sonunda hipertansiyonla birlikte gelişen Mg^{2+} konsantrasyonundaki azalmanın, Ca^{2+} regülasyonunda görev alan L-tipi Ca^{2+} kanalları, RyR, SERCA ve Na^+ - Ca^{2+} deşitokuşçusu üzerinde olumsuz bir etki oluşturmadığı görülmüştür.

Reaktif oksijen türler, ateroskleroz, diyabet, kardiyak hipertrofi, kalp yetmezliği, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi kardiyovasküler hastalıkların yanında hipertansiyon gelişiminde de önemli rol oynar. Bu durum, damar sistemi ve böbreklerde antioksidan kapasitenin azalması, NO'nun biyo-yararlılığının azalması

ve oksidanların aşırı üretiminden kaynaklanır. Kardiyovasküler hücrelerde ROS üretiminde özellikle $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 önemlidir. Bu iki radikal farklı yolları aktive eder. Artmış $O_2^{\cdot-}$ seviyesi, NO'yu inaktive eder ve endotelial disfonksiyon ve vazokonstriksiyona yol açar (26). Hipertansiyon ve vasküler hastalıklardaki ROS'un başlıca enzimatik kaynakları ksantin oksidaz, NOS ve NAD(P)H oksidazdır (27, 28). SHR'lerde ksantin oksidaz ve ROS üretiminin arttığı ve bunun arteryel tonus artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (26). Ayrıca, yapılan çalışmalarda Mg^{2+} eksikliğinin de kardiyovasküler hastalıklarda oksidatif stres hasarını ve fonksiyon kayıplarını arttırdığı tespit edilmiştir (29, 266). Mg^{2+} , antioksidan enzim aktivitesini artırmanın yanında Ca^{2+} aşırı yüklenmesini azaltarak oksijen radikallerinin üretimini baskılar (30). Kalpte Mg^{2+} eksikliği ile SOD ve KAT aktivitelerinin azaldığı ve H_2O_2 indüklü lipid peroksidasyonun arttığı gösterilmiştir (32). Çalışmamızda miyositlerden salınan $O_2^{\cdot-}$ miktarı ve intraselüler H_2O_2 konsantrasyonu belirlenmiş ve hipertansiyonda anlamlı düzeyde arttığı görülen bu parametrelerin MgO tedavisi ile normal seviyelere düştüğü görülmüştür. Magnezyumun bu düzeltici etkisini antioksidan aktivitesi yoluyla gösterdiği düşünülmektedir.

Oksidatif stresin kalp yetmezliğine yol açabildiği ve bunu Ca^{2+} homeostazında bir değişiklik olmaksızın sarkomerik proteinlerin ROS-bağımlı modifikasyonu ile gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir (267-272). ROS, miyofilamentlerin Ca^{2+} bağlanma bölgeleri üzerinde etki göstererek çapraz köprü oluşumunu engeller ve Ca^{2+} aracılı kuvvet üretimini azaltır. Bazı çalışmalarda miyozin ağır zincir (MHC), sarkomerin redoks sensörü olarak tanımlanmaktadır. Çünkü Cys⁶⁹⁷ ve Cys⁷⁰⁷'nin redoks modifikasyonları, miyozin ATPaz aktivitesini azaltır ve miyofilament disfonksiyonlarına yol açar (268, 273, 274). Redoks modifikasyonuna uğrayabilen diğer protein ince filamenttir (aktin ve tropomiyozin) Bu proteinlerin redoks modifikasyonu sonucunda aktin-miyozin çapraz köprü oluşumunda ve ince filamentlerin Ca^{2+} tarafından aktivasyonunda bozukluklar meydana gelir (275). Aktin Cys³⁷⁴ bölgesinin oksidasyonu filament kayma hızını ve maksimum aktomiyozin ATPaz aktivitesini değiştirir (276). Tropomiyozinin Cys¹⁹⁰ bölgesinin oksidasyonu sonucunda bükülebilirlik özelliği ve tropomiyozin-ince filament bağlantısı bozulur (277). Dolayısıyla ROS üretiminin artması ve sarkomerik proteinlerin oksidasyonu miyofilament Ca^{2+} duyarlılığında azalma ile sonuçlanır. Çalışmamızda, hipertansiyonda $[Mg^{2+}]_i$ seviyelerinde azalma olmasına karşın uyarılma kasılma çiftleniminde görev alan I_{Ca} akımlarında, intraselüler ortamdaki Ca^{2+} düzeylerini kontrol eden NCX, SERCA ve RyR gibi Ca^{2+} salınım ve geri alım mekanizmalarında değişiklik gözlenmemiştir. Ancak kasılma yanıtı azalmış ve relaksasyon zamanları uzamıştır. Kasılmada elde edilen bu değişiklikler, ROS üretimindeki artış dolayısıyla miyofilament Ca^{2+} sensitivitesindeki azalmadan kaynaklanmaktadır. Ayrıca, MgO verilen kontrol grubunda kasılma genliğinde değişiklik olmamasına rağmen relaksasyon zamanlarının hipertansiyonla benzer özellik göstermesi, patolojik bir durum yok iken Mg^{2+} diyeti uygulanmasının ekstrasellüler Mg^{2+} seviyelerindeki değişiklik aracılığıyla kanal kinetiklerini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, hipertansiyon modeli olarak SHR, DOCA-tuzu hipertansiyon modeli gibi L-NAME indüklü hipertansiyon modeli de yaygın olarak kullanılmaktadır. L-arjinin analogları (L-NMA, L-NNA, L-NAME, L-

CPA, L-NIO) ve diğ er NOS inhibitörleri, NOS enzimini de ğ iş ik oranlarda inhibe etmektedir (278, 279). L-NAME indüklü hipertansiyon modeli ile yapılan ç alı ş malarda NOS enzim aktivitesinin yakla ş ik %60 civarında bloke oldu ğ u gösterilirken (222, 225, 226), yapılan bazı ç alı ş malarda da NOS enzimlerinin protein ekspresyonlarında farklılık gözlenmemi ş tir (229, 280). Ayrıca, Vrankova ve arkadaşlarının yaptıkları ç alı ş mada, 7 hafta boyunca 40 mg/kg/gün dozunda L-NAME uyguladıkları sı ç anlarda hipertansiyon ve hipertansiyona sekonder olarak kardiyak hipertrofi gözlenmesine kar ş ın, NOS aktivitesinde farklılık bulunamamı ş tir (281). Yang ve arkadaşlarının yaptıkları diğ er bir ç alı ş mada, 50 mg/kg/gün dozunda L-NAME uygulanan sı ç anların kalp dokusunda nitrit/nitrat seviyelerinin de ğ iş medi ğ i gözlenmi ş ve NOS inhibitörlerinin uzun süreli uygulanmasının etkilerinin NO seviyelerindeki azalma ile de ğ il, oksidatif stres ve ACE artı ş ı üzerindeki etkisinden kaynaklandı ğ ı ileri sürülmü ş tür (282). Oksijen aracılı ğ ıyla kolaylıkla nitrit ve nitrate yükseltgenen yarı ömrü çok kısa olan bir molekül olması ve biyolojik dokularda doğrudan ölçülmesinin zor olması nedeniyle ç alı ş mamızda da NO indeksi olarak nitrit/nitrat kullanılmı ş tir. Kontrolle kıyaslandı ğ ında hipertansiyonda nitrit/nitrat seviyelerinde fark gözlenmemi ş tir. Elde etti ğ imiz bu sonuç uzun süreli NOS inhibisyonu sonucu ortaya ç ı kan de ğ iş ikliklerin, Mg²⁺ eksikli ğ inin tetikledi ğ i ROS artı ş ıyla ili ş kili oldu ğ unu teyid etmektedir.

Daha önce yapılan birç ok ç alı ş mada, Mg²⁺ eksikli ğ inin ROS artı ş ının yanında antioksidan kapasiteyi baskıladı ğ ı da gösterilmi ş tir. Mg²⁺ eksikli ğ inde antioksidan sistemin enzimatik yola ğ ı (SOD, KAT) üzerinde olu ş turdu ğ u baskılayıcı etkilerin Mg²⁺ tedavisi ile geri döndürüldü ğ ü yapılan tüm ç alı ş malarda ortak görü ş olmasına kar ş ın GSH seviyeleri üzerine olan etkileri ile ilgili farklı sonuçlar elde edilmi ş tir (8, 283, 284). Ç alı ş mamızda hipertansiyonun tetikledi ğ i Mg²⁺ eksikli ğ inin antioksidan kapasite üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla GSH seviyelerinin belirlenmesinin tercih edilmesinde glutayonun kan basıncının regülasyonunda da görev alıyor olması ve GSH infüzyonunun kan basıncını düşürmesi etkili olmu ş tur (285). Yapılan deneylerin sonucunda hipertansiyonda GSH/GSSG oranının anlamlı seviyede dü ş tü ğ ü ve MgO tedavisinin azalan GSH/GSSG oranları üzerinde etkili olmadığı görülmü ş tür. Magnezyumun SOD, KAT gibi antioksidan savunma sisteminin enzimatik yollarının aktivasyonunu artırdı ğ ı ve GSH üzerinde etkili olmadığı göz önüne alındı ğ ında, Mg²⁺'un antioksidan etkilerini daha çok enzimatik yollar üzerinden gösterdi ğ i sonucuna varılabilir.

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir (286). Mg²⁺ eksikli ğ i olu ş turulan hayvanlarda beyin, böbrek ve karaciğ er dokularında protein karbonil seviyelerinin yükseldi ğ i görülmü ş tür (287, 288). Ç alı ş mamızda protein hasarının tespitinde yaygın olarak kullanılan protein karbonil miktarı da ölçülmü ş tür. Mevcut veriler ış ığında MgO tedavisi protein oksidasyonunu belirgin şekilde azaltmı ş tir. Ren, SHR'lerde yapmı ş oldu ğ u ç alı ş mada hipertansiyonda protein oksidasyon seviyelerinin oldukça yüksek oldu ğ unu ve kardiyomiyosit kasılma oranındaki azalmanın ve relaksasyon zamanındaki uzamanın moleküler mekanizmasının protein oksidasyonuna ve apoptosise dayandı ğ ını açıklamı ş tir (289). Bu bilgilerin ış ığında ve elde etti ğ imiz bulgular doğ rultusunda kardiyak kontraktilete fonksiyon

bozukluklarında protein oksidasyonunun çok önemli bir role sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Literatürde çeşitli hipertansiyon modellerinde $[Mg^{2+}]_i$ seviyelerinin azaldığı ve bu azalmanın kalpte hipertansiyona bağlı gelişen hipertrofide meydana gelen elektrofizyolojik bozukluklarda rolü olabileceği ileri sürülmesine karşın kronik Mg^{2+} tedavisinin sonuçları üzerine çalışma bulunmamaktadır. Sonuç olarak çalışmamızda, L-NAME kullanılarak oluşturulan hipertansiyon modelinde kardiyak miyositlerde meydana gelen elektrofizyolojik değişiklikler belirlenmiş, ROS'un ve $[Mg^{2+}]_i$ seviyelerinin bu değişikliklerle olan ilişkileri ortaya konulmuştur. Ayrıca, uzun süreli MgO tedavisinin hipertansiyonun kalpte oluşturduğu elektriksel, mekanik ve biyokimyasal değişikliklere etkisi incelenmiş ve Mg^{2+} un hipertansiyonda terapötik potansiyele sahip olabileceği gösterilmiştir.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, NOS blokörü olan L-NAME ile indüklenen hipertansiyonun kalpte meydana getirdiği elektrofizyolojik anormallikler ile yine hipertansiyona paralel olarak gelişen $[Mg^{2+}]_i$ seviyelerinin azalması arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu amaçla hipertansif hayvanlara 6 hafta boyunca MgO tedavisi uygulanması sonucunda elde ettiğimiz bulgular şu şekilde özetlenebilir:

- 1- Altı haftalık L-NAME uygulaması hipertansiyona ve ona bağlı kardiyak hipertrofiye sebep olmuştur. Ayrıca $[Mg^{2+}]_i$ seviyelerinde azalmaya sebep olmuştur.
- 2- Hipertansiyonun neden olduğu kasılma genliğindeki azalma ve relaksasyon zamanlarındaki uzama MgO tedavisi ile geri döndürülmüştür. Bunun yanında kasılma ile eş zamanlı elde edilen Ca^{2+} transientlerinin zaman sabitindeki uzama MgO tedavisi ile düzelmiştir.
- 3- Hipertansiyonla ilişkili olarak AP süresinin uzaması, potasyum akımlarının baskılanması ve MgO tedavisi ile geri döndürülmesi hipertansiyonda uyarılma-kasılma çiftleniminde meydana gelen elektrofizyolojik değişikliklerde Mg^{2+} eksikliğinin önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.
- 4- Hipertansiyona paralel gelişen ve kontrole göre anlamlı azalma gösteren $[Mg^{2+}]_i$ seviyelerinin, çalışmamızda elde ettiğimiz düzeydeki azalmalarının Ca^{2+} homeostazında görev alan kanal ve protein yapılar üzerinde etkili olmadığı ve $[Ca^{2+}]_i$ seviyelerinin çok sıkı kontrol edildiğini göstermektedir.
- 5- Bulgular hipertansiyonda arttığı bilinen ROS'un miyofilament Ca^{2+} duyarlılığında azalmaya sebep olabileceğini düşündürmektedir. Hipertansiyonda oksidatif stresin artması ve antioksidan sistemin baskılanmasında Mg^{2+} eksikliği önemli bir rol oynamaktadır.
- 6- Çalışmamızda azalan GSH/GSSG oranı üzerine antioksidan özelliği olduğu bilinen Mg^{2+} 'un etkili olmaması ve buna karşılık protein oksidasyonunu önemli ölçüde düzeltmesi, Mg^{2+} 'un antioksidan özelliklerini enzimatik yolların aktivasyonunu kolaylaştırarak yaptığının bir göstergesidir. Ayrıca, hipertansiyonda protein oksidasyonundaki ciddi artış, kardiyak kontraktilite bozukluklarında protein oksidasyonunun çok önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. 1997. The Sixth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC VI).NIH Publication No. 98-4080.
2. 1993. Summary of 1993 World Health Organisation-International Society ofHypertension Guidelines for The Management of Mild Hypertension Subcommittee of WHO/ISH Mild Hypertension Liaison Committee. *BMJ* 307:1541-1546.
3. Hunt, S.C., Cook, N.R., Oberman, A., Cutler, J.A., Hennekens, C.H., Allender, P.S., Walker, W.G., Whelton, P.K., and Williams, R.R. 1998. Angiotensinogen genotype, sodium reduction, weight loss, and prevention of hypertension: trials of hypertension prevention, phase II. *Hypertension* 32:393-401.
4. Goonasekera, C.D., Shah, V., Rees, D.D., and Dillon, M.J. 1997. Nitric oxide activity in childhood hypertension. *Arch Dis Child* 77:11-16.
5. Izzard, A.S., and Heagerty, A.M. Hypertension and the vasculature: arterioles and the myogenic response: *J Hypertens*. 1995 Jan;13(1):1-4.
6. Kaplan NM, L.E.S. 1998. *Clinical Hypertension Williams and Wilkins Inc.* 34-98, 37 baskı.
7. Kumar, K.V., and Das, U.N. 1993. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun* 19:59-66.
8. Kumar, B.P., Shivakumar, K., and Kartha, C.C. 1997. Magnesium deficiency-related changes in lipid peroxidation and collagen metabolism in vivo in rat heart. *Int J Biochem Cell Biol* 29:129-134.
9. Marin, J., and Rodriguez-Martinez, M.A. 1997. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther* 75:111-134.
10. Hayakawa, H., and Raij, L. 1998. Nitric oxide synthase activity and renal injury in genetic hypertension. *Hypertension* 31:266-270.
11. Chouabe, C., Ricci, E., Kurdi, M., Legrand, C., Bricca, G., and Bonvallet, R. 2009. Evaluation of remodeling in left and right ventricular myocytes from heterozygous (mRen2)²⁷ transgenic rats. *Gen Physiol Biophys* 28:24-38.
12. Li, X., and Jiang, W. 2000. Electrical remodeling of membrane ionic channels of hypertrophied ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Chin Med J* 113:584-587.
13. Brooksby, P., Levi, A.J., and Jones, J.V. 1993. The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 11:611-622.
14. Keung, E.C. 1989. Calcium current is increased in isolated adult myocytes from hypertrophied rat myocardium. *Circ Res* 64:753-763.
15. Sharikabad, M.N., Ostbye, K.M., Lyberg, T., and Brors, O. 2001. Effect of extracellular Mg(2+) on ROS and Ca(2+) accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H344-353.
16. Altura, B.M., and Altura, B.T. 1985. New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardiovascular system. I. Clinical aspects. *Magnesium* 4:226-244.
17. Liao, F., Folsom, A.R., and Brancati, F.L. 1998. Is low magnesium concentration a risk factor for coronary heart disease? The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J* 136:480-490.

18. Touyz, R.M. 2008. Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels, magnesium transport, and vascular biology: implications in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:11.
19. Sontia, B., and Touyz, R.M. 2007. Role of magnesium in hypertension. *Arch Biochem Biophys* 458:33-39.
20. Altura, B.M., and Altura, B.T. 1995. Magnesium and cardiovascular biology: an important link between cardiovascular risk factors and atherogenesis. *Cell Mol Biol Res* 41:347-359.
21. Wang, M., and Berlin, J.R. 2007. Voltage-dependent modulation of L-type calcium currents by intracellular magnesium in rat ventricular myocytes. *Arch Biochem Biophys* 458:65-72.
22. Griffiths, E.J. 2000. Calcium handling and cell contraction in rat cardiomyocytes depleted of intracellular magnesium. *Cardiovasc Res* 47:116-123.
23. Chakraborti, S., Chakraborti, T., Mandal, M., Mandal, A., Das, S., and Ghosh, S. 2002. Protective role of magnesium in cardiovascular diseases: a review. *Mol Cell Biochem* 238:163-179.
24. Abbott, L.G., and Rude, R.K. 1993. Clinical manifestations of magnesium deficiency. *Miner Electrolyte Metab* 19:314-322.
25. Parikka, H., Toivonen, L., Naukkarinen, V., Tierala, I., Pohjola-Sintonen, S., Heikkila, J., and Nieminen, M.S. 1999. Decreases by magnesium of QT dispersion and ventricular arrhythmias in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 20:111-120.
26. Paravicini, T.M., and Touyz, R.M. 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31:dc08-s247.
27. Lacy, F., Gough, D.A., and Schmid-Schonbein, G.W. 1998. Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med* 25:720-727.
28. DeLano, F.A., Parks, D.A., Ruedi, J.M., Babior, B.M., and Schmid-Schonbein, G.W. 2006. Microvascular display of xanthine oxidase and NADPH oxidase in the spontaneously hypertensive rat. *Microcirculation* 13:551-566.
29. Kharb, S., and Singh, V. 2000. Magnesium deficiency potentiates free radical production associated with myocardial infarction. *J Assoc Physicians India* 48:484-485.
30. Kramer, J.H., Misik, V., and Weglicki, W.B. 1994. Magnesium-deficiency potentiates free radical production associated with postischemic injury to rat hearts: vitamin E affords protection. *Free Radic Biol Med* 16:713-723.
31. Prohaska, J.R. 1991. Changes in Cu,Zn-superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats. *J Nutr* 121:355-363.
32. Manju, L., and Nair, R.R. 2006. Magnesium deficiency augments myocardial response to reactive oxygen species. *Can J Physiol Pharmacol* 84:617-624.
33. Xie, L.H., Chen, F., Karagueuzian, H.S., and Weiss, J.N. 2009. Oxidative-stress-induced afterdepolarizations and calmodulin kinase II signaling. *Circ Res* 104:79-86.
34. Morton, J.J., Beattie, E.C., Speirs, A., and Gulliver, F. 1993. Persistent hypertension following inhibition of nitric oxide formation in the young Wistar rat: role of renin and vascular hypertrophy. *J Hypertens* 11:1083-1088.
35. De Artinano, A.A., and Gonzalez, V.L. 1999. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharmacol Res* 40:113-124.
36. Gibbons, G.H. 1997. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. *Am J Cardiol* 79:3-8.
37. Pollock, D.M. 1999. Chronic studies on the interaction between nitric oxide and endothelin in cardiovascular and renal function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:258-261.

38. Zatz, R., and Baylis, C. 1998. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 32:958-964.
39. Gardiner, S.M., Kemp, P.A., Bennett, T., Palmer, R.M., and Moncada, S. 1992. Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. *Eur J Pharmacol* 213:449-451.
40. Eugene Braunwald, D.P.Z., Peter Libby, Norman M. Kaplan. 2001. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine 6th Edition*:P.941-972.
41. SC., T. 1998. Pathogenesis of hypertension. In *Primer on Kidney Diseases*. Greenberg A(ed): National Kidney Foundation, Academic Pres:491-495.
42. NM., K. 1998. Primary hypertension: Pathogenesis, in *Clinical Hypertension*. Williams & Wilkins, 7th edition:pp. 41-99.
43. Chobanian AV, B.G., Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. 2003. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 289(219):2560-2567.
44. Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K., and He, J. 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365:217-223.
45. Guilbert, J.J. The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life: *Educ Health (Abingdon)*. 2003 Jul;16(2):230.
46. <http://tekharf.org/images/2009/bolum6.pdf>.
47. Altun, B., Arici, M., Nergizoglu, G., Derici, U., Karatan, O., Turgan, C., Sindel, S., Erbay, B., Hasanoglu, E., and Caglar, S. 2005. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in Turkey (the Patent study) in 2003. *J Hypertens* 23:1817-1823.
48. VM., C. 1995. Clinical aspects and management of essential hypertension . In *Textbook of Nephrology*. Massry SG, Glassock RJ(eds) 3th edition. Williams and Wilkins, Baltimore, :pp1189.
49. Januszewicz, W., and Chodakowska, J. 1996. Pathogenesis of essential hypertension--present views. *Pol J Pharmacol* 48:61-65.
50. Okamoto, K., and Aoki, K. 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27:282-293.
51. Lerman, L.O., Chade, A.R., Sica, V., and Napoli, C. 2005. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* 146:160-173.
52. Dahl, L.K. 1972. Salt and hypertension. *Am J Clin Nutr* 25:231-244.
53. Fujita, K., Matsumura, Y., Kita, S., Miyazaki, Y., Hisaki, K., Takaoka, M., and Morimoto, S. 1995. Role of endothelin-1 and the ETA receptor in the maintenance of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension. *Br J Pharmacol* 114:925-930.
54. Sun, Z.J., and Zhang, Z.E. 2005. Historic perspectives and recent advances in major animal models of hypertension. *Acta Pharmacol Sin* 26:295-301.
55. Volpe, M., Sosa, R.E., Muller, F.B., Camargo, M.J., Glorioso, N., Laragh, J.H., Maack, T., and Atlas, S.A. 1986. Differing hemodynamic responses to atrial natriuretic factor in two models of hypertension. *Am J Physiol* 250:H871-878.
56. Yu, H., Rakugi, H., Higaki, J., Morishita, R., Mikami, H., and Ogihara, T. 1993. The role of activated vascular angiotensin II generation in vascular hypertrophy in one-kidney, one clip hypertensive rats. *J Hypertens* 11:1347-1355.
57. Kone, B.C., and Baylis, C. 1997. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 272:F561-578.
58. Loscalzo, J., and Welch, G. 1995. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 38:87-104.

59. Sander, M., Hansen, J., and Victor, R.G. 1997. The sympathetic nervous system is involved in the maintenance but not initiation of the hypertension induced by N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertension* 30:64-70.
60. Hropot, M., Grottsch, H., Klaus, E., Langer, K.H., Linz, W., Wiemer, G., and Scholkens, B.A. 1994. Ramipril prevents the detrimental sequels of chronic NO synthase inhibition in rats: hypertension, cardiac hypertrophy and renal insufficiency. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350:646-652.
61. Ribeiro, M.O., Antunes, E., de Nucci, G., Lovisolio, S.M., and Zatz, R. 1992. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20:298-303.
62. Zhao, H., Shimokawa, H., Uragami-Harasawa, L., Igarashi, H., and Takeshita, A. 1999. Long-term vascular effects of Nomega-nitro-L-arginine methyl ester are not solely mediated by inhibition of endothelial nitric oxide synthesis in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 33:554-566.
63. Yuasa, S., Li, X., Hitomi, H., Hashimoto, M., Fujioka, H., Kiyomoto, H., Uchida, K., Shoji, T., Takahashi, N., Miki, S., et al. 2000. Sodium sensitivity and sympathetic nervous system in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:18-24.
64. Vapaatalo, H., Mervaala, E., and Nurminen, M.L. 2000. Role of endothelium and nitric oxide in experimental hypertension. *Physiol Res* 49:1-10.
65. Navarro, J., Sanchez, A., Saiz, J., Ruilope, L.M., Garcia-Estan, J., Romero, J.C., Moncada, S., and Lahera, V. 1994. Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am J Physiol* 267:R1516-1521.
66. Touyz, R.M. 2003. Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Mol Aspects Med* 24:107-136.
67. Cowna, J.A. 2000. The biological chemistry of magnesium. VCH Publishers, New York.
68. Grubbs, R.D., and Maguire, M.E. 1987. Magnesium as a regulatory cation: criteria and evaluation. *Magnesium* 6:113-127.
69. Laurant, P., and Berthelot, A. 1992. Influence of endothelium in the in vitro vasorelaxant effect of magnesium on aortic basal tension in DOCA-salt hypertensive rat. *Magnes Res* 5:255-260.
70. Mahboob, T., Mumtaz, M., and Haleem, M.A. 1996. Electrolyte content of serum, erythrocyte, kidney and heart tissue in salt induced hypertensive rats. *Life Sci* 59:731-737.
71. Laurant, P., and Berthelot, A. 1994. Influence of endothelium on Mg(2+)-induced relaxation in noradrenaline-contracted aorta from DOCA-salt hypertensive rat. *Eur J Pharmacol* 258:167-172.
72. Berthelot, A., Luthringer, C., Meyers, E., and Exinger, A. 1987. Disturbances of magnesium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *J Am Coll Nutr* 6:329-332.
73. Laurant, P., Kantelip, J.P., and Berthelot, A. 1995. Dietary magnesium supplementation modifies blood pressure and cardiovascular function in mineralocorticoid-salt hypertensive rats but not in normotensive rats. *J Nutr* 125:830-841.
74. Jones, M.R., Martins, J.E., and Clemens, R.A. 1988. Mineral balance and blood pressure in the young spontaneously hypertensive rat. *J Nutr* 118:114-120.
75. Wells, I.C., and Agrawal, D.K. 1992. Abnormal magnesium metabolism in two rat models of genetic hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 70:1225-1229.
76. Jelicks, L.A., and Gupta, R.K. 1991. Intracellular free magnesium and high energy phosphates in the perfused normotensive and spontaneously hypertensive rat heart. A ³¹P NMR study. *Am J Hypertens* 4:131-136.

77. Adachi, M., Nara, Y., Mano, M., Ikeda, K., Horie, R., and Yamori, Y. 1993. Intralymphocytic free calcium and magnesium in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and effects of blood pressure and various antihypertensive agents. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20:587-593.
78. Saito, N., Abbu, G.C., Konishi, Y., Nishiyama, S., and Okada, T. 1995. Magnesium, calcium and trace elements in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 22:S212-214.
79. Kisters, K., Hausberg, M., and Kosch, M. Effect of oral magnesium supplementation on blood pressure, platelet aggregation and calcium handling in deoxycorticosterone acetate-induced hypertension in rats: *J Hypertens.* 2001 Jan;19(1):161-2.
80. Altura, B.M., Altura, B.T., Carella, A., Gebrewold, A., Murakawa, T., and Nishio, A. 1987. Mg²⁺-Ca²⁺ interaction in contractility of vascular smooth muscle: Mg²⁺ versus organic calcium channel blockers on myogenic tone and agonist-induced responsiveness of blood vessels. *Can J Physiol Pharmacol* 65:729-745.
81. Elin, R.J. 1994. Magnesium: the fifth but forgotten electrolyte. *Am J Clin Pathol* 102:616-622.
82. Rodriguez-Soriano, J., and Vallo, A. 1994. Pathophysiology of the renal acidification defect present in the syndrome of familial hypomagnesaemia-hypercalciuria. *Pediatr Nephrol* 8:431-435.
83. 1997. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride. Washington, DC: National Academy Press.
84. Fine, K.D., Santa Ana, C.A., Porter, J.L., and Fordtran, J.S. 1991. Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. *J Clin Invest* 88:396-402.
85. Kerstan D and Quamme G. Calcium in Internal Medicine, e.b.M.S., Morii H, and Nishizawa Y. London: Springer-Verlag. 2002. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption of magnesium. Calcium in Internal Medicine, edited by Massry SG, Morii H, and Nishizawa Y. London: Springer-Verlag: p. 171–183.
86. Konrad, M., Schlingmann, K.P., and Gudermann, T. 2004. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F599-605.
87. de Rouffignac, C., and Quamme, G. 1994. Renal magnesium handling and its hormonal control. *Physiol Rev* 74:305-322.
88. Dai, L.J., Ritchie, G., Kerstan, D., Kang, H.S., Cole, D.E., and Quamme, G.A. 2001. Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiol Rev* 81:51-84.
89. Quamme, G.A., and Dirks, J.H. 1980. Magnesium transport in the nephron. *Am J Physiol* 239:F393-401.
90. Quamme, G.A., and Dirks, J.H. 1980. Intraluminal and contraluminal magnesium on magnesium and calcium transfer in the rat nephron. *Am J Physiol* 238:F187-198.
91. Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J. 2005. Epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ channels in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 16:15-26.
92. Romani, A. 2007. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 458:90-102.
93. Cefaratti, C., and Romani, A.M. 2007. Functional characterization of two distinct Mg(2+) extrusion mechanisms in cardiac sarcolemmal vesicles. *Mol Cell Biochem* 303:63-72.
94. Romani, A.M. 2007. Magnesium homeostasis in mammalian cells. *Front Biosci* 12:308-331.
95. Romani, A.M., and Maguire, M.E. 2002. Hormonal regulation of Mg²⁺ transport and homeostasis in eukaryotic cells. *Biometals* 15:271-283.
96. Fagan, T.E., and Romani, A. 2000. Activation of Na(+)- and Ca(2+)-dependent Mg(2+) extrusion by alpha(1)- and beta-adrenergic agonists in rat liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G943-950.

97. Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. 1993. The effect of angiotensin II on platelet intracellular free magnesium and calcium ionic concentrations in essential hypertension. *J Hypertens* 11:551-558.
98. Okada, K., Ishikawa, S., and Saito, T. 1992. Cellular mechanisms of vasopressin and endothelin to mobilize [Mg²⁺]_i in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 263:C873-878.
99. Kolisek, M., Zsurka, G., Samaj, J., Weghuber, J., Schweyen, R.J., and Schweigel, M. 2003. Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *Embo J* 22:1235-1244.
100. Sahni, J., Nelson, B., and Scharenberg, A.M. 2007. SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg²⁺ transporter. *Biochem J* 401:505-513.
101. Goytain, A., and Quamme, G.A. 2005. Functional characterization of ACDP2 (ancient conserved domain protein), a divalent metal transporter. *Physiol Genomics* 22:382-389.
102. Schlingmann, K.P., and Gudermann, T. 2005. A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport. *J Physiol* 566:301-308.
103. Monteilh-Zoller, M.K., Hermosura, M.C., Nadler, M.J., Scharenberg, A.M., Penner, R., and Fleig, A. 2003. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* 121:49-60.
104. Groenesteghe, W.M., Hoenderop, J.G., van den Heuvel, L., Knoers, N., and Bindels, R.J. 2006. The epithelial Mg²⁺ channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg²⁺ content and estrogens. *J Am Soc Nephrol* 17:1035-1043.
105. Fleig, A., and Penner, R. 2004. The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci* 25:633-639.
106. Beech, D.J. 2005. Emerging functions of 10 types of TRP cationic channel in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:597-603.
107. Schlingmann, K.P., Waldegger, S., Konrad, M., Chubanov, V., and Gudermann, T. 2007. TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* 8:813-821.
108. Weglicki, W.B., Phillips, T.M., Freedman, A.M., Cassidy, M.M., and Dickens, B.F. 1992. Magnesium-deficiency elevates circulating levels of inflammatory cytokines and endothelin. *Mol Cell Biochem* 110:169-173.
109. Schmitz, C., Perraud, A.L., Fleig, A., and Scharenberg, A.M. 2004. Dual-function ion channel/protein kinases: novel components of vertebrate magnesium regulatory mechanisms. *Pediatr Res* 55:734-737.
110. Nadler, M.J., Hermosura, M.C., Inabe, K., Perraud, A.L., Zhu, Q., Stokes, A.J., Kurosaki, T., Kinet, J.P., Penner, R., Scharenberg, A.M., et al. 2001. LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 411:590-595.
111. Demeuse, P., Penner, R., and Fleig, A. 2006. TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain. *J Gen Physiol* 127:421-434.
112. Takezawa, R., Schmitz, C., Demeuse, P., Scharenberg, A.M., Penner, R., and Fleig, A. 2004. Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6009-6014.
113. He, Y., Yao, G., Savoia, C., and Touyz, R.M. 2005. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II. *Circ Res* 96:207-215.
114. Murphy, E., Freudenrich, C.C., and Lieberman, M. 1991. Cellular magnesium and Na/Mg exchange in heart cells. *Annu Rev Physiol* 53:273-287.
115. Zhang, G.H., and Melvin, J.E. 1996. Na⁺-dependent release of Mg²⁺ from an intracellular pool in rat sublingual mucous acini. *J Biol Chem* 271:29067-29072.
116. Di Francesco, A., Desnoyer, R.W., Covacci, V., Wolf, F.I., Romani, A., Cittadini, A., and Bond, M. 1998. Changes in magnesium content and subcellular distribution

- during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Arch Biochem Biophys* 360:149-157.
117. Korner, P.I., Bobik, A., Angus, J.A., Adams, M.A., and Friberg, P. 1989. Resistance control in hypertension. *J Hypertens Suppl* 7.
 118. Folkow, B. 1990. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension* 16:89-101.
 119. Schiffrin, E.L., Deng, L.Y., and Larochelle, P. 1993. Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. *Clin Invest Med* 16:177-186.
 120. Touyz, R.M., Tolloczko, B., and Schiffrin, E.L. 1994. Mesenteric vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats display increased calcium responses to angiotensin II but not to endothelin-1. *J Hypertens* 12:663-673.
 121. Feldman, R.D., and Gros, R. 1998. Impaired vasodilator function in hypertension: the role of alterations in receptor-G protein coupling. *Trends Cardiovasc Med* 8:297-305.
 122. Nakajima, T., Iwasawa, K., Hazama, H., Asano, M., Okuda, Y., and Omata, M. 1997. Extracellular Mg²⁺ inhibits receptor-mediated Ca⁽²⁺⁾-permeable non-selective cation currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 320:81-86.
 123. Yoshimura, M., Oshima, T., Matsuura, H., Ishida, T., Kambe, M., and Kajiyama, G. 1997. Extracellular Mg²⁺ inhibits capacitative Ca²⁺ entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 95:2567-2572.
 124. Touyz, R.M., Marshall, P.R., and Milne, F.J. 1991. Altered cations and muscle membrane ATPase activity in deoxycorticosterone acetate-salt spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 9:737-750.
 125. Ishiguro, S., Matsuyama, T., Sakaguchi, H., and Nishio, A. 1997. Ex vivo study of the increased sensitivity to NO of endothelium-denuded thoracic aortas isolated from dietary magnesium-deficient rats. *Magnes Res* 10:21-31.
 126. Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. 1999. Activation of the Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger modulates angiotensin II-stimulated Na⁽⁺⁾-dependent Mg²⁺ transport in vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. *Hypertension* 34:442-449.
 127. Zheng, T., Li, W., Altura, B.T., and Altura, B.M. 2001. Use of protein kinase C inhibitors results in rapid [Mg⁽²⁺⁾]_i mobilization in primary cultured rat aortic smooth muscle cells: are certain kinase C isoforms natural homeostatic regulators of cytosolic free Mg⁽²⁺⁾. *Eur J Pharmacol* 413:R1-3.
 128. Zhang, B., Zhang, Y., Wang, Z., and Zheng, Y. 2000. The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *J Biol Chem* 275:25299-25307.
 129. Yang, Z.W., Wang, J., Zheng, T., Altura, B.T., and Altura, B.M. 2000. Low [Mg⁽²⁺⁾]_o induces contraction and [Ca⁽²⁺⁾]_i rises in cerebral arteries: roles of Ca⁽²⁺⁾, PKC, and PI3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H2898-2907.
 130. Yang, Z.W., Wang, J., Zheng, T., Altura, B.T., and Altura, B.M. 2000. Low [Mg⁽²⁺⁾]_o induces contraction of cerebral arteries: roles of tyrosine and mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H185-194.
 131. Resnick, L.M., Gupta, R.K., DiFabio, B., Barbagallo, M., Mann, S., Marion, R., and Laragh, J.H. 1994. Intracellular ionic consequences of dietary salt loading in essential hypertension. Relation to blood pressure and effects of calcium channel blockade. *J Clin Invest* 94:1269-1276.
 132. Altura, B.M., Zhang, A., and Altura, B.T. 1993. Magnesium, hypertensive vascular diseases, atherogenesis, subcellular compartmentation of Ca²⁺ and Mg²⁺ and vascular contractility. *Miner Electrolyte Metab* 19:323-336.
 133. Fullerton, D.A., Hahn, A.R., Agrafojo, J., Sheridan, B.C., and McIntyre, R.C., Jr. 1996. Magnesium is essential in mechanisms of pulmonary vasomotor control. *J Surg Res* 63:93-97.

134. Altura, B.M., and Altura, B.T. 1981. Magnesium ions and contraction of vascular smooth muscles: relationship to some vascular diseases. *Fed Proc* 40:2672-2679.
135. Fabiato, A. 1985. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85:247-289.
136. Fabiato, A., and Fabiato, F. 1975. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249:469-495.
137. Bers, D.M. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205.
138. WAHLER, G.M. (1997). Cardiac action potentials. In: *Cell Physiology*, Ed.: N. Sperelakis. New York, Academic Press, :p.: 780-790.
139. Marban, E., and Tsien, R.W. 1982. Enhancement of calcium current during digitalis inotropy in mammalian heart: positive feed-back regulation by intracellular calcium? *J Physiol* 329:589-614.
140. Lee, K.S., Marban, E., and Tsien, R.W. 1985. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 364:395-411.
141. Cannell, M.B., Berlin, J.R., and Lederer, W.J. 1987. Effect of membrane potential changes on the calcium transient in single rat cardiac muscle cells. *Science* 238:1419-1423.
142. Beuckelmann, D.J., and Wier, W.G. 1988. Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J Physiol* 405:233-255.
143. O., A. 2009. Cardiac Ion Channels. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.* 2::185-194.
144. Frank, J.S., Mottino, G., Reid, D., Molday, R.S., and Philipson, K.D. 1992. Distribution of the Na(+)-Ca²⁺ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J Cell Biol* 117:337-345.
145. Yang, Z., Pascarel, C., Steele, D.S., Komukai, K., Brette, F., and Orchard, C.H. 2002. Na⁺-Ca²⁺ exchange activity is localized in the T-tubules of rat ventricular myocytes. *Circ Res* 91:315-322.
146. Kieval, R.S., Bloch, R.J., Lindenmayer, G.E., Ambesi, A., and Lederer, W.J. 1992. Immunofluorescence localization of the Na-Ca exchanger in heart cells. *Am J Physiol* 263:C545-550.
147. Scriven, D.R., Dan, P., and Moore, E.D. 2000. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79:2682-2691.
148. Crespo, L.M., Grantham, C.J., and Cannell, M.B. 1990. Kinetics, stoichiometry and role of the Na-Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature* 345:618-621.
149. Hinata, M., Yamamura, H., Li, L., Watanabe, Y., Watano, T., Imaizumi, Y., and Kimura, J. 2002. Stoichiometry of Na⁺-Ca²⁺ exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 545:453-461.
150. Levi, A.J., Spitzer, K.W., Kohmoto, O., and Bridge, J.H. 1994. Depolarization-induced Ca entry via Na-Ca exchange triggers SR release in guinea pig cardiac myocytes. *Am J Physiol* 266:H1422-1433.
151. Litwin, S., Kohmoto, O., Levi, A.J., Spitzer, K.W., and Bridge, J.H. 1996. Evidence that reverse Na-Ca exchange can trigger SR calcium release. *Ann N Y Acad Sci* 779:451-463.
152. Litwin, S.E., Li, J., and Bridge, J.H. 1998. Na-Ca exchange and the trigger for sarcoplasmic reticulum Ca release: studies in adult rabbit ventricular myocytes. *Biophys J* 75:359-371.
153. Sipido, K.R., Maes, M., and Van de Werf, F. 1997. Low efficiency of Ca²⁺ entry through the Na(+)-Ca²⁺ exchanger as trigger for Ca²⁺ release from the

- sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca²⁺ current and reverse-mode Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchange. *Circ Res* 81:1034-1044.
154. Goldhaber, J.I., Lamp, S.T., Walter, D.O., Garfinkel, A., Fukumoto, G.H., and Weiss, J.N. 1999. Local regulation of the threshold for calcium sparks in rat ventricular myocytes: role of sodium-calcium exchange. *J Physiol* 2:431-438.
 155. Marks, A.R. 2001. Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol* 33:615-624.
 156. Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., et al. 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339:439-445.
 157. Nakai, J., Imagawa, T., Hakamat, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H., and Numa, S. 1990. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* 271:169-177.
 158. Otsu, K., Willard, H.F., Khanna, V.K., Zorzato, F., Green, N.M., and MacLennan, D.H. 1990. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265:13472-13483.
 159. Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H., and Imoto, K. 1992. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 312:229-235.
 160. Meissner, G., and Henderson, J.S. 1987. Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca²⁺ and is modulated by Mg²⁺, adenine nucleotide, and calmodulin. *J Biol Chem* 262:3065-3073.
 161. Meissner, G. 1986. Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261:6300-6306.
 162. Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., and Marks, A.R. 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101:365-376.
 163. Witcher, D.R., Kovacs, R.J., Schulman, H., Cefali, D.C., and Jones, L.R. 1991. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* 266:11144-11152.
 164. Wehrens, X.H., and Marks, A.R. 2003. Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease. *Trends Biochem Sci* 28:671-678.
 165. Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y.M., and Jones, L.R. 1997. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 272:23389-23397.
 166. MacLennan, D.H., Abu-Abed, M., and Kang, C. 2002. Structure-function relationships in Ca⁽²⁺⁾ cycling proteins. *J Mol Cell Cardiol* 34:897-918.
 167. Vangheluwe, P., Louch, W.E., Ver Heyen, M., Sipido, K., Raeymaekers, L., and Wuytack, F. 2003. Ca²⁺ transport ATPase isoforms SERCA2a and SERCA2b are targeted to the same sites in the murine heart. *Cell Calcium* 34:457-464.
 168. Haghghi, K., Schmidt, A.G., Hoit, B.D., Brittsan, A.G., Yatani, A., Lester, J.W., Zhai, J., Kimura, Y., Dorn, G.W., 2nd, MacLennan, D.H., et al. 2001. Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure. *J Biol Chem* 276:24145-24152.
 169. Simmerman, H.K., and Jones, L.R. 1998. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78:921-947.
 170. Koss, K.L., and Kranias, E.G. 1996. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 79:1059-1063.

171. Li, L., Desantiago, J., Chu, G., Kranias, E.G., and Bers, D.M. 2000. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H769-779.
172. Hagemann, D., and Xiao, R.P. 2002. Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 12:51-56.
173. Maier, L.S., and Bers, D.M. 2002. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 34:919-939.
174. Bers, D.M. 2001. *Excitation–Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* edn 2. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands,.
175. Fukuda, N., Sasaki, D., Ishiwata, S., and Kurihara, S. 2001. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation* 104:1639-1645.
176. Gordon, A.M., Homsher, E., and Regnier, M. 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 80:853-924.
177. Toyokuni, S. 1999. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 49:91-102.
178. Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Cargnoni, A., Pasini, E., De Giuli, F., and Albertini, A. 1991. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* 53:215S-222S.
179. Cheeseman, K.H., and Slater, T.F. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49:481-493.
180. Kusterer, K., Pihan, G., and Szabo, S. 1987. Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by HCl, NaOH, or ischemia. *Am J Physiol* 252:G811-816.
181. Freeman, B.A., and Crapo, J.D. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426.
182. Bergamini, C.M., Gambetti, S., Dondi, A., and Cervellati, C. 2004. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des* 10:1611-1626.
183. Hartz, J.W., and Deutsch, H.F. 1972. Subunit structure of human superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:7043-7050.
184. Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.
185. Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., and Flohe, L. 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42:68-72.
186. Fantone, J.C., and Ward, P.A. 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107:395-418.
187. Babior, B.M., Lambeth, J.D., and Nauseef, W. 2002. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397:342-344.
188. Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.
189. Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E., and Dizdaroglu, M. 1991. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* 273:601-604.
190. Nikjoo, H., O'Neill, P., Terrissol, M., and Goodhead, D.T. 1994. Modelling of radiation-induced DNA damage: the early physical and chemical event. *Int J Radiat Biol* 66:453-457.
191. Park, J.L., and Lucchesi, B.R. 1999. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 68:1905-1912.
192. Koster, J.F., Biemond, P., and Stam, H. 1987. Lipid peroxidation and myocardial ischaemic damage: cause or consequence? *Basic Res Cardiol* 1:253-260.
193. Spiteller, G. 2002. Do changes in the cell membrane structure induce the generation of lipid peroxidation products which serve as first signalling molecules in cell to cell communication? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67:151-162.

194. Hogg, N., Kalyanaraman, B., Joseph, J., Struck, A., and Parthasarathy, S. 1993. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 334:170-174.
195. Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.
196. Calabrese, V., Bates, T.E., and Stella, A.M. 2000. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res* 25:1315-1341.
197. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., and Freeman, B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1620-1624.
198. Rubbo, H., Darley-Usmar, V., and Freeman, B.A. 1996. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol* 9:809-820.
199. Aslan, M., and Freeman, B.A. 2007. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med* 43:1469-1483.
200. Aslan, M., Thornley-Brown, D., and Freeman, B.A. 2000. Reactive species in sickle cell disease. *Ann N Y Acad Sci* 899:375-391.
201. Gulbahar, O., Adisen, H., Koca, C., Aricioglu, A., and Gulekon, A. 2007. Changes in serum carbonyl and malondialdehyde levels following colchicine and vitamin E treatment in Behcet's disease. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 29:521-524.
202. Hawkins, C.L., and Davies, M.J. 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta* 2:2-3.
203. Stadtman, E.R., and Berlett, B.S. 1997. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10:485-494.
204. Ozdemir, S., Bito, V., Holemans, P., Vinet, L., Mercadier, J.J., Varro, A., and Sipido, K.R. 2008. Pharmacological inhibition of na/ca exchange results in increased cellular Ca²⁺ load attributable to the predominance of forward mode block. *Circ Res* 102:1398-1405.
205. Raju, B., Murphy, E., Levy, L.A., Hall, R.D., and London, R.E. 1989. A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium. *Am J Physiol* 256:C540-548.
206. Fatholahi, M., LaNoue, K., Romani, A., and Scarpa, A. 2000. Relationship between total and free cellular Mg(2+) during metabolic stimulation of rat cardiac myocytes and perfused hearts. *Arch Biochem Biophys* 374:395-401.
207. Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D., and Herman, B. 1999. Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev* 79:1089-1125.
208. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
209. Xu, Z., and Rozanski, G.J. 1997. Proton inhibition of transient outward potassium current in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29:481-490.
210. Rozanski, G.J., and Xu, Z. 2002. Sulfhydryl modulation of K⁺ channels in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 34:1623-1632.
211. Kornitzer, M., Dramaix, M., and De Backer, G. 1999. Epidemiology of risk factors for hypertension: implications for prevention and therapy. *Drugs* 57:695-712.
212. Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142.
213. Moncada, S., and Higgs, E.A. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21:361-374.
214. Ignarro, L.J., and Kadowitz, P.J. 1985. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25:171-191.
215. Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.

216. Vila-Petroff, M.G., Younes, A., Egan, J., Lakatta, E.G., and Sollott, S.J. 1999. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 84:1020-1031.
217. Ziolo, M.T., Kohr, M.J., and Wang, H. 2008. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* 45:625-632.
218. Bell, D., Zhao, Y.Y., Kelso, E.J., McHenry, E.M., Rush, L.M., Lamont, V.M., Nicholls, D.P., and McDermott, B.J. 2006. Upregulation of adrenomedullin and its receptor components during cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:22.
219. Mojiminiyi, F.B., Anigbogu, C.N., Sofola, O.A., and Adigun, S.A. 2009. Cardiac and Kidney Weight Indices following Dietary Salt Loading and/or Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition in the Hooded (Aguti) Rat. *Niger Postgrad Med J* 16:1-7.
220. de Oliveira, C.F., Cintra, K.A., Teixeira, S.A., De Luca, I.M., Antunes, E., and De Nucci, G. 2000. Development of cardiomyocyte hypotrophy in rats under prolonged treatment with a low dose of a nitric oxide synthesis inhibitor. *Eur J Pharmacol* 391:121-126.
221. Pechanova, O., Bernatova, I., and Babal, P. 1999. Structural alterations in the heart after long-term L-NAME and D-NAME treatment. *Gen Physiol Biophys* 1:6-9.
222. Paulis, L., Pechanova, O., Zicha, J., Barta, A., Gardlik, R., Celec, P., Kunes, J., and Simko, F. 2010. Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during L-NAME-induced hypertension. *J Pineal Res* 48:102-108.
223. Pechanova, O., and Bernatova, I. 2000. Effect of captopril on cyclic nucleotide concentrations during long-term NO synthase inhibition. *Physiol Res* 49:55-63.
224. Pechanova, O., Bernatova, I., Babal, P., Martinez, M.C., Kysela, S., Stvrtina, S., and Andriantsitohaina, R. 2004. Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension. *J Hypertens* 22:1551-1559.
225. Bernatova, I., Pechanova, O., and Simko, F. 1999. Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney. *Exp Physiol* 84:1095-1105.
226. Pechanova, O., Bernatova, I., Pelouch, V., and Simko, F. 1997. Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. *J Mol Cell Cardiol* 29:3365-3374.
227. Babal, P., Pechanova, O., Bernatova, I., and Stvrtina, S. 1997. Chronic inhibition of NO synthesis produces myocardial fibrosis and arterial media hyperplasia. *Histol Histopathol* 12:623-629.
228. Kristek, F., Gerova, M., Devat, L., and Varga, I. 1996. Remodelling of septal branch of coronary artery and carotid artery in L-NAME treated rats. *Physiol Res* 45:329-333.
229. Kuru, O., Senturk, U.K., Kocer, G., Ozdem, S., Baskurt, O.K., Cetin, A., Yesilkaya, A., and Gunduz, F. 2009. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol* 107:896-902.
230. Blache, D., Devaux, S., Joubert, O., Loreau, N., Schneider, M., Durand, P., Prost, M., Gaume, V., Adrian, M., Laurant, P., et al. 2006. Long-term moderate magnesium-deficient diet shows relationships between blood pressure, inflammation and oxidant stress defense in aging rats. *Free Radic Biol Med* 41:277-284.
231. Laurant, P., Dalle, M., Berthelot, A., and Rayssiguier, Y. 1999. Time-course of the change in blood pressure level in magnesium-deficient Wistar rats. *Br J Nutr* 82:243-251.
232. Touyz, R.M., and Milne, F.J. 1999. Magnesium supplementation attenuates, but does not prevent, development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 12:757-765.

233. Berthelot, A., and Esposito, J. 1983. Effects of dietary magnesium on the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *J Am Coll Nutr* 2:343-353.
234. Evans, G.H., Weaver, C.M., Harrington, D.D., and Babbs, C.F., Jr. 1989. Dietary magnesium does not affect blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A* 11:619-632.
235. Laurant, P., Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. 1997. Effect of magnesium on vascular tone and reactivity in pressurized mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 75:293-300.
236. Scarpa, A., and Brinley, F.J. 1981. In situ measurements of free cytosolic magnesium ions. *Fed Proc* 40:2646-2652.
237. Cittadini, A., and Scarpa, A. 1983. Intracellular Mg²⁺ homeostasis of Ehrlich ascites tumor cells. *Arch Biochem Biophys* 227:202-209.
238. Levy, L.A., Murphy, E., Raju, B., and London, R.E. 1988. Measurement of cytosolic free magnesium ion concentration by ¹⁹F NMR. *Biochemistry* 27:4041-4048.
239. Murphy, E., Freudenrich, C.C., Levy, L.A., London, R.E., and Lieberman, M. 1989. Monitoring cytosolic free magnesium in cultured chicken heart cells by use of the fluorescent indicator Fura-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2981-2984.
240. Kirschenlohr, H.L., Metcalfe, J.C., Morris, P.G., Rodrigo, G.C., and Smith, G.A. 1988. Ca²⁺ transient, Mg²⁺, and pH measurements in the cardiac cycle by ¹⁹F NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9017-9021.
241. Gupta, R.K., and Moore, R.D. 1980. ³¹P NMR studies of intracellular free Mg²⁺ in intact frog skeletal muscle. *J Biol Chem* 255:3987-3993.
242. Gupta, R.K., Benovic, J.L., and Rose, Z.B. 1978. Magnetic resonance studies of the binding of ATP and cations to human hemoglobin. *J Biol Chem* 253:6165-6171.
243. Garfinkel, L., Altschuld, R.A., and Garfinkel, D. 1986. Magnesium in cardiac energy metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 18:1003-1013.
244. Handy, R.D., Gow, I.F., Ellis, D., and Flatman, P.W. 1996. Na-dependent regulation of intracellular free magnesium concentration in isolated rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 28:1641-1651.
245. Doggrel, S.A., Nand, V., and Henderson, C.J. 1999. The effects of lignocaine and tetrodotoxin on the action potentials and contractions of left ventricles from normo- and hypertensive rats. *Gen Pharmacol* 32:429-437.
246. Mertens, M.J., Mathy, M.J., Pfaffendorf, M., and van Zwieten, P.A. 1992. Depressed inotropic response to beta-adrenoceptor agonists in the presence of advanced cardiac hypertrophy in hearts from rats with induced aortic stenosis and from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 10:1361-1368.
247. Li, S.Y., Golden, K.L., Jiang, Y., Wang, G.J., Privratsky, J.R., Zhang, X., Eason, A.R., Culver, B., and Ren, J. 2005. Inhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase differentially regulates contractile function in cardiac myocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of Ca²⁺ regulatory proteins. *Cell Biochem Biophys* 42:1-12.
248. Kobayashi, T., Hamada, M., Okayama, H., Shigematsu, Y., Sumimoto, T., and Hiwada, K. 1995. Contractile properties of left ventricular myocytes isolated from spontaneously hypertensive rats: effect of angiotensin II. *J Hypertens* 13:1803-1807.
249. McCrossan, Z.A., Billeter, R., and White, E. 2004. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *Cardiovasc Res* 63:283-292.
250. Chen-Izu, Y., Chen, L., Banyasz, T., McCulle, S.L., Norton, B., Scharf, S.M., Agarwal, A., Patwardhan, A., Izu, L.T., and Balke, C.W. 2007. Hypertension-induced remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:14.

251. Bartunek, J., Weinberg, E.O., Tajima, M., Rohrbach, S., Katz, S.E., Douglas, P.S., and Lorell, B.H. 2000. Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension : novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation* 101:423-429.
252. Sonoyama, K., Igawa, O., Miake, J., Yamamoto, Y., Sugihara, S., Sasaki, N., Shimoyama, M., Hamada, T., Taniguchi, S., Yoshida, A., et al. 2005. Effects of angiotensin II on the action potential durations of atrial myocytes in hypertensive rats. *Hypertens Res* 28:173-179.
253. Chan, V., Fenning, A., Levick, S.P., Loch, D., Chunduri, P., Iyer, A., Teo, Y.L., Hoey, A., Wilson, K., Burstow, D., et al. 2011. Cardiovascular changes during maturation and ageing in male and female spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 57:469-478.
254. Momtaz, A., Coulombe, A., Richer, P., Mercadier, J.J., and Coraboef, E. 1996. Action potential and plateau ionic currents in moderately and severely DOCA-salt hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 28:2511-2522.
255. Michailova, A.P., Belik, M.E., and McCulloch, A.D. 2004. Effects of magnesium on cardiac excitation-contraction coupling. *J Am Coll Nutr* 23:514S-517S.
256. Bara, M., and Guiet-Bara, A. 1984. Potassium, magnesium and membranes. Review of present status and new findings. *Magnesium* 3:215-225.
257. Sheehan, J.P., and Seelig, M.S. 1984. Interactions of magnesium and potassium in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Magnesium* 3:301-314.
258. Shorofsky, S.R., Aggarwal, R., Corretti, M., Baffa, J.M., Strum, J.M., Al-Seikhan, B.A., Kobayashi, Y.M., Jones, L.R., Wier, W.G., and Balke, C.W. 1999. Cellular mechanisms of altered contractility in the hypertrophied heart: big hearts, big sparks. *Circ Res* 84:424-434.
259. Wang, M., Tashiro, M., and Berlin, J.R. 2004. Regulation of L-type calcium current by intracellular magnesium in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 555:383-396.
260. Kiyosue, T. Removal of intracellular Mg(2+) activates cardiac Na(+)/Ca(2+) exchanger: *Cardiovasc Res*. 2002 Feb 1;53(2):290-1.
261. Milnes, J.T., and MacLeod, K.T. 2001. Reduced ryanodine receptor to dihydropyridine receptor ratio may underlie slowed contraction in a rabbit model of left ventricular cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 33:473-485.
262. Qi, M., Shannon, T.R., Euler, D.E., Bers, D.M., and Samarel, A.M. 1997. Downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase during progression of left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 272:H2416-2424.
263. Ohta, K., Kim, S., Hamaguchi, A., Miura, K., Yukimura, T., and Iwao, H. 1995. Expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase mRNA in the hypertrophied heart of young spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 22:S228-229.
264. Gusev, K., and Niggli, E. 2008. Modulation of the local SR Ca²⁺ release by intracellular Mg²⁺ in cardiac myocytes. *J Gen Physiol* 132:721-730.
265. Wei, S.K., Quigley, J.F., Hanlon, S.U., O'Rourke, B., and Haigney, M.C. 2002. Cytosolic free magnesium modulates Na/Ca exchange currents in pig myocytes. *Cardiovasc Res* 53:334-340.
266. Anderson, R.A., Ellis, G.R., Chirkov, Y.Y., Holmes, A.S., Payne, N., Blackman, D.J., Jackson, S.K., Lewis, M.J., Horowitz, J.D., and Frenneaux, M.P. 2004. Determinants of platelet responsiveness to nitric oxide in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 6:47-54.
267. Ytrehus, K., Myklebust, R., and Mjos, O.D. 1986. Influence of oxygen radicals generated by xanthine oxidase in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res* 20:597-603.

268. Luo, J., Xuan, Y.T., Gu, Y., and Prabhu, S.D. 2006. Prolonged oxidative stress inverts the cardiac force-frequency relation: role of altered calcium handling and myofilament calcium responsiveness. *J Mol Cell Cardiol* 40:64-75.
269. Sumandea, M.P., and Steinberg, S.F. 2011. Redox signaling and cardiac sarcomeres. *J Biol Chem* 286:9921-9927.
270. Vaage, J., Antonelli, M., Bufi, M., Irtun, O., DeBlasi, R.A., Corbucci, G.G., Gasparetto, A., and Semb, A.G. 1997. Exogenous reactive oxygen species deplete the isolated rat heart of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 22:85-92.
271. Wang, L., Lopaschuk, G.D., and Clanachan, A.S. 2008. H₂O₂-induced left ventricular dysfunction in isolated working rat hearts is independent of calcium accumulation. *J Mol Cell Cardiol* 45:787-795.
272. Gao, W.D., Liu, Y., and Marban, E. 1996. Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation* 94:2597-2604.
273. Passarelli, C., Petrini, S., Pastore, A., Bonetto, V., Sale, P., Gaeta, L.M., Tozzi, G., Bertini, E., Canepari, M., Rossi, R., et al. 2008. Myosin as a potential redox-sensor: an in vitro study. *J Muscle Res Cell Motil* 29:119-126.
274. Tiago, T., Simao, S., Aureliano, M., Martin-Romero, F.J., and Gutierrez-Merino, C. 2006. Inhibition of skeletal muscle S1-myosin ATPase by peroxynitrite. *Biochemistry* 45:3794-3804.
275. Canton, M., Neverova, I., Menabo, R., Van Eyk, J., and Di Lisa, F. 2004. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H870-877.
276. Crosbie, R.H., Miller, C., Cheung, P., Goodnight, T., Muhrad, A., and Reisler, E. 1994. Structural connectivity in actin: effect of C-terminal modifications on the properties of actin. *Biophys J* 67:1957-1964.
277. Canton, M., Skyschally, A., Menabo, R., Boengler, K., Gres, P., Schulz, R., Haude, M., Erbel, R., Di Lisa, F., and Heusch, G. 2006. Oxidative modification of tropomyosin and myocardial dysfunction following coronary microembolization. *Eur Heart J* 27:875-881.
278. Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., and Moncada, S. 1992. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 20:S60-62.
279. Sogni, P., Moreau, R., Ohsuga, M., Cailmail, S., Oberti, F., Hadengue, A., Pussard, E., and Lebrec, D. 1992. Evidence for normal nitric oxide-mediated vasodilator tone in conscious rats with cirrhosis. *Hepatology* 16:980-983.
280. Paulis, L., Pechanova, O., Zicha, J., Krajcirovicova, K., Barta, A., Pelouch, V., Adamcova, M., and Simko, F. 2009. Melatonin prevents fibrosis but not hypertrophy development in the left ventricle of NG-nitro-L-arginine-methyl ester hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 27:97.
281. Vrankova, S., Parohova, J., Barta, A., Janega, P., Simko, F., and Pechanova, O. 2010. Effect of nuclear factor kappa B inhibition on L-NAME-induced hypertension and cardiovascular remodelling. *J Hypertens* 28.
282. Yang, H.Y., and Chen, J.R. 2008. Renoprotective effects of soy protein hydrolysates in N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride-induced hypertensive rats. *Hypertens Res* 31:1477-1483.
283. Zhou, Q., Olinescu, R.M., and Kummerow, F.A. 1999. Influence of low magnesium concentrations in the medium on the antioxidant system in cultured human arterial endothelial cells. *Magnes Res* 12:19-29.
284. Hans, C.P., Chaudhary, D.P., and Bansal, D.D. 2002. Magnesium deficiency increases oxidative stress in rats. *Indian J Exp Biol* 40:1275-1279.

285. Barbagallo, M., Dominguez, L.J., Tagliamonte, M.R., Resnick, L.M., and Paolisso, G. 1999. Effects of glutathione on red blood cell intracellular magnesium: relation to glucose metabolism. *Hypertension* 34:76-82.
286. Shacter, E. 2000. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol* 319:428-436.
287. Stafford, R.E., Mak, I.T., Kramer, J.H., and Weglicki, W.B. 1993. Protein oxidation in magnesium deficient rat brains and kidneys. *Biochem Biophys Res Commun* 196:596-600.
288. Boparai, R.K., Kiran, R., and Bansal, D.D. 2007. Insinuation of exacerbated oxidative stress in sucrose-fed rats with a low dietary intake of magnesium: evidence of oxidative damage to proteins. *Free Radic Res* 41:981-989.
289. Ren, J. 2007. Influence of gender on oxidative stress, lipid peroxidation, protein damage and apoptosis in hearts and brains from spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:432-438.

ÖZGEÇMİŞ

Nihal ÖZTÜRK, 1979 yılında Afyon'un Dinar ilçesinde doğdu, ilk, orta ve lise öğrenimini Afyon'da tamamladı. 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'nde üniversite eğitime başladı. Lisans diplomasını 2003 yılında aldı ve 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Yüksek Lisans diplomasını 2008 yılında aldı Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.