



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İSOPROTERENOL İLE OLUŞTURULAN KALP
KRİZİ MODELİNDE KRONİK ALKOL KULLANIMININ
MİYOKARDİYAL APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ VE KALPAİN
İNHİBİTÖRÜ 1'İN (N-ASETİL-LÖSİN-LÖSİN-NORLÖSİNAL)
KARDİYOPROTEKTİF ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

AYŞEGÜL OĞLAKÇI İLHAN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜNGÖR KANBAK**

MAYIS 2016



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İSOPROTERENOL İLE OLUŞTURULAN KALP
KRİZİ MODELİNDE KRONİK ALKOL KULLANIMININ
MİYOKARDİYAL APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ VE KALPAİN
İNHİBİTÖRÜ 1'İN (N-ASETİL-LÖSİN-LÖSİN-NORLÖSİNAL)
KARDİYOPROTEKTİF ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

AYŞEGÜL OĞLAKÇI İLHAN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜNGÖR KANBAK**

MAYIS 2016

Proje No: 111S533 (Tübitak 1002- Hızlı Destek Programı)

KABUL VE ONAY SAYFASI

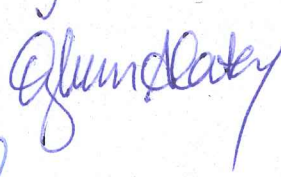
Ayşegül Oğlakçı İlhan'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "Ratlarda İsoproterenol İle Oluşturulan Kalp Krizi Modelinde Kronik Alkol Kullanımının Miyokardiyal Apoptoz Üzerine Etkisi Ve Kalpain İnhibitörü 1'in (N-Asetil-Lösın-Lösın-Norlösınal) Kardiyoprotektif Rolünün Araştırılması" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih
10/05 /2016

Üye: Prof. Dr. GÜNGÖR KANBAK



Üye: Prof. Dr. İ. ÖZKAN ALATAŞ



Üye: Prof. Dr. SEMA USLU



Üye: Prof. Dr. HASAN VEYSİ GÜNEŞ



Üye: Doç. Dr. FİLİZ ÖZDEMİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10/05/2016 tarih ve 1029/5149 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr. Hasan Veyisi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü



ÖZET

Alkol tüketimi ve alkolizm yüksek bir mortalite ve morbiditeye sahip sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Aşırı dozda alkol tüketimi önemli bir kalp dokusu hasarı oluşturarak ani ölümlere neden olmaktadır. Alkolün oluşturduğu kalp dokusu hasarının mekanizması tam olarak bilinmese de reaktif oksijen türlerinin oluşumu, asetaldehidin protein adduktları oluşturması, mitokondri fonksiyonlarının değişmesi gibi sebeplerin kalp dokusuna zarar verdiği düşünülmektedir.

Kardiyovasküler hastalıklar gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde görülen ölümlerin başlıca sebeplerinden birisidir. Kardiyovasküler hastalıklar içinde en sık görüleni de miyokart infarktüsü (MI)'dür. MI, yetersiz doku perfüzyonundan kaynaklanan uzamış iskemi sonucu meydana gelen geri dönüşümsüz miyokart hücre hasarı ve nekrozudur.

Çalışmada MI'a bağlı apoptotik hücre ölümü üzerine kronik alkol kullanımının etkisi ve kalpain inhibitörü-1 kullanımının rat kalp dokusu üzerindeki koruyucu rolü biyokimyasal, histolojik ve morfometrik olarak ortaya konulmaya çalışıldı. Çalışmamızda erkek Wistar Albino cinsi ratlar kullanıldı. Ratlar kontrol, çözücü, alkol, miyokart infarktüsü, alkol+miyokart infarktüsü ve alkol+miyokart infarktüsü+inhibitör grubu olmak üzere 18'er rattan oluşan 6 gruba ayrıldı. Rat kalplerinde miyokartiyal hasarın yol açtığı apoptozun göstergesi olarak sitokrom c düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında alkol, MI ve alkol+MI gruplarında ($p<0,001$) ve kaspaz 3 düzeylerinin alkol ($p>0,05$), MI ($p<0,001$) ve alkol+MI ($p<0,001$) gruplarında istatistiksel olarak artmış olduğu, sitokrom c salınımında rol oynayan mitokondriyal kardiyolipin içeriğinin alkol, MI ve alkol+MI gruplarında azalmış olduğu ($p<0,001$) ve apoptozun tetiklenmesinde rol aldığı bilinen sistein proteazlardan kalpain düzeylerinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$) bulundu. Alkol+MI grubu ile karşılaştırıldığında inhibitör grubunda kalpain düzeyleri ($p<0,05$), kaspaz düzeyleri ($p<0,001$) ve sitokrom c düzeylerinin ($p<0,001$) azaldığı, kardiyolipin içeriğinin ($p<0,001$) arttığı görülmüştür. MI göstergesi olarak EKG (elektrokardiyogram) ölçümleri yapıldı ve kan serumlarında kreatin kinaz MB (CK-MB) düzeyleri ölçüldü. Serum CK-MB enziminin kontrol grubuna göre MI ($p<0,001$), alkol ($p<0,001$) ve alkol+MI gruplarında ($p<0,05$) arttığı ve inhibitör grubunda MI grubuna göre düşme ($p<0,05$) olduğu gözlemlendi. Histolojik özellikler ve doku hasarının incelenmesi sonucu, alkolün tek başına sadece hemoraji ve

ödem bulgularında arttırıcı etkisi gözlemlendi. MI ise tüm histopatolojik kriterler açısından ciddi hasar yaratmıştı. Alkolün MI ile birlikte bu hasarları biraz daha arttırdığı gözlemlendi. Alkol+MI grubuna kalpain inhibitörü ile tedavi uygulandığında, kalpain inhibitörünün istatistiksel olarak sadece miyokartiyal fragmentasyon ve çizgilenme kaybında azalmaya yardımcı olduğu, diğer histopatolojik kriterler açısından ise anlamlı olmayan, ancak iyileşmeye yardımcı olabilecek bir ajan olduğu izlendi. Morfometrik inceleme sonucu, alkol ve MI ile artan infarkt alanı yüzdesi alkol+MI grubunda çok daha fazlayken, alkol+MI+kalpain inhibitör grubunda azalmıştır.

Sonuç olarak MI'a bağlı apoptotik hücre ölümü üzerine kronik alkol kullanımının etkisinin hücre ölümünü tetikleme kapasitesine sahip olduğu, biyokimyasal, histolojik ve morfometrik incelemeler sonucu kalpain inhibitörünün apoptozu azaltabileceği bulundu. Kalpain inhibitörü 1'in alkol ve MI nedeniyle oluşan miyokartiyal apoptozu ortadan kaldırabilecek terapötik yaklaşımlara katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Alkol, miyokart infarktüsü (MI), kalpain inhibitörü, apoptoz

ABSTRACT

Excessive alcohol consumption and alcoholism causes health disorders with high mortality and morbidity. Excessive acute alcohol consumption causes sudden deaths due to serious injuries in cardiac tissues. Although exact mechanism of cardiac tissue damage caused by alcohol is unknown reactive oxygen species, protein adducts formed by acetaldehyde and mitochondrial dysfunction are proposed as possible mechanisms.

Cardiovascular disease is one of the main reasons for deaths in the developed and developing countries. Myocardial infarction (MI) is the most common form of cardiovascular diseases. MI is irreversible myocardial cell damage and necrosis caused by prolonged ischemia due to inadequate tissue perfusion.

In this study, the effect of chronic alcohol abuse on apoptotic cell death due to MI and the protective role of calpain inhibitor 1 on the heart tissue of rats were determined by biochemical, histological and morphometric methods. Male Wistar Albino rats were used and six groups with eighteen rats in each (control, vehicle, alcohol, myocard infarction, alcohol+myocard infarction and alcohol+inhibitor +myocard infarction) were included in our study. As an indicator of myocardial damage result of chronic alcohol consumption and MI caused apoptosis in the heart tissue of rats, compared with control group cytochrome c levels ($p < 0,001$) were found to be high significantly in alcohol, MI and alcohol+MI groups and caspase 3 levels were found to be high significantly in alcohol ($p > 0,05$), MI ($p < 0,001$) and alcohol+MI ($p < 0,001$) groups, the levels of mitochondrial cardiolipin contents that play role in release of cytochrome c a were found to be low significantly in alcohol, MI and alcohol+MI groups ($p < 0,001$) and the levels of the proteases that play role in triggering apoptosis, such as capain, were found to be high and not statistically significant ($p > 0,05$). Increased calpain ($p < 0,05$), caspase ($p < 0,001$) and cytochrome c ($p < 0,001$) levels in alcohol+MI group were decreased compared with alcohol+MI+calpain inhibitory group. ECG (electrocardiogram) measurement was made and blood serum of creatine kinase MB (CK-MB) levels were measured as a marker of MI. Serum CK-MB levels were increased significantly in MI ($p < 0,001$), alcohol ($p < 0,001$) and alcohol+MI ($p < 0,05$) groups compared with control group and decreased inhibitory group significantly ($p < 0,05$) compared with MI group. As a result of histological features and examination of tissue damage, only alcohol was increased hemoragy and edema. MI was

created serious damage for the purposes of histopathological criteria. This damage was slightly increased together with alcohol+MI. When alcohol + MI group treated with calpain inhibitor, the calpain inhibitor a statistically significant reduction in myocardial fragmentation and loss streak to help, other histopathological criteria are not significant, however, was found to be an agent that can help you improve. Result of morphometric examination, percentage of infarct size increased with alcohol and MI group but this increment was higher too in alcohol+MI group and percentage of infarct size decreased alcohol + MI + calpain inhibitor group.

As a result of, we found that chronic alcohol abuse is capable of triggering apoptotic cell death due to MI, calpain inhibitory with biochemical, histological and morfometric experiment may reduce apoptosis. We think that calpain inhibitor 1 may contribute to eliminate therapeutic approaches myocardial apoptosis due to alcohol and MI.

Key Words: Alcohol, myocard infarction (MI), calpain inhibitor, apoptosis.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL DİZİNİ	x
TABLO DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalp.....	3
2.1.1. Kalbin anatomisi	3
2.2. Miyokart İnfarktüsü ve Tanısı	5
2.2.1. Kreatin kinaz ve izoenzimleri	6
2.2.2. Elektrokardiyogram (EKG)	7
2.3. İsoproterenol (ISO) İle Deneysel Miyokart İnfarktüsü Oluşturulması	9
2.4. Alkol Tüketimi	10
2.4.1. Alkol ve metabolizması.....	11
2.4.1.1. Alkol dehidrogenaz (ADH) yolağı	12
2.4.1.2. Mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS)	12
2.4.1.3. Katalaz	12
2.4.1.4. Non oksidatif alkol metabolizması.....	13
2.4.2. Alkol Metabolitleri	13
2.5. Apoptotik Hücre Ölümü	15
2.5.1. Apoptozun morfolojisi	16
2.5.2. Apoptozun mekanizmaları	17
2.5.2.1. Endoplazmik retikulum (ER) aracılı yolak.....	18
2.5.2.2. Ekstrinsik (ölüm reseptör aracılı) yolak	18
2.5.2.3. İntrensik (mitokondriyal) yolak	18
2.5.3. Sitokrom c-kardiyolipin (CL) ilişkisi	19
2.5.4. Kardiyolipin	22
2.5.4.1. Kardiyolipin sentezi	22
2.5.4.2. Kardiyolipin katabolizması	24
2.5.4.3. Kardiyolipinin görevleri	24
2.5.5. Apoptozda rol oynayan proteazlar	25
2.5.5.1. Kaspazlar	25

2.5.5.1.1. Apoptoz-kaspaz bağlantısı	27
2.5.5.1.2. Kaspaz 3	27
2.5.5.2. Kalpainler.....	28
2.5.5.2.1. Kalpain aktivasyonu	31
2.5.5.2.2. Kalpainlerin apoptozdaki rolü.....	32
2.5.5.2.3. Kalpain aktivitesinin regülasyonu	33
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	36
3.1. Deney Hayvanları ve Madde Uygulamaları	36
3.1.1. Deney grupları	36
3.1.2. Kronik alkol uygulaması	37
3.1.3. Miyokart infarktüsünün oluşturulması.....	38
3.1.4. Kalpain inhibitör 1 uygulaması	38
3.1.5. Anestezi	39
3.1.6. EKG çekilmesi	39
3.1.7. Cerrahi işlemler.....	39
3.2. Biyokimyasal Deneyler	40
3.2.1. Serum CK MB düzeylerinin belirlenmesi.....	40
3.2.2. Mitokondri izolasyonu	41
3.2.3. Mitokondriyal kardiyolipin içeriği ölçümü	41
3.2.4. Sitokrom c salınımı ölçümü	42
3.2.5. Kaspaz 3 aktivitesi tayini	43
3.2.6. Kalpain aktivasyonu ölçümü.....	44
3.2.7. Doku protein miktarı ölçümü.....	44
3.3. Histolojik Analizler	46
3.3.1. H&E boyama.....	46
3.3.2. Apoptozun değerlendirilmesi	46
3.3.3. Morfolojik değerlendirme	47
3.4. İstatiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR	49
4.1. EKG Bulguları.....	49
4.2. Biyokimyasal Bulgular	53
4.2.1. Serum CK-MB düzeyleri	53
4.2.2. Mitokondriyal kardiyolipin içeriği.....	54
4.2.3. Sitokrom c salınımı	55
4.2.4. Kaspaz 3 aktivitesi	56
4.2.5. Kalpain aktivitesi	57
4.3. Histolojik Bulgular	58
4.3.1. H&E bulguları.....	58

4.3.2. Tunel bulguları	68
4.3.3. Morfometrik bulgular	72
5. TARTIŞMA	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR DİZİNİ	82
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1: Kalbin anatomisi.....	4
Şekil 2.2: Kalp duvarının tabakaları.....	5
Şekil 2.3: MI belirteçlerinin zamana göre salınımları.....	6
Şekil 2.4: Kreatin kinaz.....	7
Şekil 2.5: EKG sistemi.....	8
Şekil 2.6: EKG.....	9
Şekil 2.7: İsoproterenolün yapısı.....	9
Şekil 2.8: Etanolün yapısı.....	11
Şekil 2.9: Etanol metabolizması.....	13
Şekil 2.10: Etanolün metabolitlerinin etkileri.....	15
Şekil 2.11: Apoptoz morfolojisi.....	17
Şekil 2.12: İntrensik ve ekstrinsik yolaklar.....	19
Şekil 2.13: Sitokrom c – kardiyolipin etkileşimi.....	20
Şekil 2.14: Kardiyolipin ve dış mitokondriyal membranın permeabilizasyonu.....	21
Şekil 2.15: Apoptoz.....	21
Şekil 2.16: Kardiyolipinin yapısı.....	22
Şekil 2.17: Kardiyolipin sentezi.....	23
Şekil 2.18: Kaspazlar.....	26
Şekil 2.19: Kaspaz aktivasyonu.....	27
Şekil 2.20: Kaspaz 3 tetramerinin yapısı.....	28
Şekil 2.21: m-kalpainin şematik gösterimi.....	29
Şekil 2.22: Kalpain ailesi.....	30
Şekil 2.23: Kalpain aktivasyon mekanizması.....	31
Şekil 2.24: Kalpain, kalpastatin ve kaspazlar arasındaki ilişki.....	32
Şekil 2.25: Hücre ölümünde kalpain aktivasyonu.....	33
Şekil 2.26: Kalpastatinin inhibisyonu.....	34
Şekil 2.27: Kalpain inhibitörü I N-[N-(N-Asetil-L-lösil)-L-lösil]-L-norlösilal).....	35
Şekil 3.1: EKG çekilmesi ve kayıt sistemi.....	39
Şekil 3.2: Kardiyolipin-NAO etkileşimi.....	42
Şekil 3.3: Bradford reaksiyonu.....	45
Şekil 4.1: Kontrol grubu EKG örneği.....	51
Şekil 4.2: Alkol grubu EKG örneği.....	51
Şekil 4.3: MI grubu EKG örneği.....	51
Şekil 4.4: Alkol+MI grubu EKG örneği.....	52
Şekil 4.5: Alkol+MI+İnhibitör grubu EKG örneği.....	52
Şekil 4.6: Çözücü grubu EKG örneği.....	52
Şekil 4.7: Serum CK MB düzeyleri.....	53
Şekil 4.8: Mitokondriyal kardiyolipin içeriği.....	54
Şekil 4.9: Sitokrom c salınım oranları.....	55
Şekil 4.10: Kaspaz aktivitesi düzeyleri.....	57
Şekil 4.11: Kalpain aktivitesi düzeyleri.....	58

Şekil 4.12: Kontrol grubu genel görünüm.....	63
Şekil 4.13: Alkol grubu genel görünüm.....	64
Şekil 4.14: MI grubu genel görünüm	65
Şekil 4.15: Alkol+MI grubu genel görünüm	66
Şekil 4.16: Alkol+MI+Kalpain inhibitörü grubu genel görünüm	67
Şekil 4.17: Çözücü grubu genel görünüm.....	68
Şekil 4.18: TUNEL bulguları.....	70
Şekil 4.19: Alkol+MI grubu TUNEL bulguları	71
Şekil 4.20: Alkol+MI+Kalpain inhibitör ve çözücü grupları TUNEL bulguları.	72
Şekil 4.21: Relatif infarkt alanı sonuçları	73

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1: Modifiye sıvı diyet.....	38
Tablo 4.1: EKG sonuçları.....	50
Tablo 4.2: Serum CK MB sonuçları	53
Tablo 4.3: Mitokondriyal kardiyolipin içeriği sonuçları	54
Tablo 4.4: Sitokrom c salınım oranları (Sitozolik/Mitokondriyal)	55
Tablo 4.5: Kaspaz 3 aktivitesi düzeyleri	56
Tablo 4.6: Kalpain aktivitesi düzeyleri	57
Tablo 4.7: Miyokartiyal dokudaki histolojik değişiklikler	61
Tablo 4.8: Damarlardaki histolojik değişiklikler	62
Tablo 4.9: Grupların apoptotik indeks değerleri.....	69

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AC-DEVD-pNA: Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilidin
ADH: Alkol dehidrogenaz
ADP: Adenozin difosfat
Aİ: Apoptotik indeks
ALCAT1: Açıl Koenzim A: lizokardiyolipin açıltransferaz 1
AMC: A 7-Amino-4-Metil Kumarin
ASK: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz
ATP: Adenozin trifosfat
cAMP: Siklik adenozin monofosfat
CANP: Kalsiyum bağımlı doğal proteaz
CASPASE: Sistein aspartat spesifik proteinaz
CDP-DAG: Sitidindifosfat-diaçilgliserol
CHAPS : Cholamidpropil Dimetilammonio-1-Propansülfonat
CK: Kreatin kinaz
CK-MB: Kreatin kinaz miyokartial band
CL: Kardiyolipin
CYP2E1: Sitokrom p450
DAB: Diaminobenzidin
BPM: Dakikadaki atım
DISC: Ölümü uyarıcı sinyal kompleksi
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
DTT: Dithiothreitol
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
EGTA: Etilenbis(oksonitrilo)tetra-asetat
EKG: Elektrokardiyogram
ER: Endoplazmik retikulum
H₃PO₄: Fosforik asit
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HCl: Hidroklorik asit
HEPES: Hidroksietil piperazinethansülfonik asit
IMM: Mitokondriyal iç membran
IMS: Zarlar arası boşluk
ISO: İsoproterenol
IHD: İskemik kalp hastalıkları
K₂HPO₄: Monopotasyum fosfat
KCl: Potasyum klorür
KOH: Potasyum Hidroksit
LDH: Laktat dehidrogenaz
Meos: Mikrozomal sitokrom p450 sistemi
MgCl₂: Magnezyum Klorür

MI: Miyokart infarktüsü
MI: Mililitre
MLCL AT: Monolizokardiyolipin açıltransferaz
MLCL: Monolizokardiyolipine
Mm: Milimolar
MSD: Modifiye sıvı diyet
NaCl: Sodyum Klorür
NAD: Nikotinamid adenin dinükleotit
NCX: Sodyum kalsiyum değiştirici
ng: Nonagram
NAO: N-nonil- akridin-oranj
Aİ: Apoptotik indeks
OMM: Dış mitokondriyal membran
PA: Fosfotidik asit
PBS: Fosfat tamponu
PG: fosfotidilgliserol
PGP: fosfotidilgliserol fosfata
PLA: Fosfolipaz A2
PLD: Fosfolipaz D
PMNL: Polimorf nüveli lökosit
pNA: p-nitroanilin
PTP: Permabilite transisyon poru
Sn: Saniye
SPSS: Statistical Package for Social Sciences
SD: Standart sapma
TAZ: Tafazzin
TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz
TnI: Troponin I
TNF: Tümör Nekroz Faktör
TnT: Troponin T
TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick and Labeling
VDAC: Voltaja bağlı anyon kanalları

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklar günümüzde batılı ülkelerde mortalite ve morbiditenin en sık sebebidir (Bozbeyoğlu, 2008). Yapılan çalışmalar tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklar sonucu görülen ölüm oranının 1990 ve 2020 yılları arasında % 28,9'dan % 36,3'e yükseleceğini göstermektedir (Abanonu, 2005). Kardiyovasküler hastalıklar içinde de en sık görüleni miyokart infarktüsü (MI)'dür (Halıcı vd., 2006). Miyokartın iskemik nekrozu olarak tanımlanan MI, genellikle toplumun üretken yaş grubunda sıkça görülen, akut dönem sonrası komplikasyonlara bağlı olarak ciddi sorunlara yol açan ve ölümlerle sonuçlanabilen önemli bir toplum sağlığı sorunudur. Son yıllardaki tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen ülkemizde ve sanayileşmiş toplumlarda en önemli morbidite ve mortalite nedenlerindedir (Şentürk, 2008). MI'ı diğer hastalıklardan ayıran en önemli fark ani başlangıçlı olması ve ölümlerin büyük çoğunluğunun ilk saatlerde yaşanıyor olmasıdır. Bu nedenle son elli yıldır birçok bilim adamı MI'ın önlenmesi ve MI sonrası oluşabilecek komplikasyonları azaltmak için sayısız çalışma yapmaktadır (Halıcı vd., 2006).

Aşırı alkol tüketimi ve alkolle ilişkili sorunlar tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Alkol kullanım bozuklukları küresel hastalık yükünün %4'ünü, Türkiye'de erkeklerde hastalık yükünün %1,8'ini oluşturmaktadır. Alkolle ilişkili sorunların gelişimini birçok etken etkilemektedir. İçme sınırlarının ve aşırı alkol tüketimiyle ilişkili risklerin bilinmemesi en önemli etkidir. Tüketim miktarı ve zarar arasında ilişki söz konusudur, alkol miktarı arttıkça zarar riski de artar. Kronik alkol tüketimi uzun süreli tıbbi durumlara (örneğin, karaciğer hasarı, belirli kanserler, alkol bağımlılığı) yol açma riski taşımaktadır. Alkol kullanımının belki de en önemlisi etkisi iskemik kalp hastalığı ile hastalarda ani ölüme neden olmasıdır (Akvardar & Uçku, 2010).

Hem MI'ın hemde kronik alkol kullanımının ayrı ayrı kalp üzerinde zarar verici etkileri söz konusudur. Bu yüzden çalışmamızın iki temel amacı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, miyokart infarktüsü üzerine kronik alkol tüketiminin ratların kalplerinde oluşabilecek miyokartiyal apoptoza etkisinin belirlenmesidir. İkinci ve bizce en önemli amacı, miyokart infarktüsü geçiren ve kronik alkol tüketen ratlarda oluşması beklenen miyokartiyal apoptozun, kalpain inhibitör 1 uygulaması ile önlenmesidir. Kalsiyum bağımlı sitozolik sistein proteaz olan kalpainler miyokart infarktüsünün patofizyolojisinde rol oynamaktadırlar. Miyokartiyal hipoksi boyunca kalpain aktivitesi artmakta ve artan kalpain aktivitesi kalpain inhibitör 1 ile azaltılmaktadır (Neuhof vd., 2004). Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda kalpain inhibisyonunun, reperfüzyon hasarını ve miyokart infarktüsünü azaltarak iyileşmeyi arttırdığı görülmüştür (Neuhof, 2014). Benzer bir sonucu kronik

alkol kullanımı ve miyokart infarktüsünün birlikte olduğu durumda da görmeyi hedefledik.

Bu konunun anlaşılması için apoptotik hücre ölüm yolakları ve histolojisi üzerine yoğunlaşıldı. Apoptotik yolaklar üzerinden açığa çıkan sitokrom c ve kaspaz 3 düzeyleri, sitokrom c salınımında rol oynayan mitokondriyal kardiyolipin içeriği, apoptozun tetiklenmesini sağlayan sistein proteaz kalpain düzeyleri, kan serumlarında miyokart infarktüs markırı kreatin kinaz MB (CK-MB) düzeyleri ve elektrokardiyogram (EKG) ölçümleri ile kalp dokusunda histolojik analizler ile apoptotik indeks ve infarkt alanı belirlendi.

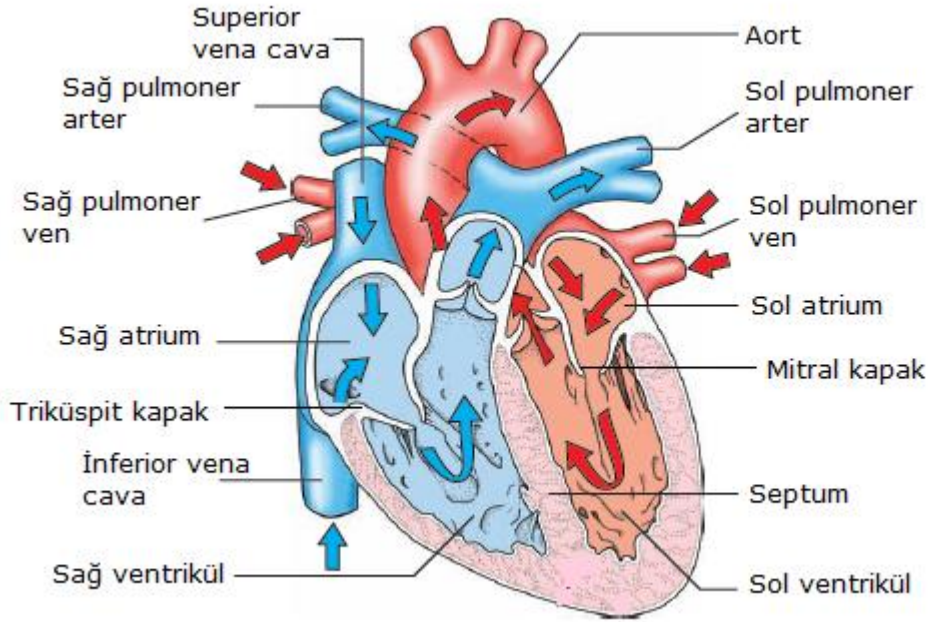
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp

Kardiyovasküler sistem, kanın vücuda dağıldığı geniş bir ağ sistemidir. İki önemli görevi gerçekleştirir. Birinci görevi vücut organlarımız için oksijen ve besin sağlamak, ikinci görevi ise dokulardan metabolizma faaliyetleri sonucu oluşan atık ürünleri uzaklaştırmaktır. Kardiyovasküler sistemin merkezi organı kalptir (Cabin, 1992).

2.1.1. Kalbin Anatomisi

Kalp, göğüs boşluğunun ortasında iki akciğerimizin arasında yer alan kapalı yumruk büyüklüğünde kaslı bir organdır. Ortalama ağırlığı erkeklerde 300-350 gram, kadınlarda 250- 300 gramdır (Shah, Gnanasegaran, Cohon & Buscombe, 2009). İki tanesi solda iki tanesi sağda olmak üzere dört odacıktan oluşur. Kalbin üst kısmındaki odacıklar *atrium (kulakçık)* olarak adlandırılır, venöz sistem ve akciğerlerden gelen kanı alır sonrasında güçülerek kanı ventriküllere pompalarlar. Alt kısımdaki odacıklar *ventrikül (karıncık)* olarak adlandırılır ve atriadan gelen kanı alarak akciğerlere ve vücuda pompalarlar. Sol atria ve sol ventrikül, sağ atria ve sağ ventrikülden duvar benzeri sert bir yapı ile ayrılır ve bu yapıya *septum* adı verilir. Sağ ventrikülün musküler duvarı sol ventriküle göre daha incedir. Sağ taraf kanı sadece akciğerlere pompalarken sol taraf bütün vücuda kan pompalar (Heyden, 2013). Sağdaki kulakçık ve karıncık arasında *triküspit kapak*; soldaki kulakçık ve karıncık arasında ise *mitral kapak* denilen kapaklar vardır. Kalbin sol karıncığından insanın en büyük atardamarı olan ve tüm vücuda oksijenlenmiş kanı taşıyan aort damarı çıkar. Sol karıncık ile aort damarı arasında aort kapağı vardır. Sağ karıncıktan ise akciğerlere oksijenlenmemiş kanı taşıyan pulmoner damar çıkar. Sağ karıncık ile pulmoner damar arasında pulmoner kapak vardır. Kalbin sağ atriyumuna tüm vücuttan gelen kanı toplayan damarlar (vena cava inferior ve vena cava superior) açılır. Bu kan akciğer atardamarı (pulmoner arter) ile sağ ventrikül tarafından akciğere pompalanır. Akciğerlerde oksijenlenmiş olan kan sol atriya açılan 4 adet akciğer toplardamarları (pulmoner venler) ile sol kulakçığa gelir. Oradanda mitral kapaktan geçerek sol karıncığına gelir ve sol karıncık tarafından da tüm vücuda pompalanır. Kalpte yer alan kapaklar kanın bu dolaşımı sırasında, kanın geriye kaçmaksızın tek yönde akmasını sağlarlar (Shah, Gnanasegaran, Cohon & Buscombe, 2009) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Kalbin anatomisi

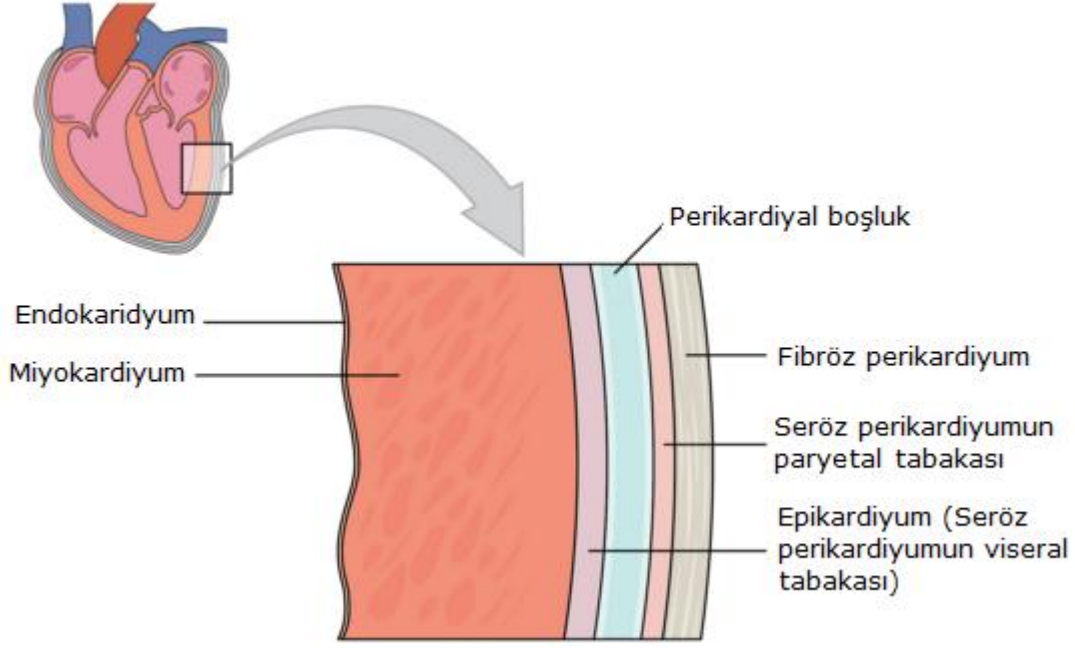
(Heyden, 2013)

Karbondioksit ile zenginleştirilmiş, oksijeni az olan kirli kan (mavi oklar) sistemik dolaşımdan sağ atriüme akar ve sağ ventriküle pompalanır. Daha sonra sağ ventrikülden, kan akciğerlere taşıyan pulmoner artere pompalanır. Akciğerlerde kan karbondioksitini bırakıp oksijeni alır. Oksijenden zengin kan (kırmızı oklar) sol atriüme geri gelir ve sistemik dolaşım aracılığıyla nefes solan vücuda pompalayan ventriküle akar (Heyden, 2013).

Kalp perikardiyal boşluk olarak adlandırılan sıvı dolu bir boşluk içinde yer alır. Perikardiyal boşluğun çevresi ve duvarlar perikardiyum adı verilen özel bir membranla kaplıdır. Perikardiyum seröz bir membran olup kalbin yağlanması için seröz sıvı üretir ve kalbi dış etkilerden ve çevresindeki organlarla sürtünmesinden korur. Yağlanmanın yanı sıra, perikardiyum kalbi durduğu pozisyonda tutmaya yarar. Perikardiyum iki tabakadan oluşur. Viseral tabaka kalbin dış kısmını kaplar, paryetal tabaka perikardiyal boşluğun dış çevresinde bir kese oluşturur (Martini, Timmons & Tallitsch, 2015)

Kalp dıştan içe doğru epikardiyum, miyokartiyum ve endokardiyum olmak üzere 3 tabakadan oluşur. Epikardiyumun diğer adı perikardiyumun viseral tabakası olarak geçer. Bu sebeple de ince bir seröz membrandır ve kalbin yağlanmasına ve dış kısmının korunmasına yardımcı olur. Epikardiyumun altındaki kalın miyokartiyum tabakası kardiyak kas dokusundan yapılmıştır, kan kapilleri, lenf kapilleri ve sinir lifleri ile zengindir. Kanı, kalbin odacıkları dışına pompalar. En içteki tabaka endokardiyum olarak

adlandırılır ve epitelyum doku ve elastik ve kollajen fiberleri, bağ dokusu, kan damarları ve kardiyak kas fiberleri olarak bilinen Purkinje hücrelerinden oluşur. Endokardiyum kalp içinde bulunan kanın tutulmasından sorumludur (Martini, Timmons & Tallitsch, 2015). (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Kalp duvarının tabakaları

(Heyden, 2013).

2.2. Miyokart İnfarktüsü ve Tanısı

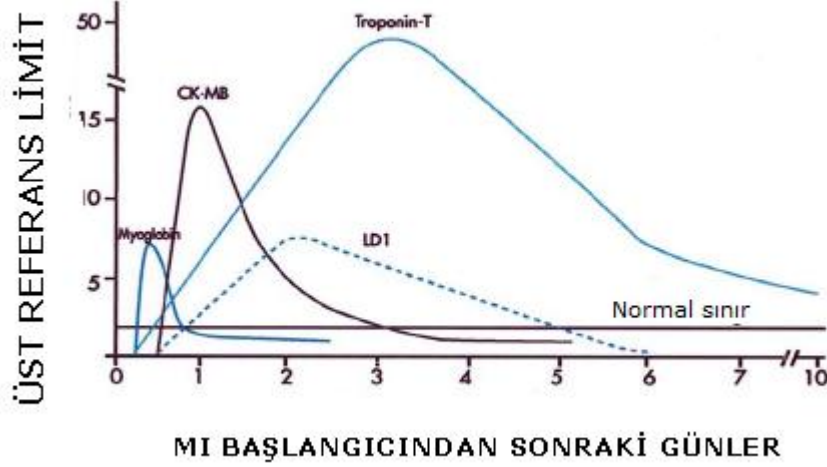
Kalp krizi, miyokartiyal infarktüs (miyo=kas, cardial=kalp, infarction=hasar) ve MI olarak da bilinir (Heyden, 2013). MI, yetersiz doku perfüzyonundan kaynaklanan uzamış iskemi sonucu meydana gelen geri dönüşümsüz miyokart hücre hasarı ve nekrozudur (Başarılı, 2007). Angina pectori, miyokart infarktüsü, iskemik kardiyomiyopati ve ani kardiyak ölüm miyokartiyal iskemi sonucu görülen klinik sendromlardır (Şentürk, 2008).

Miyokart infarktüsü teşhisi aşağıdaki değerlendirmeler sonucu yapılır:

- Semptomlar (göğüs ağrısı, sıkıştırma, yanma),
- Hikaye
- Fiziksel muayene (kalp fonksiyonundaki değişiklikler stretoskop ile duyulabilmektedir)
- Elektrokardiyogram (EKG) (son değişiklikleri bile gösterir)
- Kan testleri (Şentürk, 2008)

EKG'nin tanısal özgüllüğü yaklaşık %100, tanısal duyarlılığı %63-82 olduğundan tanı koymada serum kardiyak belirleyicilere ihtiyaç duyulur

(Şentürk, 2008). Miyokartiyal hücreler nekroza uğradıklarında zar bütünlüğü bozulur ve hücre içi makromoleküler yapı lenfatikler ile dolaşıma geçerler. Bunlara "serum kardiyak belirteçler" denir (Sağlam, 2006). Kreatin kinaz (CK) izoenzimleri, laktat dehidrogenaz (LDH), miyogloblin ve troponin I (TnI) ve troponin T (TnT) en sık kullanılanlardır. Kardiyak belirteçlerin molekül ağırlıkları ve hasar sonrası salınımları farklılık göstermektedir (Şekil 2.3) (Şentürk, 2008)



Şekil 2.3: MI belirteçlerinin zamana göre salınımları

(Şentürk, 2008)

Plazma konsantrasyonlarında kardiyak enzimlerin yükselişi, miyokart nekrozunun yaygınlığına ve bu enzimlerin dolaşıma karışmasına bağlıdır (Şentürk, 2008). Optimal bir özgünlük için; biyokimyasal belirteçlerin miyokart dokusunda yüksek oranda bulunması gerekirken başka dokuda ve serumda hiç bulunmaması gerekir. Optimal duyarlılık için ise miyokart hasarını takiben süratle seruma çıkması ve serumdaki miktarı ile hasarın derecesi arasında uyum olması gereklidir. Ayrıca ölçüm metodunun tanıya olanak sağlayacak kadar yeterli sürede serumda yüksek düzeyde kalması önemlidir (Sağlam, 2006). Bu sebeple araştırmamızda kardiyak testlerinden birisi olan kreatin kinaz izoenzimi miyokartiyal band (CK-MB) aktivitesi on ikinci saatte ölçülebilecek en uygun test olarak kullanıldı.

2.2.1.Kreatin kinaz ve izoenzimleri

Kreatin kinaz (EC 2.7.3.2) enzimi, yüksek enerjili fosfat gruplarının geçici bir depolanma şekli olan fosfokreatinden, fosfat grubunu adenozin difosfat (ADP)'a transfer ederek adenozin trifosfat (ATP)'in oluşumunu ve

kreatinin, ATP tarafından tekrar fosfokreatine fosforillenmesini katalizler (Bong, vd., 2008) (Şekil 2.4).



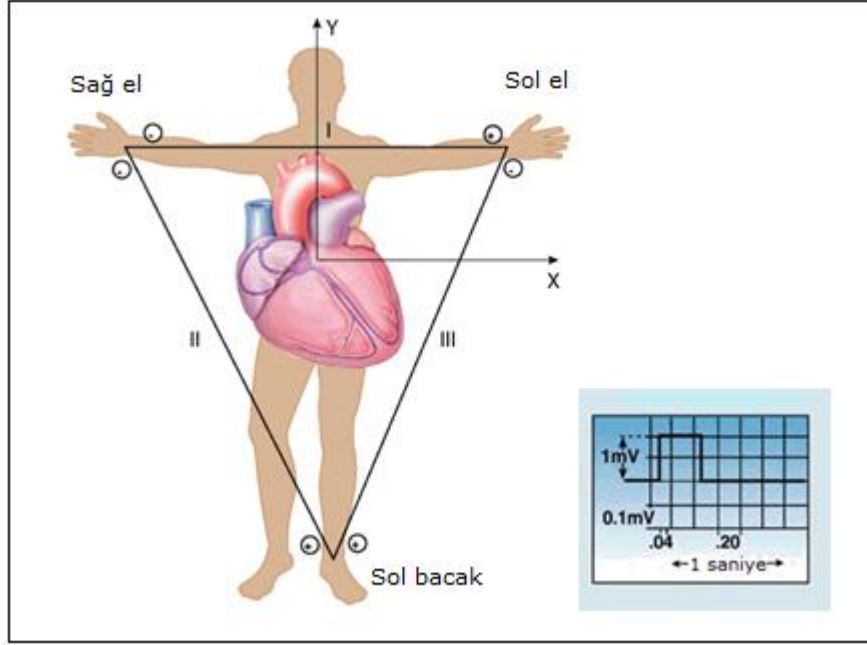
Şekil 2.4: Kreatin kinaz

(Schlattner, Eder, Dolder, Khucha, & Strauss, 2000)

CK, her biri 40 kD olan iki alt üniteden oluşan dimerik bir enzimdir. Monomerler B (brain) ve M (muscle) harfleri ile tanımlanmaktadır. Monomerler farklı şekilde bağlanarak farklı izoenzimleri oluştururlar. Canlı organizmalarda iskelet kasında (CK-MM), kalp kasında (CK-MB) ve sinir dokusunda (CK-BB) olmak üzere üç izoenzimi vardır (Etem, Etem, Yıldırım, Ulutaş & Ünal, 2011). MI sonrasında CK-MB, total serum CK'nın %5'inden daha fazla yükselir. İnfarktüs genişliği, CK-MB yükselme seviyesi ile tahmin edilebilir. CK-MB düzeyleri akut miyokart infarktüsünün tanısında altın standart olarak kullanılmaktadır (Şentürk, 2008).

2.2.2. Elektrokardiyogram (EKG)

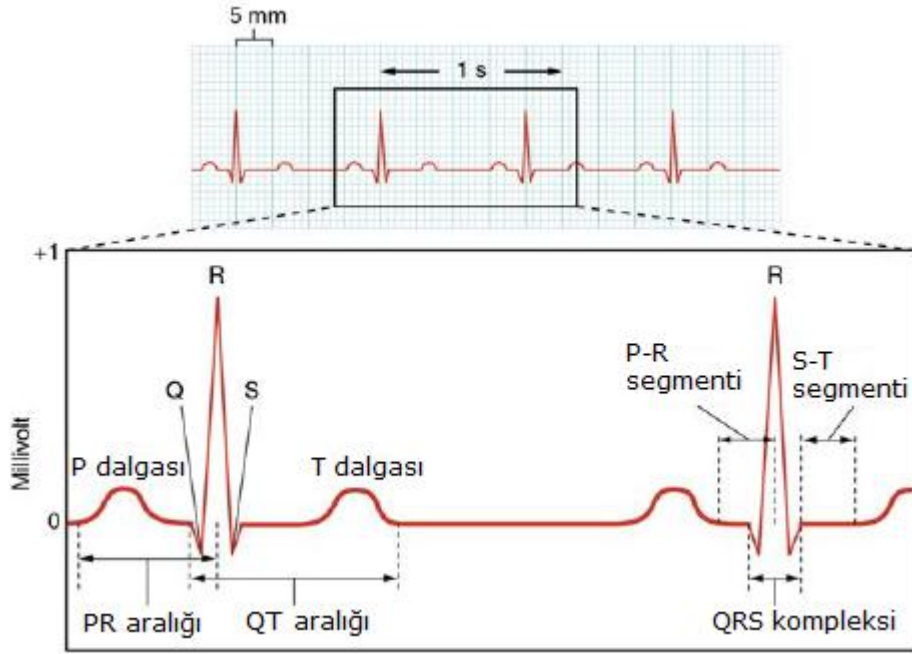
Kalp kendi kendine uyarı oluşturarak ritmik kasılma gösteren kastır. EKG, kalbin çalışması sırasında oluşan elektriksel aktivitelerin vücudun değişik yerlerine konulan elektrotlar aracılığıyla milimetrik kâğıtlar üzerine kaydedilmesi esasına dayanır. EKG ritim, iletim bozukluklarının tanısında en değerli yöntemdir. Kolay uygulanması, invazif olmaması, kısa sürmesi ve ucuz olması en önemli avantajlarıdır (Doğan, Toprak, Onrat & Dursun, 2011). EKG kaydı için kollara, bacaklara ve göğüs duvarı üzerindeki belirli bölgelere metal elektrotlar yerleştirilir. Bu elektrotlar kablolar aracılığıyla EKG aletine bağlıdır. EKG aletinin hareketli metal iğnesi elektriksel değişiklikleri dönen bir kâğıda kaydeder. Kalpteki elektriksel aktivasyon pozitif elektrotun yerleştirildiği bölgeye doğru ise (+) pozitif, pozitif elektrottan uzaklaşıyorsa (-) negatif bir defleksiyon oluşturur. Bu defleksiyonların genliği milimetre (mm), süresi saniye (sn) olarak hesaplanır (Öztürk, 2006). (Şekil 2.5)



Şekil 2.5: EKG sistemi

(<http://www.sci.utah.edu/~macleod/bioen/be6000/labnotes/ecg/descrip.html>,
<http://ecg.utah.edu/lesson/1#ecgwaves>)

Bir elektrokardiyogram P dalgası, QRS kompleksi ve T dalgasından oluşur. QRS kompleksi üç ayrı dalga olan Q, R ve S dalgalarından oluşur (Şekil 2.6). P dalgası, atriyal kasılma olmadan önce atriyumun depolarize olması sırasında oluşan elektrik potansiyelleri etkisiyle görülür. Atriyumların depolarizasyonunu yansıtır. QRS kompleksi, ventriküller kasılmadan önce, depolarize olduğunda üretilen potansiyellerle ortaya çıkar. Ventriküllerin depolarizasyonunu yansıtır. Sonuç olarak hem P dalgası hem de QRS kompleksi depolarizasyon dalgalarıdır. T dalgası, ventriküler depolarizasyon evresinden çıkarken oluşan potansiyellerle ortaya çıkar. Bu işlem normalde depolarizasyondan 0,25 ile 0,35 saniye sonra görülür. T dalgası repolarizasyon dalgası olarak bilinir. Sonuçta elektrokardiyogram, depolarizasyon ve repolarizasyon dalgalarından meydana gelmiştir (Özcan, 2010).

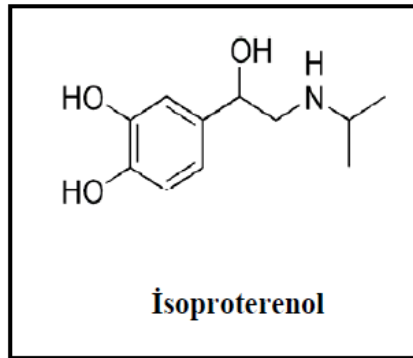


Şekil 2.6: EKG

(Heyden, 2013).

2.3. İsoproterenol (ISO) İle Deneysel Miyokart İnfarktüsü Oluşturulması

Sentetik bir katekolamin olan İsoproterenol'ün (ISO) sistemik ismi 4-(1-hidroksi-2-[(metiletil)amino]etil)-1,2-benzendiol hidroklorit olup kapalı formülü $C_{11}H_{17}NO_3 \cdot HCl$ 'dir ve molekül ağırlığı 242,72 g'dır (Şekil 2.7). Yapı olarak adrenaline çok benzemekle beraber sadece β_1 ve β_2 reseptörlerini uyarır ve α reseptörlerini hiç etkilemez (Şentürk, 2008).



Şekil 2.7: İsoproterenolün yapısı

(Şentürk, 2008)

Katekolaminler miyokartın kasılma yeteneği ve metabolizmasının önemli düzenleyicisidirler. Sadece normal kardiyovasküler düzenlemede değil iskemik kalp hastalıkları ve kalp yetmezliği gibi hastalıklarda önemli yere sahiptirler. Sağlıklı koşullarda kalpteki dolaşım ve dokudaki katekolamin konsantrasyonu nanomolar düzeydedir. Ancak iskemi gibi patofizyolojik durumlarda, bu sınır mikromolar düzeye çıkabilir. Katekolaminlerin aşırı endojen salınımı ve ekzojen alınımı kardiyak kas hücrelerinin enerji rezervlerini tüketir. Bu durum nekrozu başlatıp geri dönüşümsüz hücre hasarına neden olan biyokimyasal ve yapısal değişikliklerine yol açar (Senthil, Sridevi & Pugalendi, 2007). Yapılan çalışmalarda ratlarda yüksek doz ISO uygulamasının insanda oluşan MI'daki patofizyolojik değişikliklerle aynı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Kısacası ratlara yüksek doz ISO uygulaması insanlarda oluşan MI'ın tüm biyokimyasal, fizyopatolojik ve histopatolojik değişiklikleri ile birebir örtüşmektedir. Bu nedenle ISO ile indüklenen MI modeli iyi standardize edilmiş bir modeldir ve birçok ilacın yararlı etkilerini veya kardiyak fonksiyonlar üzerine olan etkisini araştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır (Halıcı vd., 2006). ISO ile indüklenen hasar sol ventrikülerin subendokardiyal bölgesinde ve intraventriküler septumda maksimumdur (Upaganlawar, Gandhi & Balaraman, 2011). ISO ile indüklenen miyokartiyal hasarın mekanizması tam olarak bilinmese de çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Bunlardan en önemlisi, katekolaminlerin otooksidasyonu ile sitotoksik serbest radikallerin üretimidir. Serbest radikal aracılı membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu ve peroksidasyon sonrası mitokondri membranında bütünlük ve fonksiyon kaybı meydana getiren membran permeabilitesindeki değişiklikler ISO ile indüklenen kardiyotoksisiteden sorumludur (Ganesan, Rajesh, Anandan & Dhandapani, 2007; Sharma, Kishore, Gupta, Joshi & Arya, 2001). Sıklık adenozin monofosfat (cAMP) düzeylerindeki artış, intrasellüler kalsiyum artışı ve yüksek enerjili fosfatların tüketilerek enerji rezervlerinin boşaltılması da önemli faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır (Şentürk, 2008).

2.4. Alkol Tüketimi

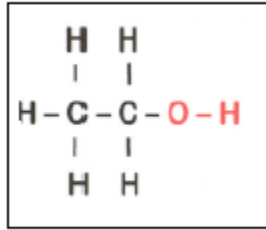
Alkollü içeceklerin tüketimi toplumların çoğunda görülen, çok eski uygarlıklardan günümüze kadar uzanan ve oldukça sık rastlanan bir alışkanlıktır (Çelik, Görgülü & Tezel, 2002). Halk arasında 'alkol' olarak adlandırılan "etil alkol" ya da "etil alkol içeren içecekler" ilk çağlardan itibaren insanlar tarafından kullanılan keyif verici maddeler arasında yer almaktadır (Özcan, 2008). Bilinen ilk bira 8 bin yıl önce Mezopotamyalıların arpayı ekmek yapmak için ıslah etmesiyle yapılmıştır. Bundan 6 bin yıl önce de Sümerlerin Godin tepelerinde bira ve şarap içtiği bilinmektedir. Daha sonra insanoğlunun yerleşik düzene geçmesiyle alkol üretimi ve tüketimi giderek artmıştır (Çelik vd., 2002). Kişilerin gelirlerinin ve refah düzeylerinin artması alkole ulaşmayı kolaylaştırmakta ve arttırmaktadır. Öte yandan üzüntüler ve

stres de alkol kullanımı arttırmaktadır. Bu gibi durumlar daha sonra yüksek doz alkol alımını ve alkol bağımlılığını ortaya çıkarmıştır (İlter & Tekin, 2005).

Yapılan araştırmalara göre hafif ve orta derecede alkol tüketiminin kardiyovasküler sistem üzerine faydalı olduğu, fazla tüketiminin ise sağlığı olumsuz etkilediği yönündedir. Gözlemsel ve metabolik çalışmalarda kardiyovasküler yararın günde 1-2 kadeh (çoğu kez herhangi bir içkinin bir kadehinden bahsedilirken 10-15 g etanol içerdiği kabul edilmektedir) alkollü içeceklerle görüldüğü belirtilmiştir (Çelik vd., 2002). Ancak yüksek dozda kronik alkol tüketimi hipertansiyon, kardiyomiyopati, miyokart infarktüsü gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıklara yol açmakta ve bu hastalıklar sonucu meydana gelen ölüm riskini artırmaktadır (Baysan vd., 2005).

2.4.1. Alkol ve metabolizması

Alkol terimi, doymuş bir karbon atomuna bağlı hidroksil grubundan oluşan geniş bir grup organik molekülü kapsar. Alkol (etanol) basit bir moleküldür ve karbonhidratların fermantasyonu veya distilasyonu sonucu elde edilmektedir. Etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$) renksiz, uçucu, kendine özgü kokusu ve tadı olan yanıcı bir sıvıdır (Özcan, 2008) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Etanolün yapısı

(Özcan, 2008)

Vücuttaki alkolün %90 'ından fazlası asetik aside okside edilir. Geriye kalan küçük bir kısmı ise ter, idrar ve nefes ile vücuttan uzaklaştırılır. Oksidasyon karaciğerde çeşitli yöntemlerle gerçekleşir. Ana yolak alkölü asetaldehide okside eden sitozolik enzim olan alkol dehidrogenazdır (ADH). Yüksek alkol konsantrasyonlarında oksidasyon mikrozomal sitokrom p450 sistemi (Meos) ile katalize edilmektedir. Az bir miktarı da katalaz bağımlı oksidasyon ile gerçekleştirilir (Mukherjee, 2014).

2.4.1.1. Alkol dehidrogenaz (ADH) yolağı

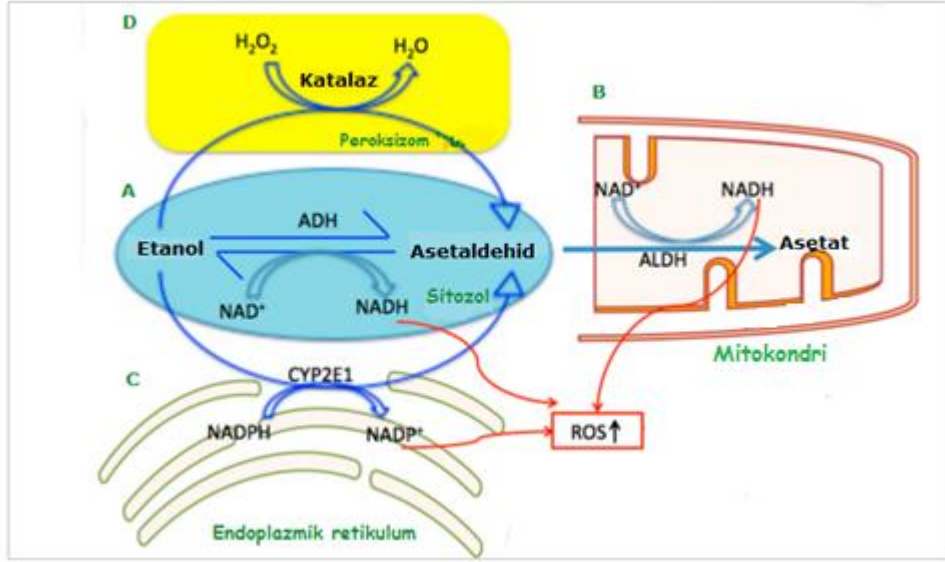
Alkol dehidrogenaz (EC.1.1.1.1) enzimi etanolü asetaldehide okside eder (Salman, 2007). Bu oksidasyon işlemi sırasında nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) iki elektronunu vererek NADH meydana getirir. NADH oksidatif fosforilasyonla ATP üretmek için kullanılır (Smith, Marks & Lieberman, 2007) (Şekil 2. 9A). Oluşan asetaldehid mitokondride yer alan aldehid dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenerek asetat elde edilir (Salman, 2007). Asetatın büyük bir kısmı kana geçer ve iskelet kasları ile diğer dokular tarafından alınıp asetil KoA'ya aktive edilerek krebs döngüsünde okside edilir (Smith vd., 2007) (Şekil 2. 9B).

2.4.1.2. Mikrozomal etanol okside edici sistem (MeOS)

Alınan etanolün küçük bir kısmı (%10-20) sitokrom p450 (özellikle CYP2E1) bağımlı olan bu yoldan okside edilir. Bu sistem düz endoplazmik retikulumda lokalizedir. CYP2E1 etanol için yüksek bir Km'e sahiptir. CYP2E1 göreceli olarak NADP⁺ kullanarak yüksek indirgeme potansiyeline sahiptir. Bu durum serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur (Ramchandani & Watson, 2013) (Şekil 2. 9C).

2.4.1.3. Katalaz

Etanol metabolizmasındaki bir diğer yolak peroksizomlarda bulunan katalaz yolağıdır. Katalaz yolağı H₂O₂ varlığında invitro olarak etanolü okside eder (Zakhari, 2006). Katalaz enzimine sahip olmayan kişilerin bile etanol alımını takiben asemptomatik oldukları bilindiğinden katalaz yolağı etanol metabolizmasında önemli bir role sahip değildir (İlter & Tekin, 2005) (Şekil 2. 9D).



Şekil 2.9: Etanol metabolizması

(Li vd., 2015)

2.4.1.4. Non oksidatif alkol metabolizması

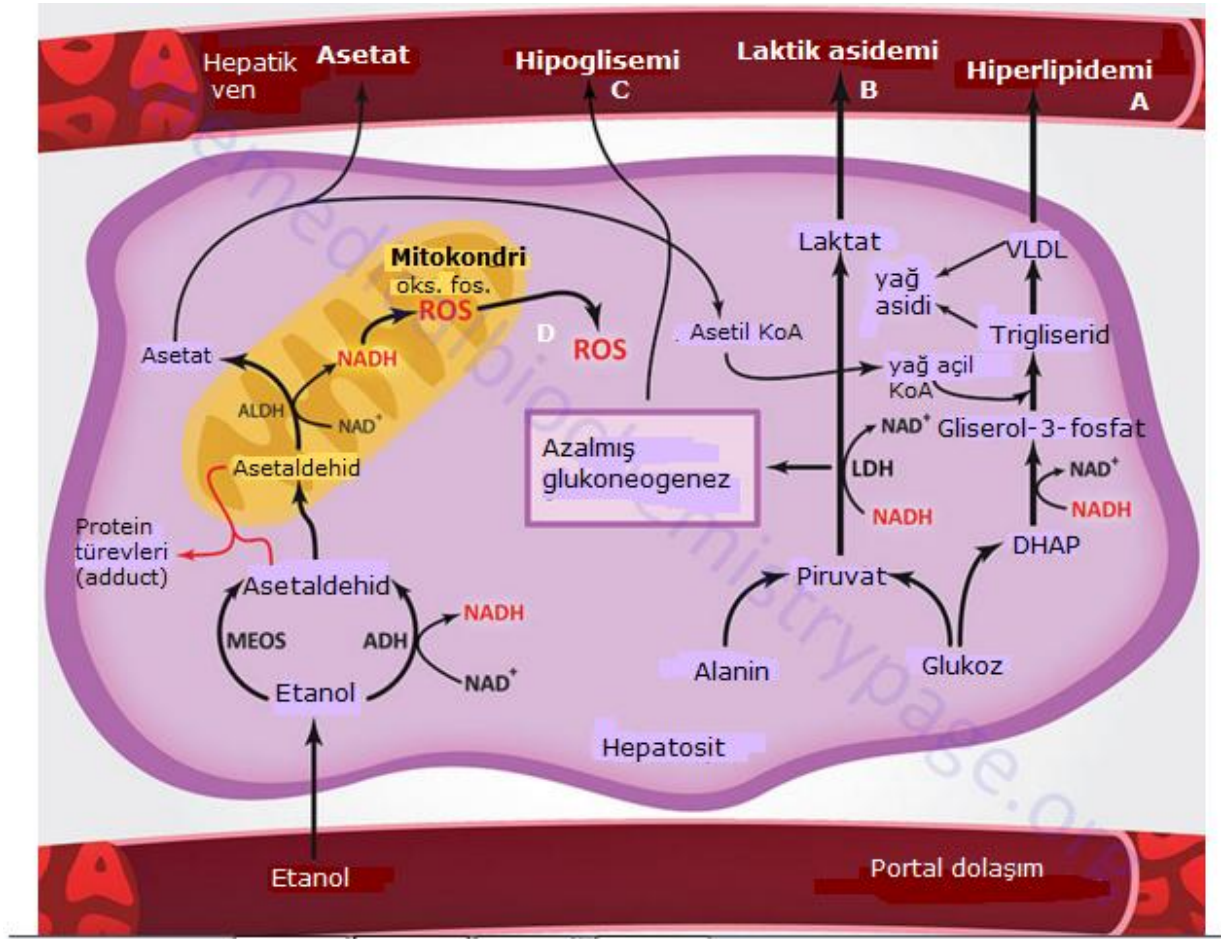
Alkol çeşitli yollar tarafından non oksidatif olarak da metabolize edilir. Birinci yolda alkolün yağ asitleri ile reaksiyonundan yağ asidi etil esterleri oluşur. Diğer yolda fosfotidil etanol gibi fosfor içeren yağ molekülleri oluşur. Bir diğer yolda fosfotidik asit (PA) oluşturmak üzere fosfolipidleri ayıran fosfolipaz D (PLD) enzimi gereklidir. Fosfolipaz D'nin etanol için Km değeri yüksektir ve bu enzimatik reaksiyon yüksek alkol konsantrasyonlarında gerçekleşir (Zakhari, 2006).

2.4.2. Alkol metabolitleri

- **NADH/NAD⁺ oranındaki değişikliğin etkileri:** Etanolün sindiriminden sonra hem sitozolik alkol dehidrojenaz reaksiyonu ile hem mitokondriyal aldehit dehidrojenaz reaksiyonu ile NADH+H⁺ üretilir ve NAD⁺ tüketimi sonucu NADH+H⁺/NAD⁺ belirgin derecede artar. Artan NADH yağ asidi oksidasyon yolağı üzerinde inhibitör etki yapar. Bu sebeple de etanol metabolizması sonucu oluşan aşırı miktarda NADH yağ asidi sentezini tetikler. Karaciğerde triaçilgliseroller birikerek karaciğer yağlanmasına sebep olur (Salman, 2007) (Şekil 2. 10A). Sitrik asit (Krebs) döngüsü baskılanır. Laktat/pürivat oranı artarak hiperlaktikasidemi gelişir; hiperürisemi ortaya çıkar ve ürik asidin idrarla atılımı azalır (Şekil 2. 10B). Karaciğerde glukoneogenesis baskılanarak glikojen depoları azalır ve bunun sonucunda kan şekeri düşer (Şekil 2. 10C). Alkolün akut alımında ise glikojen

depolarından glikoza dönüşüm sonucu kan şekeri yükselir. Serum lipoprotein ve trigliserid düzeylerinde artış olur (Bağış, 2013).

- **Asetaldehid:** Alkolün oksidatif metabolizması sonucu oluşan asetaldehid çeşitli yollarla hücre ve dokularda hasara neden olur. Asetaldehid proteinlere bağlanarak protein türevleri (adduct) oluşturur. Oluşan bu protein türevleri hepatositlerde protein salgısını bozar. Serbest radikal harabiyetini artırır (Şekil 2. 11D). Glutatyona direkt olarak bağlanır ve bu molekülün H_2O_2 'ye karşı koruma ve lipid peroksidasyonunu önleme becerisini azaltır (Manzo-Avalos & Molina, 2010). Etanolün kronik şekilde alınması ile mitokondriler harabiyete uğrar, elektron taşıma hızı inhibe olur ve oksidatif fosforilasyonla ATP üretiminde azalma görülür. (Smith vd., 2007). Aynı zamanda, mitokondriyal iç/dış membran (IMM/OMM) geçirgenliğini, membran permabilite transisyon porlarının (PTP) açılmasını ve voltaja bağlı anyon kanalları (VDAC) ile kompleks oluşturan proapoptotik faktör bax'ın translokasyonunu etkiler. Mitokondriyal permeabilite transisyon porları genişlediğinde, mitokondriyal şişme meydana gelir ve sitokrom c salınımına izin verilerek apoptoz başlatılır (Manzo-Avalos & Molina, 2010).



Şekil 2. 10: Etanolün metabolitlerinin etkileri

(King, 1996)

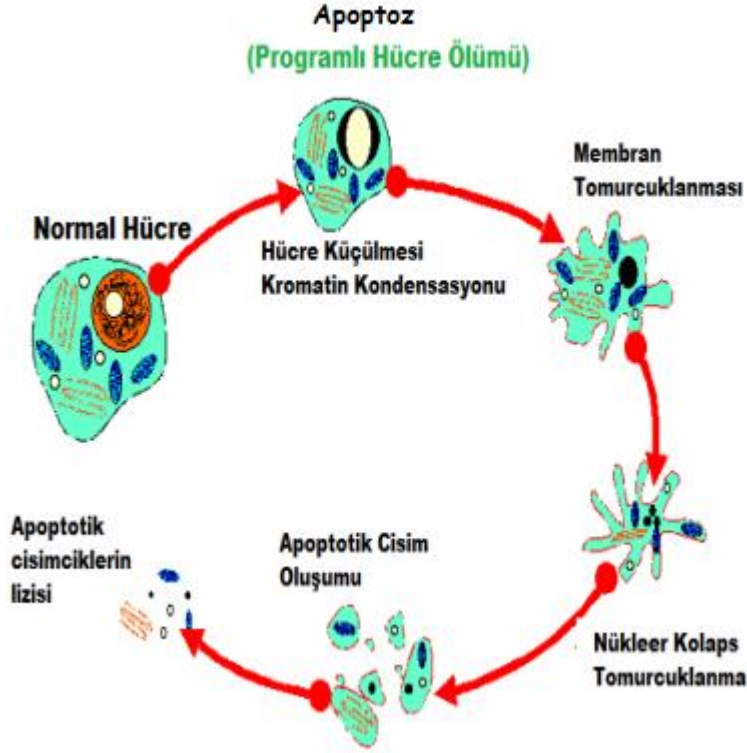
2.5. Apoptotik Hücre Ölümü

Hücre ölümü çok hücreli organizmaların normal fonksiyonlarının işleyişi için gereklidir (Bras, Queenan & Susin, 2005). Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılır böylelikle denge korunmuş olur. Hücre ölümü, hücrelerdeki normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terimi ise ilk kez 1965 yılında terim olarak kullanılmıştır (Yılmaz, 2005). Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tarif edilmiştir. Kerr fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı "büzüşme nekrozu" olarak adlandırmıştır. Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptozu, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre

için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir. 1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozu seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptoza yönlendirdiğini bildirmiştir. Böylece apoptozun genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır. Apoptoz genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla düzenlenmektedir. *Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı* apoptoz ile eş anlamlı olarak kullanılabilen terimlerdir. (Yılmaz, 2005; Arslanyüreği, 2009).

2.5.1. Apoptozun morfolojisi

Apoptoza uğramış hücrelerde hücre küçülür, deformasyona uğrar ve komşu hücrelerle bağlantısını kaybeder. Kromatinleri yoğunlaşır ve nükleer membran etrafında toplanır. Hücre yüzeyinde çıkıntı ve tomurcuklanma görülür ve son olarak hücre parçalanarak apoptotik cisimcikler oluşur. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır ve değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Oluşan apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından yutulur ve bir inflamatuvar yanıtı neden olmadan dokudan uzaklaştırılırlar (Gewies, 2003). Apoptozun en önemli özgül yönü DNA'nın DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven "ladder pattern" görüntüsünün ortaya çıkmasına neden olur. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar. (Ulukaya, 2003) (Şekil 2. 11)



2.5.2. Apoptozun mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları karmaşık ve enerji gerektiren olaylar dizisidir. Apoptoz üç yoldan tetiklenmektedir:

1. Endoplazmik retikulum aracılı yolak
2. Ekstrinsik veya ölüm reseptör aracılı yolak
3. İntrensik veya mitokondriyal yolak

Bu üç hücrel ölüm mekanizmasının başlangıç noktaları ve bu mekanizmalarda işlev gösteren proteinler farklı olmasına rağmen, kaspaz 3/7 sisteminin işlevselleştirilmesi ve apoptoza özgün morfolojinin (hücre büzülmesi, kromozom yoğunlaşması, kromozomal DNA'nın parçalanması ve nükleer ve hücre iskelet proteinlerinin parçalanması) ortaya çıkması bu üç ölüm mekanizmasında ortaktır (Yıldırım, Koçak & Yıldırım, 2012).

2.5.2.1. Endoplazmik retikulum (ER) aracılı yolak

Hipoksi, oksidatif stres kalsiyum dengesindeki bozukluklar endoplazmik retikulumda stres oluşturan ajanlardır (Logue, Gorman, Cleary, Keogh & Samali, 2013). ER stresi ile indüklenen hücre ölümü gelişiminde 3 ayrı yolak tespit edilmiştir. Bunlardan ilki, fizyolojik koşullarda sentezlenmeyen ya da düşük düzeyde sentezlenen transkripsiyon faktör ailesinin üyesi olan CHOP/GADD153 geninin transkripsiyonel düzeyde uyarılmasıdır. CHOP'un aşırı uyarılması ile büyümede duraklama ve apoptoz meydana gelir. İkinci apoptotik yol gen ekspresyonunu düzenleyen ve stres durumunda apoptoz ile hayatta kalma arasında verilecek karara katılan sinyal ileti proteinlerinin bir ailesi olan JNK aktivasyonudur. ER stresi JNK'ları IRE1 üzerinden aktive eder. JNK aktivasyonunun ve p38 yolunun devamlılığı apoptoz sinyal düzenleyici kinaz (ASK1)'in aktivasyonunu gerektirir ve hücre apoptoza gider. Üçüncü yol ise ER membranının sitozolik tarafında lokalize olan kaspaz 12'nin aktive edildiği yolaktır. ER stresi ile aktive edilir. Kaspaz 12 ayrıca m-kalpain, IRE1/ TRAF2 ve kaspaz 7 tarafından da aktive edilmektedir (Çelik, Şen & Hazman, 2015). Aktif kaspaz 9 'da diğer efektör kaspazları aktive ederek apoptoza neden olmaktadır (Logue vd., 2013).

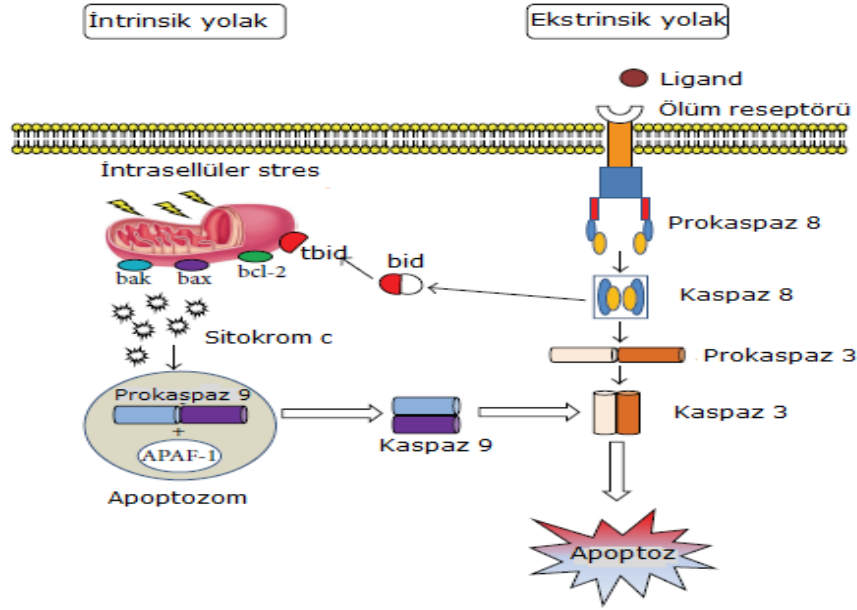
2.5.2.2. Ekstrinsik (ölüm reseptör aracılı) yolak

Bu yolak hücre zarında bulunan ve ölüm reseptörleri olarak da adlandırılan proteinler tarafından ölüm uyarısının hücre içerisine iletilmesi ile başlamaktadır. Ekstrinsik hücre ölüm mekanizmasında en iyi çalışılmış olan reseptörler Fas reseptörü ve TNF (Tümör Nekroz Faktör) reseptörü-1'dir. Ölüm reseptörleri, ligandları ile bağlandıktan sonra reseptörün hücre içi kısmında ölüm domaini varlığında konformasyonel değişiklik meydana gelir. Bu protein kompleksi DISC olarak adlandırılır (Ölümü uyaran sinyal kompleksi, DISC: The death inducing signaling complex) (Dash). Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8 aktifleşir. Aktif kaspaz-8 de iki yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Ya direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her iki yolla da aktive olan kaspaz-3 DNA fragmantasyonuna neden olur (Coşkun & Özgür, 2011) (Şekil 2.12)

2.5.2.3. İntrensik (mitokondriyal) yolak

İntrensik veya mitokondriyal yolak DNA hasarı gibi birçok uyaran tarafından tetiklenir (Bras vd., 2005). Mitokondri apoptozun başlatılmasında önemli rol oynar. İç zar, dış zar ve zarlar arası boşluktan (IMS) oluşan mitokondride özellikle IMS'de yer alan bazı proteinlerin salınımı apoptotik

hücre ölümünün erken aşamalarında gözlenmiştir. Bu proteinler arasında apoptoz indükleyici faktör, Smac/DIABLO ve sitokrom c yer almaktadır (Ott, Robertson, Gogvadze, Zhitovsky, & Orrenius, 2002). Mitokondrinin dış zarında ise Bcl-2 ailesi proteinleri bulunmaktadır. Bunlar apoptozun oluşumunu sağlayan (pro-apoptotik) veya sağlamayan (anti-apoptotik) olarak iki gruba ayrılır. Bu proteinler hücrelerin yaşam ile ölüm arasındaki dengesini oluştururlar. Pro-apoptotik proteinler (örn: Bax) mitokondrinin membran geçirgenliğini bozarak sitokrom c salınmasını sağlar (Favaloro, Allocati, Graziano, Di Ilio & De Laurenzi, 2012). Mitokondriden sitokrom c salınımı apoptotik yolağı başlatan birincil ve önemli basamaktır (Ott vd., 2002). Sitozole salınan sitokrom c, Apaf-1 adı verilen protein ve prokaspaz 9 ile apoptozomu oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'u aktif hale getirir ve bu da kaspaz-3'ü aktive eder (Norberg vd., 2008). Kaspaz 3 nükleusa göç ederek orada DNA fragmentasyonuna ve hücre ölümüne neden olur (O'brien & Kirby, 2008)(Şekil 2.12).

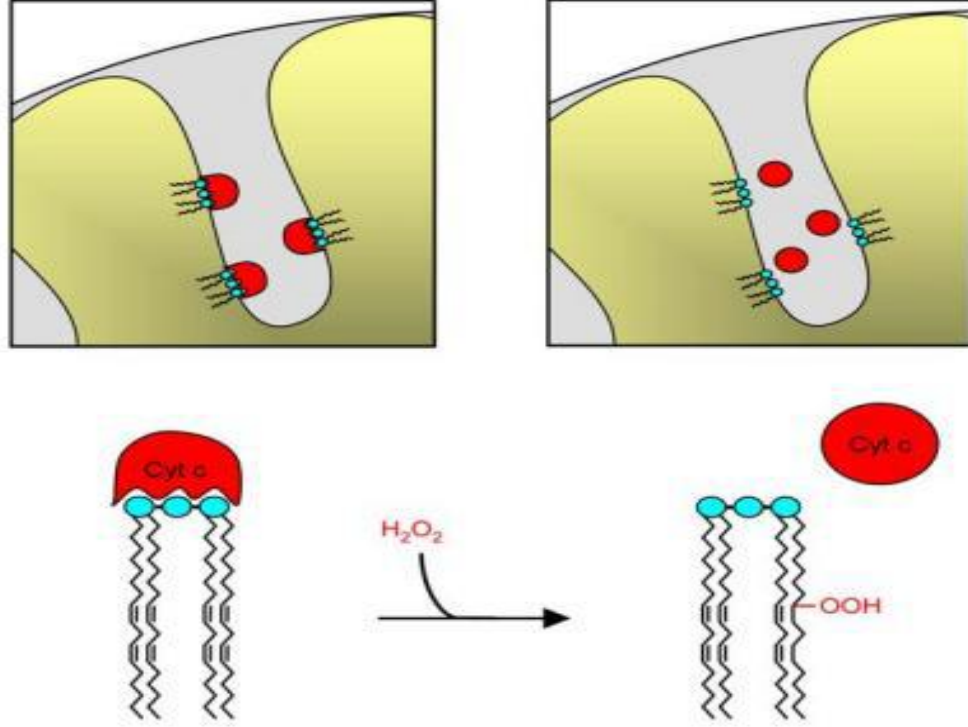


Şekil 2.12: İntinsik ve ekstrinsik yolaklar

(Loreto vd., 2014)

2.5.3. Sitokrom c- kardiyolipin (CL) ilişkisi

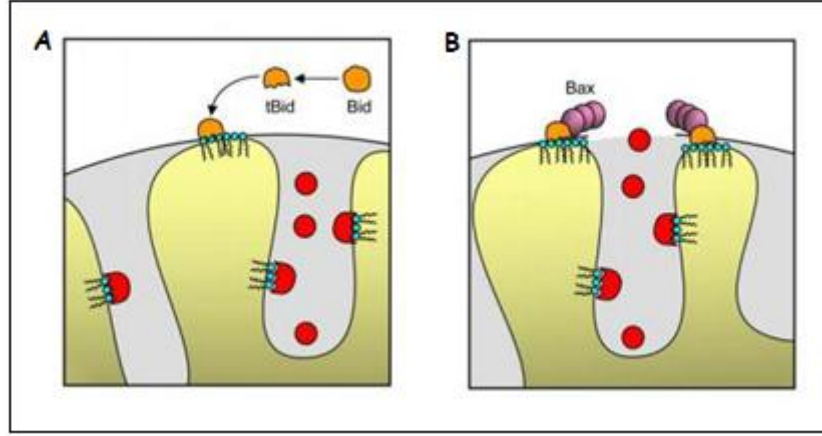
Sitokrom c iç membrana anyonik fosfolipid olan kardiyolipin ile bağlıdır (Ott vd., 2002). Sitokrom c'nin mitokondriden salınımı için öncelikle kardiyolipinden ayrılması gereklidir. Kardiyolipin peroksidasyonu iç membrandan sitokrom c'nin salınmasını sağlar (Şekil 2. 13).



Şekil 2. 13: Sitokrom c – kardiyolipin etkileşimi.

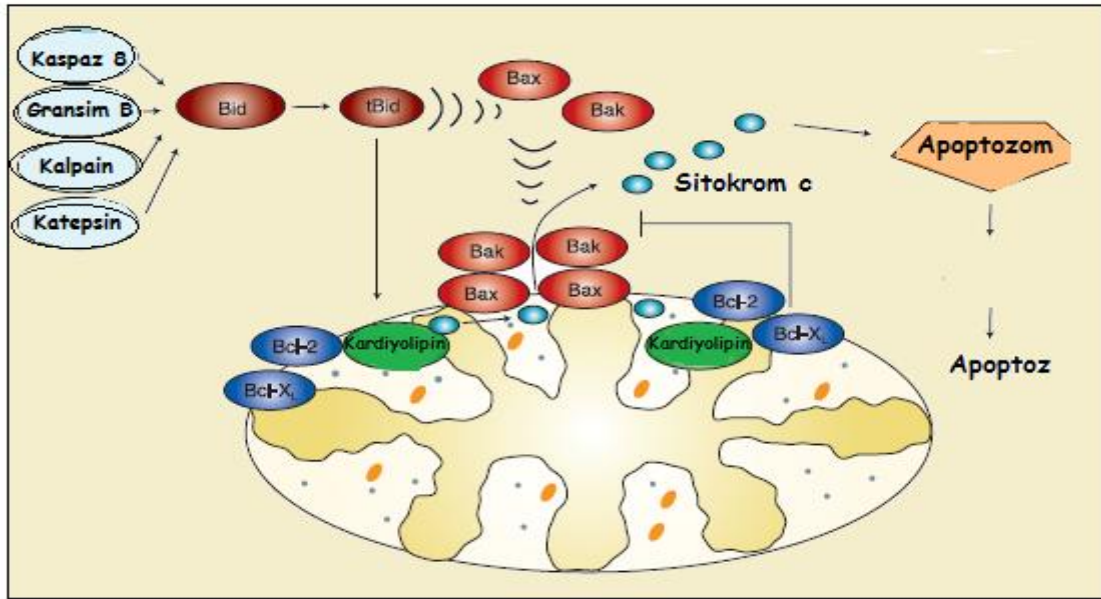
(Gonzalvez & Gottlieb, 2007)

Sitokrom c (kırmızı) iç mitokondrial membranın dış yüzeyinde kardiyolipin ile bağlıdır ve bu nedenle mitokondrial dış membranın permeabilitesi sitokrom c için yeterli değildir. Sitokrom c'nin kardiyolipinden (mavi) ayrılması için dış membran geçirgenliği için bir aşama gerektirir ve bu aşama kardiyolipinin peroksidasyonu tarafından tetiklenir. Sitokrom c'nin mitokondriden salınmasında son basamaktaki süreç dış membran geçirgenliğinin bozulmasından kaynaklanır. Yapılan çalışmalarda tBid'in de kardiyolipin ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Şekil 2. 14A). Kardiyolipin Bcl-2 proteini ve tBid için yerleşme noktası olarak görev yapar. Yarılmadan sonra, tBid (sarı) kardiyolipin (mavi) ile özel bir etkileşim yaparak mitokondriye transloke olur. Bu durum mitokondriyal kristada sıkışan sitokrom c'nin ayrılmasına neden olur. tBid-kardiyolipin etkileşimi mitokondriyi bax-bak etkisi için hazır hale getirir. Bax; membranın kendisine zarar vermeden kardiyolipinin yerel organizasyonunu değiştirerek mitokondriyal dış membrandan geçebilir (Gonzalvez & Gottlieb, 2007) (Şekil 2. 14B).



Şekil 2. 14: Kardiyolipin ve dış mitokondriyal membranın permeabilizasyonu
(Gonzalvez & Gottlieb, 2007).

Sitozole salınan sitokrom c Apaf-1 adı verilen protein ve prokaspaz 9 ile apoptozomu oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'ü aktif hale getirir ve bu da kaspaz-3'ü aktive eder (Norberg vd., 2008). Kaspaz 3 nükleusa göç ederek orada DNA fragmentasyonuna ve hücre ölümüne neden olur (O'brien & Kirby, 2008) (Şekil 2. 15).

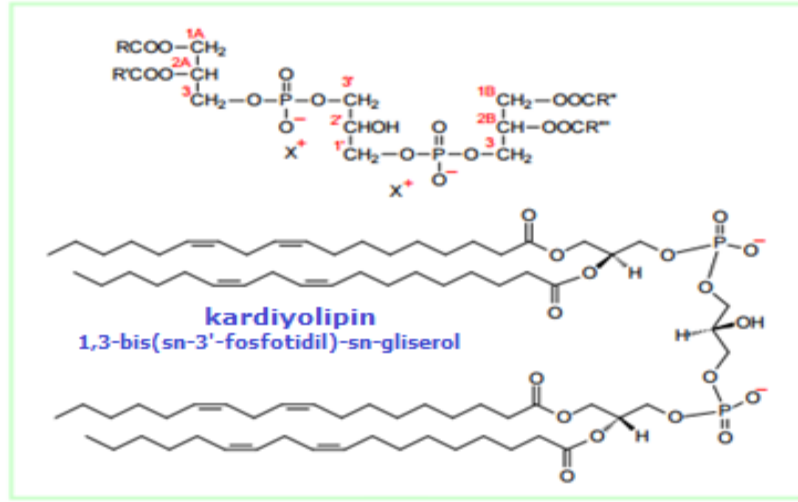


Şekil 2. 15: Apoptoz

(Fariss, Chan, Patel, Houten & Orrenius, 2005)

2.5.4. Kardiyolipin

Kardiyolipin, difosfotidilgliserol veya 1,3-bis(sn-3'-fosfotidil)-sn-gliserol olarak da bilinir. Yapısında üç gliserol omurgası ve dört açıl grubu vardır (Şekil 2. 16) (Christie, 2010). İlk kez sığır kalp dokusundan izole edilmiştir. Mitokondrial membrana özgündür fakat organelin farklı kompartmanlarında yer alıp almadığı hala tartışılmaktadır. İç membranın iç yüzeyinde (total fosfolipid bileşiminin %18'i) dış yüzeyine göre (total fosfolipid bileşiminin %6'sı) daha fazladır. Mitokondri dış membranında da az miktarda bulunur (%4) (Gonzalvez & Gottlieb, 2007).



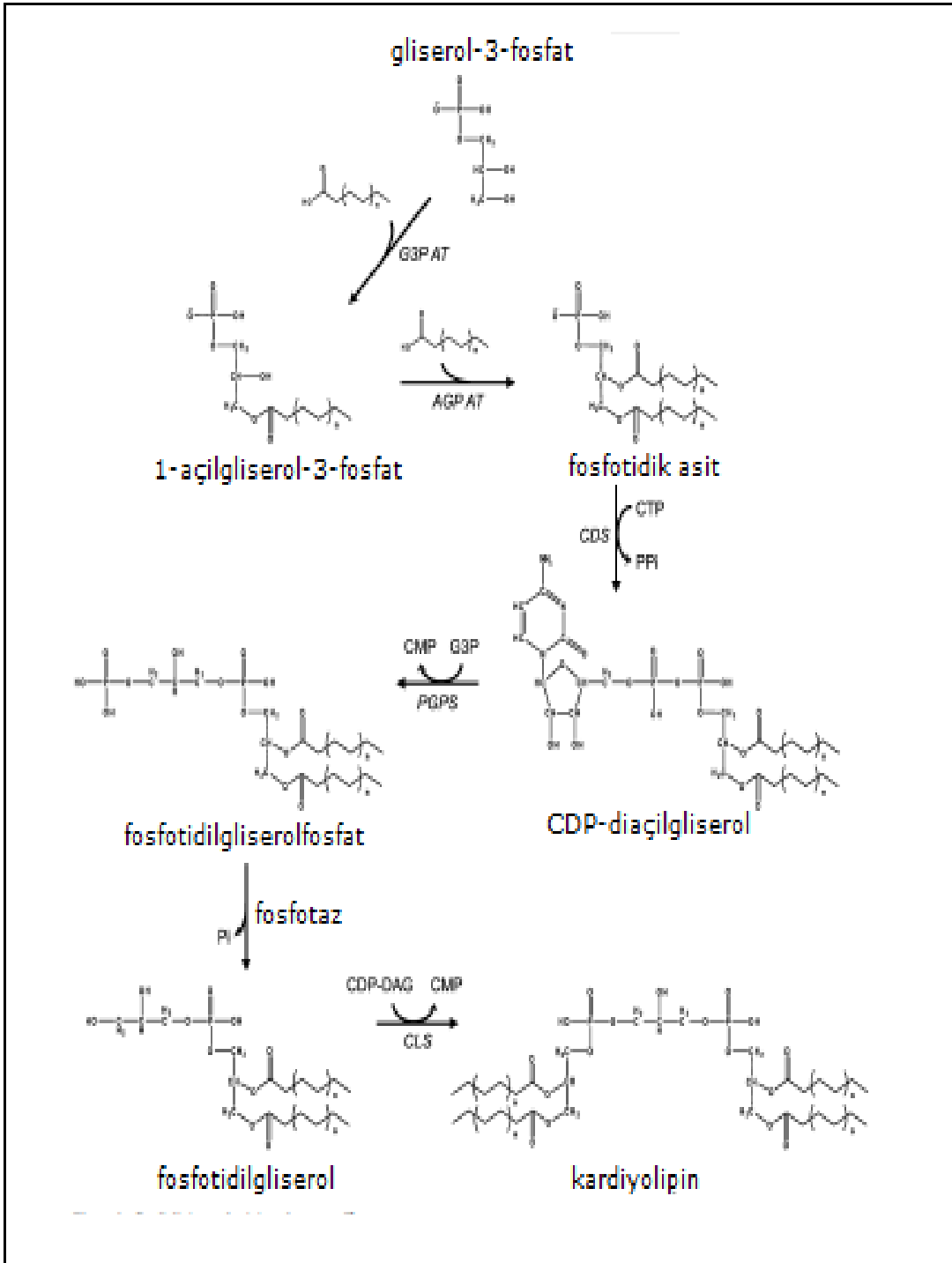
Şekil 2.16: Kardiyolipinin yapısı

(Christie, 2010)

2.5.4.1. Kardiyolipin sentezi

Kardiyolipin memelilerin mitokondri iç membranında 4 basamakta sentezlenir. Sentezin öncüsü olan fosfotidik asit (PA) dış mitokondri membranında sentezlenir ve kardiyolipin sentezi için iç membrana taşınır (Sparagna & Lesnefsky, 2009). Fosfolipid sentezindeki ilk basamakta gliserol-3-fosfat, gliserol-3-fosfat açıltransferaz enzimi tarafından açillenir. Oluşan açilgliserol-3-fosfat da açilgliserol-3-fosfat açiltransferaz enzimi tarafından açillenerek PA oluşur. PA, mitokondride bulunan sitidindifosfat-diaçilgliserol (CDP-DAG) sentaz tarafından CDP-DAG'a dönüştürülür. Endoplazmik retikulumda gerçekleşen birçok fosfolipid biyosentez yolağının aksine CL biyosentezi mitokondride gerçekleşir. CL biyosentezindeki ilk hız kısıtlayıcı basamak CDP-DAG'ın fosfotidilgliserol fosfata (PGP), PGP sentaz enzimi tarafından dönüştürüldüğü basamaktır. Fosfotidilgliserol fosfat, fosfataz tarafından fosfotidilgliserole (PG) defosforillenir. Son basamakta ise PG,

kardiyolipin sentaz tarafından kardiyolipine dönüştürülür (Houtkooper & Vaz, 2008) (Şekil 2. 17).



Şekil 2. 17: Kardiyolipin sentezi
(Houtkooper & Vaz, 2008).

Yeni sentezlenen kardiyolipin yeniden biçimlenmektedir. Kardiyolipinin bu yeniden biçimlenmesinden 3 enzim sorumludur. Birincisi endoplazmik retikulumda bulunan ALCAT1 (açıl Koenzim A: lizokardiyolipin açıltransferaz 1), açıl- koenzim A monolizokardiyolipine (MLCL) açıl transferinde kofaktör olarak görev almaktadır. Diğer iki enzim mitokondride bulunan monolizokardiyolipin açıltransferaz (MLCL AT) ve tafazzin (TAZ)'dir. Mitokondriyal MLCL- AT, açıl zincirin MLCL'e transferinde kofaktör olarak açıl koenzim A kullanır. TAZ fosfolipitten açıl grubunu MLCL'e transfer eder. Mitokondride bulunan kalsiyum bağımsız fosfolipaz A2 de kardiyolipin yeniden biçimlenmesinde görev almaktadır (Sparagna & Lesnefsky, 2009).

2.5.4.2. Kardiyolipin katabolizması

Fosfolipaz A2 (PLA) tarafından açıl grupların uzaklaştırılması ile gerçekleşir. Fosfolipaz D (PLD), kardiyolipini fosfotidik asite hidroliz eder (Cevc, 1993).

Patofizyolojik değişiklikler: Kardiyolipinin neden olduğu patofizyolojik değişiklikler 3 grup altında toplanabilir. Birincisi CL içeriğinde azalma, ikincisi CL'nin peroksidasyonu ve üçüncüsü de CL yapısındaki açıl zincirin yerinin değişmesidir. CL içeriğinde azalma iskemik kardiyomiyopati gibi kalp yetmezliklerinde görülmüştür. Kronik alkol tüketimi ise CL'nin 18:2 içeriğini azaltır ve karaciğer mitokondrisinde daha doymuş bir kardiyolipin profiline neden olur (Chicco & Sparagna, 2006).

2.5.4.3. Kardiyolipinin görevleri

- Mitokondrideki elektron taşıma zincirinin son enzimi olan sitokrom c oksidaz yada kompleks 4, dört sitokrom c molekülünün her birinden gelen elektronu alarak bir oksijen molekülüne transfer eder ve moleküler oksijeni iki su molekülüne dönüştürür. Bu enzim, enzimatik fonksiyonlarını tamamen yerine getirmek için iki kardiyolipin molekülüne ihtiyaç duyar. Kompleks III olan sitokrom bc1 de kuaterner yapısı ve fonksiyonu için kardiyolipine ihtiyaç duymaktadır (Gomez & Robinson, 1999).
- Kompleks IV tarafından katalizlenen oksidatif fosforilasyon boyunca çok miktarda proton membranın bir tarafından diğer tarafına transfer edilir ve bu durum pH değişikliğine sebep olur. Kardiyolipinin mitokondriyal membranlarda proton pompası olarak görev aldığı düşünülmektedir. Dolayısıyla proton havuzu oluşturarak mitokondri membranlar arası boşluktaki bu pH değişikliğini en aza indirir (Haines & Dencher, 2002).

- Kardiyolipinin dış mitokondriyal membrandan ayrılması sitokrom c salınımına yol açarak hücrelerde apoptoza neden olur (Belikova vd., 2006).

2.5.5. Apoptozda rol oynayan proteazlar

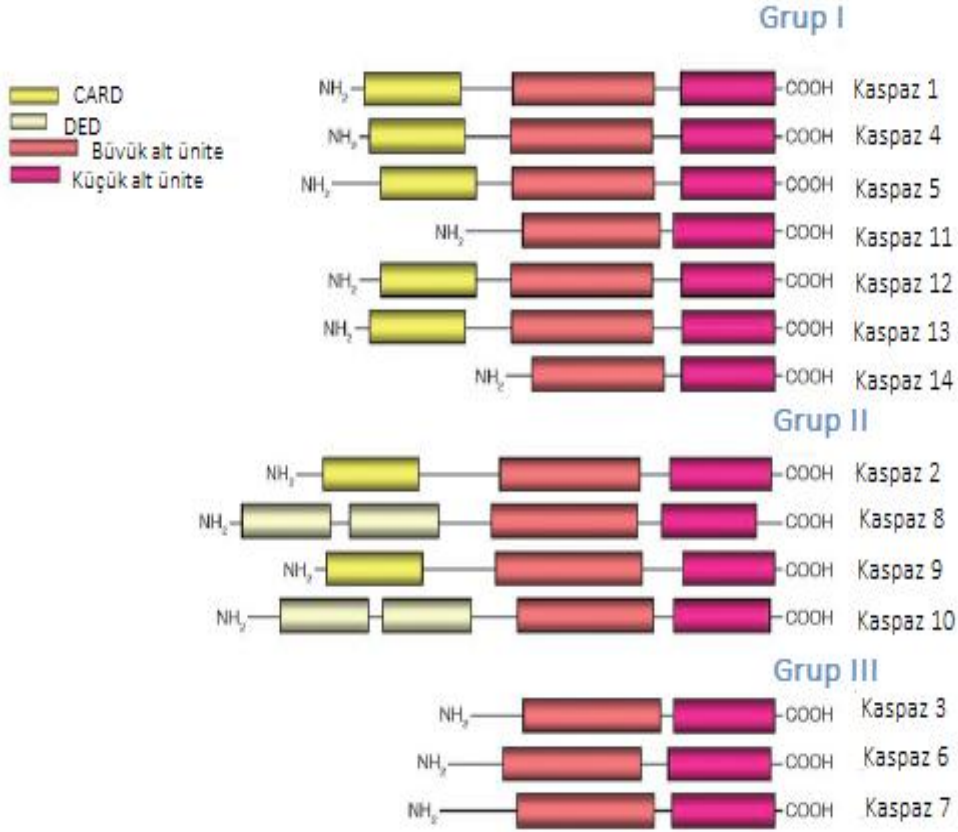
2.5.5.1. Kaspazlar

Kaspazlar, sistein aspartat spesifik proteaz ailesindedirler. (CASPASE, Cystein Aspartate Spesifik Proteinase) (Lavrik, Golks & Krammer, 2005). 14 tane farklı kaspaz belirlenmiş olup bunlardan 11 tanesi insanlarda bulunur. Hücrede prokaspaz olarak sentezlenirler ve proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler (Riedl & Shi, 2004). Kaspazlar 3 kısımdan oluşurlar: N terminal alt ünite, büyük alt ünite (20 kDa veya p20) ve küçük alt ünite (10 kDa veya p10). p20 ve p10 alt üniteleri küçük bir bağlayıcı dizi ile birbirinden ayrılırlar. Prodomainin yapısına ve fonksiyonuna bağlı olarak kaspazlar genel olarak 3 gruba ayrılırlar. Büyük prodomaine sahip kaspazlar inflamatuvar kaspazlar (grup I) ve apoptoz başlatıcı kaspazlar (grup II) olarak adlandırılırken 20-30 aminoasitlik küçük prodomaine sahip kaspazlar apoptoz iletici (efektör) kaspazlar (grup III) olarak adlandırılırlar. (Lavrik vd., 2005) (Şekil 2. 18)

1. Başlatıcı Kaspazlar: Kaspaz 2, 8, 9, 10 bu grupta yer almaktadır. Uzamış N terminal bölge ile karakterizedirler (Riedl & Shi, 2004). Başlatıcı kaspazların N-terminal kısmı hem kaspazların aktivasyonunda aracı rol oynar hem de sitokin aktivasyonuna yol açarak kaspaz dışı apoptotik yolları aktive eder. Bu gruptaki kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara yani ikincil kaspazlara iletirler (İşler, 2012).

2. Efektör Kaspazlar: Kaspaz 3, 6, 7'yi içermektedir. Kısa prodomaine sahiptirler. İnaktif haldeki prokaspaz dimerleri başlatıcı kaspazlar tarafından yarılarak aktive edilirler. Yarıma, büyük ve küçük alt üniteler arasındaki konformasyonel değişiklik ile olur. Efektör kaspaz dimerin iki aktif bölgesi bir araya getirilir ve fonksiyonel olarak olgun kaspaz meydana gelir. Aktifleşen efektör kaspaz diğer efektör kaspazları aktive edebilir (McIlwain, Berger & Mak, 2013).

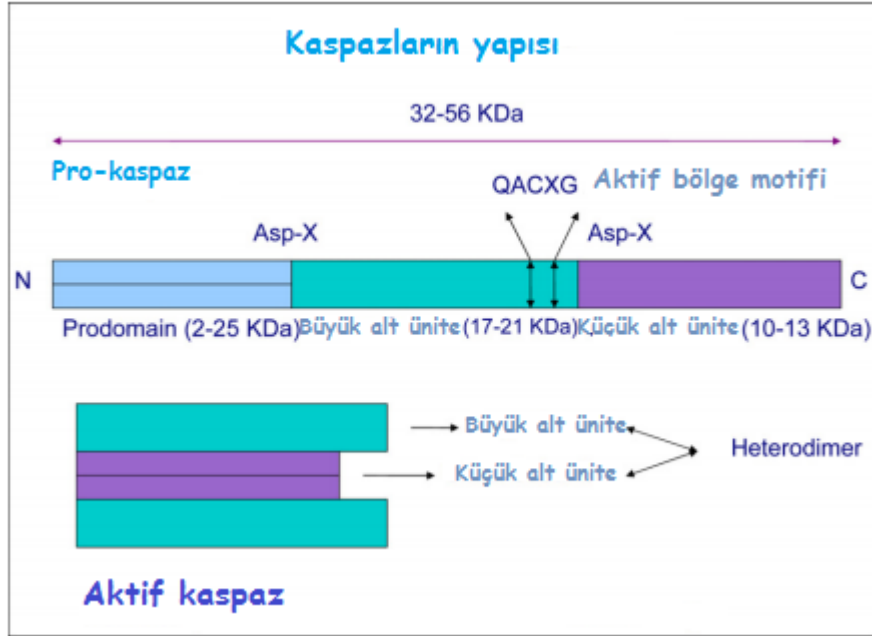
3. İnflamatuvar Kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5 ve 12 insanlardaki inflamatuvar kaspazlar, kaspaz 1, 11 ve 12 de farelerdeki inflamatuvar kaspazlardır (McIlwain, Berger & Mak, 2013). Sitokin sekresyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Ayrıca kaspaz 1, 4, 5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler (Yıldırım, 2009)



Şekil 2. 18: Kaspazlar

(Lavrik vd., 2005)

Prokaspazlar 3 yolla aktive olurlar. Birinci yol aktif olan diğer bir kaspaz aracılığı ile olur. İkinci yol oto kataliz, üçüncü yol ise apaf-1, sitokrom c ve kaspaz 9'dan oluşan bir aktivatör protein aracılığı ile olur. Kaspazlar genel yapısında 5 peptitten oluşan korunmuş aktif motif içerirler QACXG (X R, Q veya G). Sisteinin aktif bölgesi bu beş peptit içerisindedir. Aktivasyon olduğunda, proenzimin proteolitik işlemi domainler arasındaki özel aspartat kalıntılarında gerçekleşir ve prodomain ortadan kalkar. Büyük ve küçük alt biriminin sıralanması ile bir heterodimer oluşmaktadır. Oluşan heterodimer yapısında bir büyük ve bir küçük alt ünite bulunur. İki heterodimerin birleşmesiyle bir tetramer oluşur ve bu yapı kaspaz aktivasyonu için gereklidir (Korsnes & Espenes, 2011) (Şekil 2. 19).



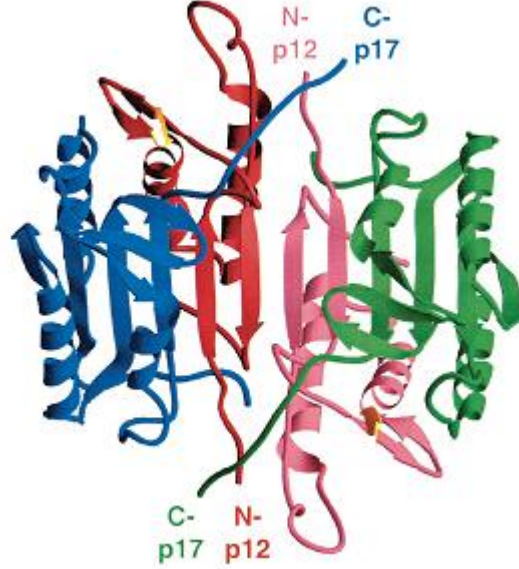
2.5.5.1.1. Apoptoz- Kaspaz Bağlantısı

Kaspazların apoptozla ilk ilişkisi bir nematod olan *Caenorhabditis Elegans* ile yapılan çalışmalar sırasında ortaya çıkmıştır. Nematodta yapılan genetik çalışmalar sonucu apoptozu düzenleyen dört tane gen bulunmuştur. Bunlar CED-3, CED-4, CED-9 ve egl-1 genleridir ve bu genlerin memelilerde homologlarının bulunduğu anlaşılmıştır. Bcl-2, Apaf-1 ve kaspaz proteaz ailesi, CED-3, CED-4 ve CED-9' un memelilerdeki analogları olarak tanımlanmıştır. Kaspaz ailesi CED-3' ün, Bcl-2 ailesi ise CED-9' un homologudur (Riedl & Shi, 2004). Proteaz ailesi üyelerinden en fazla çalışma yapılan kaspaz kaspaz 3'tür. (Sadowski-Debbing, Coy, Mier, Hug & Los, 2002). Kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşime giren bir kaspaz proteindir. Son çalışmalarda apoptotik süreçte kaspaz-3'ün en önemli rolü üstlendiği ve kaspaz-9'unda kaspaz-3'e benzer özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Yıldırım, 2009).

2.5.5.1.2. Kaspaz 3

Apoptozdaki rolü ve özgünlüğü açısından memelilerde en çok çalışılan kaspaz, kaspaz 3'tür. Yama, apopain olarak da bilinmektedir (Porter & Janicke, 1999). Prokaspaz 3, 277 amino asitten oluşur, CED-3 ile %35 homoloji gösterir.

Zimojen formda oluşan kaspaz 3'ün moleküler ağırlığı 32 kDa'dur. 17 kDa ve 12 kDa alt ünitelere ayrılır. Kaspaz 3 prekürsörü Asp175-Ser 176 bölgesinden p12 alt ünitesini vermek üzere, Asp28-Ser29 bölgesinden de p17 alt ünitesini vermek üzere yarılr. Bu iki alt ünite birleşerek aktif kaspaz 3 meydana gelir. Aktif kaspaz 3 enzimi iki tane p17 ve iki tane p12 alt ünitelerinden oluşan bir heterodimerdir. (Santa Cruz Biotechnology) (Şekil 2. 20)



Şekil 2. 20: Kaspaz 3 tetramerinin yapısı

(Chang & Yang, 2000)

p17 alt ünite mavi ve yeşil, p12 alt ünite kırmızı ve pembe.

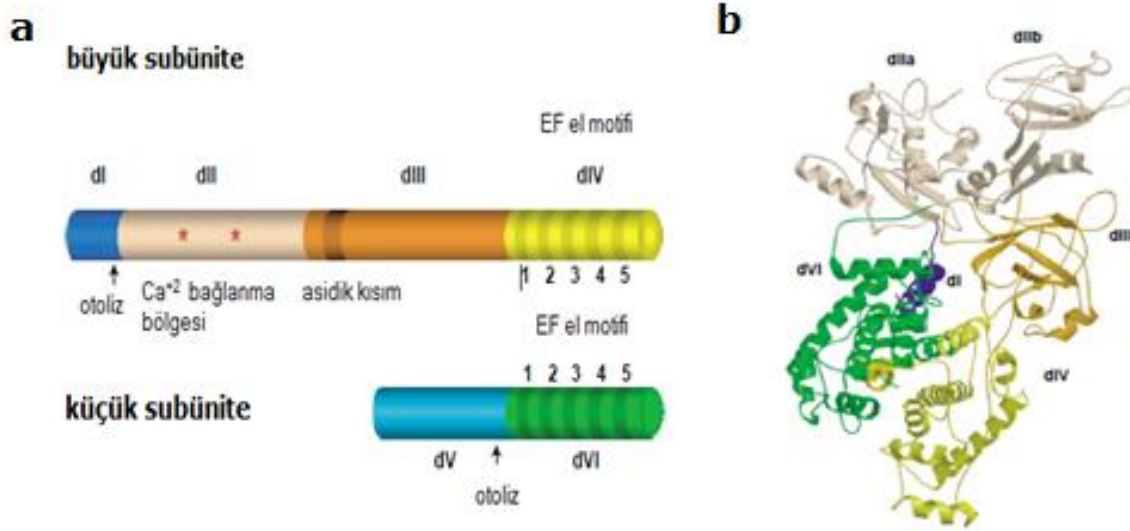
Sistein 163, kaspaz 3'ün aktif kısmındaki katalitik sisteindir (Porter, 2006). Normal şartlar altında, kaspazlar substratlarındaki tetrapeptit sekansları tanırlar ve aspartik asit kalıntılarından sonraki peptit bağlarını hidroliz ederler. Kaspaz-3 ün spesifik substratı; tetrapeptit motif 'Asp-x-x-Asp' dir ve kaspaz 7 ile benzerlik gösterir (Agniswamy, Fang & Weber, 2007). Kaspaz-3, kaspaz-6 and 7'yi aktive eder, kaspaz-8, 9 ve 10 tarafından aktive edilir (Atagün, Eren & Gürkanlı, 2011).

2.5.5.2. Kalpainler

Kalpainler (CAPN, EC 3.4.22.17) kalsiyum ile aktive olan sistein proteazlardır. Enzim aktivitesini allosterik olarak etkileyen birkaç kalsiyum bağlama bölgesi içerirler (Branca, 2004). Hücre iskeleti ve sinyal iletiminde görev alan proteazlar olup ayrıca hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz,

musküler distrofiler, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi diğer fizyolojik ve patofizyolojik proseslerde de yer alırlar (Kaya, 2005).

Kalpainer 78-80 kDa ve 29 kDa'lık subünitelerden oluşan heterodimerlerdir. 80 kDa'lık ünite katalitik yan birimi içerir. 29 kDa'lık ünite ise düzenleyici (regülatör) subünitedir. Büyük subünit dört domainden (dI-dIV), küçük subünit iki domainden (dV-dVI) oluşur. Domain dI, dVI boşluğuna bağlı tek α -heliksten oluşur. Domain dII katalitik bölgeyi içerir ve dIIa ve dIIb olmak üzere iki subdomaine ayrılmıştır. Domain dIII asidik bölgeyi içerir ve bu bölge Ca^{+2} ile kalpain aktivasyonunda rol oynar. Domain dIV ve dVI, Ca^{+2} 'mun bağlandığı domainlerdir ve EF el motifine sahiptirler. Domain dV küçük subünitenin N terminal ucunda glisin kümesini içerir (Khorchid & Ikura, 2002) (Şekil 2. 21) .

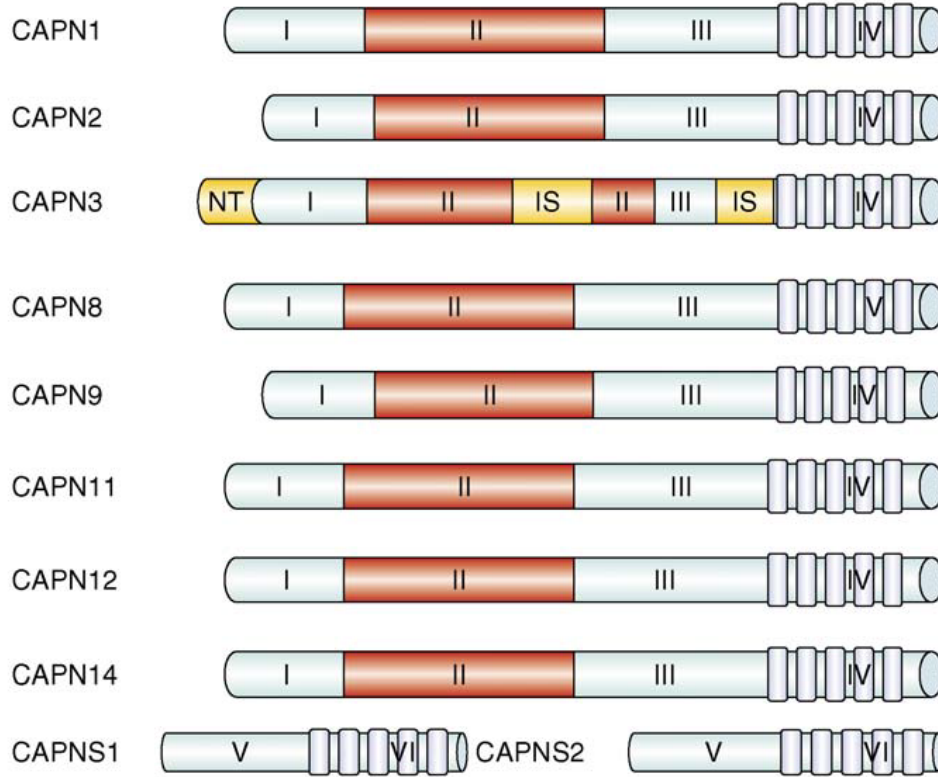


Şekil 2. 21: m-kalpainin şematik gösterimi

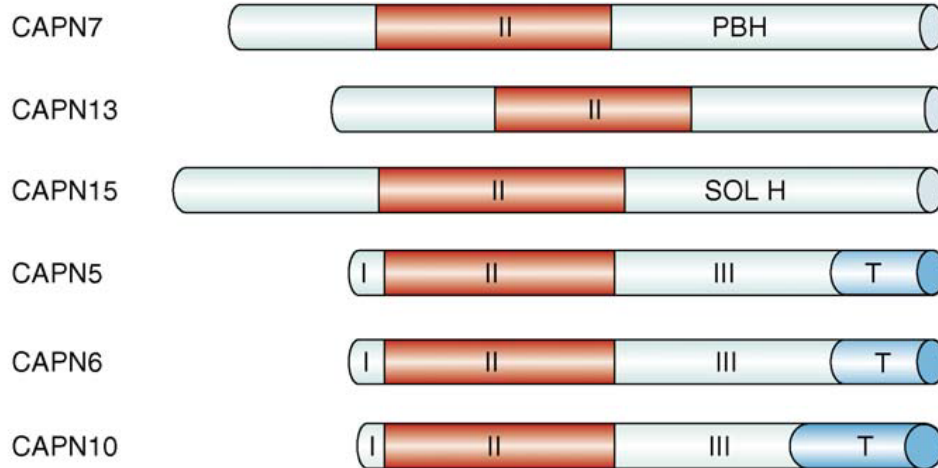
(Khorchid & Ikura, 2002)

Kalpain ailesinin memelilerde 15 geni vardır. Bunlardan 9 tanesi tipik, 6 tanesi atipik kalpain olarak sınıflandırılır. Tipik kalpainer EF el motifinin yer aldığı C terminal Ca^{+2} bağlama domaini ile karakterize iken atipik kalpainerde bu bölge yoktur (Branca, 2004) (Şekil 2. 22).

Tipik kalpainler



Atipik kalpainler



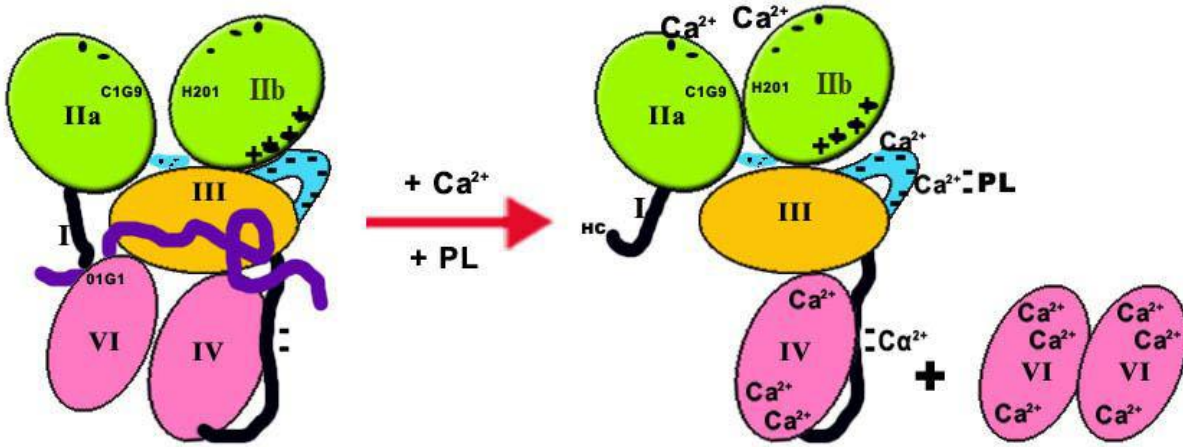
Şekil 2. 22: Kalpain ailesi

(Saez, Lorca, Moron & Ruiz, 2006)

En iyi karakterize edilmiş olan μ ve m kalpainlerdir (kalpain I ve II). μ kalpainler 5-50 mikromol kalsiyum konsantrasyonlarında aktive olur iken m kalpainler 200-1000 mikromol kalsiyum konsantrasyonlarında aktive olur ve parsiyel olarak otolize uğrarlar. İn-vivo olarak her iki kalpaininde fizyolojik kalsiyum konsantrasyonlarında (100-300 mikromol) aktive olduğu görülür (Kaya, 2005).

2.5.5.2.1. Kalpain aktivasyonu

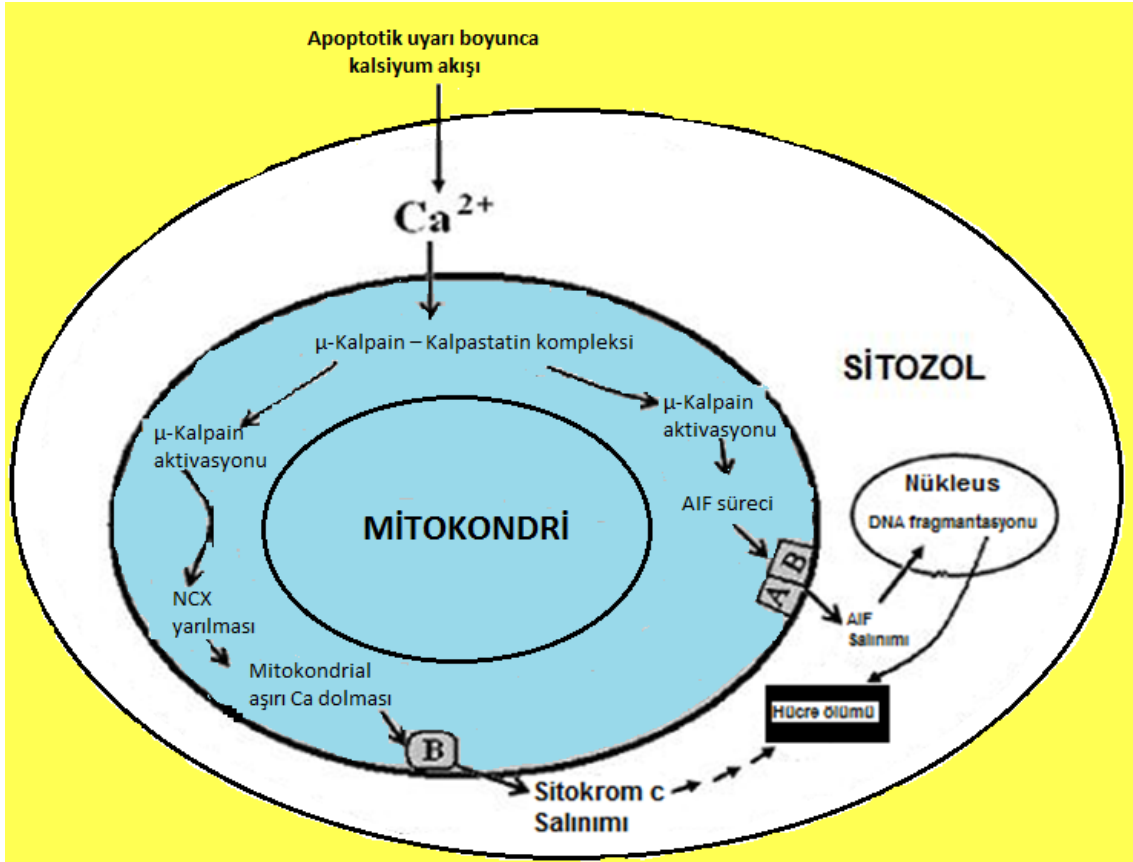
İntrasellüler serbest Ca^{2+} konsantrasyonu normal sınırlarda olduğunda kalpainler sitozolde inaktif proenzim olarak bulunurlar. Kalpain aktivasyonu intrasellüler serbest Ca^{2+} konsantrasyondaki yükselme ile tetiklenir. Kalpainlerin kalsiyum tarafından aktive edilme mekanizması adım adım henüz bilinmese de, domainler arası etkileşimi etkileyen konformasyonel değişikliklerin yer aldığı aktivasyon mekanizması ortaya konulmuştur (Qian, 2008). Kalsiyum yokluğunda, subdomain IIa ve IIb yapısal olarak ayrılmıştır. Ca^{2+} 'nin bağlanması konformasyonel değişikliği indükler. Domain IIa ve IIb birbirine yaklaşır ve bağlanır, böylece fonksiyonel katalitik bir bölge oluşturulur. m -kalpain de en az üç farklı Ca^{2+} bağlama bölgesi vardır: ikisi kalmodulin benzeri domain IV ve VI, bir asidik loop içeren domain III ve proteaz domain II' dir. m -kalpainin Ca^{2+} tarafından aktivasyonunda, Ca^{2+} 'un domain IV,VI ve III 'e bağlanması ile domain I, domain VI'den ve domain II' de domain III den ayrılır ve böylelikle 30 k, 80k 'dan ayrılır (Suzuki, Hata, Kawabata & Sorimachi, 2004) (Şekil 2. 23).



Şekil 2. 23: Kalpain aktivasyon mekanizması

(Suzuki, Hata, Kawabata & Sorimachi, 2004)

Aktif kalpain membranlarda bulunur. Kalpainlerin aktivasyonlarında veya inaktivasyonlarında fosforilasyon önemli bir role sahiptir (Kaya, 2005).



Şekil 2. 25: Hücre ölümünde kalpain aktivasyonu

(Kar vd., 2010)

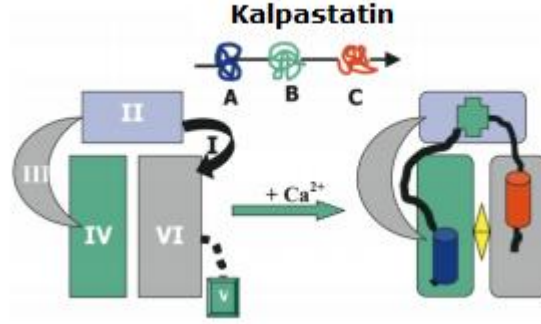
Bir apoptotik uyarın hücre içine kalsiyum akışına neden olur. Kalsiyum konsantrasyonundaki artış, AIF yapımına neden olan IMS/IM daki kalpain aktivasyonu ile sonuçlanır. Eş zamanlı olarak da mitokondrial NCX (Sodyum Kalsiyum Değiştirici) de yarılmaması, majör kalsiyum fıskırması olabilir ve mitokondrial kalsiyum aşırı dolması, sitokrom c salınımı olur. AIF ün yarılıp parçalara ayrılması, sonra sitozol içine salınımı (A), Bax/Bak aracılı porlar (B) veya kalsiyum bağımlı mitokondrial permeabilite geçişinin uyarılması, nükleusa translokasyon ve orada kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu oluşumu (Kar vd., 2010)

2.5.5.2.3. Kalpain aktivitesinin regülasyonu

Kalpain aktivitesi endojen inhibitör kalpastatin ile eksojen olarak da verilen kalpain inhibitörleri ile regüle edilir. (Cuzzocrea vd., 2000).

Kalpastatin: Kalpainin endojen inhibitör proteindir. Moleküler ağırlığı 120 kDa'dur ancak organlarda farklılık göstermektedir. Kalpastatinin inhibitör aktivitesi kalpainler için spesifiktir. Kalpain haricinde diğer proteazları inhibe etmez. Kalpastatin, kalpain ile beraber sitozolde ve zarda bulunur (Shi, Melnikov, Schrier & Edelstein, 2000). Kalpastatin tekrarlayan dört adet

inhibitör domain içerir ve bir molekül kalpastatin 4 molekül kalpaini inhibe eder. Her bir domainde A,B,C bölgeleri vardır. A ve C bölgeleri sırasıyla kalmodülün benzeri olan dIV ve dVI'ya, b bölgesi ise dII'ye bağlanır.(Şekil 2. 26) (Todd vd., 2003).

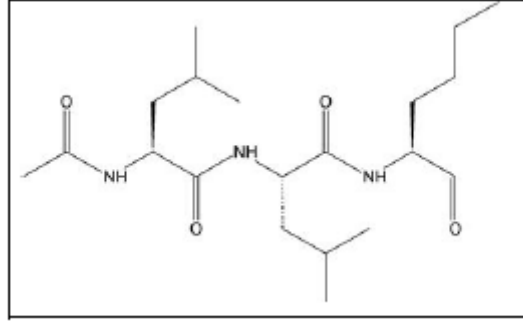


Şekil 2. 26: Kalpastatinin inhibisyonu

(Todd vd.,2003)

Ekzojen Verilen Kalpain İnhibitörleri: Bir düzineden fazla kalpain inhibitörü bilinmektedir. Bunlardan bazıları E64 (N-trans-epoksisüksinil- L- lösin 4-guanidinobutilamid), Leupeptin (N-asetil-Leu-Leu-argininal), Kalpain inhibitör I (N-asetil-Leu-Leu-norlösinal), Kalpain inhibitör II (N-asetil-Leu-Leu-metiyoninal), AK295 (benziloksikarbonil-Leu-aminobutirik asit-CONH(CH₂)₃-morfolin), AK275 (benziloksikarbonil-Leu-aminobutirik asid-CONH-CH₂CH₃) leupeptin gibi peptid aldehytlerdir (Kaya, 2005).

- **Leupeptin** peptid aldehytidir. Hücre geçirgenliği azdır. Enzimi aktiflemek için aldehit son grubu sulfhidrit grubuna bağlanır. Bu bağlanma kalsiyuma bağımlı ve geri dönüşümlüdür (Kaya, 2005).
- **E 64** ve daha geçirgen versiyonu olan **E-64-d** (sinonimleri: loxistatin, EST ve Ep453), hücre geçirgenliği olan bir inhibitördür. (Yoshifuji vd., 2005). Kovalent bağlarla sülfidril gruplarına geri dönüşümsüz olarak bağlanır (Kaya, 2005).
- **Kalpain inhibitör-1** hücre geçirgenliği olan bir inhibitördür. Aldehyd peptid olan kalpain inhibitör-1, kalpainin aktif bölgesini bloke eder (Şekil 2. 27) (Kaya, 2005).



Şekil 2. 27: Kalpain inhibitörü I N-[N-(N-Asetil-L-lösil)-L-lösil]-L-norlösilal)

(Kaya, 2005).

Diğer kalpain inhibitörlerine rağmen kalpain inhibitörü 1 katarakt, romatizmal artrit, felç ve miyokart infarktüsü gibi çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde kalpainlerin aşırı aktivasyonunu araştırmak amacıyla kullanılmıştır (Chatterjee vd., 2001).

3- GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları ve Madde Uygulamaları

Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında üretilmiş olan aynı yaştaki 150-200 gr Wistar Albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Deneylere başlamadan önce ratlar ayrı kafeslere koyularak laboratuvar koşullarına alıştırmaları sağlandı. Standart hayvan bakım kafeslerinde, 12 saatlik gece/gündüz dönüşümde, sabit $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve sabit nemli ($\%55\pm 5$) ortamda tutuldu.

Çalışmamızda 6 grup oluşturuldu. Deneylerimizde kullanılan doku kalbin sol ventrikülüdür. Sol ventrikül izole edildiğinde çok küçük olduğu için (150-200 mg) her bir bölümdeki incelemeler için ayrı grup oluşturuldu. Toplamda 108 adet rat kullanıldı. 48 adet rat (n=8) Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda biyokimyasal analizler için, 30 adet rat (n=5) ise Histoloji Anabilim Dalı'nda histolojik incelemeler için, 30 adet rat (n=5) Anatomi Anabilim Dalı'nda anatomik incelemeler için ayrıldı. Bu çalışmada yapılan bütün işlemler için Osmangazi Üniversitesi Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezinden izin alınarak etik kurul raporu düzenlendi (Kayıt no:217/2011). Bu araştırma için gerekli kaynak TÜbitak 1002 Projeleri Komisyonunca desteklenen 111S533 nolu projeden sağlanmıştır.

3.1.1. Deney grupları

Kontrol grubu (n=18): Bu gruptaki ratlara otuz gün boyunca İzokalorik Modifiye Sıvı Diyet (MSD) verildi.

Alkol grubu (n=18): Bu gruptaki ratlara otuz gün boyunca alkollü MSD verildi.

MI grubu (n=18): Bu gruptaki ratlara otuz gün boyunca izokalorik MSD verildi 29. ve 30. günlerde iki doz olacak şekilde 24 saat aralıklarla ISO-HCl (150 mg/kg) uygulandı.

Alkol+MI grubu (n=18): Bu gruptaki ratlara otuz gün boyunca alkollü MSD verildi. 29. ve 30. günlerde iki doz olacak şekilde 24 saat aralıklarla ISO-HCl (150 mg/kg) uygulandı.

Alkol+MI+İnhibitör grubu (n=18): Bu gruptaki ratlara otuz gün boyunca alkollü MSD verildi. 29. ve 30. günlerde iki doz olacak şekilde 24 saat aralıklarla ISO-HCl (150 mg/kg) ve ISO uygulamasından 15 dakika önce 10 mg/kg kalpain inhibitörü 1 (N-Asetil-Lösin-Lösin-Norlösin) uygulandı.

Çözücü grubu (n=18): Bu gruptaki ratlara otuz gün boyunca izokalorik MSD verildi. 29. ve 30. günlerde kalpain inhibitörünün çözüldüğü miktarda Dimetil sülfoksit (DMSO) uygulandı.

3.1.2. Kronik alkol uygulaması

Kronik alkol uygulaması için ratlara modifiye sıvı diyet uygulaması yapıldı. Ratlar MSD'yi alkollü veya alkolsüz 30 gün süre ile her sabah saat 10.00'da aldılar. Deney süresinde hayvanlara ekstra süt/su desteği yapılmadı.

Modifiye Sıvı Diyet: Düşük yağlı inek sütü 925 ml, 25-75 ml alkol % 96,5 ve sükroz 17 gr içermektedir. Bu karışımın tamamı 1000,7 kcal/L'dir. Alkol oranı artarken diyetin izokalorik dengesini sağlamak için sükroz verilmesi azaltıldı. Deneyin başlangıcında ratlara adaptasyon süresinde sıvı diyet alkolsüz olarak 2 gün süre ile verildi. Alkol oranı yavaş yavaş artırılarak 3 gün boyunca % 2,4 oranında alkollü süt, takip eden 4 gün boyunca % 4,8 oranında alkollü süt ve takip eden 21 gün boyunca da %7,2 oranında alkollü süt verildi. Sıvı diyet her hayvana 100 ml/gün miktarında taze olarak her gün aynı saatte ve ağız kısmı bilyalı cam şişelerde verildi. Ratların günlük alkol alımı ve ağırlık takibi yapılarak ağırlıklarına göre alkol uygulanması için gerekli değerler hesaplandı (Baysan vd., 2005; Erinç vd., 2003).

İzokalorik Modifiye Sıvı Diyet: İzokalorik MSD, 75 ml alkol (60,75g) yerine 75 ml inek sütü ile 96 gr sükroz içermekteydi (Baysan vd., 2005; Erinç vd., 2003) (Tablo 3. 1).

Tablo 3. 1: Modifiye sıvı diyet

Günler	Kontrol Grubu	Alkol Grubu	MI Grubu	Alkol + MI Grubu	Alkol + MI + İnhibitör Grubu	Çözücü Grubu
1. ve 2. gün	Alkolsüz sıvı diyet	Alkolsüz sıvı Diyet	Alkolsüz sıvı diyet	Alkolsüz sıvı diyet	Alkolsüz sıvı diyet	Alkolsüz sıvı diyet
3.,4., ve 5. günler	Alkolsüz sıvı diyet	% 2,4 oranında alkollü süt	Alkolsüz sıvı diyet	% 2,4 oranında alkollü süt	% 2,4 oranında alkollü süt	Alkolsüz sıvı diyet
6.,7.,8., ve 9. günler	Alkolsüz sıvı diyet	% 4,8 oranında alkollü süt	Alkolsüz sıvı diyet	% 4,8 oranında alkollü süt	% 4,8 oranında alkollü süt	Alkolsüz sıvı diyet
10. ve 30. Günler arasında	Alkolsüz sıvı diyet	%7,2 oranında alkollü süt	Alkolsüz sıvı diyet	%7,2 oranında alkollü süt	%7,2 oranında alkollü süt	Alkolsüz sıvı diyet

3.1.3. Miyokart infarktüsünün oluşturulması

MI oluşturmak için kronik alkol kullanımı uygulamasının son iki gününde İsopterol-HCl (Hidroklorik asit) subkutan olarak 24 saat aralıklarla iki kez 150 mg/kg olarak uygulandı. İkinci ISO dozundan 12 saat sonra ratlara anestezi uygulandı (Oktar vd., 2010).

3.1.4. Kalpain inhibitör 1 uygulaması

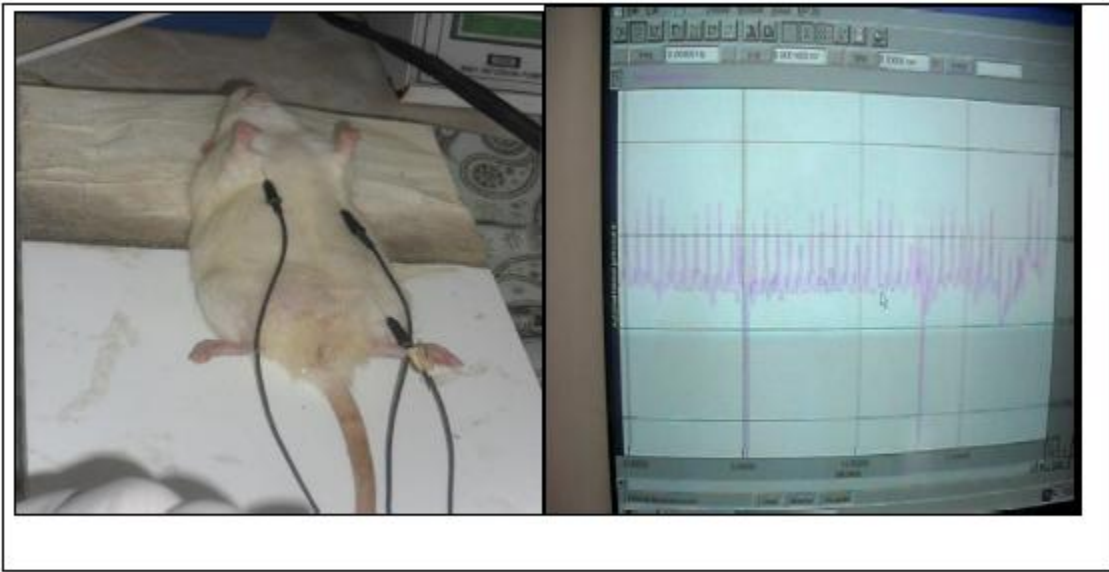
Kalpain inhibitör 1 (N-asetil-lösin-lösin-norlösin) ISO-HCl enjeksiyonlarından 15 dakika önce 10 mg/kg olarak intraperitoneal yolla verildi. İnhibitör DMSO'da çözüldü. Çözücü grubuna da inhibitörün çözüldüğü miktarda DMSO intraperitoneal yolla verildi (Mani vd., 2009; Cuzzocrea vd., 2000; Yoshikawa vd, 2005).

3.1.5. Anestezi

Ratlar son ISO-HCl uygulamasından 12 saat sonra anestezi maddeleriyle (Ketamin/Ksilazin 3: 1, 1,32 mg/kg intraperitoneal) uyutuldu (Jump vd., 2009; Li vd., 2005).

3.1.6. EKG Çekilmesi

Anestezi ile uyutulan ratlara kendiliğinden solunum altında bilgisayarlı Biopar marka MP100 model veri değerlendirme ve kayıt sistemi kullanılarak ölçüm yapıldı ve D-2 kayıtları kullanıldı (Şekil 3. 1).



Şekil 3. 1: EKG çekilmesi ve kayıt sistemi

3.1.7. Cerrahi işlemler

Her rat için EKG ölçümleri yapıldıktan sonra hayvanların kalplerinden kan alındı ve cerrahi olarak kalbin sol ventrikülü çıkartıldı. Taze dokuda çalışılacak olan mitokondriyal kardiyolipin içeriği ölçümü için ayrılan doku parçası dışında kalan dokunun diğer kısımları biyokimyasal çalışmalar için çalışma anına kadar -80°C 'de saklandı. Histolojik çalışmalar için dokular nötral formalinde 24-48 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyondan sonra dokuların rutin histolojik takipleri yapıldı.

3.2. Biyokimyasal Deneyler

3.2.1. Serum CK-MB düzeylerinin belirlenmesi

Serum CK-MB düzeyleri ticari kit (Cusabio CSB-E14403r) kullanılarak ölçüldü.

Ölçüm kısaca şu şekilde yapıldı:

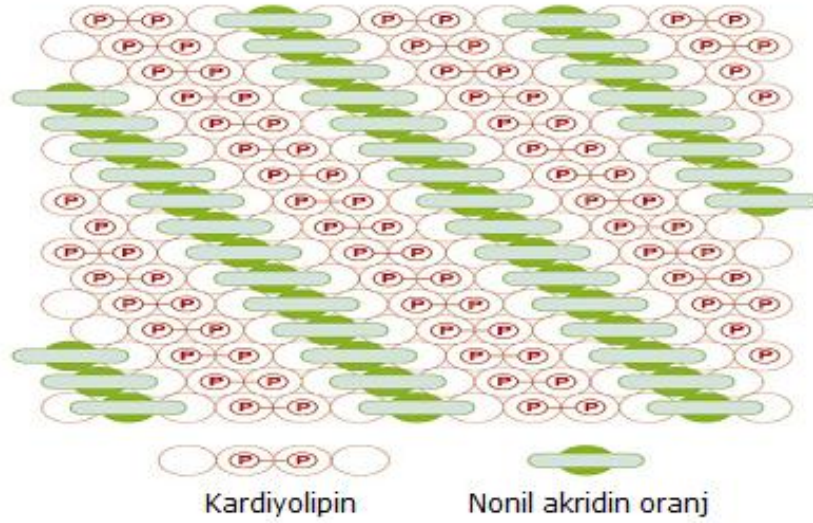
- Kitin içerisinden çıkan 96'lık *plate* kuyucuklarına 100 µl standart, kör ve serum pipetlendi.
- 2 saat 37⁰C' de inkübe edildi.
- Her bir kuyucuktaki sıvı boşaltıldı.
- 100 µl solüsyon A (Biotin ile bağlanmış poliklonal CK-MB antikoru) pipetlendi.
- 1 saat 37⁰C' de inkübe edildi.
- Her bir kuyucuktaki sıvılar boşaltıldı. 200 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
- 100 µl solüsyon B (*Horseradish peroksidaz bağlı avidin*) pipetlendi.
- 1 saat 37⁰C' de bekletildi.
- Her bir kuyucuktaki sıvılar boşaltıldı. Her bir kuyucuk 200 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.
- 90 µl substrat (Tetrametilbenzidin) solüsyonundan her bir kuyucuğa pipetlendi.
- Işıktan korunarak 15-30 dakika inkübe edildi.
- 50 µl stop solüsyonundan (Sülfirik asit) her bir kuyucuğa pipetlendi. Oluşan sarı renk 450 nm'de elisa okuyucu (Victor) ile ölçüldü.
- Kitin içerisinden çıkan standart ile seri dilüsyon yapıldı. Standartların absorbans değerleri ölçüldü ve kalibrasyon eğrisi çizildi. CK-MB sonuçları ng/ml olarak ifade edildi (Lisa, Haleagrahara & Chakravarthi, 2011).

3.2.2. Mitokondri izolasyonu

Taze dokudan mitokondri izolasyonu için Mitokondri İzolasyon Kiti (Sigma MITOISO1) ticari kit kullanıldı. Buz üzerinde bekletilen taze bir doku örneği (sakrifikasyondan sonraki bir saat içinde alınmış) kullanıldı. Dokular ilgili özütleme tamponu A (50 mM HEPES (Hidroksietil piperazinethansülfonik asid), pH 7,5, 1 M mannitol, 350 mM sükroz ve 5 mM EGTA (Etilenbis(oksonitrilo)]tetra-Asetat) içerir) ile iki kez yıkandı ve küçük parçalara (yaklaşık 50-100 mg) bölünerek bir Eppendorf tüp içerisinde tartıldı. Doku parçaları bistüri ve soğutulmuş cam levha yardımıyla daha da küçük parçalara bölündü. Örnek 2 ml'lik Eppendorf tüpü içerisinde 0,25 mg/ml tripsin içeren 10 hacim uygun özütleme tamponu A içerisinde süspanse edildi. 3 dakika boyunca buz üstünde inkübe edildi ve daha sonra doku bir dakika boyunca santifüjde döndürüldü. Süpernatant aspirasyon yoluyla atıldı ve 0,25 mg/ml tripsin içeren uygun özütleme tamponu A'dan 8 hacim eklendi. 20 dakika boyunca buz üstünde inkübe edildi. Proteolitik reaksiyonu sonlandırmak için 10 mg/ml'lik son konsantrasyon elde edilecek şekilde albümin solüsyonu eklendi ve karıştırılarak doku bir dakika boyunca santifüjde döndürüldü. Aspirasyon yoluyla süpernatant atıldı, kalan pellet 8 hacim uygun özütleme tamponu A ile yıkandı ve doku bir dakika boyunca santifüjde döndürüldü. Süpernatant aspirasyon ile atıldı ve 8 hacim uygun özütleme tamponu eklendi. Homojenize edildi ve homojenizatörün ucu yukarı aşağı 20-30 kere hareket ettirilerek tam bir homojenizasyon sağlandı. Numune 5 dakika boyunca 600 X g'de homojenize edildi. Süpernatant başka bir tüpe transfer edildi ve bu yeni tüp 11000 X g'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan pellet 1 x depolama tamponunda (50 mM HEPES, pH 7,5, 1,25 M sükroz, 5 mM ATP, 0,4 mM ADP, 25 mM sodyum süksinat, 10 mM K₂HPO₄ (Monopotasylum fosfat) ve 5 mM DTT (Dithiothreitol) içerir) süspanse edildi (her 100 mg doku için yaklaşık 40 µl). Bu numune analiz için hazırdır (Maity vd., 2009).

3.2.3. Mitokondriyal kardiyolipin içeriği ölçümü

Mitokondriyal kardiyolipin içeriğini ölçmek için 10-N-nonil- akridin-oranj (NAO) boyası kullanıldı (Petit, Maftah, Ratinaud & Julien, 1992). 1980'li yıllarda 10-N-nonil- akridin-oranj boyasının yaşayan ökaryotik hücrelere sızdığı ve özellikle mitokondriyi boyadığı belirlenmiştir. Boyamanın iç mitokondriyal membranda daha fazla olduğu görülmüştür. Seyreltilmiş solüsyonlarda NAO'nun mitokondrideki kardiyolipin için oldukça spesifik bir boya olduğu anlaşılmıştır. NAO kardiyolipin ile etkileşime giren büyük bir baş grup ve küçük kuyruk yapısına sahiptir (Mileykovskaya vd., 2001) (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2: Kardiyolipin-NAO etkileşimi

(Mileykovskaya vd., 2001)

İzole edilen mitokondriler 37⁰C'de 145 mM KCl (Potasyum Klorür), 50 mM sükröz, 5 mM NaCl (Sodyum Klorür), 1 mM EGTA (Etilendiamintetraasetik Asit, 1 mM MgCl₂ (Magnezyum Klorür), 10 mM fosfat tamponu içeren tampon A içerisinde 1 saat inkübe edildi. Mitokondriler daha sonra soğuk tampon A ile yıkandı ve 4⁰C'de 15000Xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Pellet aynı tamponda resüspanse edildi ve 37⁰C'de 5 µM nonil-akridin oranj varlığında 45 dakika inkübe edildi. Boyanın fazlası santrifügasyon ile yıkandı ve mitokondriyal pellet spektrofourometrede flouresans ölçüm için (λex 485 nm, λem 535 nm) tampon A ile dilüe edildi. Flouresans değerleri quinine (0,1 N H₂SO₄ içerisinde 1 µg/ml kullanılarak λ ex 360 nm, λ em 457 nm) değerleri referans olarak kullanıldı (Tanusree, Nilkantha, Gayatri, Uttara, & Sasanka, 2006).

3.2.4. Sitokrom c salınımı ölçümü

Sitokrom c salınımının ölçümü için kalp dokusu tampon A (20 mmol/l HEPES-KOH (Potasyum Hidroksit), pH 7,5, 250 mmol/l sükröz, 10 mmol/l KCl, 1,5 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l ditiyotreitöl, 0.1 mmol/l fenilmetilsülfonil florid, 2 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml löpeptin, ve 5 µg/ml pepstatin) içerisinde homojenize edildi. 800Xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet tekrar süspanse edildikten sonra 8000Xg' de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet, tampon B (Tris-HCl, nonidet P-40, CaCl) içerisinde çözüldü ve mitokondriyal fraksiyon olarak kullanıldı. Süpernatant ise 100000Xg'de 1 saat santrifüj edildi ve sonrasında süpernatant sitozolik

fraksiyon olarak kullanıldı (Soeda vd., 2001). Hem mitokondriyal fraksiyonda hem de sitozolik fraksiyonda ticari kit (R&D Systems MCTC0) kullanılarak sitokrom c ölçümü yapıldı. Sitozolik fraksiyonun mitokondriyal fraksiyona oranı mitokondriyal hasarın göstergesi olarak kullanıldı (Grunnet vd., 2009)

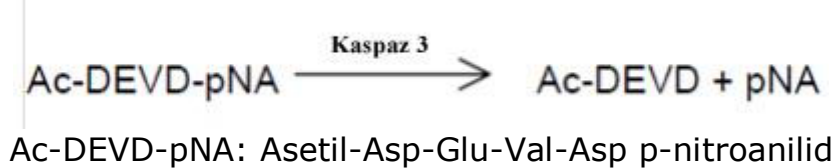
Sitokrom c ölçümü kısaca şu şekilde yapıldı:

- Kitten çıkan *plate* de bulunan her bir kuyucuğa 75 µl konjugat solüsyonu (*Horseradish peroksidaz* bağlı rat/fare sitokrom c antikoru) eklendi.
- 50 µl standart (200 ng rat/fare sitokrom c), kontrol, numune *plate* pipetlenip karıştırıldı. 2 saat oda ısında bekletildi.
- 400 µl yıkama solüsyonu ile her bir kuyucuk 5 kez yıkandı.
- 100µl substrat (H₂O₂ ve Tetrametilbenzidin) eklenip 30 dakika oda ısısında bekletildi.
- 100 µl stop solüsyonu (Hidroklorik asit) eklenip 30 dakika içinde 450 nm'de elisa okuyucu (Victor) ile absorbanslar okutuldu.

Kitin içerisinde çıkan standart ile seri dilüsyon yapıldı. Standartların absorbans değerleri ölçüldü ve kalibrasyon eğrisi yardımıyla sonuçlar ng/ml olarak hesaplandı. Sitozolik fraksiyonun sonuçları mitokondriyal fraksiyona oranlandı.

3.2.5. Kaspaz 3 aktivitesi tayini

Kaspaz 3 aktivitesi kolorimetrik yöntem ile belirlendi. Kaspaz-3 aktivitesinin tayini için ticari kit (Sigma- CASP3C) kullanıldı. Bu kit, asetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilidin (Ac-DEVD-pNA), p-nitroanilin (pNA) oluşacak şekilde kaspaz-3 tarafından hidrolizi ile oluşan pNA absorbansının 405 nm'de ölçüm prensibine dayanmaktadır.



Kalp doku örnekleri lizis tamponunda (250 mM HEPES, pH:7,4, %1 CHAPS (Cholamidpropil Dimetilammonio-1-Propansülfonat), 50 mM DTT, 10 mM EDTA) (1/10) homojenize edilerek 855Xg'de +4°C'de 20 dakika santrifüj

edildi. Süpernatant 18623Xg'de 15 dakika santrifüj edilip, süpernatantta santrifüj işlemi tekrarlandı. Süpernatant fraksiyonunda kaspaz-3 aktivitesi belirlendi (Zovein vd., 2004).

Kaspaz-3 aktivitesi ölçümü kısaca şu şekilde yapıldı:

- 96'lık *plate* kuyucuklarına numune, kör ve standarttan 5 µl eklendi.
- Üzerlerine 85 µl çalışma solüsyonundan (200 mM HEPES, pH 7.4, 1% CHAPS, 50 mM DTT, 20 mM EDTA) eklendi.
- Kaspaz 3 substratı Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilidden 10 µl eklendi.
- 1 saat 37°C'de bekletildikten sonra ELISA okuyucu ile 405 nm'de absorbanlar ölçüldü. p-Nitroanilin kullanılarak standart grafiği çizildi. Doku protein içeriğinin ölçülmesiyle µmol pNA/ dakika/ mg protein olarak ifade edildi.

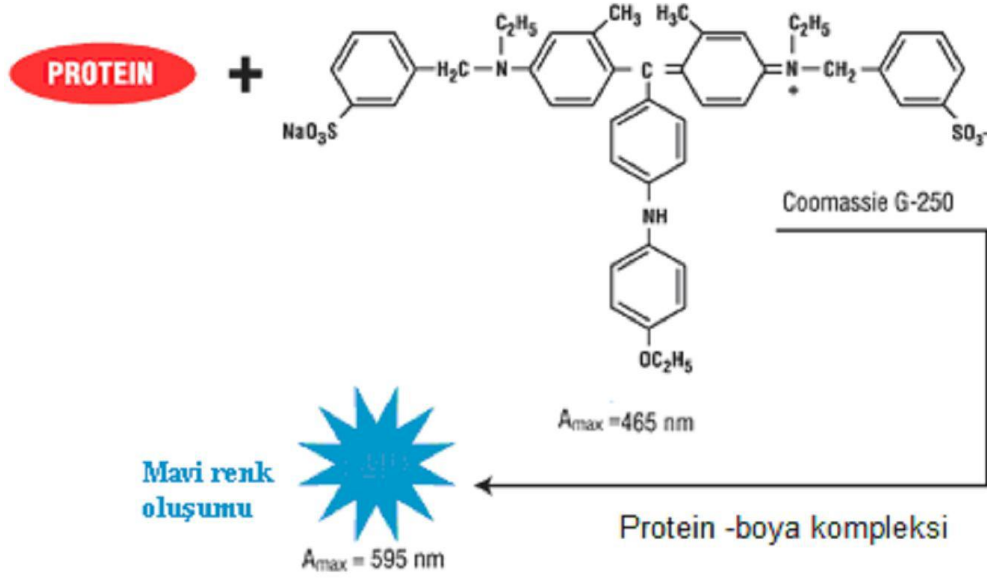
3.2.6. Kalpain aktivasyonu ölçümü

3,2 mM imidazol-HCl içeren 10 mM 2-merkaptoetanol (pH:7.3) "ölçüm tamponu" olarak kullanıldı. 20 mM EGTA ve 25 mM EDTA (pH:7.3) içeren ölçüm tamponu "kalsiyumsuz tampon" olarak kullanıldı. Ölçüm tamponuna 1,25 mM CaCl₂ (pH:7,3) eklenerek "kalsiyumlu tamponu" elde edildi. Dokular (5 ml/g doku) kalsiyumsuz tamponuna konularak homojenize edildi. Daha sonra (14000Xg, 4°C, 30 dakika) santrifüj edildi. Ölçüm süpernatantın kalsiyumsuz tamponda 5 kez dilüe edilmesinden sonra yapıldı. 500 µl dilüe süpernatant içeren 4 tüpün ilk ikisine 1,5 ml kalsiyumsuz tampon eklendi. Diğer ikisine 1,5 ml kalsiyum tamponu eklendi. 37°C de 10 dakikalık ön inkübasyondan sonra 10 µl substrat N-süksinil-Leu-Tyr-7-amino-4-metil kumarin (10 mM DMSO içinde) eklendi. 30 dakikalık inkübasyondan sonra bütün tüpler flouremetrede 380 eksitasyon ve 460 nm emisyonunda okundu. Kalpain aktivitesi kalsiyum bağımlı flouresans ve kalsiyum bağımlı olmayan flouresansın farkı olarak tespit edildi. A 7-amino-4-metil kumarin (AMC) ile standart eğri oluşturuldu. Kalpain aktivitesi total protein ve dakikaya göre AMC salınımı olarak ifade edildi (Mcdonald vd., 2001)

3.2.7. Doku protein miktarı ölçümü

Çalışmamızda bir örnek içerisindeki protein miktarının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden birisi olan bradford yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde boya olarak proteinlerdeki pozitif yüke bağlanan

negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılmaktadır. Asidik çözeltilerde bu boyanın proteinlere bağlanması, boyanın maksimum absorpsiyonunun 465 nm (kırmızı) den 595 nm (mavi) ye kaymasına neden olmaktadır (Metin, 2007).



Şekil 3. 3: Bradford reaksiyonu
(Metin, 2007)

Kalp dokusundan elde ettiğimiz homojenatların protein miktarları Bradford yöntemi ile ölçüldü. 25 mg Coomasie brilliant blue G-250, 12,5 ml %95 etanolde çözüldürülüp, 25 ml %85 fosforik asit (H_3PO_4) eklendi. Bu boya çözeltisi çift distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Bu stok solüsyon bir cam şişede oda sıcaklığında saklandı. Kullanılacağı zaman 5 kere sulandırılarak Whatman filtreden geçirildi.

Ölçüm: 100 μ l örnek 5 ml stok solüsyon ile karıştırıldı, vortekslendi. 5 dakika oda ısısında bekledikten sonra 595 nm spektrofotometrede ölçüldü. Albumin ile seri dilüsyon yapılarak standartlar hazırlandı. Protein sonuçları mg/ml olarak ifade edildi (Bradford, 1976).

3.3. Histolojik Analizler

3.3.1. H&E boyama

Deneyin sonunda sol ventrikülden elde edilen dokular hızla %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda fikse edildi. Fiksasyondan sonra, dokular parafine gömülüp, seri kesitleri alındı (4 µm). Her gruptaki ratdan 50 kesit alındı. Kesitler histolojik analizler için H&E ile, apoptotik analiz için TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick and Labeling) immunohistokimyasal boyaları ile boyandı. Dijital görüntüler, DP70 dijital kamera ataşmanı olan, Olympus BX-61 (Olympus America Inc. NY, USA) ışık mikroskobu ile görüntülendi.

Sol ventriküldeki histopatolojik değişiklikler ve damarsal değişiklikler; hasar yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak skorlandı (Fishbein, Maclean & Maroko, 1978; Morales, Gonzalez, Rodriguez, Bertolasi & Gelpi, 2002).

İnfarkt alanındaki miyokartiyumun değerlendirilmesinde kullanılan histolojik kriterler; miyokartiyal fragmentasyon, çizgilenme kaybı, dalgalı fibriller, myositer hipereozinofili, miyokartiyal hemoraji, interstisyel ödem, nüklear piknozis/karyolizis ve PMNL infiltrasyonu olarak belirlendi (Jackowski, Christe, Sonnenschein, Aghayev & Thali, 2006; Jenkins vd., 2010; Morales vd., 2002; Nakamura vd., 2000; Chuah, Moore & Zhu, 2007).

Damarsal değişikliklerin değerlendirilmesindeki kriterler ise; konjesyon, hemoraji, eozinofilik amorf materyal, perivasküler fibrozis ve mikrodamarların dilatasyonu olarak belirlendi (Fishbein vd., 1978; Morales Vd.,2002).

3.3.2. Apoptozun değerlendirilmesi

Apoptoz sırasında genomik DNA'nın kesilmesi, şablondan bağımsız biçimde serbest 3'-OH uçlarında etiketli nükleotidlerin polimerizasyonunu katalizleyen terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ile etiketlenebilen çift sarmallı, düşük molekül ağırlığına sahip DNA sarmalı parçalarını verebilir (TUNEL reaksiyonu). Apoptotik hücre ölümünün kantitesi, *in situ* hücre ölüm belirleme kiti (Katalog no:S7101; Chemicon International-ApopTag Plus Peroxidase Kits, USA) kullanılarak değerlendirildi. Önce seri kesitler ksilolde 3 kez deparafinize edildi. Azalan dereceli alkollerden geçirilerek rehidre edilen kesitler, PBS (Fosfat tamponu)'de yıkandı. Daha sonra, kesitlere oda ısısında 15 dakika proteinase K (20 µg/ml) (Merck) sindirimi sağlandı ve 2 kez PBS'te yıkandı. Daha sonra kesitler oda ısısında ekilibrasyon tamponunda inkübe

edildi. Dokular nem çemberinde ve karanlıkta 37°C'de, 60 dakika TUNEL reaksiyon karışımında (%70 reaksiyon tamponu, %30 TdT enzimi) inkübe edildi. Kesitler oda ısısında, 10 dakika durdurma/yıkama tamponunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, kesitler 3 kez PBS'te yıkandı. Daha sonra kesitlere anti-digoxigenin konjugatı uygulandı ve oda ısısında 30 dakika nem çemberinde inkübe edildi. 4 kez daha PBS'te yıkanan kesitlere, 10 dakika DAB (diaminobenzidin) uygulandı. Daha sonra kesitler distile suda 3 kez yıkanarak, kurumaya bırakıldı. Sol ventrikülden elde edilen 4 µm'lik horizontal kesitlerdeki miyokartiyal nükleuslar TUNEL yöntemi ile işaretlendi. Kahverengi boyanmış olan nükleuslar TUNEL (+)olarak kabul edildi. Miyositler x40'lık objektifte ve rastgele seçilmiş 10 optik alanda sayıldı. Sayılan nükleusların apoptotik indeksi (Aİ) hesaplandı (Aİ=TUNEL yöntemi ile işaretlenen miyokartiyal nükleusların sayısı/toplam miyokartiyal nükleusların sayısı) (Nakamura vd., 2000).

3.3.3. Morfolojik değerlendirme

Ratların sol ventrikülünden kesitler alınarak, bu kesitler üzerinde miyokart tabakasından geçen 7x7'lik nokta sayım griti kullanıldı. Buna göre; bu gritteki toplam 49 noktanın kaç tanesinin fibröz doku üzerine düştüğü sayıldı. Elde edilen fibröz doku sonuçları kullanılarak Haugan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da olduğu gibi her rat için relatif infarkt alanı bir formül yardımıyla hesaplandı.

$$\text{Relatif infarkt alanı \% (x)} = \frac{V(\text{fibröz, x}) - V(\text{fibröz, kontrol})}{V(\text{fibröz, MI}) - V(\text{fibröz, kontrol})} * 100$$

Formülde sayılan V (fibröz, MI) ve V (fibröz, kontrol) değerleri yerine koyularak alkol ve alkol+MI, alkol+MI+inhibitör gruplarının infarkt alanı yüzdeleri hesaplandı. Grafik çizilirken kontrol ve çözücü gruplarında infarkt alanı yüzdesi 0, MI grubu infarkt alanı yüzdesi 100 kabul edilerek çizilmiştir (Haugan vd., 2006).

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 ve ve Sigmastat 3.5 (Statcon INC., B. Schäfer, Witzenhausen GERMANY) paket programı kullanıldı. Gruplar arasında klinik ve metabolik değişken ölçümleri açısından fark olup olmadığını analiz etmek için öncelikle dağılımların normal dağılıma uygunlukları analiz edildi. Parametrik verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov testi

kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmaları Tek Yönlü Varyans Analiz (Oneway ANOVA) testi ve grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen verilerin karşılaştırmaları Kruskal Wallis testi kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin çoklu karşılaştırılmaları Dunn"s testi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama±standart sapma (SD, standard deviation) ve Median (%25-%75 percentiles) olarak verildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4- BULGULAR

4.1. EKG Bulguları

Çalışmamızdaki EKG sonuçlarımız tablo 4.1 ve şekil 4.1-4.6 'da gösterilmektedir. Çalışmamızdaki alkol, MI grubu P-P aralığı sonuçlarımız kontrol grubumuz ile karşılaştırıldığında düşük bulunmasına rağmen en çok düşme alkol+MI grubumuzda gözlemlendi ve bu düşüş kontrol, alkol ve MI grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$). Kalpain inhibitörü 1 uygulanan grupta ise MI grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0,001$).

Çalışmamızdaki alkol ve MI gruplarımızdaki QRS kompleks sonuçlarımız kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük bulundu (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,001$). Alkol+MI grubumuzdaki bu düşme diğer gruplara göre çok daha fazlaydı (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$; alkol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$; MI grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,01$). İnhibitör uygulanan grubumuzda ise alkol, MI, alkol+MI grupları ile karşılaştırıldığında kontrol grubu kadar yükselme gözlemlendi ve bu yükselme istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$, $p<0,001$).

Ventriküllerin depolarizasyonu ve repolarizasyonu için geçen toplam süreyi yansıtan QT aralığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında alkol ve MI gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan artma gözlemlenirken, alkol+MI grubunda en fazla artış gözlemlendi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$). Alkol+MI+inhibitör grubunda ise kontrole yakın düzeyde düşme gözlemlendi ve bu düşüş alkol, MI ve alkol+MI grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,001$; $p<0,001$).

Alkol, MI ve alkol+MI gruplarındaki R-R aralığı sonuçlarımız kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük bulundu ve istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$). Alkol+MI+ kalpain inhibitörü grubunda ise alkol ve MI gruplarına göre artış gözlemlendi ($p<0,001$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında alkol ve MI gruplarında kalp atım hızında artış gözlemlendi. Alkol+MI grubunda bu artış çok daha fazlaydı ve bu artış kontrol, alkol, MI grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$). Alkol+MI+kalpain inhibitör uygulanan grupta kalp atım hızı kontrol grubuna yakındı ve alkol+MI grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$).

Özetle çalışmamızdaki EKG sonuçlarımız göstermektedir ki alkol tüketimi ve MI'ın ayrı ayrı kalp üzerine zarar verici etkisi vardır ve bu etki alkol+MI'ın birlikte olduğu grupta çok daha fazla olmuştur ve bir miktar da olsa kalp hızını inhibetörü uygulanan grupta tedavi edici etkinlik gözlenmiştir.

Tablo 4. 1: EKG sonuçları

Deney Grupları	P-P ARALIĞI	QRS KOMPLEKSİ	Q-T ARALIĞI	R-R ARALIĞI	KALP HIZI
KONTROL GRUBU	0,020±0,002 (%100)	0,042±0,003 (%100)	0,098±0,008 (%100)	0,222±0,001 (%100)	270±20 (%100)
ALKOL GRUBU	0,018±0,002 (%90)	0,030±0,002 (%72) a	0,108±0,002 (%110)	0,200±0,002 (%90) a	300±20 (%111)
MI GRUBU	0,015±0,002 (%75) a,b	0,022±0,002 (%52) a,c	0,111±0,002 (%113)	0,123±0,001 (%55) a,c	488±20 (%181) a,b
ALKOL+MI GRUBU	0,010±0,002 (%50) a,c,d	0,010±0,002 (%27) a,c,d	0,120±0,020 (%123) a	0,120±0,002 (%54) a,c,d	500±20 (%185) a,c,d
ALKOL+MI+ İNHİBİTÖR GRUBU	0,020±0,002 (%100) d	0,040±0,002 (%95) c,d,e	0,090±0,002 (%92) b,d,e	0,205±0,002 (%92) c,d	293±20 (%108) c,e
ÇÖZÜCÜ GRUBU	0,020±0,002 (%100)	0,040±0,002 (%95) c,e	0,085±0,002 (%87) c,d,e	0,208±0,001 (%93) c,d	289±2 (%107) e

EKG parametreleri saniye olarak, kalp hızı ise dakikadaki atım (BPM) olarak verildi.

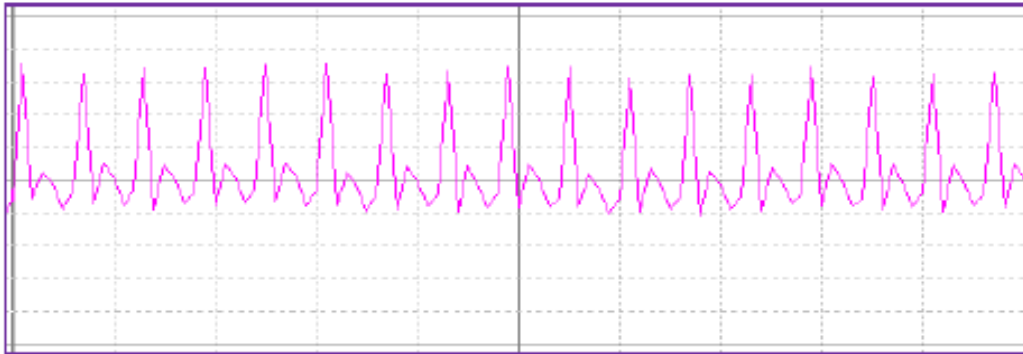
- a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$
- b: Alkol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$
- c: Alkol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$
- d: MI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$
- e: Alkol+MI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$



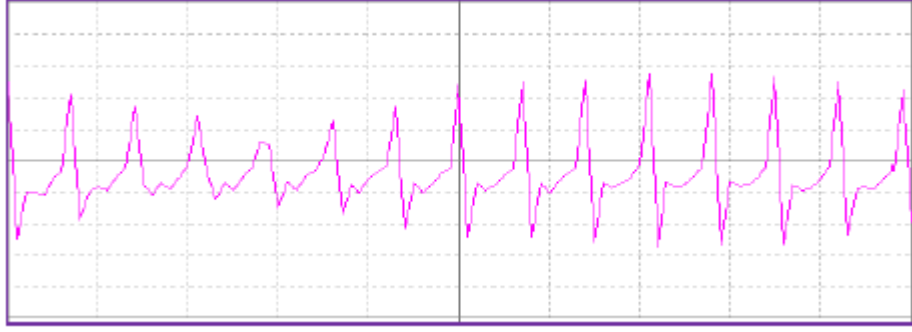
Şekil 4. 1: Kontrol grubu EKG örneği



Şekil 4. 2: Alkol grubu EKG örneği



Şekil 4. 3: MI grubu EKG örneği



Şekil 4. 4: Alkol+MI grubu EKG örneği



Şekil 4. 5: Alkol+MI+İnhibitör grubu EKG örneği



Şekil 4. 6: Çözücü grubu EKG örneği

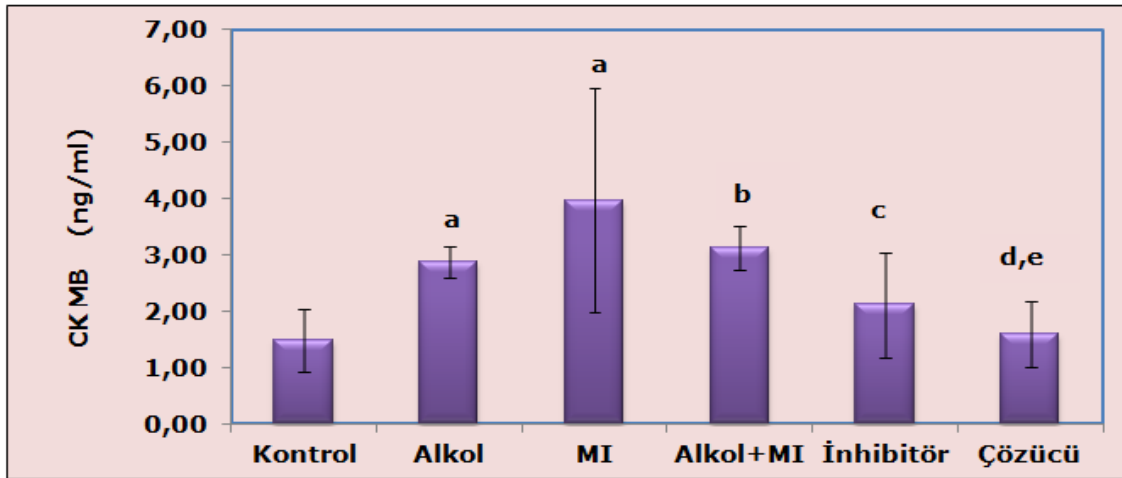
4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Serum CK-MB düzeyleri

Çalışmamızdaki serum CK-MB düzeyleri tablo 4.2 ve şekil 4.7’de gösterilmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında alkol, MI ve alkol+MI gruplarındaki serum CK-MB düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulundu (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,05$). İnhibitör grubunda ise MI grubuna göre anlamlı derecede düşme gözlemlendi ($p<0,05$). MI ve alkol+MI grupları ile karşılaştırıldığında çözücü grubu CK MB düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşme gözlemlendi (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,05$).

Tablo 4. 2: Serum CK MB sonuçları

Deney Grupları	Ortalama \pm Standart Sapma
Kontrol	1,48 \pm 0,55
Alkol	2,87 \pm 0,28 ^a
MI	3,96 \pm 1,99 ^a
Alkol+MI	3,12 \pm 0,40 ^b
İnhibitör	2,11 \pm 0,93 ^c
Çözücü	1,59 \pm 0,58 ^{d,e}



Şekil 4. 7: Serum CK MB düzeyleri

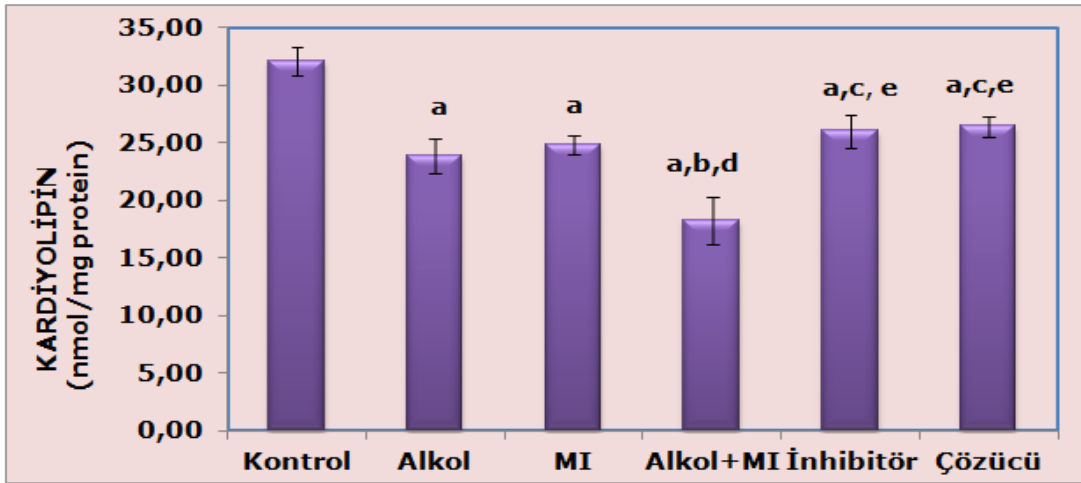
- a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$
- b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$
- c: MI grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$
- d: MI grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$
- e: Alkol+MI grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$

4.2.2. Mitokondriyal kardiyolipin içeriği

Çalışmamızdaki mitokondriyal kardiyolipin içeriğleri tablo 4.3 ve Şekil 4.8'de gsterilmektedir. Alkol, MI, alkol+MI, inhibitör ve çözücü gruplarındaki mitokondriyal kardiyolipin içeriği kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,001$). Üstelik bu düşüş alkol+MI grubunda diğer gruplardan daha fazlaydı ve alkol ve MI grupları ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). İnhibitör ve çözücü gruplarındaki mitokondriyal kardiyolipin içeriği alkol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak Şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). Alkol+MI grubu ile karşılaştırıldığında inhibitör ve çözücü gruplarındaki mitokondriyal kardiyolipin içeriği istatistiksel olarak anlamlı olacak Şekilde yüksek bulundu ($p<0,001$).

Tablo 4. 3: Mitokondriyal kardiyolipin içeriği sonuçları

Deney Grupları	Ortalama \pm Standart Sapma
Kontrol	32,10 \pm 1,23
Alkol	23,84 \pm 1,50 ^a
MI	24,84 \pm 0,82 ^a
Alkol+MI	18,17 \pm 2,05 ^{a,b,d}
İnhibitör	25,97 \pm 1,41 ^{a,c,e}
Çözücü	26,41 \pm 0,89 ^{a,c,e}



Şekil 4.8: Mitokondriyal kardiyolipin içeriği

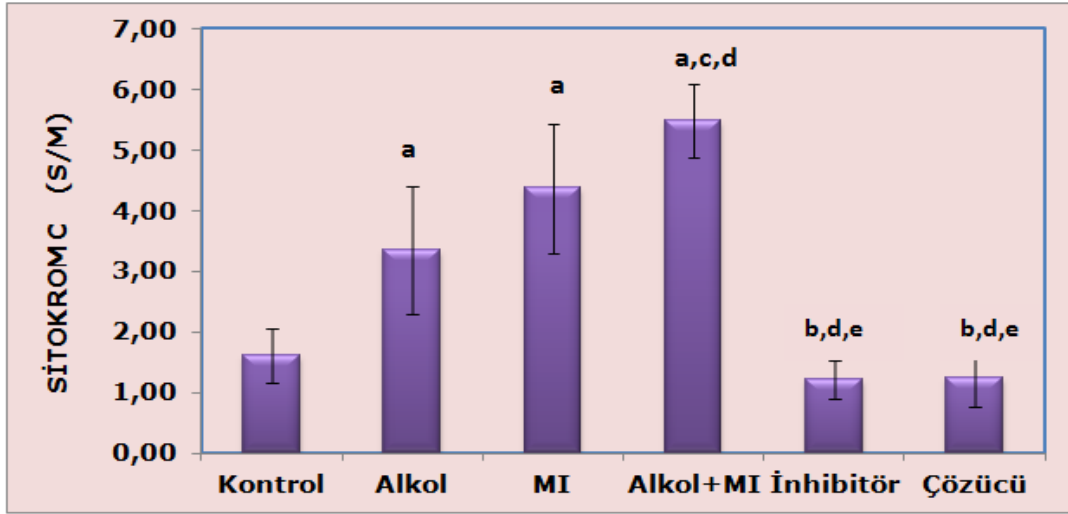
- a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$
- b: Alkol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$
- c: Alkol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$
- d: MI grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$
- e: Alkol+MI grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$

4.2.3. Sitokrom c salınımı

Çalışmamızdaki sitokrom c salınım oranları tablo 4. 4 ve şekil 4. 9'da gösterilmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında alkol, MI ve alkol+MI gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseldi ($p < 0,001$). Sitokrom c salınım oranı alkol+MI grubunda yalnızca MI geçiren grubuna göre daha yüksek bulundu ($p < 0,05$). İnhibitör ve çözücü gruplarında ise alkol, MI ve alkol+MI gruplarına göre istatistiksel olarak ileri düzeyde düşme gözlemlendi ($p < 0,001$).

Tablo 4. 4: Sitokrom c salınım oranları (Sitozolik/Mitokondriyal)

Deney Grupları	Ortalama \pm Standart Sapma
Kontrol	1,61 \pm 0,45
Alkol	3,34 \pm 1,05 ^a
MI	4,37 \pm 1,07 ^a
Alkol+MI	5,48 \pm 0,60 ^{a,d,c}
İnhibitör	1,21 \pm 0,32 ^{b,d,e}
Çözücü	1,23 \pm 0,46 ^{b,d,e}



Şekil 4. 9: Sitokrom c salınım oranları

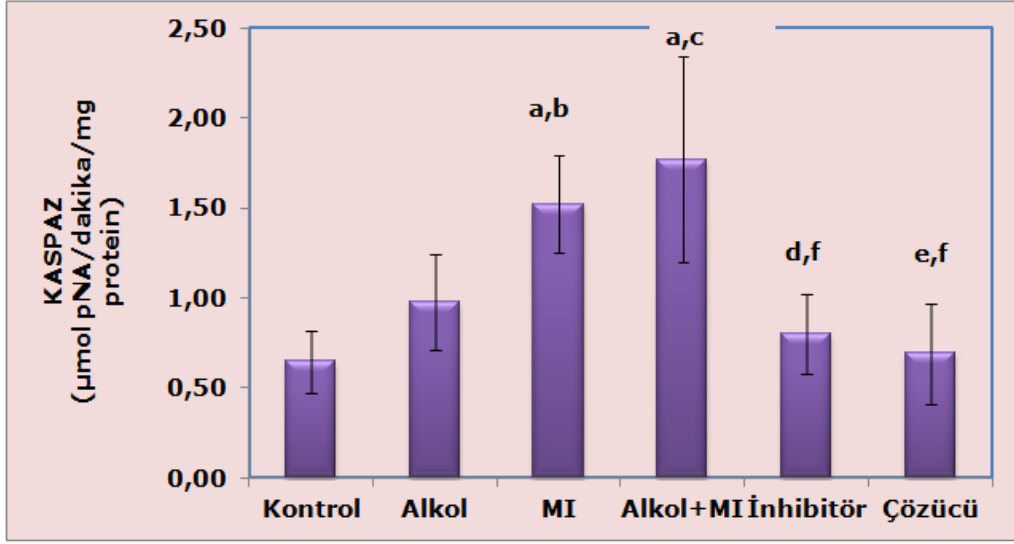
- a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$
- b: MI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$
- c: MI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$
- d: Alkol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$
- e: Alkol+MI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$

4.2.4. Kaspaz 3 aktivitesi

Çalışmamızdaki kaspaz 3 aktivitesi sonuçları tablo 4. 5 ve şekil 4. 10'da gösterilmektedir. Alkol, MI ve alkol+MI gruplarındaki kaspaz 3 aktivitesi diğer gruplara göre yüksekti ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MI ve alkol+MI grubunda istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$). Alkol grubu ile karşılaştırıldığında MI grubunda ($p<0,05$) ve alkol+MI grubunda kaspaz 3 aktivitesi istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksekti ($p<0,001$). MI grubu ile karşılaştırıldığında inhibitör grubunda istatistiksel olarak önemli düzeyde düşme gözlemlendi ($p<0,05$). Çözücü grubunda ise MI grubuna göre ileri derecede önemli düşme oldu ($p<0,001$). İnhibitör ve çözücü grubunda alkol+mı grubuna göre ileri derecede önemli düşme gözlemlendi ($p<0,001$).

Tablo 4. 5: Kaspaz 3 aktivitesi düzeyleri

Deney Grupları	Ortalama \pm Standart Sapma
Kontrol	0,65 \pm 0,17
Alkol	0,98 \pm 0,27
MI	1,52 \pm 0,27 ^{a,b}
Alkol+MI	1,77 \pm 0,57 ^{a,c}
İnhibitör	0,80 \pm 0,22 ^{d,f}
Çözücü	0,69 \pm 0,28 ^{e,f}



Şekil 4. 10: Kaspaz aktivitesi düzeyleri

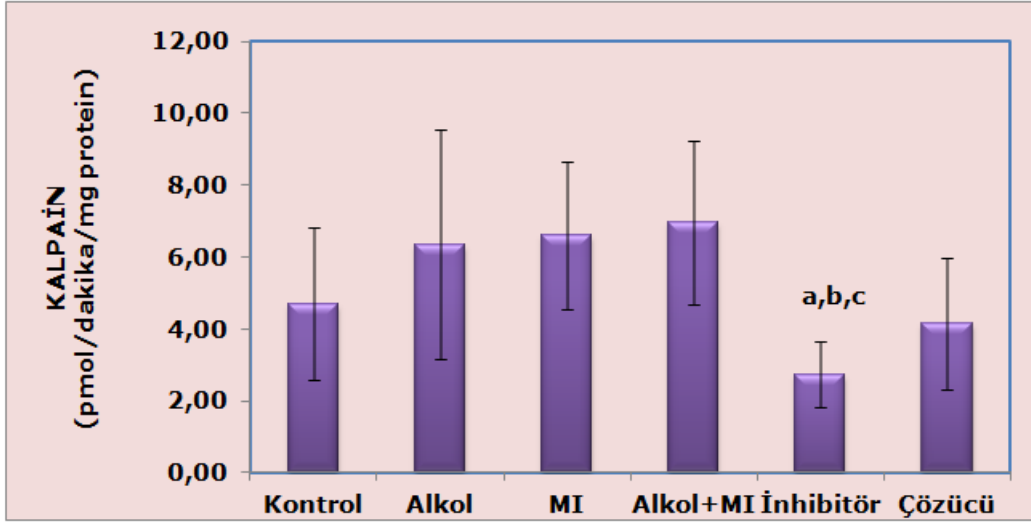
- a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$
b: Alkol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$
c: Alkol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$
d: MI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$
e: MI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$
f: Alkol+MI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$

4.2.5. Kalpain aktivitesi

Çalışmamızdaki kalpain aktivitesi sonuçlarımız tablo 4. 6 ve şekil 4. 11'de gösterilmektedir. Alkol, MI ve alkol+MI gruplarındaki kalpain aktivitesi düzeyleri kontrol grubundan yüksekti fakat bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). İnhibitör grubunda ise alkol, MI ve alkol+MI gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşme gözlemlendi (sırasıyla $p < 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,05$).

Tablo 4. 6: Kalpain aktivitesi düzeyleri

Deney Grupları	Ortalama \pm Standart Sapma
Kontrol	4,70 \pm 2,11
Alkol	6,35 \pm 3,20
MI	6,58 \pm 2,05
Alkol+MI	6,97 \pm 2,27
İnhibitör	2,73 \pm 0,92 ^{a,b,c}
Çözücü	4,15



Şekil 4. 11: Kalpain aktivitesi düzeyleri

- a: Alkol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$
b: MI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$
c: Alkol+MI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$

4.3. Histolojik Bulgular

4.3.1. H&E bulguları

H&E bulgularına göre; miyokartiyumun infarkt bölgesindeki histopatolojik değişiklikler değerlendirildi (Tablo 4. 7- 4. 8).

- Miyokartiyal fragmentasyon ve çizgilenme kaybı açısından alkol ve çözücü grubunda, kontrol grubuna göre bir farklılık gözlenmezken, diğer tüm gruplarda kontrol ve alkol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir hasar vardı ($p < 0,001$).

- Dalgalı fibril görünümü alkol+MI grubunda (Şekil 4. 15b, c) kontrol grubuna göre (Şekil 4. 12a,b) istatistiksel olarak daha fazlaydı. Alkol (Şekil 4. 13c) ile alkol+MI (Şekil 4. 15b,c) grupları arasında ve alkol+MI (Şekil 4. 15 b,c) ile çözücü grupları (Şekil 4. 17) arasında yapılan karşılaştırmalarda da anlamlı farklılık gözlemlendi ($p < 0,001$). Alkol+MI grubundaki hasar dikkat çekici idi.

- Miyositer hipereozinofili bulgusu kontrol (Şekil 4. 12a,b) ile alkol+MI (Şekil 4. 15a,b), kontrol (Şekil 4. 12a,b) ile çözücü (Şekil 4. 17c), alkol (Şekil 4. 13b) ile alkol+MI (Şekil 4. 15a,b), ve alkol (Şekil 4. 13b), ile çözücü

grupları (Şekil 4. 17c) arasındaki karşılaştırmalar da anlamlı idi ($p<0,001$). Alkol+MI ve çözücü gruplarında hasar belirgindi.

- Miyokartiyal hemoraji açısından değerlendirildiğinde MI (Şekil 4.14 a), alkol+MI (Şekil 4.15 a,b) ve alkol+MI+kalpain inhibitörü gruplarında (Şekil 4.16 c), kontrol grubuna göre (Şekil 4.12 a,b) anlamlı bir farklılık vardı ($p<0,001$).

- İnterstisyel ödem, kontrol (Şekil 4.12 a,b) ile MI (Şekil 4.14 a,b), kontrol (Şekil 4.12 a,b) ile alkol+MI (Şekil 4.15 a-d), alkol (Şekil 4.13 b) ile MI ve alkol ile Alkol+MI grupları arasındaki karşılaştırmalarda anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,001$). En belirgin ödem bulgusu MI ve alkol+MI gruplarında izlendi.

- Nüklear piknozis ve karyolizis açısından değerlendirme yapıldığında kontrol (Şekil 4.12 a,b) ile alkol+MI (Şekil 4.15 a,c,d), kontrol ile çözücü (Şekil 4.17 a,c), alkol ile alkol+MI ve alkol ile çözücü grupları arasında anlamlı farklılık vardı ($p<0,001$). MI ve alkol+MI gruplarındaki hasar dikkat çekici idi.

- PMNL infiltrasyonu kontrol (Şekil 4.12 a,b) ile MI, kontrol ile alkol+MI, alkol ile MI, alkol ile alkol+MI, alkol+MI ile çözücü ve MI (Şekil 4.14 b) ile çözücü grupları (Şekil 4.17 d) arasındaki karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$). PMNL infiltrasyonu MI ve Alkol+MI gruplarında belirgindi.

Tüm bu verilerin ışığı altında, alkolün tek başına sadece hemoraji ve ödem bulgularında artırıcı etkisi gözlemlendi. MI ise tüm histopatolojik kriterler açısından ciddi hasar yaratmıştı. Alkolün MI ile birlikte bu hasarları biraz daha arttırdığı gözlemlendi. Alkol+MI grubuna kalpain inhibitörü ile tedavi uygulandığında, dalgalı fibrillerin, miyosit hipereozinofilisinin, interstisyel ödemin, nüklear piknozis/karyolizis ve PMNL infiltrasyonunun, alkol+MI grubundaki hasara göre biraz daha azaldığı görülse de, bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı değildi. Miyokartiyal fragmentasyon ve çizgilenme kaybında, alkol+MI+kalpain inhibitörü grubunda, sadece alkol grubuna göre anlamlı bir iyileşme gözlemlendi. Genel olarak bakıldığında kalpain inhibitörünün istatistiksel olarak sadece miyokartiyal fragmentasyon ve çizgilenme kaybında azalmaya yardımcı olduğu, diğer histopatolojik kriterler açısından ise anlamlı olmayan, ancak iyileşmeye yardımcı olabilecek bir ajan olduğu izlendi (Tablo 4.7).

- Kesitlerdeki vasküler değişiklikler incelendiğinde; konjesyonun kontrol (Şekil 4. 12a,b) ile MI (Şekil 4. 14a,b,c), kontrol ile alkol+MI+kalpain inhibitörü (Şekil 4. 16a,b) ve alkol+MI (Şekil 4. 15b,c,d) ile çözücü (Şekil 4.

17b,c) grupları arasındaki karşılaştırmalarda anlamlı bir farklılık gösterdiği izlendi ($p<0,001$). Konjesyon bulgusu, bu gruplarda kontrol grubuna göre artmıştı.

- Hemoraji bulgusu MI (Şekil 4. 14c), alkol+MI (Şekil 4. 15a,b) ve alkol+MI+kalpain inhibitörü gruplarında (Şekil 4. 16c), kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdi ($p<0,001$).

- Eozinofilik amorf materyal birikimi alkol+MI (Şekil 4. 15b) ve alkol+MI+kalpain inhibitörü gruplarında (Şekil 4. 16b,c) kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0,001$). Çözücü grubunda (Şekil 4. 17c) ise alkol+MI grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,001$).

- Perivasküler fibrozis açısından değerlendirildiğinde, kontrol (Şekil 4.12 a,b) ile alkol+MI grubu (Şekil 4. 15b) arasında anlamlı farklılık vardı ($p<0,001$). Çözücü grubunda (Şekil 4. 17c) ise alkol+MI grubuna (Şekil 4. 15 c) göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,001$).

- Mikrodamarların dilatasyonunda MI (Şekil 4. 14 a,c), alkol+MI (Şekil 4. 15b,c) ve alkol+MI+kalpain inhibitörü gruplarında (Şekil 4. 16a-d) kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış vardı ($p<0,001$).

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde; kalpain inhibitörünün eozinofilik amorf materyal birikimi ve perivasküler fibrozis artışını azalttığını gözlemlese de, bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kalpain inhibitörünün diğer damarsal değişikliklerin iyileşmesinde anlamlı bir katkısı olmadığı görüldü (Tablo 4.8).

Tablo 4. 7: Miyokartiyal dokudaki histolojik değişiklikler

Gruplar	Miyokartiyal Değişiklikler Median (%25-%75 Persantil)							
	Miyokartiyal fragmentasyon	Çizgilenme kaybı	Dalgalı fibriller	Miyositer hipereozinofili	Miyokartiyal hemoraji	İnterstisyel ödem	Nüklear piknozis/karyolizis	PMNL infiltrasyonu
Kontrol	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,00)
Alkol	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,00)	2,00(1,00-,00)	1,00(1,00-,00)	0,00(0,00-,00)	0,00(0,00-,25)
MI	3,00(2,75-,00)	2,00(2,00-,00)	2,00(1,00-,25)	2,00(1,75-,00)	3,00(3,00-,00)	3,00(3,00-,00)	2,00(1,00-,00)	3,00(2,00-,00)
Alkol+MI	3,00(2,75-,00)	2,00(2,00-,00)	3,00(3,00-,00)	2,00(2,00-,00)	3,00(3,00-,00)	3,00(3,00-,00)	2,00(2,00-,00)	3,00(2,75-,00)
Alkol+MI+İnhibitör	3,00(2,00-,00)	2,00(2,00-,00)	2,00(2,00-,00)	1,00(1,00-,00)	3,00(3,00-,00)	2,00(2,00-,00)	1,00(1,00-,00)	1,00(1,00-,25)
Çözücü	1,00(1,00-,00)	1,00(1,00-,00)	0,00(0,00-,25)	2,00(2,00-,25)	1,00(1,00-,00)	1,00(1,00-,00)	2,00(2,00-,25)	0,00(0,00-,25)
P	p<0.001 a,b,c,e,f,g,	p<0.001 a,b,c,e,f,g	p<0.001 b,f,k	p<0.001 b,d,f,h	p<0.001 a,b,c	p<0.001 a,b,e,f	p<0.001 b,d,f,h	p<0.001 a,b,e,f,k,l

0: hasar yok, **1:** hafif, **2:** orta, **3:** şiddetli

- a:** Kontrol ve MI grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
b: Kontrol ve Alkol+MI grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
c: Kontrol ve Alkol+MI+Kalpain grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
d: Kontrol ve Çözücü grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
e: Alkol ve MI grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
f: Alkol ve Alkol+MI grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
g: Alkol ve Alkol+MI+Kalpain w grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
h: Alkol ve Çözücü grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
k: Alkol+MI ve Çözücü grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
l: MI ve Çözücü grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)

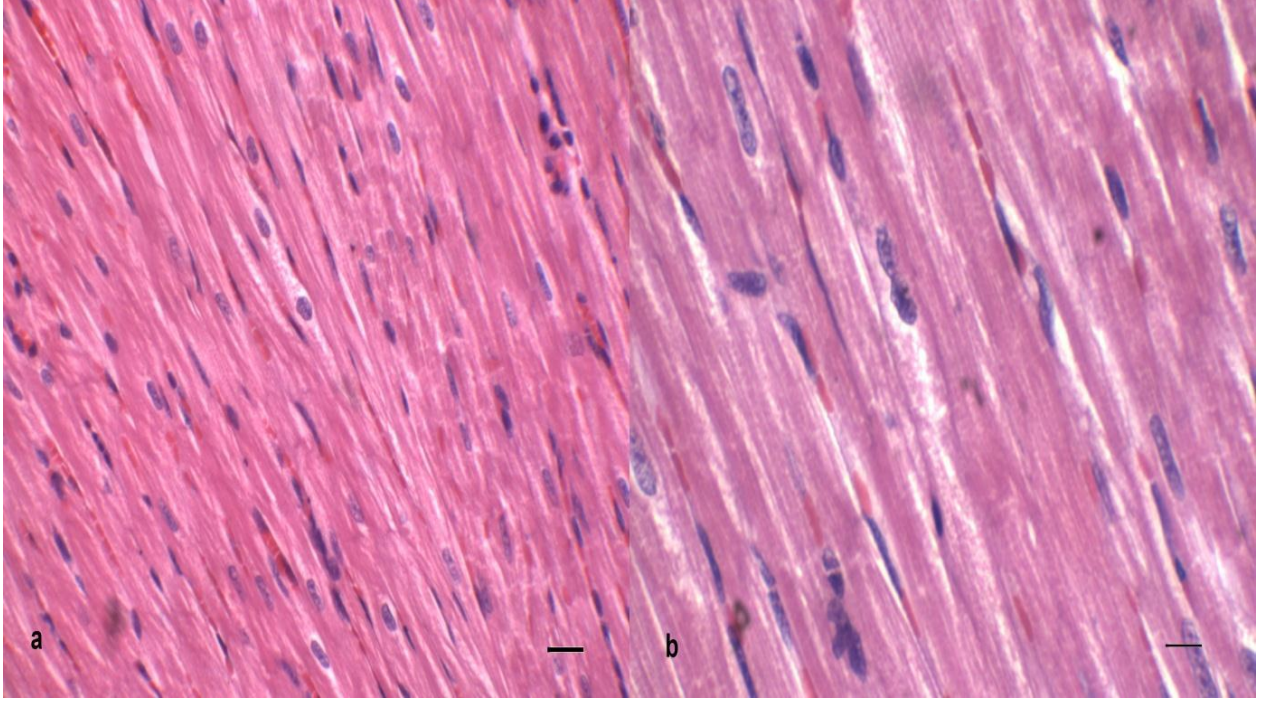
Tablo 4. 8: Damarlardaki histolojik değişiklikler

Gruplar	Damarsal Değişiklikler Median (%25-%75 Persantil)				
	Konjesyon	Hemoraji	Eozinofilik amorf materyal	Perivasküler fibrozis	Mikrodamar dilatasyonu
Kontrol	1,00(0,75-1,00)	0,00(0,00-0,00)	0,00(0,00-0,25)	0,00(0,00-0,00)	0,00(0,00-0,00)
Alkol	2,00(2,00-2,00)	1,00(0,00-2,00)	1,00(1,00-1,00)	1,00(1,00-1,25)	2,00(1,75-2,00)
MI	3,00(3,00-3,00)	3,00(3,00-3,00)	2,00(1,75-2,00)	1,00(1,00-2,00)	3,00(3,00-3,00)
Alkol+MI	3,00(2,00-3,00)	3,00(2,75-3,00)	3,00(2,75-3,00)	3,00(3,00-3,00)	3,00(3,00-3,00)
Alkol+MI+ İnhibitör	3,00(3,00-3,00)	3,00(3,00-3,00)	2,00(2,00-3,00)	1,00(1,00-1,00)	3,00(3,00-3,00)
Çözücü	3,00(3,00-3,00)	0,00(0,00-1,00)	1,00(0,00-1,00)	0,00(0,00-0,00)	3,00(3,00-3,00)
P	p<0.001 a,c,d	p<0.001 a,b,c	p<0.001 b,c,e	p<0.001 b,e	p<0.001 a,b,c

0: hasar yok, **1:** hafif, **2:** orta, **3:** şiddetli

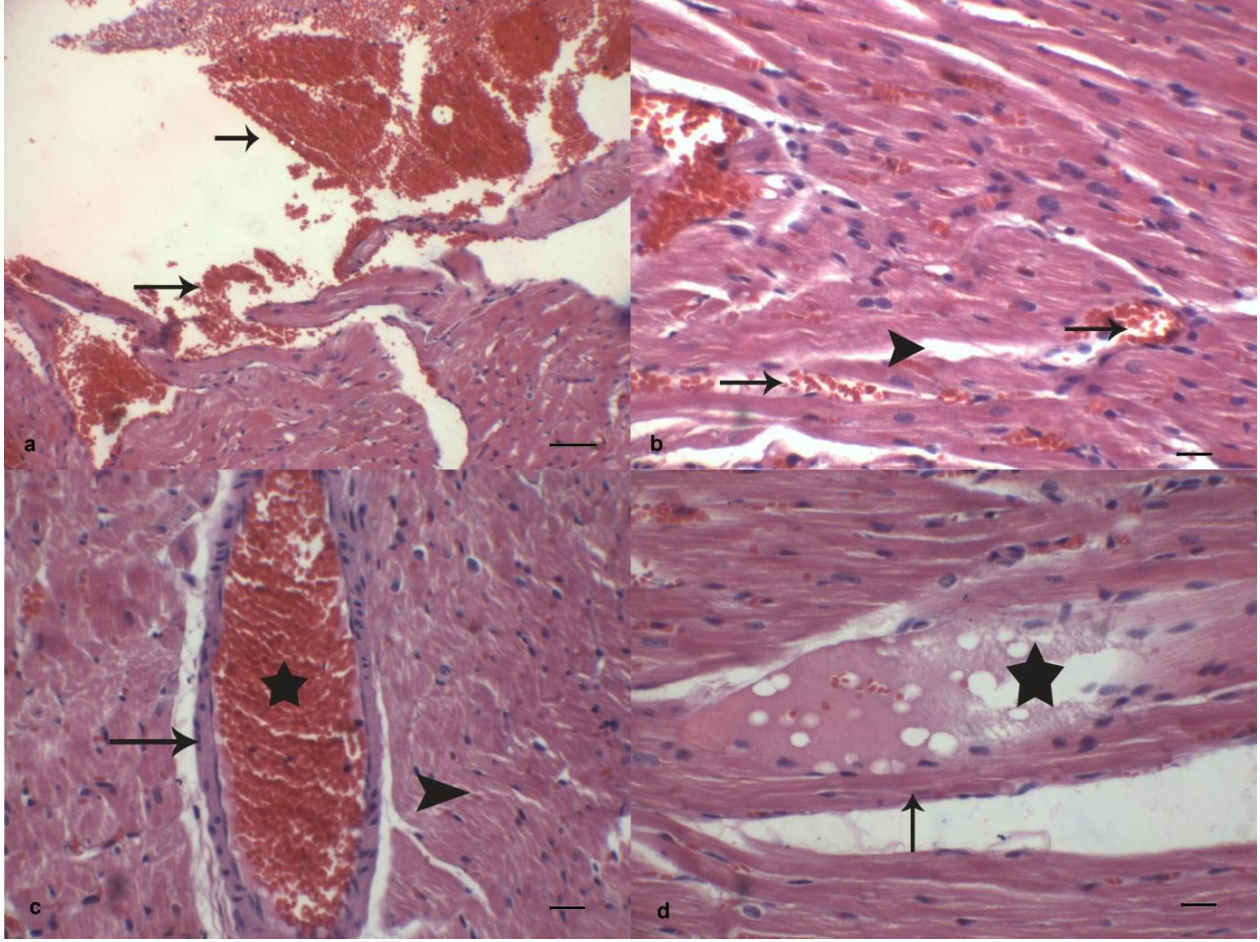
- a:** Kontrol ve MI grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
b: Kontrol ve Alkol+MI grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
c: Kontrol ve Alkol+MI+Kalpain grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
d: Kontrol ve DMSO grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)
e: Alkol+MI ve DMSO grupları arasında istatistiksel fark (p<0,05)

H&E



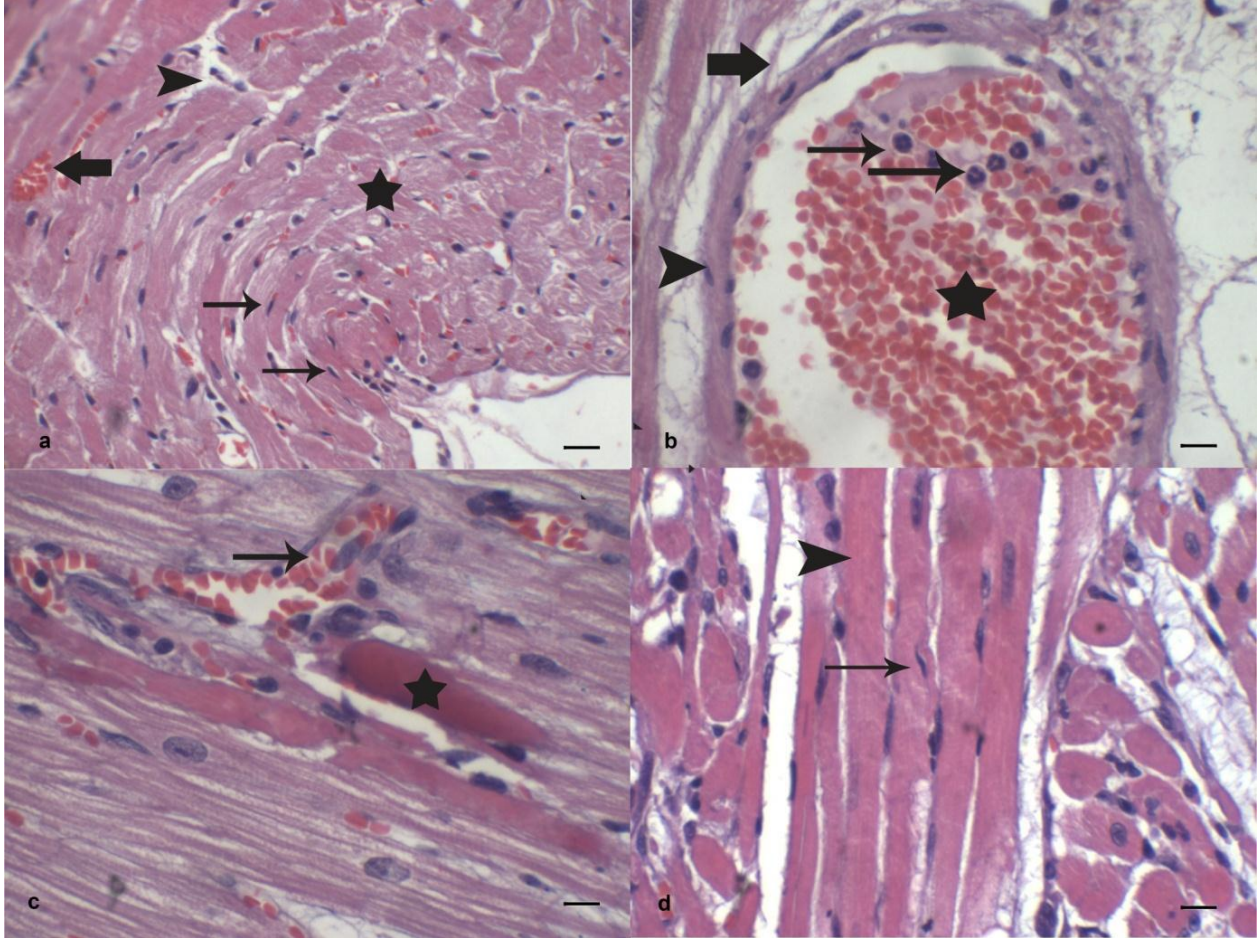
Şekil 4. 12: Kontrol grubu genel görünüm

- a)** Kontrol grubu miyokart dokusuna ait normal görünüm. H&E, Bar: 20 μ m
b) Kontrol grubu miyokart dokusuna ait normal görünüm. H&E, Bar: 10 μ m



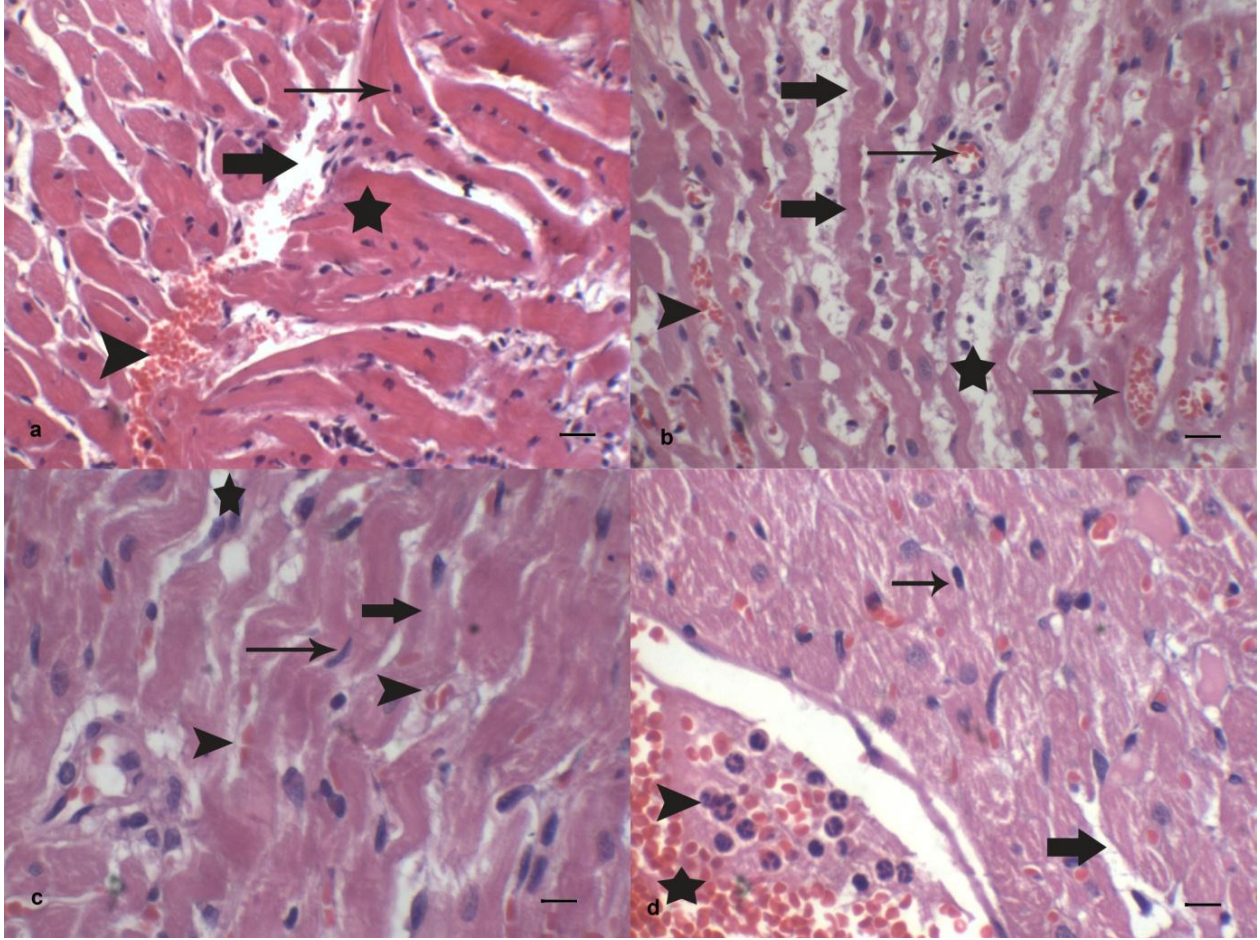
Şekil 4. 13: Alkol grubu genel görünüm

- a)** Alkol grubunda miyokartiyal hemoraji (ok). H&E, Bar: 50 μ m
b) Alkol grubunda konjesyon ve mikrodamar dilatasyonu (ok), interstisyel ödem (ok başı). H&E, Bar: 20 μ m
c) Alkol grubunda perivasküler fibrozis(ok), konjesyon (yıldız) ve dalgalı fibriller (ok başı). H&E, Bar: 20 μ m
d) Alkol grubunda damar içi eozinofilik amorf materyal birikimi (yıldız) ve perivasküler fibrozis (ok). H&E, Bar: 20 μ m



Şekil 4. 14: MI grubu genel görünüm

- a)** MI grubunda dalgalı fibriller, konjesyon (kalın ok), interstisyel ödem (ok başı) ve nüklear piknozis (ok). H&E, Bar: 20 μ m
- b)** MI grubunda PMNL infiltrasyonu (ok), perivasküler fibrozis (ok başı), interstisyel ödem (kalın ok), damar içi eozinofilik amorf materyal birikimi ve konjesyon (yıldız). H&E, Bar: 10 μ m
- c)** MI grubunda miyositer hipereozinofili (yıldız), çizgilenme kaybı ve konjesyon (ok). H&E, Bar: 10 μ m
- d)** MI grubunda nüklear piknozis (ok), çizgilenme kaybı ve miyositer hipereozinofili (ok başı).H&E, Bar: 10 μ m



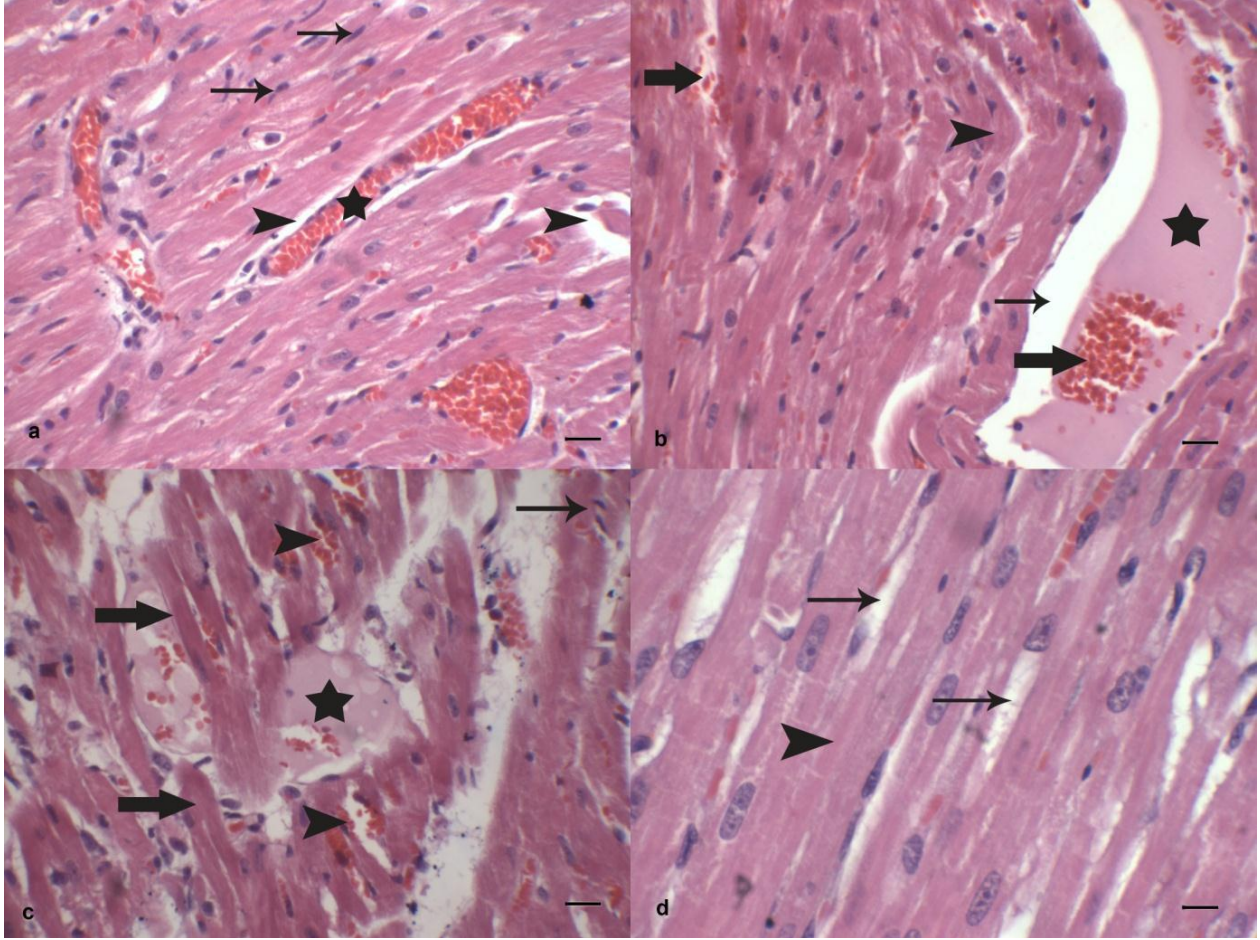
Şekil 4. 15: Alkol+MI grubu genel görünüm

a) Alkol+MI grubunda miyositer hipereozinofili (yıldız), nüklear piknozis (ok), interstisyel ödem (kalın ok) ve miyokartiyal hemoraji (ok başı). H&E, Bar: 20 µm

b) Alkol+MI grubunda dalgalı fibriller, çizgilenme kaybı ve miyositer hipereozinofili (kalın ok), miyokartiyal fragmentasyon, miyokartiyal hemoraji (ok başı), konjesyon (ok) ve interstisyel ödem (yıldız). H&E, Bar: 20 µm

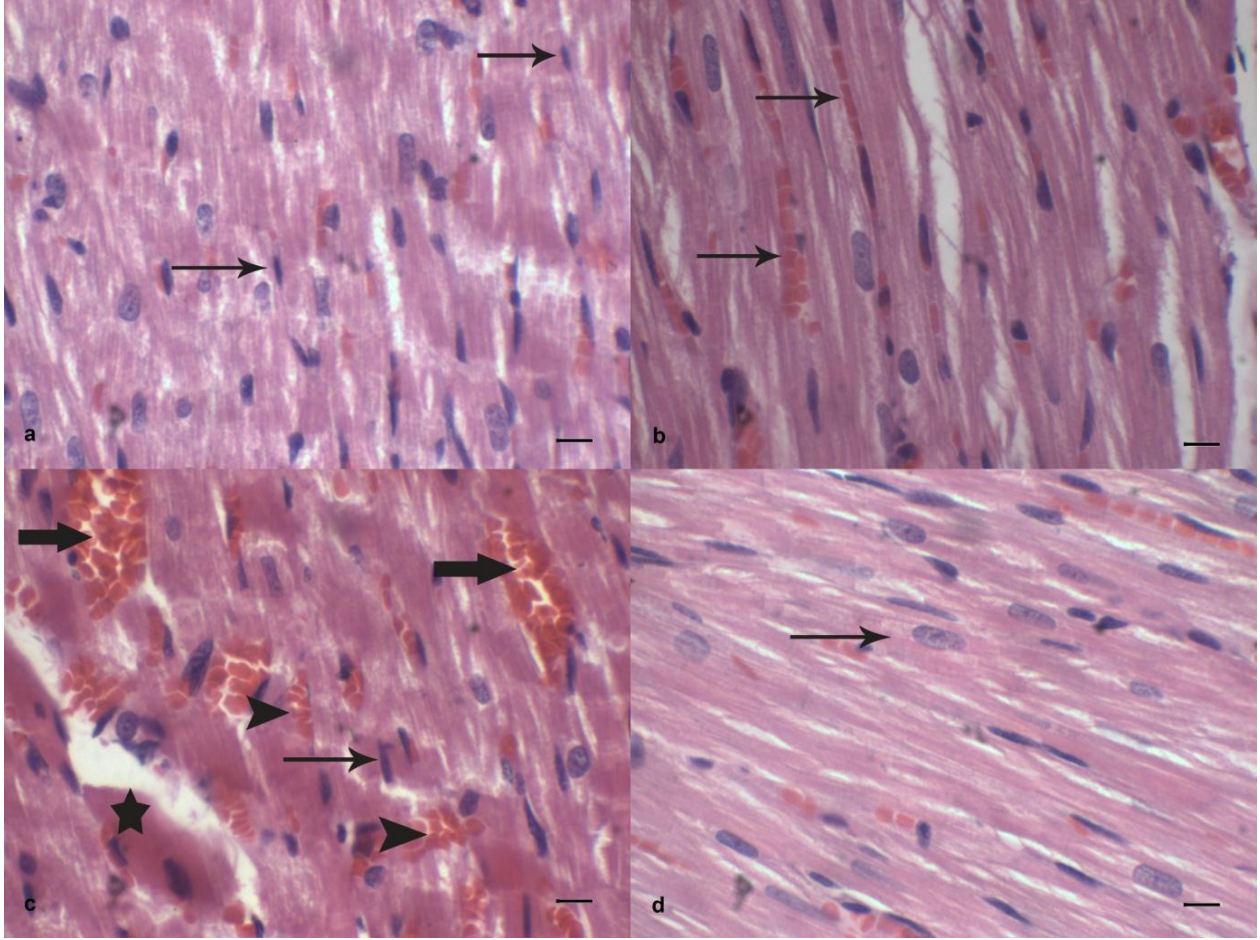
c) Alkol+MI grubunda dalgalı fibriller (kalın ok), nüklear piknozis (ok), interstisyel ödem (yıldız) ve konjesyon (ok başı). H&E, Bar: 10 µm

d) Alkol+MI grubunda PMNL infiltrasyonu (ok başı), interstisyel ödem (kalın ok), konjesyon (yıldız) ve nüklear piknozis (ok). H&E, Bar: 10 µm



Şekil 4. 16: Alkol+MI+Kalpain inhibitörü grubu genel görünüm

- a)** Alkol+MI+Kalpain grubunda konjesyon (yıldız), interstisyel ödem (ok başı), ve nüklear piknozis (ok). H&E, Bar: 20 µm
- b)** Alkol+MI+Kalpain grubunda damar içi eozinofilik amorf materyal birikimi (yıldız), dalgalı fibriller (ok başı), interstisyel ödem (ok) ve konjesyon (kalın ok). H&E, Bar: 20 µm
- c)** Alkol+MI+Kalpain grubunda miyokartiyal hemoraji (ok başı), damar içi eozinofilik amorf materyal birikimi (yıldız), çizgilenme kaybı, miyokartiyal fragmentasyon ve miyositer hipereozinofili (kalın ok) ve nüklear piknozis (ok). H&E, Bar: 20 µm
- d)** Alkol+MI+Kalpain grubunda normal görünümlü miyokartiyal fibriller (ok başı) ve interstisyel ödem (ok). H&E, Bar: 10 µm



Şekil 4. 17: Çözücü grubu genel görünüm

- a)** Çözücü grubunda nüklear piknozis (ok). H&E, Bar: 10 µm
b) Çözücü grubunda konjesyon (ok). H&E, Bar: 10 µm
c) Çözücü grubunda konjesyon (kalın ok), miyokartiyal hemoraji (ok başı), miyositer hipereozinofili (yıldız) ve nüklear piknozis (ok). H&E, Bar: 10 µm
d) Çözücü grubunda normal görünümlü miyokartiyal fibriller (ok). H&E, Bar: 10 µm

4.3.2. TUNEL bulguları

Miyokartiyal nükleuslar TUNEL yöntemi ile boyanıp, kahverengi boyanan nükleuslar TUNEL(+) olarak değerlendirildi. Apoptotik indeks hesaplanması için ise TUNEL(+) ve (-) olan nükleuslar sayıldı. Apoptotik indeksler hesaplandığında MI (Şekil 4. 18c,d), alkol+MI (Şekil 4. 19a-d) ve alkol+MI+kalpain inhibitörü gruplarında (Şekil 4.20 a,b), kontrol (Şekil 4. 18 a) ve alkol gruplarına (Şekil 4. 18b) göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,001$). Alkol+MI grubundaki apoptotik indeks, alkol grubuna göre

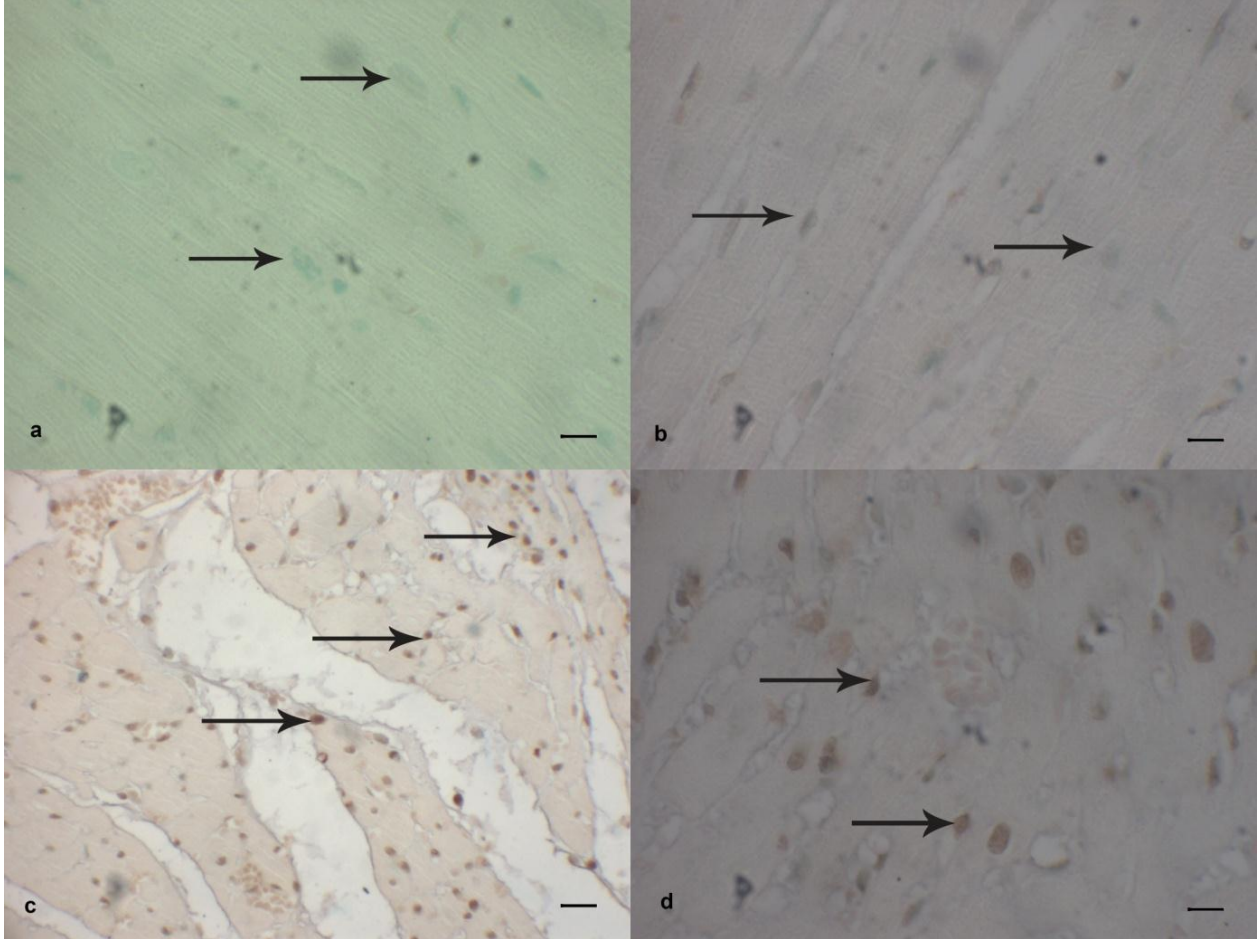
anlamli şekilde artmisti ($p < 0,001$). Alkol+MI+kalpain inhibitörü ve çözücü (Şekil 4. 20c,d) gruplarındaki apoptotik indeks, alkol+MI grubuna göre anlamlı şekilde azalmıstı ($p < 0,001$).

Tüm veriler incelendiğinde kalpain inhibitörü tedavisi uygulanan grubun apoptotik indeksinin, alkol+MI grubuna göre anlamlı şekilde azalmıstı olması, kalpain inhibitörünün apoptozisi azaltma yönünde etkili olduğunu göstermektedir. Zira apoptotik indeks en yüksek olarak alkol+MI grubunda gözlenmiştir (Tablo 4. 9).

Gruplar	Apoptotik indeks (Ortalama \pm SD)
Kontrol	1,02 \pm 1,29
Alkol	1,13 \pm 0,70
MI	51,13 \pm 5,23
Alkol+ MI	82,02 \pm 5,04
Alkol+MI+ İnhibitör	34,02 \pm 32,81
Çözücü	26,71 \pm 18,03
p	$p < 0,001$ ^{a,b,c,d,e,f,g,h,k}

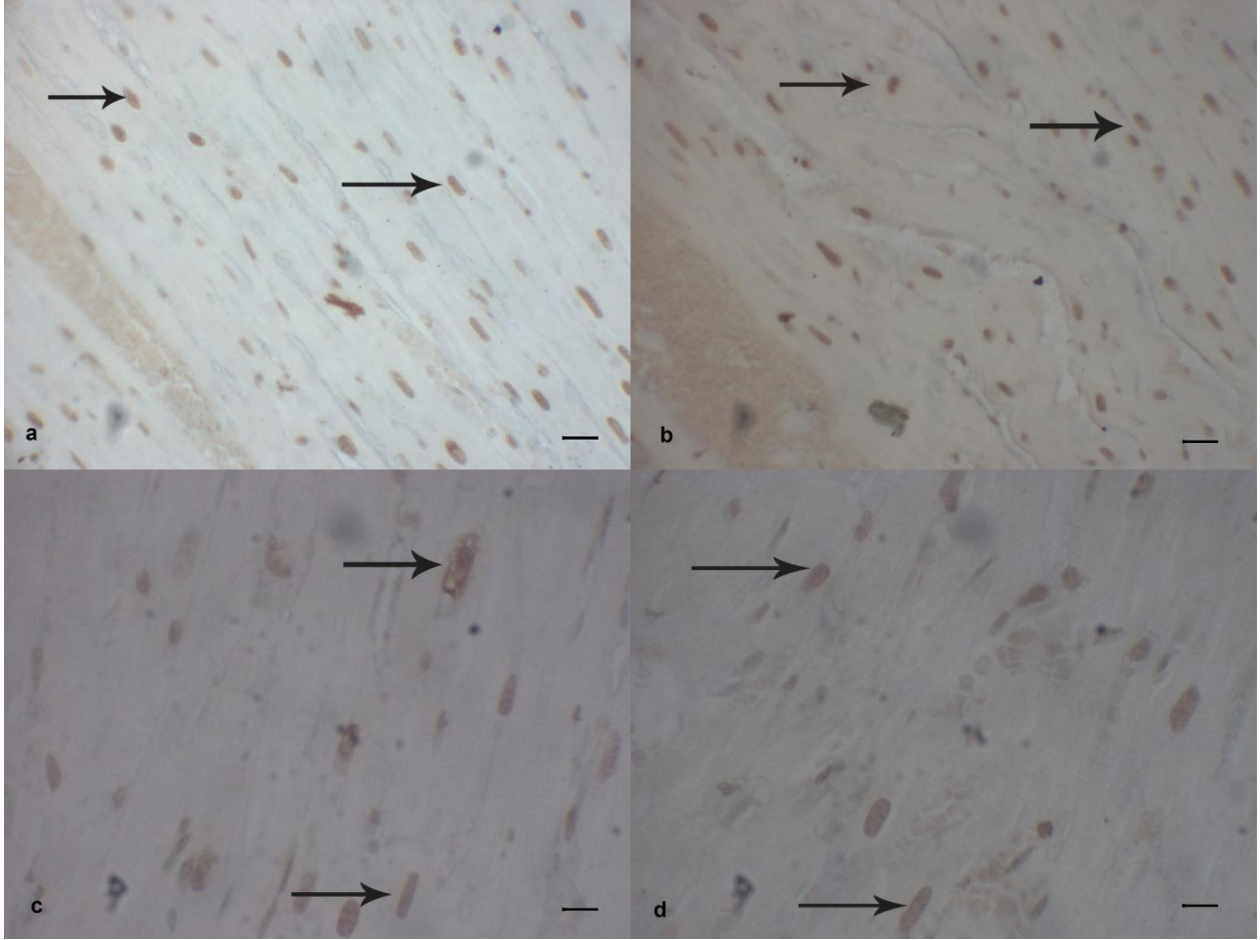
Tablo 4. 9: Grupların apoptotik indeks değerleri

- a:** Kontrol ile MI grupları arasında istatistiksel fark ($p < 0,001$)
- b:** Kontrol ile Alkol+MI grupları arasında istatistiksel fark ($p < 0,001$)
- c:** Kontrol ile Alkol+MI+Kalpain grupları arasında istatistiksel fark ($p < 0,001$)
- d:** Alkol ile MI grupları arasında istatistiksel fark ($p < 0,001$)
- e:** Alkol ile Alkol+MI grupları arasında istatistiksel fark ($p < 0,001$)
- f:** Alkol ile Alkol+MI+Kalpain grupları arasında istatistiksel fark ($p < 0,001$)
- g:** MI ile Alkol+MI grubu grupları arasında istatistiksel fark ($p < 0,001$)
- h:** Alkol+MI ile Alkol+MI+Kalpain grupları arasında istatistiksel fark ($p < 0,001$)
- k:** Alkol+MI ile çözücü grupları arasında istatistiksel fark ($p < 0,001$)



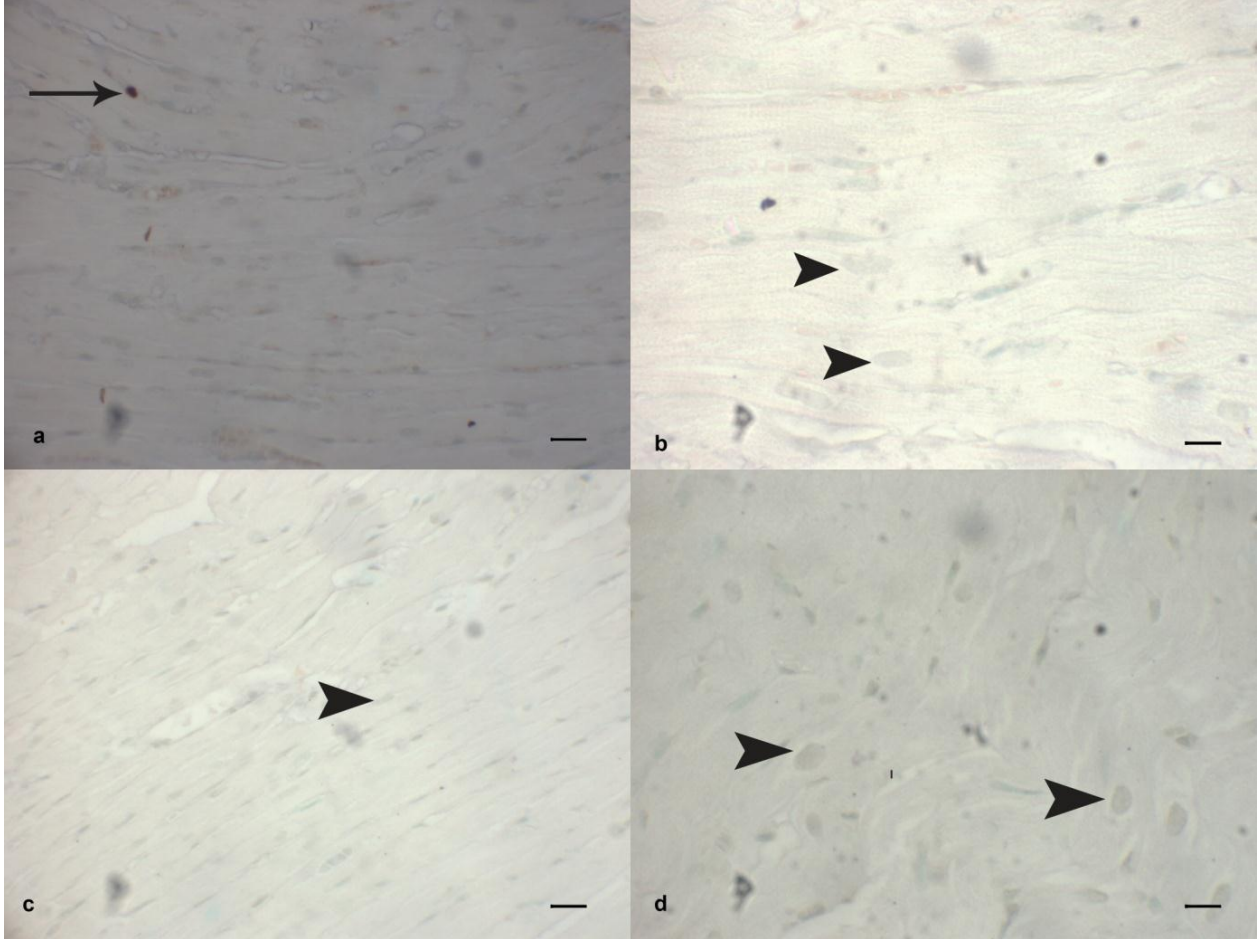
Şekil 4. 18: TUNEL bulguları

- a)** Kontrol grubunda normal görünümlü miyokartiyal nükleuslar (ok). TUNEL, Bar: 10 μ m
b) Alkol grubunda normal görünümlü miyokartiyal nükleuslar (ok). TUNEL, Bar: 10 μ m
c) MI grubunda apoptotik miyokartiyal nükleuslar (ok). TUNEL, Bar: 10 μ m
d) MI grubunda apoptotik miyokartiyal nükleuslar (ok). TUNEL, Bar: 10 μ m



Şekil 4. 19: Alkol+MI grubu TUNEL bulguları

- a)** Alkol+MI grubunda apoptotik miyokartiyal nükleuslar (ok). TUNEL, Bar: 20 µm
- b)** Alkol+MI grubunda apoptotik miyokartiyal nükleuslar (ok). TUNEL, Bar: 20 µm
- c)** Alkol+MI grubunda apoptotik miyokartiyal nükleuslar (ok). TUNEL, Bar: 10 µm
- d)** Alkol+MI grubunda apoptotik miyokartiyal nükleuslar (ok). TUNEL, Bar: 10 µm



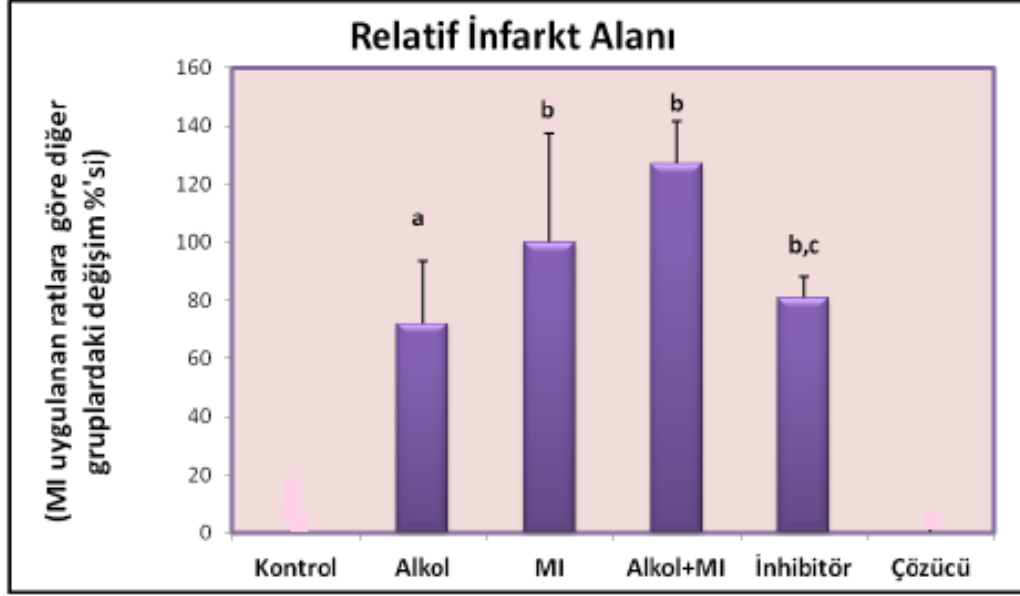
Şekil 4. 20: Alkol+MI+Kalpain inhibitör ve çözücü grupları TUNEL bulguları

- a)** Alkol+MI+Kalpain inhibitör grubunda apoptotik miyokartiyal nükleuslar (ok). TUNEL, Bar: 20 µm
b) Alkol+MI+Kalpain inhibitör grubunda normal görünümlü miyokartiyal nükleuslar (ok başı). TUNEL, Bar: 10 µm
c) Çözücü grubunda normal görünümlü miyokartiyal nükleuslar (ok başı). TUNEL, Bar: 20 µm
d) Çözücü grubunda normal görünümlü miyokartiyal nükleuslar (ok başı). TUNEL, Bar: 10 µm

4.3.3. Morfometrik bulgular

Relatif infarkt alanı hesaplanmasında kontrol ve çözücü gruplarında hasar alanı olmadığından %0 kabul edilmiş, MI grubunun ise tamamen hasar gördüğü kabul edilerek %100 alınmıştır. Alkol grubunda bu alan yüzdesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde

yüksek bulundu ($p<0,01$). Alkol+MI grubunda ise infarkt alanı yüzdesinde çok daha fazla yükselme görüldü. Bu yükselme kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$). İnhibitör grubundaki infarkt alanı yüzdesi, alkol+MI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalma gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 4. 21). Kalpain inhibitörü uygulanan grubun % infarkt alanının, alkol+MI grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olması, kalpain inhibitörünün hasarı azaltma yönünde etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 21: Relatif infarkt alanı sonuçları

- a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,01$
- b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,001$
- c: Alkol+MI grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$

5. TARTIŞMA

İskemik kalp hastalıkları (IHD), dünya çapında mortalite ve morbiditeye neden olan hastalıklardandır (Thippeswamy vd., 2009). Bu hastalıklardan birisi uzamış iskemi sonucu meydana gelen miyokart hücre hasarı olarak tanımlanan MI'dır. MI genellikle toplumun üretken yaş grubunda sıkça görülen, akut dönem sonrası komplikasyonlara bağlı olarak ciddi sorunlara yol açan ve ölümlerle sonuçlanabilen önemli bir toplum sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre her yıl 16,7 milyon insan kalp krizi nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Bu sayı dünyadaki ölümlerin üçte biri demektir (Upaganlawar vd., 2011).

Ratlarda deneysel olarak miyokart infarktüsü oluşturmak için İsopteranol yaygın olarak kullanılmaktadır (Halıcı vd., 2006). ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsü sonrası rat kalbinde oluşan patofizyolojik değişiklikler insanlarda miyokart infarktüsü sonrası oluşan patofizyolojik değişikliklere benzerlik göstermektedir. ISO, kalp kasının infarktüs benzeri hücre hasarına neden olmaktadır. ISO'nun oluşturduğu bu hasar membran geçirgenliğinin bozulmasına yol açarak miyokart membran bütünlüğünün ve fonksiyonunun kaybına yol açar. Hücre membranının hasara uğraması sonucu miyokart dokusunda bulunan hücre içerikleri dolaşıma salıverilir. Hücre hasarına bağlı olarak kan dolaşımına salıverilen kreatin kinaz izoenzimleri, laktat dehidrogenaz, miyogloblin, troponin I ve troponin T gibi bazı enzim ve proteinler miyokart infarktüsünün tanısında klinik olarak önemli rol oynarlar (Şentürk, 2008). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre MI'ın teşhisi klinik, EKG değişikliği ve CK-MB yüksekliği kriterinden en az ikisinin varlığı ile konulmaktadır (Aksoy vd., 2006). Biz de çalışmamızda CK-MB yüksekliği ve buna eşlik eden EKG değişikliği ile MI teşhisi koymayı hedefledik. CK-MB'nin ISO verilmesinden sonra 4-6 saat içinde yükselmeye başladığı, 12-24 saatleri arasında pik yaptığı ve 36-72 saatleri arasında normal düzeylere indiği belirtilmektedir (İlhan vd., 2014). Sharmila ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ISO ile indüklenen MI modelinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MI grubunda kardiyak enzimlerden CK-MB düzeyinin serumda artarken kalpte azaldığı bulunmuş ve bu enzimin aktivitesinin kalpte azalmasının sebebi olarak ISO ile oluşturulan miyokart hasarından sonra miyofibril dejenerasyonu ve miyosit nekrozu nedeniyle bu enzimlerin salınımına bağlı olabileceği belirtilmiştir (Sharmila & Rajadurai, 2012). Mehdizadeh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada isoproterenolün miyokartiyal membrandaki nekrotik hasara bağlı olarak MI grubunda serum CK-MB düzeylerini önemli düzeyde arttırdığı belirtilmiştir (Mehdizadeh, Parizadeh, Khooei, Mehri & Hosseinzadeh, 2013). Asdag ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ISO verilerek MI oluşturulan ratların serum CK-MB düzeylerinde artış gözlenmiştir (Asdag, İnamdar, Asad & Anjundan, 2008). Bu çalışmalar ile uyumlu olarak biz de çalışmamızda

miyokart infarktüs belirteci olan serum CK-MB düzeyini ISO uygulayarak MI oluşturduğumuz grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulduk ve bu yükseklik ISO'nun miyokartiyal membran geçirgenliğini ve bütünlüğünü bozduğunu desteklemektedir.

Günde bir iki kadeh gibi hafif ve orta derecede alkol kullanımı kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm riskini azaltırken yüksek dozda alkol kullanımı bu ölüm riskini arttırmaktadır (Çelik vd., 2002). Miyokartiyal iskemi veya miyokart infarktüsü bulunmayan ve ağır alkol kullanan kişilerde yapılan çalışmada serum CK-MB düzeylerinde artış görülmüştür (Osborn vd., 1995). Peres ve arkadaşları tarafından insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada 21 günlük kırmızı şarap tüketiminden sonra serum CK-MB düzeylerinde artış gözlenmiş ve bunun sebebi olarak ise kas hasarı veya alkolik rabdomiyaliz gösterilmiştir (Peres vd., 2012). Daha önce ratlar üzerinde yaptığımız akut alkol çalışmamızda alkol grubu serum CK-MB düzeylerinde kontrol grubuna göre önemli düzeyde yükselme gözlenmiştir (Kartkaya, Kanbak, Oğlakçı, Burukoğlu & Özer, 2014). Bu çalışmalar ile uyumlu olarak çalışmamızdaki alkol grubu CK-MB değerlerinde de yükselme gözlenmiştir. Bu grupta görülen yüksek CK-MB düzeyinin kardiyomiyopati tablosunu gösterdiğini düşünmekteyiz. Alkol+MI grubunda görülen CK-MB düzeyindeki yükselme kontrol ve alkol gruplarına göre daha fazla iken kalpain inhibitörü-1 uygulanan grubumuzda CK-MB düzeyinde önemli ölçüde azalma görülmektedir. Bizim çalışmamız ile uyumu olarak Neuhof ve arkadaşları tarafından yapılan iskemi çalışmasında bir başka kalpain inhibitörü olan A-705239'un CK-MB salınımını önemli düzeyde azalttığı belirtilmiştir (Neuhof vd., 2004). Mair tarafından yapılan çalışmada kalpain inhibitörü E64 ile kalpainlerin inhibisyonunun iskemiden sonra bir başka kardiyak enzim olan troponin I salınımını azalttığı belirtilmektedir (Mair, 1999). Sonuç olarak miyokartiyal hasar belirteçlerinin salınımı kalpain inhibisyonu ile azaltılmıştır. Bizim çalışmamızda da CK-MB düzeyinin inhibitör grubunda düşmesi alkol+MI'ın oluşturduğu miyokart hasarına karşı verilen inhibitör tedavisinin başarılı olduğunu göstermektedir.

Serum kardiyak enzimlerinin yanında elektrokardiyografik değişiklikler de miyokart infarktüsünün belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. (Upaganlawar & Balaraman, 2010). EKG basit, invaziv olmayan, ucuz ve çok yönlü testtir. EKG dalgalarından P dalgası atrial depolarizasyonu, QRS süresi ventriküllerin depolarizasyonu ve QT segmenti ventriküllerin repolarizasyonu temsil etmektedir (Venkatesh, 2011). Thippeswamy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kontrol grubu ile ISO uygulanan grup karşılaştırıldığında, ISO grubunda P dalgasının yoğunluğunda, QRS kompleksinde, R-R aralığında azalma, Q-T aralığında uzama ve kalp hızında artış gözlenmiştir ve bu değişikliklerin hasarlanan miyokartiyumdaki hücre membran kaybı nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Thippeswamy vd., 2009). Ghule ve arkadaşları ISO

uygulanan grupta uzamış QT aralığı ile miyokart hasarını desteklemektedirler (Ghule, Kulkarni, Bodhankar & Pandit, 2009). Avula ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ISO uygulanan grupta kalp hızında ve Q-T segmentinde artış olurken, QRS kompleksi ve RR aralığında azalma olmuştur (Avula, Asdag & Asad, 2014). Lim ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kontrol grubuna göre ISO uygulanan grupta P dalgası ve QRS kompleksinde önemli düzeyde azalma olmuştur ve bu değişikliklerin kardiyak hücre membran kaybına bağlı olabileceği gösterilmiştir (Lim, Koa & Kim, 2013). Bu çalışmalar ile uyumlu olarak çalışmamızda da ISO uygulanan grubumuzda kontrol grubuna göre % 25 azalmış P-P aralığı, % 48 azalmış QRS kompleksi, %13 uzamış Q-T aralığı, % 45 azalmış R-R aralığı tespit edilmiştir.

Alkol kullanımı uzamış Q-T aralığı, uzamış ventriküler repolarizasyon ve sempatik uyarıma neden olmaktadır. Alkol kullanımı kalp hızını arttırmaktadır ve bu artışın periferik dirençte azalma ve kardiyak debide (output) artmaya bağlı olabileceği düşünülmektedir (Venkatesh, 2011). Swathi ve arkadaşları tarafından insanlarda yapılan çalışmada alkol kullanan kişilerde QRS süresi azalmış, kalp hızı artmıştır (Swathi & Nasar, 2014). Çalışmamızdaki alkol grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında P-P aralığında % 10 azalma, QRS kompleksinde %28 azalma, Q-T aralığında %10 uzama, R-R aralığında %10 azalma, kalp hızında %11 artış görülmüştür. Sonuç olarak alkol kullanan kişilerde kardiyovasküler hastalık riski yüksektir.

Alkol ve MI 'ın birlikte olduğu grubumuzda ise CK-MB düzeylerinde olduğu gibi kalp hasarını gösteren EKG değişikliği de daha fazla olmuştur ve ve bu değişiklikler üzerinde kalpain inhibitör 1'in koruyucu etkisi olduğu görülmüştür. QRS süresi ve QT aralığı inhibitör grubunda artmıştır. Bununla birlikte inhibitör grubu kalp hızında kontrol düzeyine yakın bir azalma görülmektedir. Kalp hızındaki düşüş iskemik hasarda azalma olduğunu gösterir. Daha önce yapılan bir çalışmada da kalpain inhibitör 1 ve çözücü grubuna verilen DMSO'nun iskemiden sonra kalp hızını azaltması bizim sonuçlarımızı desteklemektedir (Yoshida vd., 1995).

İsoproterenol kardiyak kas hücrelerini uyararak membran geçirgenliğinde değişikliklere neden olur ve ISO verilmesi artmış hücre içi kalsiyum ile sarkolemma geçirgenliğine, miyokart lif hasarına neden olmaktadır (Campos, Romano, Prado & Rossi, 2008). Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu çeşitli hücre fonksiyonların düzenlenmesinde bir ikinci haberci olarak merkezi rol oynar (Berridge, Bootman & Lipp, 1998). Miyokartiyal iskemi veya hipoksi boyunca miyokartiyal kalsiyum konsantrasyonunda karakteristik bir yükselme görülür (Arthur & Belcastro, 1997). Miyokartiyal kalsiyum konsantrasyonundaki artış, miyokartiyal proteinlerde hasara neden olacak kalpainleri aktive eder ve aktivasyon

miyokartiyal yapı ve fonksiyon kaybıyla sonuçlanır (Sandmann, Prenzel, Shaw, Schauer & Unger, 2002). Kalpainler, kalsiyum bağımlı thiol-proteazlardır. Kalpainlerin aktivasyonu mitoz, hücre farklılaşması ve protein turn-overı gibi birçok hücrel proses için gereklidir fakat kalpainlerin kontrol edilemeyen aktivasyonları patolojik süreçlere neden olur. Kalpainler miyokartiyal reperfüzyon hasarı, kardiyak hipertrofi ve miyokartiyal iskemi süreçlerinde önemli rol oynarlar (Khalil vd., 2005). Çalışmamızda ISO uygulaması ile MI oluşturulan ratların kalp sol ventrikül dokusunda kalsiyum bağımlı kalpain aktivitesi ölçüldü ve MI grubu kalpain aktivitesi sonuçlarımız kontrol ve çözücü grubuna göre daha yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Alkol grubu kalpain aktivitesi de kontrol ve çözücü grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde yüksek bulundu ve alkol grubunda görülen kalpain aktivitesindeki artışın etanolün hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırıcı etkilerinden dolayı olabileceğini düşünüyoruz. Alkol+MI grubumuzda ise hem ISO hem de alkolün hücre kalsiyum depoları üzerinde destabilize edici etkisinden dolayı kalpain aktivitesi sadece alkol ve sadece MI grubumuza göre daha yüksek bulundu. Meydana gelen bu yüksek kalpain aktivitesini ve sonrasında oluşacak hücre ölümünü engellemek amacıyla kalpain inhibitörü kullandığımız alkol+MI+inhibitör grubunda, kalpain aktivitesi düzeyinin alkol, MI ve alkol+MI gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azaldığı görülmüştür. Bu durum doku hasarını azaltmayı amaçladığımız çalışmamızın ana noktasıdır. Çünkü miyokart infarktüsü, hipertansif kardiyomiyopati ve iskemi reperfüzyon hasarını içeren çeşitli patolojik durumlarda kalpain aktivitesinin arttığını gösteren sayısız çalışma yapılmış ve kalpain inhibitörlerinin etkinliği gösterilmiştir. İskemi ile ilişkili hastalıklarda endojen ve sentetik kalpain inhibitörlerinin potansiyel terapötik etkileri araştırılmıştır. İzole kalp modellerinde kalpain inhibitörü A-705253 (CAL 9961)'ün iskemi-reperfüzyon sonrasında miyokartiyal ve mitokondriyal fonksiyonları koruduğu gözlenmiştir (Khalil vd., 2005). Kalpain aktivitesi sarkomer yapısındaki değişikliğe aracılık eder, iskemi reperfüzyon hasarında kontraktıl bozukluğu etkiler. Kalp yetmezliği olan hastalardan izole edilen ventriküler dokuda kalpain salgısında önemli düzeyde artış olmuştur (Patterson, Portbury, Schisler, & Willis, 2011). Farelerde yapılan bir çalışmada kalpain inhibitörü enjekte edilmesinin miyokart hasarını ve bu hasardan dolayı meydana gelen ölümleri azalttığı gösterilmiştir (Debiasi, Edelstein, Sherry & Tyler, 2001). Yoshikawa ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise kalpain inhibitörü 1'in iskemi-reperfüzyon hasarına karşı kalp üzerinde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Yoshikawa vd., 2005).

Kalpte intrasellüler kalsiyum seviyesindeki değişiklik aynı zamanda apoptoza neden olan yolakları tetikler. Sitokrom c salınımını etkileyen Bad defosforilasyonunda kalsiyumun rol oynadığı düşünülmektedir. Benzer şekilde, (Ca^{+2}) bağımlı sistein proteaz kalpain, Bax yarılmasını sağlayarak Bax'ın proapoptotik aktivitesini gerçekleştirmesine neden olur. (Ca^{+2}) 'un

ayrıca, apoptoz sırasında mitokondriyal membran geçiş porlarını etkileyerek sitokrom c salınımında rol oynadığı belirtilmektedir (Gill, Mestril & Samali, 2002). Sitokrom c'nin mitokondriden salınımı için öncelikle kardiyolipinden ayrılması gereklidir. Kardiyolipinin çeşitli patolojik durumlarla ilişkisi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Gonzalvez & Gottlieb, 2007). Oksidatif stres ve lipit peroksidasyonunun nöronal kayıp ve mitokondriyal disfonksiyona neden olan önemli faktörler olduğu bilinir. Yaşlanma ile birlikte beyinde kardiyolipinin azaldığı rapor edilmiştir ve bunun nedeninin serbest radikal stresine maruz bırakılan beyin mitokondrilerindeki lipid peroksidasyonunun olduğu gösterilmiştir (Sen, Sen, Tripathi, Chatterjee & Chakrabarti, 2006). Kronik alkol kullanımının, kardiyolipinin yağ zinciri içeriğini azalttığı ve karaciğer mitokondrisinde daha çok doymuş kardiyolipin profiline neden olduğu gösterilmiştir. Bu değişiklikler alkol tarafından mitokondriyal membran dayanıklılığın bozulduğunu ifade eder (Taraschi, Ellingson, Janes & Rubin, 1991). Çalışmamızda sitokrom c salınımında önemli rol oynayan mitokondriyal kardiyolipin içeriği ölçüldü ve alkol ve MI gruplarımızda mitokondriyal kardiyolipin içeriği kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuştur. Alkol+MI grubumuzda bu düşme çok daha fazladır. Mitokondriyal kardiyolipin miktarında düşme olması, mitokondriyal kardiyolipinlerin perokside olduklarını ve sitokrom c salınımına izin vererek sitozole salınan sitokrom c miktarının fazla olduğunu göstermektedir. İnhibitör grubumuzdaki mitokondriyal kardiyolipin içeriğinde alkol, MI ve alkol+MI grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artış gözlemlendi. Bu artışın sitozole salınan sitokrom c miktarının az olması ile ilgili olduğu düşünmekteyiz.

İskemi, kardiyolipinin azalmasının bir sonucu olarak iç membranın vizkositesini arttırır. Mitokondriden sitokrom c kaybına neden olur (Sparagna & Lesnefsky, 2009). Uzun dönem alkol kullanımı da mitokondri membran geçirgenliğini arttırarak sitokrom c salınımına neden olmaktadır (Yan, Zhu, Liu, Zhang & Liu, 2007). Biz çalışmamızda MI ve alkolün mitokondri üzerinde etkilerini belirleyebilmek için mitokondriden sitozole sızan sitokrom c salınımını ölçtük. Mitokondrilerde kalan sitokrom c miktarını da ölçerek birbirine oranladık. Bu oran sayesinde sitozole sızma arttığında mitokondri fraksiyonunda sitokrom c içeriği azalacağı için bunların arasındaki oran da belirgin düzeyde artmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi (Burgess vd., 1999) bizim çalışmamızda da bu oran mitokondriyal hasarı temsil etmektedir ve alkol, MI ve alkol+MI gruplarımızda kontrol grubuna göre yükselme görülmeyle birlikte en fazla yükselme alkol+MI grubumuzda olmuştur. Bunun nedeninin hem kalp krizi hem de kronik alkol kullanımının mitokondri üzerindeki etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Alkol+MI+ inhibitör grubu sitokrom c salınım oranı kontrol grubundan da düşük bulunmuştur. Bu azalma kalpain inhibitörünün mitokondriyal kalpainler

üzerindeki etkisinden dolayı olabilir. Çünkü mitokondriyal kalpainlerin aktivasyonunun sitokrom c salınımına yol açtığını gösteren yayınlar vardır (Kar vd., 2010). Sitokrom c salınım sonuçlarımız ile mitokondriyal kardiyolipin içeriği sonuçlarımız birbirini desteklemektedir.

Miyokartiyal apoptozun sitozolde sitokrom c birikmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Abbate, Biondi-Zoccai & Baldi, 2002). Sitozole salınan sitokrom c, kaspaz 3'ün aktivasyonu için gerekli kaspaz 9 aktivasyonunda görev aldığı için (Gill, Mestri & Samali, 2002) bu sonuçlarımız kaspaz 3 sonuçlarımızı da etkilemiştir. MI grubunda olduğu gibi alkol grubunda da görülen sitokrom c oranlarındaki yükseklik, kaspaz 3 yüksekliği ile bağlantılıdır. Alkol+MI grubunda görülen en yüksek sitokrom c oranı yine en yüksek kaspaz 3 yüksekliği ile bağlantılıdır. Alkol grubu kaspaz 3 düzeyinin yüksek olmasının sebebi alkolün kaspaz 3 aktivitesi üzerindeki etkisi olabilir. Çünkü etanol kaspaz 3 aktivitesini indükleyerek hücre ölümüne neden olmaktadır (Chen, Wang & Wang, 2000). İnhibitör grubunda görülen kaspaz 3 aktivitesi düzeyindeki azalma kalpain inhibitörünün hücre ölümü üzerindeki koruyucu etkisini göstermektedir. Daha önce yapılmış çalışmalarda kalpainlerin prokaspaz 3'ü aktive ettiği gösterilmiş ve kalpain inhibitörleri kullanarak kalpainlerin ve dolaylı olarak da kaspaz 3 aktivasyonunun engellenmesi ile hücre ölümü üzerindeki koruyucu etkisi gösterilmiştir (Ray, Matzella & Wilford, 2001).

Miyokartiyal infarktüs sonrası görülen en büyük özellikler miyokartiyumun boyutu, şekli ve interstial fibröz birikimi ile birlikte hacmindeki değişikliklerdir. Uzgur ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmanın histopatolojik incelemesinde, ISO grubunda miyokart infarktüsü ile uyumlu belirgin atrofi ve fibrotik değişiklik gözlenmiştir (Uzgur, Usta & Gökmen, 2011). Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MI grubunda artmış doku içi fibröz birikmesi gözlenmektedir (Zhang, Zhou, Lei, Yuan, Wang, 2008). Yapılan bir diğer çalışmada MI hasarı ile paralel olarak fibröz doku oluşumu görülmüştür (George vd., 2003). Literatür araştırması yapıldığında miyokart infarktüsü çalışmalarında infarkt alanının fibröz dokudaki artışı ile ilişkili olduğu görülmüştür (Nielsen vd., 2003). Aynı zamanda kaspaz 3'ün aşırı salgılanması da infarkt alanını arttırarak kardiyak fonksiyonlarda azalmaya neden olmaktadır (Abbate vd., 2002). Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında alkol, MI ve alkol+MI grubu infarkt alanı yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artmıştır ve en fazla artış alkol+MI grubunda görülmektedir. Kalpain inhibitörü uygulanan grupta ise alkol+MI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde infarkt alanı yüzdesi azalmıştır. Gill ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da kalpain inhibitörü uygulamasının infarkt alanını azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (Gill vd., 2002). Köpeklerde yapılan çalışmada kalsiyum

ile aktive olan nötral proteaz inhibitör E-64 ile ön tedavi yapılarak infarkt alanı azaltılmıştır. Kalpain inhibitörlerinden A-705239 ve A-705253'in miyokart infarktüsüne karşı koruyucu olduğu çalışmada gösterilmiştir. (Neuhof vd., 2004). Khalil ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kalpain inhibitörü A-705253'in infarkt alanını azalttığı, sol ventrikül kontraktilesini arttırdığı ve böylelikle miyokartiyal koruma sağladığı belirtilmektedir (Khalil vd., 2005). Neuhof ve arkadaşı tarafından yapılan çalışmada kalpeptin verilmesinin apoptotik hücre ölmümünü, infarkt alanını ve miyokartiyal fonksiyon bozukluğunu azalttığı belirtilmiştir (Neuhof & Neuhof, 2014). Arora tarafından yapılan çalışmada rat kalplerinde miyokartiyal hasar sonrasında infarkt alanında azalma görülmüştür (Arora, 2016).

ISO uygulaması histolojik olarak miyokartiyal liflerde bozulmaya, inflamatuvar hücrelerin birikmesine, interstisyel ödeme ve hemorajiye neden olmaktadır (Upaganlawar vd., 2011). Ribeiro ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ISO verilen ratların miyokartiyal histopatolojik incelemesinde yaygın miyofibriller bozulma, interstisyel ödem ve nötrofil infiltrasyonu görülmüştür. (Ribeiro, Buttros, Oshima, Bergamaschi & Campos, 2009). Sagor ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ISO uygulanan grubun sol ventrikülünde yaygın miyokartiyal yapı anormallikleri, kardiyak doku ödemi ve inflamatuvar hücrelerin birikmesine neden olduğu görülmüştür (Sagor, Tabassum, Poto & Alam, 2015). Pipaliya ve Vaghasiya tarafından yapılan bir çalışmada ISO uygulanan ratların infarkt boyutunda artış gözlenmiştir. Histopatolojik incelemede ise ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kas fiberlerinde parçalanma görülmüştür (Pipaliya & Vahasiya, 2012). ISO uygulayarak MI oluşturduğumuz çalışmamızda da aynı histopatolojik değişiklikler olmuştur.

Hem kronik alkol kullanımının hem de miyokart infarktüsünün ayrı ayrı kalp dokusu üzerinde etkisi gösterilmiştir. Kronik alkol kullanımının deneysel çalışmalarda kalp üzerinde apoptozu artırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir. MI nedeniyle miyokartın beslenememesi iskemik bölgelerin oluşmasına ve bu bölgelerde geri dönüşümlü ve dönüşümsüz hasarlara neden olur. Bu sonuçlar bizlere hem kronik alkol kullanımı hem de MI nedeniyle kalp dokusunda miyokartiyal apoptozun oluşabileceğini göstermektedir. Oluşan miyokartiyal apoptozla bağlantılı olarak kalpain inhibitör 1'in (N-Asetil-Lösin-Lösin-Norlösin) koruyucu özelliği apoptotik sonuçlarla ilişkilendirilmeye çalışıldı. Çalışmamız MI ve kronik alkol kullanımının birlikte karşılaştığı durumlarda kalpain inhibitörü 1'in koruyucu rolü üzerine literatürlerdeki ilk bilgileri verecektir. MI ve/veya kronik alkol kullanımı ile kalpain inhibitörü 1 uygulamaları karşılaştırılarak, MI ve alkolden doğan hasara karşı değişik tedavi metodlarının geliştirilmesinde bu çalışma katkı sağlayacak ve ekonomiye katkıda bulunacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada biyokimyasal, histolojik ve anatomik yöntemler kullanılarak, miyokart infarktüsü üzerine kronik alkol tüketiminin ratların kalplerinde oluşabilecek miyokartiyal apoptoza etkisinin belirlenmesi ve oluşması beklenen miyokartiyal apoptozun kalpain inhibitör 1 uygulaması ile önlenmesi amaçlanmıştır. Miyokart hasarı serum belirteçlerinden birisi olan CK-MB düzeyinin yükseldiği görülmüştür. Kalp dokusunda biyokimyasal metotlarla ölçülen mitokondriyal kardiyolipin içeriğinin azaldığı, kalpain, kaspaz 3 aktiviteleri ile sitokrom c salınımının arttığı ve böylece hücre ölümü yolağının aktivasyonu gözlenmiştir. Histolojik metotlarla incelediğimiz apoptotik indeks ve ışık mikroskobu incelemeleri, biyokimyasal verilerimizi destekler niteliktedir. Bu sonuçlarımız alkol ve MI'ın birlikte olduğu durumda çok daha fazla hasar meydana getirdiğini kanıtlar özelliindedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, alkol ve MI indüklemeli miyokart hasarı modelinde gerçekleşen kalpain aktivasyonunun kardiyak patolojinin gelişiminde önemli bir role sahip potansiyel terapötik hedef olduğunu, doku hasarını azaltmak için kullanılan kalpain inhibitör 1'in kardiyoprotektif etkisinin olabileceğini göstermektedir. Çünkü kalpain inhibitör 1 verilen tedavi grubunda, alkolün, MI'ın ve daha da önemlisi alkol+MI'ın neden olduğu hücre ölümü belirteçlerinden kalpain, kaspaz aktiviteleri ile sitokrom c salınımında azalmalar görüldüğü, mitokondriyal kardiyolipin içeriğinin arttığı görülmüştür. Benzer şekilde histokimyasal apoptotik indekste ve ışık mikroskobu incelemelerinde morfolojik olarak belirgin iyileşmeler görülmüştür.

Çalışmamızda kalpain inhibitörünün alkol, MI, alkol ve MI'ın birlikte olduğu durumda kardiyoprotektif etkinliği tespit edildi ve bu bulguların sonraki çalışmalar için bir basamak oluşturacağına inanıyoruz. Ayrıca elde edilen sonuçlar hem kalp krizi ve hem de kronik alkol kullanımı sonucu oluşan miyokartiyal apoptozda kalpain inhibitörü 1'in kardiyoprotektif rolünün olup olmadığı konusunda literatürlere ilk bilgileri verecektir. Kalpain inhibitörü 1'in beklendiği gibi alkol ve MI'ın sebep olduğu hasarı baskılayıcı bir etki göstermesi; ileriki deneylerde miyokartiyal apoptozun önüne geçilmesinde tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara zemin oluşturacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abanonu, B.G. (2005). Koroner arter hastalığı major risk faktorleri ve c-reaktif proteinin değerlendirilmesi, İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastahanesi, İstanbul.
- Abbate, A., Biondi-Zoccai, G. G. L., & Baldi, A. (2002). Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *Journal Of Cellular Physiology*, 193:145–153.
- Agniswamy, J., Fang, B., & Weber, I., T. (2007). Plasticity of S2-S4 specificity pockets of executioner caspase-7 revealed by structural and kinetic analysis. *FEBS J.* 274 (18): 4752–65.
- Aksoy, Y., Ergin, A., Sözüer, M. E., İkizceli, İ., Avşaroğulları, L., & Yıldırım, C. (2006). *Akut Miyokart İnfarktüsünün Erken Teşhisinde Troponin T, Miyogloblin ve CK-MB'nin Yeri. Fırat Tıp Dergisi.* 11(2): 103-107.
- Akvardar, Y., Uçku, R. (2010). *Alkol Kullanım Sorunları Nasıl Önlenir? Alkol Kullanım Bozukluklarının Tanı Ve Tedavisinde Kısa Müdahale Yaklaşımı. Anadolu Psikiyatri Dergisi,* 11:51-59.
- Arora, R. (2016). *Attenuation of ischaimia reperfusion induced myocardial cell injury in rat heart by calpastatin. International Journal of Science and Research,* 5 1.
- Arslanyüreği, H. (2009). Epigallocatechin-gallat`ın c6 glioma hücrelerine apoptotik etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Arthur, G.D., & Belcastro, A.N. (1997). A calcium stimulated cysteine protease is involved in isoproterenol induced cardiac hypertrophy. *Mol. Cell. Biochem,* 176, 241 – 248.
- Asdag, S.M.B., İnamdar, M.N., Asad, M., & Anjundan, P.K., (2008). Interaction of propranolol with garlic in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology,* 3, 6, 414-424.
- Atagün, G., Eren, Z., & Gürkanlı, İ. (2011). *Apoptoziste Mitokondrinin Rolü. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi,* 4, 2, 49-53.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Avula, P. R., Asdag, S. M., & Asad, M. (2014). *Effect Of Aged Garlic Extract and S-Allyl Cysteine and Their Interaction With Atenolol During İsoptererenol İnduced Myocardial Toxicity İn Rats. Indian J Pharmacol.* 46(1): 94–99.
- Bağış, M. (2013). Kronik alkolik ratlarda oluşan testis hasarı üzerine chrysin'nin koruyucu etkisinin histolojik olarak incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Başarılı, M.K. (2007). Miyokart infarktüsü sonrası Atorvastatin tedavisinin nitrik oksit, interlökin-6 ve oksidan-antioksidan sistem üzerine etkisi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Konya.
- Baysan, O., Kaptan, K., Erinç, K., Öztaş, Y., Çoşkun, T., Kayır, H., Uzun, M., Uzbay, T., Beyan, C., & Işık, E. (2005). Chronic heavy ethanol consumption is associated with decreased platelet aggregation in rats. *Tohoku J Exp. Med*, 206, 85-90.
- Belikova N. A., Vladimirov, Y. A., Osipov, A. N., Kapralov, A. A., Tyurin, V. A., Potapovich, M. V., Basova, L. V., Peterson, J., Kurnikov, I. V. & Kagan, V. E. (2006). Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry*, 45 (15): 4998–5009.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., & Lipp, P. (1998). Calcium, a life and death signal, *Nature*, 395, 645 – 648.
- Blomgren, K., Zhu, C., Wang, X., Karlsson, J.O., Leverin, A. L., Bahr, B. A., Mallard, C., & Hagberg, H. (2001). Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia, a mechanism of pathological apoptosis?. *The Journal Of Biological Chemistry*, 276, 13, 10191–10198.
- Bong, S.M., Moon, J.H., Nam, K.H., Lee, K.S., Chi, Y.M., & Hwang, K.Y. (2008). Structural studies of human brain-type creatine kinase complexed with the adp-mg²⁺-no³⁻-creatine transition-state analogue complex. *FEBS letters*, 582(28):3959–3965. doi: 10.1016/j.febslet.2008.10.039.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Bozbeyoğlu, E. (2008). Primer perkütan girişim uygulanan akut st-elevasyonlu miyokart infarktüsü hastalarında klopidogrel direnci ve no-reflow ilişkisi, Kardiyoloji Uzmanlık Tezi, Dr. Siyami Ersek Gögüs Kalp ve Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul.
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Branca, D. (2004). Calpain-related diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322, 1098-1104.
- Bras, M., Queenan, B., & Susin, S. A. (2005). Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)*, 70, 2, 231-239.
- Burgess, D., H., Svensson, M., Dandrea, T., Gronlund, K., Hammarquist, F., Orrenius, S., & Cotgreave, I. A. (1999). Human skeletal muscle cytosols are refractory to cytochrome c dependent activation of type-II caspases and lack apaf-1. *Cell Death Differ*, 6, 256-261.
- Cabin, H. S. (1992). The Heart and Circulation, Yale University School of Medicine Heart Book, Chapter 1.
- Campos, E.C., Romano, M.M.D., Prado, C.M., & Rossi, M.A. (2008). Isoproterenol induces primary loss of dystrophin in rat hearts: correlation with myocardial injury, *Int. J. Exp. Path*, 89, 367-381.
- Cevc, G. (1993). *Phospholipids handbook*. p. 783. ISBN 0-8247-9050-2.
- Chang, Y. H., & Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 4.
- Chatterjee, P. K., Brown, P. A. J., Cuzzocrea, S., Zacharowski, K., Stewart, K. N., Mota-Filipe, H., McDonald, M. C., & Thiemeermann, C. (2001). Calpain inhibitor-1 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *Kidney International*, 59, 2073-2083.
- Chen D.B., Wang, L., & Wang, P.H. (2000). Insulin-like growth factor 1 retards apoptotic signaling induced by ethanol in cardiomyocytes. *Life Sci.*, 67, 1683-1690.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Chicco, A. J., Sparagna, G. C. (2006). Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Christie, W. W. (2010). Scottish Crop Research Institute (and Mylnefield Lipid Analysis), Invergowrie, Dundee, Scotland, May 11th.
- Chuah, S.C., Moore, P.K., & Zhu, Y.Z. (2007). S-allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293, 2693-2701.
- Cuzzocrea, S., McDonald, M.C., Mazzon E., Siriwardena D., Serraino, I., Dugo, L., Britti, D., Mazzullo, G., Caputi, A.P., & Thiemermann, C. (2000). Calpain inhibitor I reduces the development of acute and chronic inflammation. *Am J Pathol*, 157, 6, 2065–2079.
- Çelik, S., Görgülü, Ş., & Tezel, T. (2002). *Alkol Tüketimi Ve Koroner Kalp Hastalığı*. Türk Kardiyoloji Derneği Arş., 30, 634-639.
- Çelik, S., Şen, S., & Hazman, Ö. (2015). *Endoplasmik Retikulum Stresine Cevap Yolakları ve Tip 2 Diyabet Patogenezinde Endoplasmik Retikulum Stres Aracılı Beta Hücre Apoptosisinin Rolü*. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 16:227-237.
- Çoşkun, G., & Özgür, H. (2011). *Apoptoz Ve Nekrozun Moleküler Mekanizması*. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 20:145, Adana.
- Dash, P. Apoptosis, Basic Medical Sciences, St.George's, University of London. <http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash>.
- Debiasi, R.L., Edelstein, C.L., Sherry, B., & Tyler K.L. (2001). *Calpain inhibition protects against virus-induced apoptotic myocardial injury*. *Journal Of Virology*, 351–361.
- Doğan, N., Toprak, D., Onrat, E., & Dursun, H. (2011). *Kalple İlgili Belirti ve Bulguları Olmayanlarda EKG Analizi*. *Türk Aile Hek Dergisi*, 15(4):173-177.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Erinç, K., Barçın, C., Özsoy, N., Öztaş, E., Gül, N., Sağ, C., Uzbay, T., Kırılmaz, A., Ayvalı, C., & Demirtaş, E. (2003). Effects of chronic alcohol consumption on myocardial ischemia in rats. *Pharmacological Research*, 47, 175-180.
- Etem, A.A., Etem, E.Ö., Yıldırım, S.T., Ulutaş, G.Ş., & Ünal, S. (2011). CK-MB Kütle ve Aktivite Ölçüm Yöntemlerinin Akut Miyokart Enfarktüsü ve Sağlıklı Gruplarda Karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 9(2): 53-59.
- Fariss, M. W., Chan, C. B., Patel, M., Houten B. V., & Orrenius, S. (2005) Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions*, 5, 2.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., & De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease, *Aging*, 4, 5.
- Fishbein, M.C., Maclean, D., & Maroko, P.R. (1978). Experimental myocardial infarction in the rat. Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol*, 90, 57-70.
- Ganesan, B., Rajesh, R., Anandan, R., Dhandapani, D. (2007). Protective effect of betaine on changes in the levels of protein, glycoproteins and amino acids in isoprenaline-induced myocardial infarction in rats, *African Journal Of Biochemistry Research*, 6, 117-123.
- George, J., Biner, S., Keren, P., Barshack, I., Goldberg, I., Sherez, J., Levitzki, A., Keren, G., Roth, A. (2003). Tyrphostin AG-556 reduces myocardial infarct size and improves cardiac performance in the rat. *Experimental and Molecular Pathology*, 74, 3, 314-318.
- Gewies, A. (2003). *ApoReview, Introduction to Apoptosis*. 1-26.
- Ghule, A. E., Kulkarni, C. P., Bodhankar, S. L., & Pandit, V. A. (2009). Effect of pretreatment with coenzyme q10 on isoproterenol-induced cardiotoxicity and cardiac hypertrophy in rats. *Current Therapeutic Research*, 70, 6.
- Gill, C., Mestral, R., & Samali, A. (2002). Losing heart: the role of apoptosis in heart disease—a novel therapeutic target. *The FASEB Journal*, 16.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Gomez, B., & Robinson, N. C. (1999). Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1. *Biochemistry*, 38 (28): 9031–9038.
- Gonzalvez, F., Gottlieb, E. (2007). *Cardiolipin: setting the beat of apoptosis*. *Apoptosis*, 12:877–885, doi 10.1007/S10495-007-0718-8.
- Grunnet, L.G., Aikin, R., Tonnesen, M.F., Paraskevas, S., Blaabjerg, L., Storling, J., Rosenberg, L., Billestrup, N., Maysinger, D., & Mandrup-Poulsen, T. (2009). Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in cells. *Diabetes*, 58, 8, 1807-15.
- Haines, T. H., & Dencher, N. A. (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.*, 528 (1–3): 35–39.
- Halıcı, Z., Bayır, Y., Süleyman, H., Çadırcı, E., Keleş, M.S., & Bayram, E. (2006). *Amiodaron'un Ratlarda İsoptererenol İle Oluşturulan Akut Ve Kronik Miyokart İnfarktüsü Modelinde Eritropoetin Seviyeleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*. *The Eurasian Journal Of Medicine*.
- Haugan, K., Marcussen, N., Kjølbye, A. L., Nielsen, M. S., Hennan, J. K., & Petersen, J. S. (2006). Treatment with the gap junction modifier rotigaptide (zp123) reduces infarct size in rats with chronic myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 47, 2.
- Heden, R. J. (2013). *Anatomy & Physiology*. OpenStax College, Chapter 19, The Cardiovascular System: The Heart.
- Houtkooper, R. H., & Vaz, F. M. (2008). Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 2493 – 2506.
- İlhan, S., Yılmaz, N., Nacar, E., Motor, S., Oktar, S., & Şahna, E. (2014). The effect of caffeic acid phenethyl ester on isoproterenol-induced myocardial injury in hypertensive rats. *Anadolu Kardiyol Derg*, 14: 576-82.
- İlter, T., Tekin, F. (2005). *Alkol Metabolizması*, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, İzmir, Güncel Gastroenteroloji 9/1.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- İşler, O. (2012). Primer Prostat Kanserine Bağlı Kaspaz -2 Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Konya.
- Jackowski, C., Christe, A., Sonnenschein, M., Aghayev, E., & Thali, M.J. (2006). Postmortem unenhanced magnetic resonance imaging of myocardial infarction in correlation to histological infarction age characterization. *Eur Heart J*, 27, 2459-2467.
- Jenkins, C.P., Cardona, D.M., Bowers, J.N., Oliai, B.R., Allan, R.W., & Normann, S.J. (2010). The utility of c4d, c9, and troponin t immunohistochemistry in acute myocardial infarction. *Arch Pathol Lab Med*, 134, 256-263.
- Jump, S.S., Childs, T.E., Zwetsloot, K.A., Booth, F.W., Lees, S.J. (2009). Fibroblast Growth Factor 2-Stimulated Proliferation Is Lower In Muscle Precursor Cells From Old Rats. *Exp Physiol*, 94, 6, 739-48.
- Kar, P., Samanta, K., Shaikh, S., Chowdhury, A., Chakraborti, T., & Chakraborti, S. (2010). *Mitochondrial calpain system: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics*, 495, 1, 1-7.
- Kartkaya, K., Kanbak, G., Oğlakçı, A., Burukoğlu, D., & Özer M.C. (2014). Protective effect of calpain inhibitor N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal on acute alcohol consumption related cardiomyopathy. *Mol Biol Rep.*, 41.
- Kaya, M. (2005). Bir Kalpain İnhibitörü Olan Ak295'in Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi, İstanbul.
- Khalil, P. N., Neuhof, C., Huss, R., Pollhammer, M., Khalil, M. N., Neuhof, H., Fritz, H., & Siebeck M. (2005). Calpain inhibition reduces infarct size and improves global hemodynamics and left ventricular contractility in a porcine myocardial ischemia/reperfusion model. *European Journal of Pharmacology*, 528, 1-3,124-131.
- King, m. W. (1996). <http://themedicalbiochemistrypage.org/ethanol-metabolism.php>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Khorchid, A., Ikura, M. (2002). How calpain is activated by calcium. *Nature Structural Biology*, 9, 4.
- Korsnes, M. S., Espenes, A. (2011). Yessotoxin as an apoptotic inducer. *Toxicon*, 57, 947-958.
- Krenz, M., Cohen, MV., Downey, JM. (2002). The protective and anti-protective effects of ethanol in a myocardial infarct model. *Ann NY Acad Sci*, 957, 103-114p.
- Lavrik, I. N., Golks, A., & Krammer, P. H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of Clinical Investigation*, 115
- Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W. & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int. J. Mol. Sci*, 16, 26087-26124.
- Li, S.Y., Fang, C.X., Aberle, N.S., Ren, B.H., Ceylan, A.F., Ren J. (2005). Inhibition of pi-3 kinase/akt/mtor, but not calcineurin signaling, reverses insulin-like growth factor induced protection against glucose toxicity in cardiomyocyte contractile function. *J Endocrinol*, 186, 3, 491-503.
- Lim, K. H. (2013). Cardioprotective potential of Korean Red Ginseng extract on isoproterenol-induced cardiac injury in rats. *Journal of Ginseng Research*, 37, 3, 273-282.
- Lisa, M., Haleagrahara, N., & Chakravarthi, S. (2011). Insulin-like growth factor-1 (igf-1) reduces ischemic changes and increases circulating angiogenic factors in experimentally - induced myocardial infarction in rats. *Vascular Cell*, 13.
- Logue, S. E., Gorman, A. M., Cleary, P., Keogh, N., & Samali, A. (2013). Current concepts in er stress-induced apoptosis. *Carcinogenesis & Mutagenesis*
- Loreto, C., Rocca, G. L., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S., Ralph, D. J., Cellek, S., Musumeci, G., Giunta, S., Djinovic, R., Basic, D., & Sansalone, S. (2014). The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in peyronie's disease. *BioMed Research International*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Mair, J. (1999). Tissue release of cardiac markers: from physiology to clinical applications. *Clin Chem Lab Med*, 37, (11/12):1077–1084.
- Maity, P., Bindu, S., Dey, S., Goyal, M., Alam, A., Pal, C., Reiter, R. & Bandyopadhyay, U. (2009). Melatonin reduces indomethacin-induced gastric mucosal cell apoptosis by preventing mitochondrial oxidative stress and the activation of mitochondrial pathway of apoptosis. *J. Pineal, Res*, 46, 314-323.
- Mani, S.K., Balasubramanian, S., Zavadzka, J.A., Jeffords, L.B., Rivers, W.T., Zile, M.R., Mukherjee, R., Spinale, F.G., & Kuppuswamy, D. (2009). Calpain inhibition preserves myocardial structure and function following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297, 1744–1751.
- Manzo-Avalos, S., Saavedra-Molina, A. (2010). Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption, international journal of environmental. *Research and Public Health*, 7, 4281-4304.
- Martini, F. H., Timmons, M. J., Tallitsch, R. B. (2015). Human Anatomy (8th Edition), Chapter 21.
- Mcdonald, M.C., Mota-Filipe, H., Paul, A., Cuzzocrea, S., Abdelrahman, M., Harwood, S., Plevin, R., Chatterjee, P.K., Yaqoob, M.M., & Thiemermann, C. (2001). Calpain inhibitor 1 reduces the activation of nuclear factor-kb and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock. *FASEBJ*, 15, 1, 171-186.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Mehdizadeh, R., Parizadeh, M. R., Khooei, A. R., Mehri, S., & Hosseinzadeh, H. (2013). *Cardioprotective effect of saffron extract and safranal in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. Iran J Basic Med Sci*, 16, 1.
- Metin, K. (2007). Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri, Moleküler Biyoloji. (Yıldırım, A., Bardakçı, .F., Karataş, M., Tanyolaç, B.), 555-597, Nobel, Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Mileykovskayaa, E., Dowhana, W., Birkeb, R. L., Zhengb, D., Lutterodtb, L., & Hainesb, T. H. (2001). Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. *FEBS Letters*, 507, 187-190.
- Morales, C., Gonzalez, G.E., Rodriguez, M., Bertolasi, C.A., & Gelpi, R.J. (2002). Histopathologic time course of myocardial infarct in rabbit hearts. *Cardiovasc Pathol*, 11,339-345.
- Mukherjee, S. (2014). Alcohol metabolism and generation of free radicals: A deep insight. *Alcohol*, 18;2(1):10.
- Nakamura, T., Ueda, Y., Juan, Y., Katsuda, S., Takahashi, H., & Koh, E. (2000). Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. In vivo study. *Circulation*, 102,572-578.
- Neuhof, C., Fabiunke, V., Deibele, K., Speth, M., Moller, A., Lubisch, W., Fritz, H., Tillmanns, H., & Neuhof, H. (2004). Reduction of myocardial infarction by calpain inhibitors A-705239 and A-705253 in isolated perfused rabbit hearts. *Biol. Chem.*, 385, 1077-1082. DOI 10.1515/BC.2004.139
- Neuhof, C., & Neuhof, H. (2014). Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J Cardiol.*, 26; 6(7): 638-652.
- Neuhof, C., Götte, O., Trumbeckaite, S., Attenberger, M., Kuzkaya, N., Gellerich, F., Möller, A., Lubisch, W., Speth, M., Tillmanns, H., & Neuhof, H. (2005). A Novel Water-Soluble and Cell-Permeable Calpain Inhibitor Protects Myocardial and Mitochondrial Function in Postischemic Reperfusion. *Biological Chemistry*, 384,12, 1597-1603.
- Nielsen, M.S., Marcussen, N., Jorgensen, N.K., Rathlou, N.H.H., Kjolbye, A.L., & Petersen, J.S. (2003). ZP123 inhibits ischemia-induced cell swelling in cardiomyocytes and reduces infarct size after myocardial infarction (MI) in rats. *International Gap Junction Conference*.
- Norberg, E., Gogvadze, V., Ott, M., Horn, M., Uhlen, P., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2008). An increase in intracellular ca^{2+} is required for the activation of mitochondrial calpain to release aif during cell death. *Cell Death and Differentiation*, 15, 1857-1864.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- O'brien, M., Kirby, R. (2008). *Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18, 6, 572–585.
- Oktar, S., Aydın, M., Yönden, Z., Alçın, E., İlhan, Ş., & Nacar, A. (2010). Effects of caffeic acid phenethyl ester on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 10, 298-302.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 552-565.
- Osborn, L.A., Rossum, A., Standefer, J., Jackson, J., Skipper, B., Beeson, C., & Crawford, M.H. (1995). Evaluation of CK and CK-MB in alcohol abuse subjects with recent heavy consumption. *Cardiology.*, 86(2):130-4.
- Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhitovsky, B., & Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process, *Pnas*, 99, 1259–1263.
- Özcan, F. (2008). Gebelik Sırasında Uzun Dönem Etil Alkol, Metil Alkol Ve Etilen Glikol'e Maruz Kalmanın Yeni Doğan Yavrular Üzerinde Toksik Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Toksikoloji ABD.
- Özcan, S. (2010). Bluetooth ile ekg verilerinin iletimi, Yüksek Lisans Tezi, Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Öztürk, A. (2006). Ratlarda izofluran ve desfluran anestezilerinin elektrokardiografi üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahi (Vet) Anabilim Dalı.
- Patterson, C., Portbury, A., Schisler, J. C., & Willis, M. S. (2011). Tear me down: Role of calpain in the development of cardiac ventricular hypertrophy. *Circ Res.*, 109(4): 453–462.
- Peres, R. C., Hirata, R., Claudio, S. R., Liz, T., Silva, T. C., & Ribeiro, D. A. (2012). Red dry wine modulates plasma cholesterol levels and cardiac enzymes in humans. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Petit, J.M., Maftah, A., Ratinaud, M.H., & Julien, R. (1992). *10-N-Nonyl Acridine Orange* interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 209, 267-273.
- Pipaliya, H., & Vaghasiya, J. (2012). Cardio protective effect of vitamin A against isoproterenol-induced myocardial infarction. *J Nutr Sci Vitaminol*, 58, 402-407.
- Porter, A. G. (2006). Flipping the safety catch of procaspase-3. *Nature Chemical Biology*, 2, 509 – 510.
- Porter, A. G., Janicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6, 99 – 104.
- Qian, J. (2008). The calpain protease active site: A target for inhibitor and activity-based probe design, Master, Queen's University, Canada.
- Ramchandani, V. A., Watson, R. R. (Ed). (2013). Genetics of Alcohol Metabolism, Chapter 2, Alcohol, Nutrition, and Health Consequences, Nutrition and Health.
- Ray, S.K., Matzella, D.D., & Wilford, E.L. (2001). Inhibition of calpain mediated apoptosis by e-64-d reduced immediate early gene expression and reactive astrogliosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats. *Brain Res*, 916, 115-126.
- Ribeiro, D. E., Buttros, J. B., Oshima, C. T. F., Bergamaschi, C. T., & Campos, R. R. (2009). Ascorbic acid prevents acute myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: Role of inducible nitric oxide synthase. *J Mol Hist.*, 40:99-105
- Riedl, S. J., Shi, Y. (2004). Molecular Mechanisms of Caspase Regulation During Apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 5.
- Sadowski-Debbing, K., Coy, J. F., Mier, W., Hug, H., & Los M. (2002). Caspases – their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 50, 19-34.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Saez, M. E., Ramirez-Lorca, R., Moron, F. J., & Ruiz, A. (2006). The therapeutic potential of the calpain family: New aspects, *Drug Discovery*, 11, 19/20.
- Sagor, A. T., Tabassum, N., Potol, A., & Alam, A. (2015). Xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, prevented oxidative stress, fibrosis, and myocardial damage in isoproterenol induced aged rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Sağlam, İ. (2006). Akut koroner sendromda Pro-Bnp düzeyinin; ekokardiyografiyle predikte edilen infarkt alanı ile ilişkisi, Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü, İstanbul.
- Salman, E. (2007). Alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase gene polymorphism in Turkish alcoholic people and control group, Master Of Science, The Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology in Bioengineering and Biotechnology, İzmir.
- Sandmann, S., Prenzel, F., Shaw, L., Schauer, R., & Unger, T. (2002). Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium--influence of the calpain inhibitor cal 9961. *Br J Pharmacol*, 135, 8, 1951-1958.
- Santa Cruz Biotechnology, Inc. Caspase-3 (H-277): Sc-7148.
- Schlattner, U., Eder, M., Dolder, M., Khucha, Z., Strauss, A., & Wallimann, T. (2000). Divergent enzyme kinetics and structural properties of the two human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. *Biol. Chem.*, 381, 1063-1070.
- Sen, T., Sen, N., Tripathi, G., Chatterjee, U., & Chakrabarti, S. (2006). Lipid peroxidation associated cardiolipin loss and membrane depolarization in rat brain mitochondria. *Neurochem Int*.
- Senthil, S., Sridevi, M., & Pugalendi, K.V. (2007). Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats, *Toxicologic Pathology*, 35, 418-423.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Shah, S., Gnanasegaran, G., Cohon, J. S., & Buscombe, J. R. (Ed.). (2009). Integrating cardiology for nuclear medicine physicians, the heart: anatomy, *Physiology and Exercise Physiology*, Chapter 1, s. 3-23.
- Sharma, M., Kishore, K., Gupta, S.K., Joshi, S., & Arya, D.S. (2001). Cardioprotective potential of ocimum sanctum in isoproterenol induced myocardial infarction in rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 225, 75-83.
- Sharmila, S. T., Rajadurai, M. (2012). Preventive effect of bio-aq on cardiac markers, lipids, and membrane bound enzymes in isoproterenol - induced myocardial infarction in rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5, 2.
- Shi, Y., Melnikov, V. Y., Schrier, R. W., & Edelstein, C. L. (2000). Downregulation of the calpain inhibitor protein calpastatin by caspases during renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 279: F509-F517.
- Smith, C., Marks, A.D., & Lieberman, M., (Ed. İnal, M.E., Atik U., Aksoy N., Haşimi, A.). (2007). *Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım*. (2. Baskı), Güneş Tıp Kitabevi, 458- 471.
- Sodea, J., Miyagawa, S., Sano, K., Masumoto, J., Taniguchi, S., & Kawasaki, S. (2001). Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during warm ischemia in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, 1115-1123.
- Sparagna, G. C., & Lesnefsky, E. J. (2009). Cardiolipin remodeling in the heart. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 53,4.
- Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., Sorimachi, H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53.
- Swathi, K., Nasar, A. R. (2014). Study ECG effects in alcoholic and normals. *J. Pharm. Sci. & Res.*, 6(7), 263-265.
- Şentürk, S. (2008). İsoptererenol ile miyokart infarktüsü oluşturulmuş ratlarda L-Lizin'in total sialik asit düzeylerine etkisinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Tan, Ç. (2014). Muhtemel otoimmün lenfoproliferatif sendrom (alps) tanısıyla izlenen hastaların bilinen moleküler defektler yönünden araştırılması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tanusree, S., Nilkantha, S., Gayatri, T., Uttara, C., & Sasanka, C. (2006). Lipid peroxidation associated cardiolipin loss and membrane depolarization in rat brain mitochondria, *Neurochemistry International*, 49, 20-27.
- Taraschi, T.F., Ellingson, J.S., Janes, N., & Rubin E. (1991). The role of anionic phospholipids in membrane adaptation to ethanol. *Alcohol Alcohol Suppl.*, 1, 241-245.
- Thippeswamy, B.S., Thakker, S.P., Tubachi, S., Kalyani, G.A., Netra, M.K., Patil, U., Desai, S., Gavimath, C.C., & Veerapur, V.P. (2009). Cardioprotective effect of cucumis trigonus roxb on isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4 ,2, 29-37.
- Todd, B., Moore, D., Deivanayagam, C. C. S., Lin,G., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K. K. W., & Narayana, S. W. L. (2003). A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: crystal structures of the native domain vi of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *Journal Of Molecular Biology*, 328, 131-146.
- Ulukaya, E. (2003). Apoptozis ders notları. Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı.
- Upaganlawar, A., & Balaraman, R. (2010). Protective effects of lagenaria sceraria (molina) fruit juice in isoproterenol induced myocardial infarction. *International Journal Of Pharmacology*, 6,5, 645-651.
- Upaganlawar, A., Gandhi, G., Balaraman, R. (2011). Isoproterenol- induced myocardial infarction. protective role of natural products, *Journal Of Pharmacology And Toxicology*, 6(1), 1-17.
- Uzgur, S., Usta, U., & Gökmen, S.S. (2011). İsoptererenol ile miyokart infarktüsü oluşturulmuş ratlarda L-lizinin serum sialik asit düzeylerine etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 36,3, 248-254.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Venkatesh, G. (2011). Electrocardiogram (ECG) as a diagnostic tool for the assessment of Cardiovascular status in alcoholics. *Biomedical Research*, 22 (3): 333-337.
- Yan, M., Zhu, P., Liu, M.L., Zhang, H.T., & Liu, L. (2007). Ethanol induced mitochondria injury and permeability transition pore opening: role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.*, 28, 13, 16, 2352-2356.
- Yıldırım, A. (2009). Deneysel spinal kord travmasında glukojen sentez kinaz 3 inhibitörü AR-A014418' n nöroprotektif etkilerinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul.
- Yıldırım, İ. H., Koçak, N., & Yıldırım, S. C. (2012). Programlı hücre ölümü. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 2(3):58-66.
- Yılmaz, İ. (2005). Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi; ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.
- Yoshida, K., Inui, M., Harada, K., Saido, T.C., Sorimachi, Y., Ishihara, T., Kawashima, S., & Sobue, K. (1995). Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circ Res.*, 77(3):603-10.
- Yoshifuji, H., Umehara, H., Maruyama, H., Itoh, M., Tanaka, M., Kawabata, D., Fujii, T., & Mimori, T. (2005). Amelioration of experimental arthritis by a calpain-inhibitory compound: regulation of cytokine production by E-64-d in vivo and in vitro. *International Immunology*, Vol. 17, 10, pp. 1327-1336.
- Yoshikawa, Y., Hagihara, H., Ohga, Y., Takenaka, C.N., Murata, K., Taniguchi, S., & Takaki, M. (2005). Calpain inhibitor-1 protects the rat heart from ischemia-reperfusion injury: analysis by mechanical work and energetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, 1690-1698.
- Zakhari, S. (2006). Overview: How is alcohol metabolized by the body?. 29, 4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Zhang, Y.L., Zhou, S.X., Lei, J., Yuan, G.Y., & Wang, J.F. (2008). Blockades of angiotensin and aldosterone reduce osteopontin expression and interstitial fibrosis infiltration in rats with myocardial infarction. *Chin Med. J.*, 121,21, 2192-2196.
- Zovein, A., Flowers-Ziegler, J., Thamocharan, S., Shin, D., Sankar, R., Nguyen, K., Gambhir, S., & Devaskar, S.U. (2004). Postnatal hypoxic-ischemic brain injury alters mechanisms mediating neuronal glucose transport. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286, 2, 273-282.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Doğum tarihi ve yeri: 1985 - ESKİŞEHİR
Uyruğu: T. C.
Medeni durumu: Evli
İletişim adresleri: aoglakci@gmail.com- 05532040394

Eğitim Durumu

1991- 1996: Mualla Zeyrek İlköğretim Okulu (İlköğretim)
1996 – 1999: Mualla Zeyrek İlköğretim Okulu (Ortaöğretim)
1999 – 2003: Yabancı Dil Ağırlıklı Yunus Emre Lisesi (Lise)
2003 – 2007: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü
2008 -: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi
Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Programı
Yabancı Dil: İngilizce

Mesleki Deneyim

2013-2015: Kocaeli Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Birimi Saha Koordinatörü
(Üroloji, Nefroloji, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Bölümleri)

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Türk Biyokimya Derneği

Yayınlar

Makaleler

1. Hakan Senturk, Gokhan Bayramoglu, Ali Dokumacioglu, Erinc Aral, Gungor Kanbak, Mine İnal, **Aysegul Oglakci**, Protective effects of *Echinacea purpurea* in an acetic acid induced rat model of colitis, Biological Diversity and Conservation, 5/2 (2012) 59-65.

2. Kanbak G, Canbek M, **Oğlakçı A**, Kartkaya K, Sentürk H, Bayramoğlu G, Bal C, Göl B, Ozmen A., Preventive role of gallic acid on alcohol dependent and cysteine protease-mediated pancreas injury, *Molecular Biology Reports*, 2012, 39, 12, 10249-10255.
3. Uyanoglu, Mustafa, Yamac, Mustafa, Canbek, Mediha, Senturk, Hakan, Kartkaya, Kazim, **Oğlakci, Aysegul**, Turgak, Ozge, Kanbak, Gungor. Curative Effect of Crude Exopolysaccharides of Some Macrofungi on Alcohol-Induced Liver Damage, *Ultrastructural Pathology*, 2012.
4. Kartkaya K, **Oğlakçı A**, Şentürk H, Bayramoğlu G, Canbek M, Kanbak G., Investigation of the possible protective role of gallic acid on paraoxanase and arylesterase activities in livers of rats with acute alcohol intoxication, *Cell Biochemistry and Function*, 2013
5. Emre Ozkara, Ramazan Durmaz, Gungor Kanbak, **Aysegul Oğlakci**, Hasan Emre Aydin, Zuhtu Ozbek, Murat Vural, Ali Arslantas, Metin Atasoyş The Effect of Propolis Following Experimental Spinal Cord Injury, *World Spinal Column Journal*, Volume 5 / No: 1 / January 2014
6. Kanbak G, Uzuner K, Kuşat Ol K, **Oğlakçı A**, Kartkaya K, Şentürk H., Effect of kefir and low-dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unhypertensive rats with 4 weeks salt diet. *Clin Exp Hypertens*. 2014;36(1):1-8.
7. Uyanoglu M, Canbek M, van Griensven LJ, Yamac M, Senturk H, Kartkaya K, **Oğlakci A**, Turgak O, Kanbak G. Effects of polysaccharide from fruiting bodies of *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, and *Phellinus linteus* on alcoholic liver injur *Int J Food Sci Nutr*. 2014 Jun;65(4):482
8. Ozalp FO, Canbek M, Yamac M, Kanbak G, Van Griensven LJ, Uyanoglu M, Senturk H, Kartkaya K, **Oğlakci A**. Consumption of *Coprinus comatus* polysaccharide extract causes recovery of alcoholic liver damage in rats. *Pharm Biol*. 2014 Aug;52(8):994-1002.
9. Kartkaya K, Kanbak G, **Oğlakçı A**, Burukoğlu D, Ozer MC. Protective effect of calpain inhibitor N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal on acute alcohol consumption related cardiomyopathy. *Mol Biol Rep*. 2014 Oct;41(10):6743-53.
10. Sogut I, **Oğlakci A**, Kartkaya K, Ol KK, Sogut MS, Kanbak G, Inal ME. Effect of boric acid on oxidative stress in rats with fetal alcohol syndrome. *Exp Ther Med*. 2015 Mar;9(3):1023-1027
11. Emre Delen, Ramazan Durmaz, **Ayşegül Oğlakçı**, Güngör Kanbak, Dilek Burukoğlu, Cengiz Bal, Deneysel omurilik yaralanmalarında kefirin

lizozomal proteasların salınımı üzerine etkisi. Journal of Clinical and Analytical Medicine 2015;6(suppl 1): 21-5

12. Kevser Kusat Ol, Güngör Kanbak, **Ayşegül Oğlakçı İlhan**, Dilek Burukoglu, Ferruh Yücel. The investigation of the prenatal and postnatal alcohol exposure-induced neurodegeneration in rat brain: protection by betaine and/or omega-3. Childs Nerv Syst

Sözlü Bildiri

1. Kanbak, G., Canbek, M., **Oğlakçı, A.**, Kartkaya, K., Şentürk, H., Bayramoğlu, G., Bal, C., Göl, B., Özmen, A. Akut Etanole Bağlı Sistein Proteaz Aracılı Pancreas Hasarı ve Gallik Asitin Koruyucu Rolü. 21. Ulusal Biyokimya Kongresi, 28-31 Ekim 2009, İstanbul.

Poster Bildiri

1. G. Unver, G. Kanbak, E. Söztutar, **A. Oğlakçı**, C. Bal, M. İnal, Evaluation of oxidant/antioxidant effects of Omega-3 fatty acids and Kefir on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats, Cell Membranes and Free Radical Research, 26-29 Haziran, 2012.
2. G. Unver, G. Kanbak, G. Söztutar, E. **Oğlakçı A**, Bal C, İnal M, Evaluation of apoptotic effects of Omega -3-fatty acids and Kefir on isoproterenol – induced myocardial infarction in rats, 14-16 Kasım 2012, FEBS Special Meeting, Kuşadası TURKEY.
3. Kevser Kuşat OL, **Ayşegül Oğlakçı**, Kazım Kartkaya, Güngör Kanbak, Effect of Morinda citrifolia (noni) and low dose aspirin on isoproterenol induced myocardial infarction in rats, 14-16 Kasım 2012, FEBS Special Meeting, Kuşadası TURKEY.
4. Kevser Kuşat OL, **Ayşegül Oğlakçı**, Kazım Kartkaya, Güngör Kanbak, Kubilay Uzun, Hakan Şentürk, Effect of kefir and low dose aspirin on arterial blood pressure measurement and renal apoptosis in unhypertensive rats with 4 weeks salt diet, 14-16 Kasım 2012, FEBS Special Meeting, Kuşadası TURKEY.
5. Emre Delen, Ramazan Durmaz, **Ayşegül Oğlakçı**, Güngör Kanbak, Dilek Burukoğlu, Cengiz Bal, Deneysel omurilik yaralanmalarında kefirin lizozomal proteasların salınımı üzerine etkisi. 28. Türk Nöroşirürji Derneği Bilimsel Kongresi, 4-8 Nisan 2014, Beldibi, Antalya

Projeler

1. 109S510 (TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi) Prenatal Alkol Kullanımı Sonucunda Sıçan Beyinlerinde Oluşan Nöroapoptozun Folik Asit ve Betain ile Önlenmesinin Araştırılması. Bursiyer. 15.06.2010/15.06.2011.
2. 200819002 (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi) Bazı makrofunguslardan Elde Edilen Ekzopolisakkaritlerin (EPS) sıçanlarda alkolik Karaciğer Üzerine Etkileri. Araştırmacı. 01.02.2008/01.02.2011.
3. 201011003 (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi) Akut alkol alımına bağlı olarak ortaya çıkan kardiyomyopate, bir kalpain inhibitörü olan N-Acetyl- L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal'ın kardioprotektif etkisi. Araştırmacı. 11.01.2010/ 11.01.2012
4. 111S533 (TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi) Ratlarda İzoproterenol İle Oluşturulan Kalp Krizi Modelinde Kronik Alkol Kullanımının Miyokartiyal Apoptoz Üzerine Etkisi ve Kalpain İnhibitörü 1'in (N-Asetil-Lösin-Lorlösin) Kardioprotektif Rolünün Araştırılması. Bursiyer 15.04.2012/ 15.04.2013
5. 114S241 (TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi) Kronik Alkol Tüketiminde Statin Kullanımının İskelet Kasındaki Apoptotik Hücre Ölümü Üzerine Olan Etkileri ve Betainin Koruyucu Rolünün Araştırılması. Bursiyer. 15.09.2014-15.09.2015

Kurs ve Eğitimler

1. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi, Hayvan Deneyleri Ve Kesim Kursu, Eylül 2009.
2. Winter School On Frontiers In Nanomedicine And Nanobiotechnology, 10 13 Haziran, 2010, Bilkent Üniversitesi, Ankara



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ VE CERRAHİ DENEYSEL ARAŞTIRMA MERKEZİ
(TİCAM)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 01. 06. 2011
TOPLANTI SAYISI : 37
DOSYA KAYIT NUMARASI : 217
KARAR NUMARASI : 217
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof. Dr. Güngör KANBAK
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Prof. Dr. Kubilay UZUNER
Prof. Dr. Ferruh Yücel
Yrd. Doç. Dr. Onur UYSAL
Doktora Öğrencisi Ayşegül OĞLAKÇI
: *Wistar Albino*

HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Güngör KANBAK 'ın araştırma yürütücüsü olduğu 217/2011 kayıt numaralı ve "Ratlarda İzoproterenol ile Oluşturulan Kalp Krizi Modelinde Kronik Alkol Kullanımının Miyokardiyal Apoptoz Üzerine Etkisi ve Kalpain İnhibitörü 1'in (N-ASETİL-LÖSİN-LÖSİN-NORLÖSİNAL) Kardiyoprotektif Rolünün Araştırılması" konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması kabul edilerek onaylanmasına karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Doç. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Doç. Dr. Ömür ELÇİOĞLU (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Vet. Hek. Sümmani DEMİRCİ (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)