

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

AKUT ALKOL ALIMINA BAĞLI OLARAK ORTAYA ÇIKAN
KARDİYOMİYOPATİDE, BİR KALPAIN İNHİBİTÖRÜ OLAN
N-ACETYL-L-LEUCYL-L- LEUCYL -L-NORLEUCINAL'IN
KORUYUCU ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

KAZIM KARTKAYA

PROF. DR. GÜNGÖR KANBAK

TEMMUZ-2012

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

AKUT ALKOL ALIMINA BAĞLI OLARAK ORTAYA ÇIKAN
KARDİYOMİYOPATİDE, BİR KALPAIN İNHİBİTÖRÜ OLAN
N-ACETYL-L-LEUCYL-L- LEUCYL -L-NORLEUCINAL'IN
KORUYUCU ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

KAZIM KARTKAYA

PROF. DR. GÜNGÖR KANBAK

Proje No: 201011003 (ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu)

PDF Eraser Free

İÇİNDEKİLER

KAPAK.....	i
İÇ KAPAK.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
GRAFİKLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Etanol Metabolizması.....	3
2.1.1. Alkol dehidrogenaz.....	4
2.1.2. Mikrozomal etanol okside edici sistem.....	5
2.1.3. Katalaz.....	6
2.1.4. Nonoksidatif etanol metabolizması.....	6
2.1.5. Etanolün artmış NADH/NAD ⁺ oranından kaynaklanan akut etkileri.....	7
2.1.6. Asetaldehid toksisitesi.....	7
2.1.7. Etanol ve ilaç etkileşimi.....	8
2.2. Alkol Tüketimi ve Kalp Hastalıkları.....	9
2.2.1. Alkol ve kardiyomiyopati.....	11
2.3. Hücre Ölümü.....	12
2.3.1. Apoptotik hücre ölümü.....	13
2.3.1.1. Apoptozun düzenlenmesi.....	14
2.3.1.2. Apoptoz yolağı.....	14
2.3.1.2.1. Ekstrinsik yolak.....	15
2.3.1.2.2. İntrinsik mitokondrial yolak.....	16
2.3.1.2.3. İntrinsik endoplazmik retikulum yolağı.....	17
2.3.1.3. Apoptozda mitokondrinin rolü.....	18
2.3.1.4. Apoptotik hücre ölümü üzerinde etanolün etkisi.....	18

2.3.2. <i>Nekrotik hücre ölümü</i>	19
2.3.2.1. <i>Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar</i>	19
2.3.3. <i>Otofajik hücre ölümü</i>	20
2.4. Apoptozda Rol Oynayan Proteazlar	21
2.4.1. <i>Kaspazlar</i>	21
2.4.2. <i>Katepsinler</i>	21
2.4.3. <i>Kalpainler</i>	22
2.4.3.1. <i>Endoplazmik retikulum ve kalsiyum</i>	27
2.4.3.2. <i>Kalpain-katepsin hipotezi</i>	28
2.4.3.3. <i>Kalpain aktivasyonunun regülasyonu</i>	28
2.4.3.3.1. <i>Kalpainler ve kalpastatin</i>	29
2.4.3.3.2. <i>Kalpain inhibitörleri</i>	29
2.4.3.4. <i>Kalpain ve kaspazların apoptozdaki sinerjik rolleri</i>	30
2.4.3.5. <i>Mitokondri içindeki kalpainler</i>	31
2.4.3.5.1. <i>Mitokondrial kalpainlerin regülasyonu</i>	35
2.5. Miyokard Hasarının Biyokimyasal Belirteçleri	36
2.5.1. <i>Kreatin kinaz-MB</i>	36
2.5.2. <i>Atrial ve beyin natriüretik peptidler</i>	37
3. MATERYAL VE METOD	39
3.1. Cerrahi İşlem ve Operasyon Protokolü	39
3.1.1. <i>Deney grupları</i>	39
3.1.2. <i>Etanol infüzyonu</i>	39
3.1.3. <i>İnhibitör</i>	40
3.1.4. <i>Anestezi</i>	40
3.1.5. <i>Numunelerin saklanması</i>	40
3.2. Biyokimyasal Ölçümler	41
3.2.1. <i>Kalpain aktivasyonu ölçümü</i>	41
3.2.2. <i>Katepsin B ve L aktivite ölçümleri</i>	42
3.2.3. <i>Kaspaz 3 aktivasyonu ölçümü</i>	43
3.2.4. <i>Sitokrom c salınımı ölçümü</i>	44
3.2.5. <i>Serum BNP düzeyinin belirlenmesi</i>	46
3.2.7. <i>Doku protein miktarı ölçümü</i>	48
3.3. Histolojik İncelemeler	49
3.3.1. <i>Işık mikroskobu incelemesi</i>	49
3.3.2. <i>TUNEL Boyama Tekniği Protokolü</i>	50
3.3.3. <i>Kaspaz-3 ün immünohistokimyasal değerlendirilmesi:</i>	50
3.4. İstatiksel Analiz	51
4. SONUÇLAR	52
4.1. Biyokimyasal Sonuçlar	52
4.1.1. <i>Kalpain aktivitesi</i>	52
4.1.2. <i>Katepsin L aktivitesi</i>	53
4.1.3. <i>Katepsin B aktivitesi</i>	54

4.1.4. Kaspaz 3 aktivitesi	55
4.1.5. Sitokrom c salınımı	56
4.1.6. Serum BNP düzeyi	57
4.1.7. Serum CK-MB düzeyi	58
4.2. Histolojik Sonuçlar	59
4.2.1. Işık mikroskobu incelemesi	59
4.2.2. TUNEL bulguları	62
4.2.3. Kaspaz 3 immüno histokimyasal incelemesi	64
5. TARTIŞMA	66
5.1. Kalpain Aktivitesi Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi	67
5.2. Katepsin L ve B Aktivitesi Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi	68
5.3. Mitokondriden Sitokrom C Salınımı Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi	69
5.4. Kaspaz 3 Aktivitesi Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi	70
5.5. DNA Fragmantasyonu Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi	71
5.6. Serum BNP Düzeyleri Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi	72
5.7. Serum CK-MB Düzeyleri Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi	73
5.8. Işık Mikroskobu İncelemeleri	73
5.9. Miyokardiyum Üzerinde Kalpain Aktivasyonu ve İnhibisyonunun Etkisi	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR DİZİNİ	77
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Etanol.....	4
Şekil 2.2 Etanol metabolizmasının ana yolu ve asetatın kas tarafından kullanılması.	5
Şekil 2.3 Etanol metabolizma yolu.	5
Şekil 2.4 Endoplazmik retikulumda MEOS tarafından katalize edilen tepkime.	6
Şekil 2.5 Alkolün indükte ettiği hepatitin gelişmesi.	8
Şekil 2.6 Etanol ile ilaç etkileşimi.	9
Şekil 2.7 Ekstrinsik yol ile gerçekleşen apoptoz.	16
Şekil 2.8 İntrinsik yol ile apoptozun oluşumu.	17
Şekil 2.9 Kalsiyum yokken insan kalpainin üç boyutlu yapısı.	24
Şekil 2.10 Kalpainin şematik yapısı.	24
Şekil 2.11 İnsan kalpain ailesi üyelerinin domain yapıları.	25
Şekil 2.12 Kalsiyum tarafından kalsiyumun aktivasyon mekanizması.	26
Şekil 2.13 Endoplazmik retikulum, kalpain ve kalsiyumun apoptozdaki rolleri.....	27
Şekil 2.14 Kalpain katepsin hipotezi.	28
Şekil 2.15 Kalpastatinin şematik diyagramı.	29
Şekil 2.16 Kalpain İnhibitör I; N-[N-(N-Asetil-L-lösil)-L-lösil]-L-norlösilal.....	30
Şekil 2.17 Kalpain ve Kaspazların apoptozdaki rolleri.	30
Şekil 2.18 Mitokondrideki kalpain aracılı hücre ölümü modeli.	32
Şekil 2.19 AIF'ün oluşumu ve mitokondriden salınımı modeli.	33
Şekil 2.20 Kalpain, kalpastatin ve kaspazlar arasındaki ilişki.....	34
Şekil 2.21 Kalsiyum ile indüklenen mitokondrial disfonksiyondan sonra kalpain 10 etkisinin ileri sürülen mekanizması.	35
Şekil 2.22 BNP'nin sentez ve sekresyonu.	38
Şekil 4.1 Alkol grubuna ait kalp dokusu örneklerinin ışık mikroskobu incelemesi görüntüleri.....	60
Şekil 4.2 Kalp dokusu tüm gruplara ait ışık mikroskobu görüntüleri.....	61
Şekil 4.3 Kontrol grubu(a), inhibitör grubuna (c) ve çözücü grubu(d) ait TUNEL immünohistokimyasal boyaması.....	62
Şekil 4.4 Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması ışık mikroskobu görüntüleri.....	64

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 3.1 Kalpain aktivitesi kalibrasyon eğrisi.....	41
Grafik 3.2 Katepsin aktivitesi kalibrasyon eğrisi.....	42
Grafik 3.3 Kaspaz 3 aktivitesi kalibrasyon eğrisi.....	43
Grafik 3.4 Sitokrom c ölçümü kalibrasyon eğrisi.....	45
Grafik 3.5 Beyin Natriüretik Peptid Kalibrasyon eğrisi.....	46
Grafik 3.6 Serum CK MB ölçümü kalibrasyon eğrisi.....	47
Grafik 3.7 Doku protein ölçümü için albumin ile yapılan kalibrasyon eğrisi.....	48
Grafik 4.1 Kalp dokusu kalpain aktivitesi düzeyleri	52
Grafik 4.2 Kalp dokusu katepsin L aktivitesi sitozolik fraksiyonun lizozomal fraksiyona oranı.....	53
Grafik 4.3 Kalp dokusu katepsin B aktivitesi sitozolik fraksiyonun lizozomal fraksiyona oranı.....	54
Grafik 4.4 Kalp dokusu kaspaz 3 aktivitesi düzeyleri.....	55
Grafik 4.5 Sitokrom c salınımı sitozolik fraksiyonun mitokondrial fraksiyona oranı.....	56
Grafik 4.6 Serum BNP düzeyleri.....	57
Grafik 4.7 Kreatin Kinaz MB sonuçları.....	58

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 4.1 Kalpain aktivitesi düzeyleri	52
Tablo 4.2 Katepsin L aktivitesi oranları	53
Tablo 4.3 Katepsin B aktivitesi oranları	54
Tablo 4.4 Kaspaz 3 aktivitesi düzeyleri	55
Tablo 4.5 Sitokrom c salınımı sitozolik/mitokondrial fraksiyon oranları	56
Tablo 4.6 Serum BNP düzeyleri	57
Tablo 4.7 Serum CK MB düzeyleri	58
Tablo 4.8 Işık mikroskobu görüntüleri skorlama sonuçları.....	59
Tablo 4.9 TUNEL pozitif hücrelerin tüm hücrelere oranları.....	63
Tablo 4.10 Kaspaz 3'ün immünohistokimyasal boyanmasının değerlendirilmesi	65

KISALTMALAR DİZİNİ

- ACE: Anjiyotensin-Konverting Enzim
AIF: Apoptoz İndükleyici Faktör
ALT: Alanin Aminotransferaz
AMC: A 7-Amino-4-Metil Kumarin
ANP: Atrial Natriüretik Peptidler
APAF-1: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
AST: Aspartat Aminotransferaz
ATP: Adenozin Trifosfat
BNP: Beyin Natriüretik Peptid
CaCl₂: Kalsiyum Klorür
CAD: Kaspazla Aktive Olan DNAaz
CHAPS: Cholamidpropil Dimetilammonio-1-Propansulfonat
CK-MB: Kreatin Kinaz-MB
DISC: Ölümü Uyarıcı Sinyal Kompleksi
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
DTT: Dithiothreitol
EDTA: Etilendiamintetraasetik Asit
EGTA: Etilenbis(oksonitrilo)]tetra-Asetat
EKG: Elektrokardiyogram
ENDO-G: Endonükleaz G
ER: Endoplazmik Retikulum
FADD Fas ile ilgili Ölüm Domaini
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
HEPES: Hidroksietil piperazinethansülfonik asit
InsP₃: İnozitol-1, 4, 5 trifosfat
MEOS: Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem
MPT: Membran Permabilite Transisyonu
NAD: Nikotinamid Dinükleotit
NCX: Sodyum Kalsiyum Değiştirici

KISALTMALAR DİZİNİ (devamı)

pNA: Para-Nitroanilin

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

SERCA: Sarkoplazmik/Endoplazmik Ca⁺²-ATPaz

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TRADD: TNF Reseptör ile İlgili Ölüm Domaini

TRAF2: TNF Reseptör İle İlgili Faktör 2

Tris-HCl: Tris(hidroksimetil)aminometan Hidroklorid

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick and Labeling

VDAC: Voltaj Bağımlı Anyon Kanalları

VLDL: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein

ÖZET

Alkol tüketimi ve alkolizm yüksek bir mortalite ve morbiditeye sahip sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Bu çalışmada akut alkol tüketimi ile kardiyomiyopati oluşturduğumuz sıçanlara alkol ile birlikte kalpain inhibitörü vererek apoptoz ve nekrozda rol oynayan kalpain aktivasyonunun engellenmesi ile doku hasarını azaltmayı amaçladık.

Çalışmamızda erkek Sprague-Dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol, çözücü, alkol ve alkol+inhibitör grubu olmak üzere 10'ar sıçandan oluşan 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna gavajla izokalorik maltoz, çözücü grubuna izokalorik maltoz + DMSO, alkol grubuna 8 g/kg etanol verildi. İnhibitör grubuna alkol verilmesinden 15 dakika önce kalpain inhibitör-1 intraperitoneal olarak 20 mg/kg uygulandı. Bu uygulamalardan 12 saat sonra doku ve serum örnekleri alındı. Alkol grubu kalpain aktivitesi, katepsin L oranı, sitokrom c salınımı oranları kontrol grubuna göre yüksekti ve bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Bu testlerin inhibitör grubu sonuçları alkol grubuna göre daha düşüktü. Ama bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Alkol grubu kaspaz-3 aktivitesi ve katepsin B oranı diğer gruplara göre artmıştı fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Alkol grubu serum CK-MB ve BNP sonuçları, kontrol grubuna göre önemli düzeyde yüksekti (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,01$). İnhibitör grubu BNP sonuçları alkol grubuna göre önemli miktarda azalmıştı ($p<0,05$). Ayrıca histolojik inceleme olarak yapılan ışık mikroskobu görüntüleri, DNA fragmentasyonu ve immüno-histokimyasal kaspaz 3 aktivitesi sonuçları alkol grubuna göre inhibitör grubunda belirgin bir iyileşmeyi göstermiştir ($p<0,05$).

Sonuç olarak biyokimyasal ve histolojik bulgularımız; kalpain inhibitörü N-asetil-lösin-lösin-norlösin'in hücre ölümü yolaklarına etkisi aracılığı ile akut alkol kullanımına bağlı kalp dokusu hasarının azaltılmasında tedavi edici etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kardiyomiyopati, alkol, kalpain inhibitörü, apoptoz

SUMMARY

Excessive alcohol consumption and alcoholism causes medical problems with high mortality and morbidity. In this study we aimed to decrease the alcohol related tissue damage by inhibiting calpain activation which plays an important role in apoptosis and necrosis, in rats with acute alcohol consumption induced cardiomyopathy.

Male Sprague-Dawley rats were used and four groups with ten rats in each (control, vehicle, alcohol and alcohol + inhibitor) were included in our study. Control group received isocaloric maltose while vehicle group received isocaloric maltose with DMSO, and alcohol group received 8g/kg ethanol by gavage. Inhibitor group received 20 mg /kg calpain inhibitor 1 intraperitonally prior to alcohol administration. After twelve hours treatment, the tissue and serum samples were collected. Calpain activities, cathepsin L levels and cytochrome C release rates were significantly ($p < 0.05$) increased in alcohol group compared to control group while they were decreased in inhibitor group compared to alcohol group but this was not significant by statistically ($p > 0.05$). Caspase-3 activity and Cathepsin B levels of alcohol group were mildly increased compared to other groups but this was not significant ($p > 0.05$). Serum CK MB and BNP levels of alcohol group were excessively increased compared to control group (respectively $p < 0,001$ and $p < 0,01$). Serum BNP levels of inhibitor group were significantly ($p < 0.05$) decreased compared to alcohol group. In addition to these, histological evaluation of light microscope images and the results of DNA fragmentation and immunohistochemical caspase-3 activity results showed significant improvement in inhibitor group compared to alcohol group.

Results of our biochemical and histological evaluation results revealed that the calpain inhibitor N-acetyl-leu-leu-norleucinal may have an ameliorating effect on acute alcohol consumption related cardiac tissue damage due to its effects on cell death pathways.

Keywords: Cardiomyopathy, alcohol, calpain inhibitor, apoptosis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endüstrileşmiş batı ülkelerinde, konjestif kardiyomiyopatinin en yaygın sebeplerinden birisi aşırı miktarda alkol tüketimidir. Nitekim tüm dilate kardiyomiyopati olaylarının %21 ile %36'sı aşırı etanol tüketimiyle oluşmaktadır (45). Koroner arter olaylarını azaltması yolu ile ılımlı alkol tüketiminin kardiovasküler hastalık riskini düşürmesi şeklinde etkisi olmasına karşın, uzun süreli alkol tüketimi mitokondrial bozukluklar, hücre ölümü, kasılma disfonksiyonu, aritmiler ve kardiyak remodellemenin sebep olduğu kalp bozuklukları oluşturur. Ağır alkol tüketimi, genellikle alkolizm ile ilgili morbidite ve mortalitenin önemli sebebi olan alkolik kardiyomiyopati olarak da bilinen dilate kardiyomiyopatiyle karakterize kasılma disfonksiyonu ve kardiyak remodelleme ile sonuçlanır. Yaklaşık olarak alkol bağımlı her üç bireyden birisinde alkolik kardiyomiyopatiye rastlanır. Alkolik kardiyomiyopati veya alkolik kalp kası hastalığında sıklıkla kardiyak hipertrofi, miyofibriler mimaride bozukluklar, miyokardiyal kasılmada azalma (atım fraksiyonunda ve vurma volümünde azalma) miyokardiyal fibrozis ve aritmi görülür (185).

Ateroskleroz, miyokardiyal iskemi, diabetik kardiyomiyopati ve alkolik-kardiyomiyopatiyi içeren birçok hastalığın patogeneğinde apoptotik hücre ölümü anahtar bir rol oynar. Akut etanol maruziyetini takiben miyokard dokusunda görülen kaspaz 3 aktivasyonu, sitokrom c ile prokaspaz 9'un sitozolde artışı ve DNA fragmentasyonlu hücrelerin artışı etanol indüklemeli apoptozda mitokondrial hücre ölümü yolağının esansiyel rolünü göstermektedir. TNF- α , Fas reseptör, Fas L, kaspaz-8 ve pro-kaspaz-8 in ekspresyonunda artış olmaması etanolün oluşturduğu apoptotik yanıtta ölüm reseptörü yolağının minimal bir role sahip olduğunu göstermektedir (61).

Kalpainer hücre iskeleti ve sinyal iletiminde görev alan proteazlar olup, ayrıca hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, inflamasyon, iskemi, müsküler distrofiler, kataraktogenez, alzheimer ve parkinson hastalıkları gibi diğer fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde yer alırlar (94). Etanolün neden olduğu hücre ölümünde kalpainerin aktive olduğu Yadavalli ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (139).

Nekrotik hücre ölümü sırasında aktive olmuş kalpainlerin lizozomal zarlara zarar verdiği belirlenmiştir. İskemik olaylardan sonra ilk görülen kalpainlerin, lizozomların zarlarına yerleşmesidir ve sonrasında da katepsinler sitoplazmaya sızar. Bu gözlemler kalpain-katepsin hipotezinin oluşumuna neden olur. Kalsiyum aracılı kalpain aktivasyonu; lizozomların yırtılması, öldürücü katepsinlerin sızması ve hücrenin parçalanması ile sonuçlanır (166).

Doku hasarında rol oynayan kalpain aktivasyonunun önlenmesi amacıyla kalpain inhibitörü kullanımı son zamanlarda önem kazanmaya başlamıştır. Bir düzineden fazla kalpain inhibitörü bilinmektedir. En çok kullanılanlar peptid aldehitlerdir. Aldehit son grubu sülfidril grubuna bağlanır. Bu bağlanma kalsiyuma bağımlı ve geri dönüşümlüdür. Aldehid peptid olan Kalpain inhibitör-1 (N-asetil-Leu-Leu-norlösin) hücre geçirgenliği olan bir inhibitördür (87) ve kalpainin aktif bölgesini bloke eder (27). Birçok farklı çalışmada kalpain inhibitörlerinin etkinliği gösterilmiştir (152, 104).

Gerçekleştirilen bu çalışma, akut alkol tüketiminin kalp dokusu üzerinde yaptığı hasarı göstermek ve bu doku hasarının önlenmesinde kalpain inhibitörlerinin koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla erkek Sprague-Dawley türü sıçanlara akut toksik doz etanol verilerek kalp dokusu hasarı yaratıldı ve oluşan miyokard hasarı serum BNP ve CK-MB düzeyleri ile tespit edildi. Akut alkol toksitesi sonucu oluşan hücre ölümü sürecini göstermek için nekroz ve apoptoz mekanizması içinde yer alan sitokrom c salınımı, kaspaz 3 aktivasyonu, katepsin ve kalpain düzeyine bakıldı. Apoptoz ve nekrozda rol oynayan kalpain aktivasyonu, kalpain inhibitörü ile engellenerek, kalpain inhibitörlerinin tedavi edici etkisinin olabileceği histolojik incelemeler ve biyokimyasal ölçümler ile gösterildi.

2. GENEL BİLGİLER

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. Alkolün yol açtığı hastalıklar ve yaralanmalar önlenebilir. Aşırı alkol kullananların çoğuna tanı konulamamaktadır. Alkol sorunları yaşayan hastalara erken müdahalelerin etkinliği gösterilmiştir (2). İlimli alkol tüketiminin kardiyovasküler hastalıklar üzerinde faydalı etkileri olmasına rağmen (73) aşırı alkol tüketiminin, iskemik olmayan kardiyomyopatinin en önemli nedenlerinden biri olduğu gösterilmiştir (131).

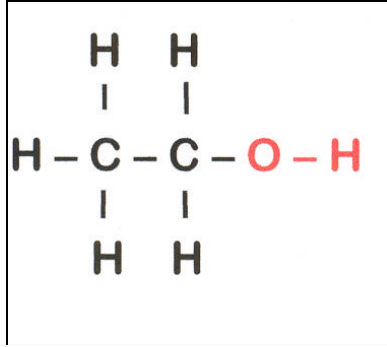
2.1 Etanol Metabolizması

Alkol terimi, doymuş bir karbon atomuna bağlı hidroksil grubundan oluşan geniş bir grup organik molekülü kapsar. Halk arasında '*alkol*' diye adlandırılan "*etil alkol*" ya da etil alkol içeren içecekler, ilk çağlardan itibaren insanlar tarafından kullanılan keyif verici maddeler arasında yer almaktadır. Alkol (etanol) basit bir moleküldür (Şekil 2.1) 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 (127).

Karaciğerde etanol metabolizmasından sorumlu başlıca üç yol vardır (154).

1. Alkol Dehidrogenaz: Sitozolda gerçekleşir.
2. Mikrozomal Etanol Okside Edici Sistem (MEOS): Endoplazmik retikulumda gerçekleşir.
3. Katalaz: Peroksizomlarda gerçekleşir.

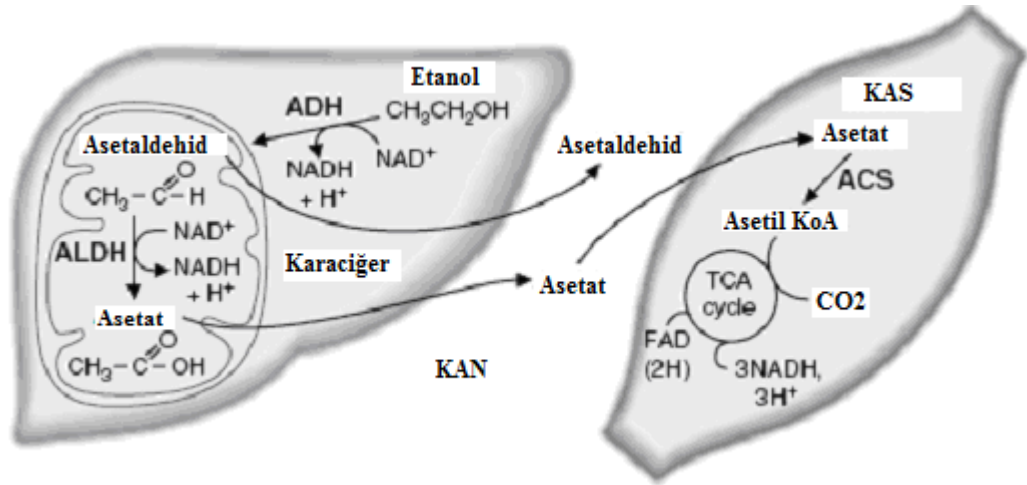
Ayrıca bu üç yoldan farklı olarak etanol metabolizmasının oksidatif olmayan yan yolun varlığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (22).



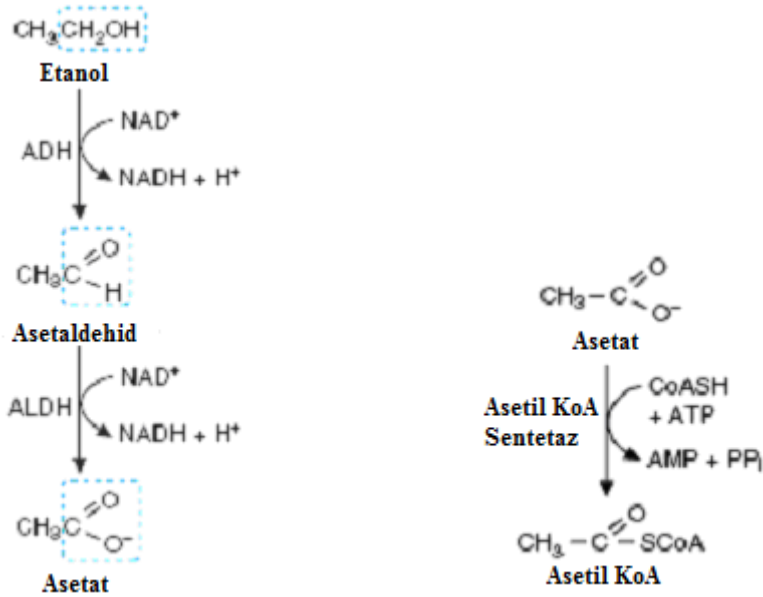
Şekil 2.1 Etanol

2.1.1. Alkol dehidrogenaz

Etanolün metabolize edilmesinde kullanılan ana yol etanolü sitozolde asetaldehide okside eden hepatik alkol dehidrogenazlardır (90). Asetaldehid esas olarak mitokondrilerde asetaldehid dehidrogenazlar tarafından daha fazla oksidasyona uğratılarak asetata çevrilir (154). Toksik olan asetaldehid kana da girebilir. Bu tepkimelerle üretilen NADH, oksidatif fosforilasyonla adenzin trifosfat (ATP) üretmek için kullanılır. Asetatın büyük bölümü kana geçer ve iskelet kasları ile diğer dokular tarafından alınıp asetil KoA'ya aktive edilerek krebs döngüsünde okside edilir (Şekil 2.2 ve 2.3) (159). Organların hemen hemen hepsi etanolün küçük miktarlarını okside edebilecek kapasitededir. Kalp dokusunda alkol dehidrogenaz çok düşük miktarda bulunmaktadır (141).



Şekil 2.2 Etanol metabolizmasının ana yolu ve asetatin kas tarafından kullanılması (159)
 ADH:Alkol Dehidrognaz, ALDH:Asetaldehid Dehidrogenaz, ACS:Asetil KoA Sentetaz

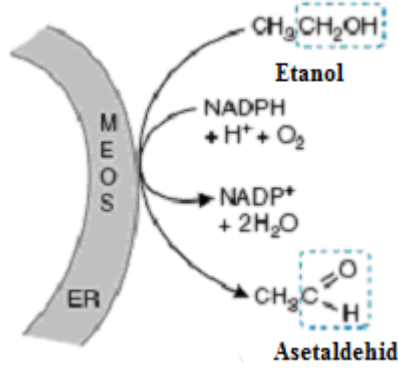


Şekil 2.3 Etanol metabolizma yolu (159)

2.1.2. Mikrozomal etanol okside edici sistem

Etanolün yaklaşık %10-20'si endoplazmik retikulumdaki sitokrom P450 enzimlerinden (özellikle CYP2E1) oluşan bir mikrozomal okside edici sistem tarafından okside edilir (Şekil 2.4). CYP2E1 etanol için yüksek bir K_m 'e sahiptir ve etanol

tarafından indüklenebilir (159). Kalp dokusunda monooksijenazların gen ekspresyonunun olduğu Thum ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (173).



Şekil 2.4 Endoplazmik retikulumda MEOS tarafından katalize edilen tepkime (159)

2.1.3. Katalaz

Katalaz etanol metabolizmasında önemli bir role sahip değildir. Hiç katalaz enzimine sahip olmayan kişilerin bile, etanol alımını takiben asemptomatik oldukları bilinmektedir (75). Çeşitli memeli türlerinin ve farelerin kalp dokusu peroksizomlarında katalaz enzimi bulunmaktadır (76). Etanol tüketimi ile birlikte 6 hafta boyunca katalaz enziminin inhibisyonu miyokard dokusunda histolojik anormalliklere neden olmuştur (141).

2.1.4. Nonoksidatif etanol metabolizması

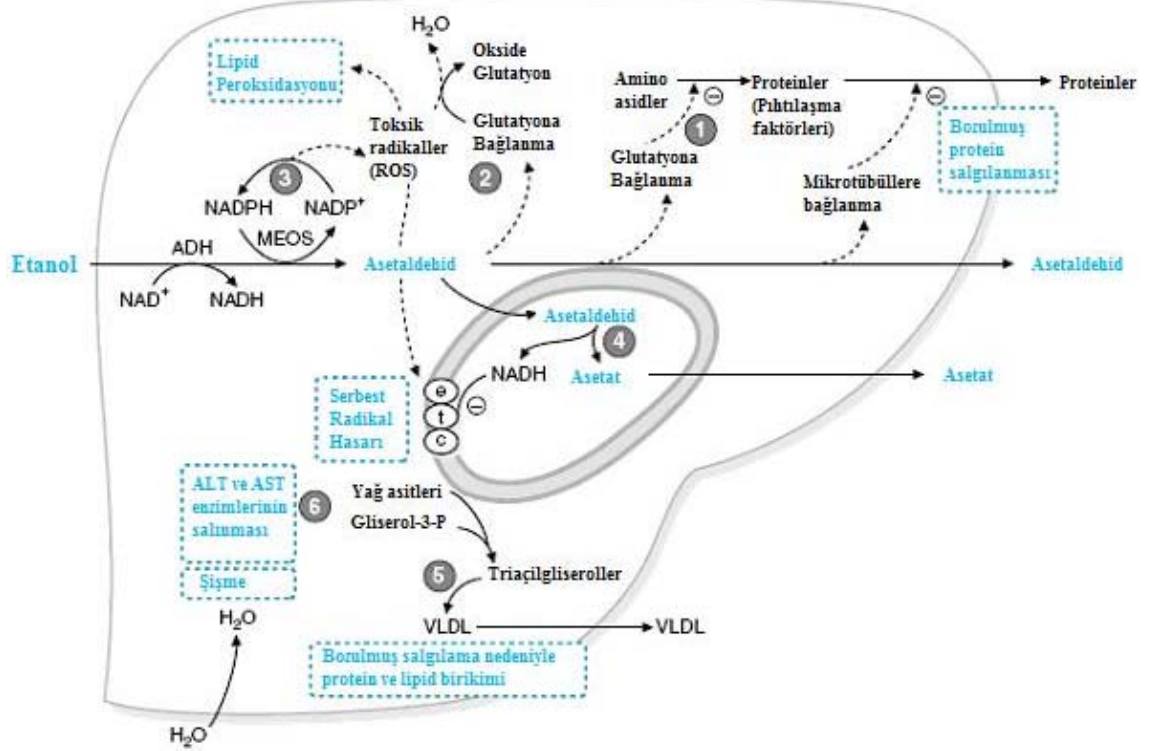
Etanol metabolizmasının bu yolu kalp dokusunda da tespit edilmiştir. Bu metabolik yolda, potansiyel toksik ürünler olan yağ asidi etil esterlerinin üretimi gerçekleşir. Bu metabolitler yağ asidi etil esteri sentaz tarafından sentezlenirler (14). Bunlar mitokondride birikerek enerji üretimi düzeyinde hücreye zarar verirler. Etanole maruz kalınca esterleşmemiş yağ asitleri etanolle reaksiyona girer ve kardiyak yağ asidi etil esteri düzeyi yükselir (23).

2.1.5. Etanolün artmış $NADH/NAD^+$ oranından kaynaklanan akut etkileri

Alkol içilmesinin akut etkileri esas olarak NADH üretilmesinden kaynaklanmakta olup bu da karaciğerdeki $NADH/NAD^+$ oranını büyük çapta arttırmaktadır. Bunun sonucunda yağ asidi oksidasyonu inhibe olmakta ve ketogenez görülebilmektedir (159). Yağ asitleri triaçilgliserole esterlenmektedir. Etanolün diğer etkileri arasında artmış lipogenez ve asetil-KoA'dan kolesterol sentezi bulunabilir (117). Artmış $NADH/NAD^+$ oranı laktik asidoza neden olabilmekte ve glukoneogenezi inhibe edebilmektedir (159).

2.1.6. Asetaldehid toksisitesi

Aşırı alkol kullanımının toksik etkilerinin birçoğu hem alkol dehidrogenaz hem de MEOS tarafından etanolden üretilen asetaldehidin birikmesine bağlıdır. Aşırı miktarda etanol alınmasından sonra karaciğerde asetaldehid birikir ve kana salınır (Şekil 2.5) (159). Asetaldehid, DNA ve proteinlere bağlanarak hücrel fonksiyonları ve gen ekspresyonunu bozar. N terminal aminoasitlerin α amino grupları veya lizinin epsilon amino grubuyla asetaldehid etkileşir ve protein türevleri (*adduct*) oluşur ve bu yapılar enzimleri de içeren birçok proteinin yapısını ve fonksiyonlarını değiştirir (154). Asetaldehid serbest radikal harabiyetini artırır. Asetaldehid glutatyona direkt olarak bağlanır ve bu molekülün H_2O_2 'ye karşı koruma ve lipid peroksidasyonunu önleme becerisini azaltır (Şekil 2.5, 2.çember). Asetaldehid serbest radikal savunma enzimlerini de bağlar. Asetaldehid ve serbest radikallerin mitokondrilerde yaptığı hasar bir toksisite döngüsü oluşturur (Şekil 2.5, 3. ve 4.çemberler). Etanolün kronik şekilde alınması ile mitokondriler harabiyete uğrar, elektron taşıma hızı inhibe olur ve oksidatif fosforilasyonla ATP üretimi azalma gösterir. Yağ asidi oksidasyonu daha da düşer ve bu yolla lipid birikimi artar (Şekil 2.5, 5.çember). Asetaldehidin mitokondriyi etkilemesiyle oluşan ürünler, mitokondriyal asetaldehid oksidasyonunu daha da bozar ve bu bir harabiyet döngüsü oluşturur (159). Asetaldehid ayrıca, alkol alımını takiben gelişebilen yüzde kızarma, çarpıntı, baş ağrısı, kusma, terleme gibi belirtilerin ortaya çıkmasından da sorumludur (75).

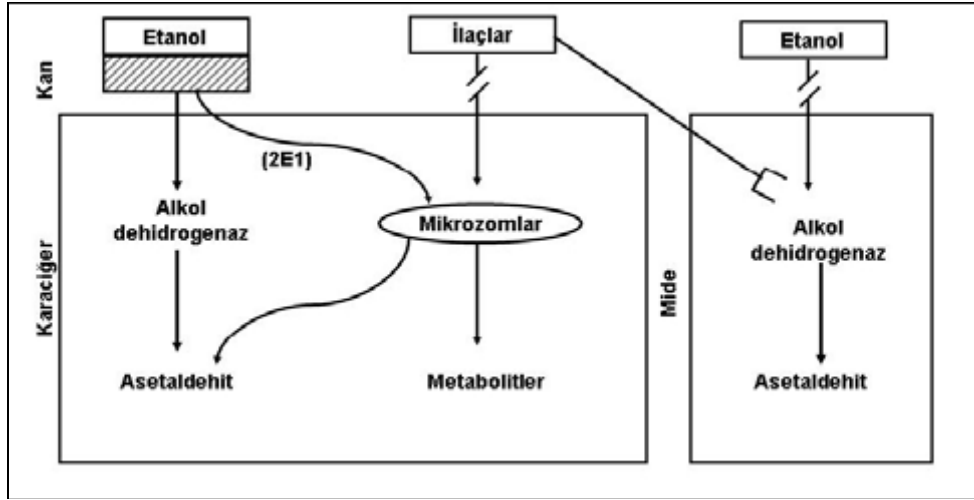


Şekil 2.5 Alkolün indükte ettiği hepatitin gelişmesi.

(1) Protein sentezi azalır ve protein salgılanması bozulur. (2) Serbest radikal hasarının oluşmasında, asetaldehidin glutatyon üzerindeki etkisi önemli bir kısmı oluşturur. (3) MEOS'un indüksiyonu serbest radikal oluşmasını arttırmakta, bu da lipid peroksidasyonu ve hücre hasarına yol açmaktadır. (4) Mitokondrial hasar, elektron taşıma zincirinin çalışmasını engeller ve bu da asetaldehidin oksidasyonunu azaltır. (5) Mikrotübül hasarı VLDL ve protein birikmesini artırır. (6) Hücre hasarı hepatik enzimler olan alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferazın (AST) serbest kalmasına yol açar (159).

2.1.7. Etanol ve ilaç etkileşimi

Kronik etanol alımı, mikrozomal enzim indüksiyonuna yol açarak, etanol ile beraber alınan diğer ilaçların metabolizmasını etkilemektedir (Şekil 2.6). Kronik etanol alan kişilerde, bazı ilaçların arzulanan terapötik kan düzeylerini sağlamak için, etanol almayanlara göre daha yüksek dozlarda kullanılması gerektiği bilinmektedir. Özellikle *warfarin*, *isoniazid*, *difenilhidantoin* gibi sık kullanılan ve kan düzeylerinin önemle takip edildiği ilaçlarda bu durum daha da önem kazanmaktadır (75).



Şekil 2.6 Etanol ile ilaç etkileşimi (75)

İlaç ile beraber akut olarak alınan aşırı doz etanol, mikrozomal enzimler için yarışacaktır. Böylece hem ilacın hem de etanolün metabolize edilmesi yavaşlayacak, kan düzeyleri artacak ve toksikasyonlara yol açabileceklerdir. Diğer taraftan metabolizması yavaşlamış ve kan düzeyi artmış olan bazı ilaçlar, gastrik alkol dehidrogenazı inhibe ederek, etanol metabolizmasının daha da yavaşlamasına yol açabilir (75).

2.2. Alkol Tüketimi ve Kalp Hastalıkları

Hafif-orta derecede alkol tüketiminin kardiyovasküler sistem üzerinde faydalı olduğu, fazla tüketiminin ise sağlığı olumsuz etkilediği bilinmektedir. Gözlemsel ve metabolik çalışmalarda kardiyovasküler yararın günde 1-2 kadeh alkollü içeceklerle görüldüğü belirtilmiştir (36). Önerilen faydalı etkilerinin yanı sıra alkol tüketiminin bilinen kötü etkileri; karaciğer harabiyeti, fetal alkol sendromu, kardiyomiyopati, hipertansiyon, hemorajik inme, kardiyak aritmi ve ani ölümdür. Bu yan etkilerin çoğu, kronik alkol alımı olarak tanımlanan günde 3 kadehten fazla uzun süreli alkol tüketimlerinde görülmektedir (54). Alkol tüketimi başlıca üç temel mekanizma ile miyokard hasarına yol açabilir: muhtemel direkt toksik etki, nutrisyonel etki (tiamin eksikliği sonucu) ve daha nadiren alkollü içeceklere eklenen kobalt gibi maddelerin neden olduğu toksik etkiler (36).

Patogenezi tam olarak tanımlanmamış olmakla beraber deneysel çalışmalarda alkol tüketimi ile interstisyumda kollajen birikimi olduğu ve bunun da erken dönemde diastolik disfonksiyona yol açtığı (172), uzun dönemde ise sistolik disfonksiyonun geliştiği ileri sürülmüştür. Sistolik disfonksiyon mekanizması olarak da zar fosfolipid içeriğinin değişmesiyle miyositlerde su ve sodyum birikimi olması, beraberinde tubuler membranların disfonksiyonu ile total hücre kalsiyum miktarı değişmeden kontraktıl proteinlere kalsiyum sunumunun sınırlanması sonucu kontraktılitenin azaldığı gösterilmiştir (153). Benzer şekilde yüksek enerjili fosfat düzeylerinin de değişmediği halde uzun süreli alkol kullanımının miyozin ATPaz ve kalsiyum ile aktive olan miyofibriler ATPaz üzerine inhibitör etkisinin olduğu saptanmıştır (148). Miyositlerde protein sentezinin de kötü yönde etkilenebileceği düşünülmesine rağmen deneysel çalışmalar, en azından hastalığın erken döneminde protein sentezinin bozulmadığını, ancak klinik olarak alkolik kardiyomyopati belirgin hale geldiğinde kontraktıl protein sentezinin bozulduğunu, yıkımın arttığını ve miyofibrillerin lizise uğradığını göstermiştir (36).

Kalp üzerinde alkolün en önemli etkilerinden birisi mitokondrial zar hasarı olabilir. Etanol, mitokondrial zar geçirgenliğini, fonksiyonunu değiştirir, mitokondrial solunumu baskılar, mitokondrial protein sentezini inhibe eder ve oksidatif stresi indükler (76). Etanol ve asetaldehidin her ikisi de kardiyak protein sentezini etkiler. Akut etanol maruziyetinin kardiyak protein sentezini azalttığı görülmüştür (156). Etanol biyomembran akışkanlığını artırır ve iyonik geçirgenliği değiştirir (37). Örneğin *in-vitro* ortamda izole edilmiş kardiyak sarkoplazmik retikulumun kalsiyumu bağlaması ve tutulumunu etanol geri dönüşümlü olarak inhibe eder (17). Asetaldehidin çok reaktif bir yapısı vardır. Yapısal ve kasılma proteinlerine kovalent bağlanır. Asetaldehid protein türevleri, immün yanıtı uyararak ve transkripsiyon üzerindeki etkileri aracılığı ile DNA hasarı ve hücre fonksiyon bozukluğuna neden olurlar (43). Akut ve kronik etanol maruziyeti sonucu kalp ve iskelet kasında oluşan asetaldehid-protein türevleri (120,176,177) nedeniyle alkolik kalp kası hastalığına sahip hastaların %33'ünde kardiyak asetaldehid-protein türevlerine karşı antikolar görülmüştür (65). Kardiyak spesifik alkol dehidrogenazın aşırı salınımı oluşturulmuş transgenik farelerde yapılan bir çalışmada etanol alımından sonra kardiyak asetaldehid düzeyi kontrol grubuna göre

4 kat daha fazla bulunmuştur. ANP gen salınımı, kardiyak protein hasarı, hipertrofi ve kas hasarında artış görülmüştür ve bunlar alkolik kalp kası hastalığının belirteçleridir (101,68).

2.2.1. Alkol ve kardiyomiyopati

Kardiyomiyopati, ilk olarak kalp kasının hastalıkları olarak tanımlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü 1995 yılında tanımı biraz değiştirmiş ve kalp fonksiyonlarının bozulmasına yol açan kalp kası hastalıkları haline getirmiştir (40). Tüm kardiyomiyopati vakaları incelendiğinde % 3,8 inde alkolik kalp kası hastalığı görülmektedir (131). Alkol alımına bağlı kardiyomiyopatide sol ventriküler dilatasyon, sol ventriküler kasılmada bozulma, pompalanan hacimde azalma, kardiyak hipertrofi, hipertansiyon ve kalp krizi riskinde artma görülür (143). Sol ventriküler hipertrofi, hem artmış kalp iş yüküne adaptasyonu sağlayan bir yanıtın göstergesidir hem de kalp bozukluklarının bir öncü temsilcisidir (33). Miyokardiyal hipertrofi, başlangıçta önemli bir kompensatör olmasına rağmen, aslında kardiyak morbiditesi ve mortalitesi için önemli bir risk faktörüdür (71). Adaptatif hipertrofik yanıt, miyositlerin hacim ve kütlelerinde bir artış ile karakterizedir. Böylece kardiyomiyosit sayısında artış olmaksızın kalp ağırlığında bir artış ile sonuçlanır (115). Sol ventrikül hipertrofisinde miyosit ölümü ile ilgili kanıtlar hem deneysel hem de klinik çalışmalarda gösterilmiştir (71).

Uzun süreli alkol tüketiminden sonra, sarkoplazmik retikulumda genişleme, miyofibrillerin bozulması ve kaybı gibi kardiyak morfoloji değişikliği olduğu gösterilmiştir. Kalpte yüksek konsantrasyonlarda bulunan asetaldehidin bifazik kronotropik ve inotropik kardiyak etkileri vardır. Kalpteki asetaldehid oranının pozitif etkileri: kardiyak pompalama, koroner kan akımı, sol ventriküler basınçtaki artışları içerir ve sıklıkla düşük konsantrasyonlardaki alkol kullanımında gözlenir. Bunlar beta adrenerjik sistemin uyarılmasıyla ilgili olabilir. Miyokardiyal doku üzerindeki negatif kronotropik ve inotropik etkileri tam olarak belirlenememesine rağmen, asetaldehidin purinerjik ve kolinerjik mekanizmalardan bağımsız miyokardiyal depresyona sebep olduğu gösterilmiştir. Diğer çalışmalarda asetaldehidin ventriküler miyosit kasılmasını

direkt inhibe ettiğine yönelik bilgiler elde edilmiştir. Bütün bu bilgiler kardiovasküler disfonksiyon üzerinde etanolün etkilerinde asetaldehidin rol oynayabildiğini göstermektedir (143). Ilımlı alkol tüketiminin kardiovasküler riskleri azaltıcı etkisi olmasına rağmen (161) ağır alkol tüketimi ile oluşan asetaldehid birikimi miyokardiyal kasılmayı baskılar, intrasellüler kalsiyum mobilizasyonunu ve membran voltaja bağımlı kanallarını etkiler (127). Hücre içi kalsiyum düzeyinin artışı ile birlikte kalpainlerin aktive olması miyokardiyal proteinlere zarar verir, miyositlerin ölümü ile miyokardiyal yapı ve fonksiyon kaybı oluşur. Çeşitli çalışmalarda kalpain inhibitörlerinin miyokardiyal proteinlerin proteolizini azalttığı ve böylece hipoksi ve iskemi boyunca kontraktıl disfonksiyonu engellediği gösterilmiştir (152).

2.3. Hücre Ölümü

İster tek hücreli ister çok hücreli canlılarda olsun; yaşamın başlıca kısımları doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Organizmaların temel canlılık birimi olan hücrelerin gereksinimleri karşılanmadığında ölüm olarak adlandırılan ve hayati olayların geri dönüşsüz olarak durması anlamına gelen olay gerçekleşir. Yaşamın düzenli bir şekilde sürdürülebilmesi için canlıyı oluşturan hücrelerin sayısal dengesi de önemlidir. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında sabit bir oran bulunması gerekir (3). Yakın zamana kadar hücre ölümü denilince akla iki morfolojik ve moleküler tanım gelmekteydi. Apoptoz, genetik olarak programlı hücre ölümü olarak tanımlanmıştı. Bunun karşıtı olan ve “rastlantısal” olarak ortaya çıkan, “programsız” hücre ölümüne nekroz denilmekteydi. Alternatif programlı hücre ölüm mekanizmalarından biri olan otofajik hücre ölümüne ilgi, maya otofaji genlerinin memeli karşılıklarının bulunması ve çalışmaların morfolojik tanımlardan moleküler düzeye inmeye başlaması sayesinde artmış; sonuç olarak, otofaji, apoptoza ek veya alternatif olarak düşünülen temel ölüm yollarından birisi haline gelmiştir (9).

Yetişkin kardiyomiyositler hücre farklılaşmasının son halidir ve onlar tahrip olursa çok nadiren yenilenirler. Kardiyomiyositlerdeki kayıplar miyokardiyumun fonksiyon bozukluklarına katkı sağlar, kalp hastalıklarına sebep olur (52). İskemi reperfüzyon, hipoksi, serbest radikaller, aşırı kalsiyum dolması, mekanik faktörler (aşırı

gerilme) ve norepinefrin ile anjitenin II gibi humoral faktörler miyositlerdeki hücre ölümünü uyarır (41). Hücre ölümü nekroz veya apoptoz ile meydana gelebilir. Kalp bozukluklarında apoptoz, nekrozla eşlenik bir şekilde oluşabilir (59). Hücre ölümünün bu iki tipi aynı faktörler tarafından tetiklenir ve hasarı oluşturan etkenin şiddeti hücrenin nekrozla mı yoksa apoptozla mı öleceğini belirler (35). Güçlü olan bir hücre ölümü sinyali, geri dönüşümsüz mitokondrial hasar ve enerji döngüsü nedeniyle nekroza sebep olur. Fakat daha ılımlı bir hücre ölümü sinyali mitokondrinin subpopulasyonlarında bir hasar oluşturabilir ve ATP'nin varlığında apoptozom oluşarak apoptoz ile sonuçlanır (91). Öldürücü olmayan hasarlar diğer taraftan sayısız hayatta kalma mekanizmasını da tetikler (41). Aşırı iş yükü ve anjiyotensin II gibi bir çok hücre ölümü sinyalinde hipertrofi ve apoptoz oluşabilir (6,33,185). Geçici miyokardiyal basınç yüklenmesi protoonkogenlerin salınımını artırır bu da miyozitlerin dengeleyici hipertrofisiyle sonuçlanırken büyüme faktörlerinin devamlılığı apoptozu oluşturabilir. Ayrıca sarkoplazmik kalsiyum konsantrasyonlarındaki yükselmeler dilate kardiyomiyopatilerin bir özelliğidir. Bu da apoptotik süreçleri başlatan endo nükleazların aktivasyonuna yol açabilir. İntrasellüler kalsiyum yüklemesi ve protoonkogenlerin sabit ekspresyonlarına ek olarak sol ventrikül dilatasyon ve hipertrofisiyle miyozitlerin kısmi hipoksisi apoptozu devam ettirebilir. Apoptoz bulguları veya onun bir belirteci prognostik öneme sahip olabilir. Apoptozu uyaran sinyallerin veya bu sinyalleri hücre ölümüne taşıyan yolların baskılanması tedavide önemli olabilir. Miyokardiyumda apoptozu düzenleyen mekanizmaların daha iyi anlaşılması miyokardiyal hastalıklı kişilerin tanısı ve tedavisi için önemli olanaklar sağlayabilir (12).

2.3.1. Apoptotik hücre ölümü

Eski bir yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Bugün de bu terimin kullanımı uygundur ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü anlatır. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir (3). Apoptoz, hücreye zarar veren yabancı maddelere karşı bir yanıt olarak oluşabilir.

Örneğin alkol tüketimi sonucunda asetaldehid, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu artırmaktadır. Alkolün indüklediği bu oksidatif stres apoptoza neden olmaktadır. Miyositlerde *in-vitro* olarak yapılan çalışmalarda asetaldehidin kaspaz 3 aktivasyonunu ve DNA fragmentasyonunu artırdığı görülmüştür (28,100).

2.3.1.1. Apoptozun düzenlenmesi

Omurgalılarda apoptozu düzenleyen genler B-cell lenfoma-2 (bcl-2), p-53 ve c-myc ailesi olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (181). Bcl-xL ve bcl-2 beraberce mitokondri zar geçirgenliğini korurlar. Proapoptotik proteinleri (Bax ve Bad) inhibe ederek apoptozu engeller (5). Bir hücre yaşayacak mı? Yoksa apoptozla ölecek mi? Bu proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin hücre içindeki ve yüzeyindeki miktarının dengesi ile belirlenir (108). Oksijenin tükenmesi, ısı stresi, kimyasal ajanlar, radyasyon, infeksiyöz ajanlar, genetik bozukluklar, besinsel ayarsızlık, immünolojik reaksiyonlar ve diğer hücre stresi nedenleri aracılığı ile oluşan hücre yaralanması proapoptotik yolları başlatır (147). Apoptozun kötü idaresi hücre büyümesi ve ölümü arasındaki dengeyi etkileyebilir ve organ disfonksiyonu ile sonuçlanır (108). Apoptoz sağlıkta iyi ayarlanmış bir süreçtir. Çok fazla veya çok az olması hastalıklara katkı sağlar. İnfekte olmuş hücrelerin apoptozu vücut tarafından uygulanan bir savunmadır. Bazı virus ve bakteriler ise infekte olmuş hücrelerin apoptotik mekanizmalarını inhibe edebilecek yeteneğe sahiptirler ve böylece ortamlarını korurlar (70). Apoptozun inhibisyonu, kontrol edilemeyen bir hücre büyümesi ve kanserin birçok tiplerinin oluşumu ile ilişkilidir. İnsanlarda aşırı apoptoz ise inme ve alzheimer hastalığı ile ilişkilidir (47). Apoptozun aktivasyonu veya restorasyonu kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde bir anahtar strateji ortaya çıkarır (50).

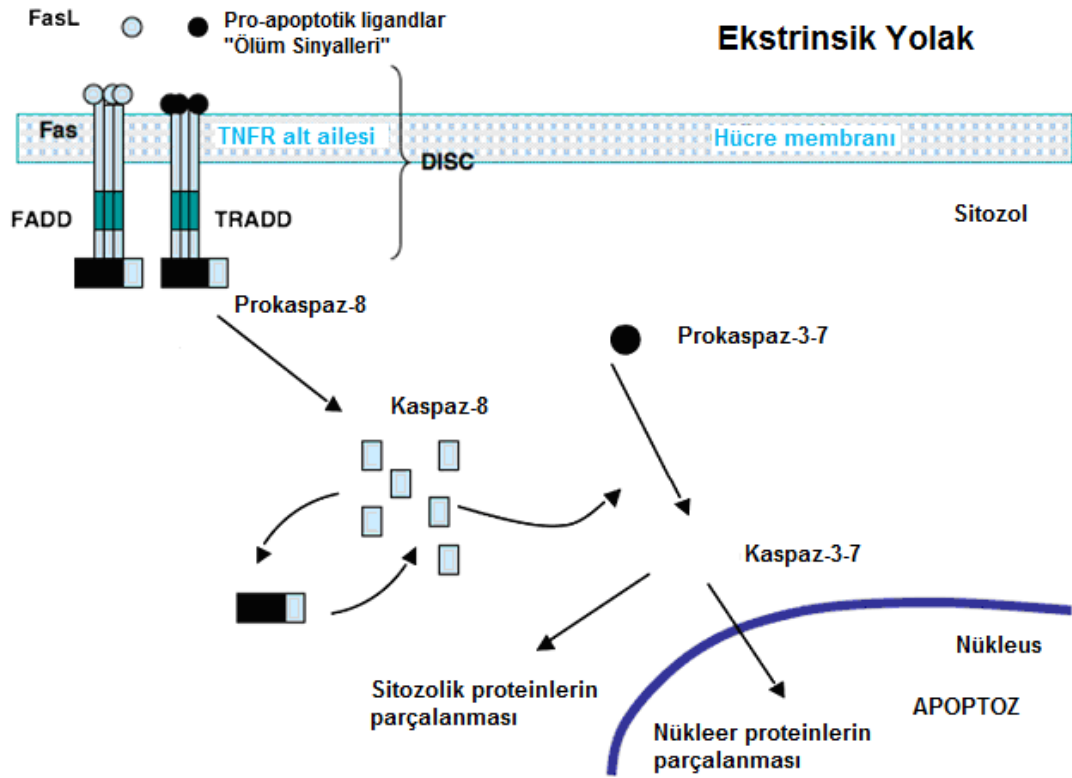
2.3.1.2. Apoptoz yolağı

Apoptoz genetik olarak kodlanabilir veya hücrenel ya da eksternal bir uyarıcıya yanıt olarak oluşabilir. Apoptozun karakteristik üç özelliği vardır; proteinlerin yarılmaları veya hidrolizi, nükleer DNA'nın yıkımı, fagositik hücreler tarafından apoptotik

hücrenin tanınması (147). Proteinlerin yarılması kaspaz adı verilen sistein proteaz ailesinin aktivasyonu ile oluşur (49). Kaspazlar inaktif formda sentezlenir ve spesifik başlatıcı mekanizmalar tarafından aktive edilirler (133). Programlanmış hücre ölümü, hücre organellerindeki hasar veya hücre zarı reseptör ligand bağlanması tarafından tetiklenen kaspaz bağımsız bir mekanizmanın sonucunda da olabilir (108). Programlı hücre ölümünde kaspaz kaskadının başlatılmasında 3 yol vardır. Kullanılacak yol, proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin dengesi ve hücre tipini içeren başlatıcı ölüm sinyaline bağlıdır (133).

2.3.1.2.1. Ekstrinsik yolak

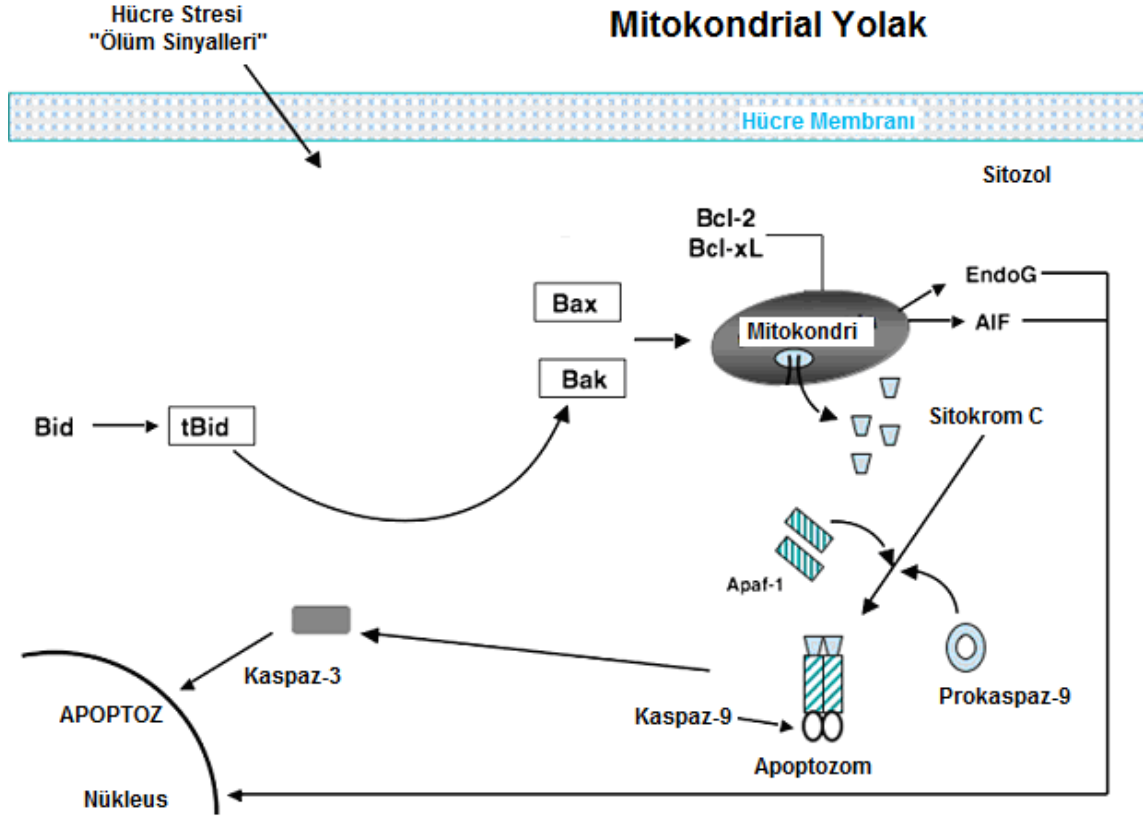
Hücre yüzeyi üzerindeki proapoptotik reseptörlere proapoptotik moleküllerin veya spesifik ligandların bağlanması ile ekstrinsik yol başlar. Bu reseptörler tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesi ve FAS reseptördür (50). Ölüm reseptörlerinin hücre içinde kalan kısmına ölüm domaini denir. En az 3 tane veya daha fazla reseptör ligand kompleksi demet halinde birbirine yaklaşır ve bir adaptör protein için bağlanma bölgesi oluşturur. Adaptör protein reseptöre özgüdür. Örneğin Fas ile ilgili ölüm domaini (FADD), TNF reseptör ile ilgili ölüm domaini (TRADD) gibi. Bu ligand reseptör adaptör protein kompleksi ölümü uyaran sinyal kompleksi (DISC: The death-inducing signaling complex) olarak adlandırılır ve kaspaz 8'in aktive olmasını sağlar. Aktif kaspaz 8'de kaspaz 3 ve 7'yi aktive ederek apoptotik süreci devam ettirmiş olur (Şekil 2.7) (108).



Şekil 2.7 Ekstrinsik yol ile gerçekleşen apoptoz (108)

2.3.1.2.2. İntrensik mitokondrial yolak

İntrensik mitokondrial yolak; DNA hasarı, ROT, radyasyon, hormon ve büyüme faktörleri yoksunluğu, kemoterapötik ajanlar, sitokinler ve glikokortikoidler gibi hücrel streslere yanıtta hücrenin içinde başlatılır (57). Apoptozu tetikleyen, kaspazları aktive edecek olan proapoptotik proteinlerin mitokondriden salınımı ile bu yolak başlar. Apoptozun indüklenmesinde bu yolağın başarısı Bcl-2 protein ailesi proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin dengesine bağlıdır (34,97). Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondri dışarı üzerinde bulunur. Porların oluşumu aracılığıyla veya iyon kanallarının hareketi ile zar geçirgenliğini kontrol ederler (113). Zar geçirgenliği bozulunca sitokrom c sitozole salınır. Sitokrom c, apaf -1 ve prokaspaz 9 ile apoptozomu oluşturur. Kaspaz 9 aktive olur ve kaspaz 9'da kaspaz 3'ü aktive eder. Kaspaz 3 nükleusa geçerek orada DNA fragmentasyonuna neden olur. Alternatif bir yolak olarak da mitokondriden salınan EndoG ve AIF'de kaspazlardan bağımsız olarak apoptozu uyarır (Şekil 2.8) (108).



Şekil 2.8 İntrensik yol ile apoptozun oluşumu (108). Endo G: Endonükleaz G, AIF:Apoptoz İndükleyici Faktör. Apaf-1:Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1.

2.3.1.2.3. İntrensik endoplazmik retikulum yolağı

Bu en az bilinen üçüncü yolaktır. Mitokondriden bağımsız olarak kaspaz 12'yi içerir (167). Hipoksi, glukoz yokluğu, kalsiyum dengesindeki bozukluklar, serbest radikaller gibi hücrel stresler, proteinlerin yapısının bozulmasına ve protein sentezinde azalmaya neden olur. Normal hücrelerde bir adaptör protein, TNF reseptör ile ilgili faktör 2 (TRAF2) ve prokaspaz 12 birbiri ile bağlı ve inaktif durumdadır. Endoplazmik retikulumun stresi TRAF2 nin ayrılmasına ve kaspaz 12'nin aktive olmasına neden olur. Aktive olan kaspaz 12 ise kaspaz 3'ü aktive eden kaspaz 9'u aktive eder (116).

2.3.1.3. Apoptozda mitokondrinin rolü

Apoptozu başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptoz yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder (11). Etanol gibi hücreye zarar veren kimyasal maddeler sitokrom c salınımına neden olabilmektedir (118). Ayrıca apoptoz indükleyici faktörde (AIF) mitokondriden sitozole geçerek apoptozu katkı sağlar (108).

2.3.1.4. Apoptotik hücre ölümü üzerinde etanolün etkisi

Etanole maruz kalan doku ve hücrelerde apoptozun arttığına yönelik birçok çalışma vardır. Örneğin 8 hafta etanol verilen sıçanların karaciğer dokusunda apoptozun arttığı görülmüştür (31). Kardiyomiyosit primer kültürlerinde etanol, doza bağımlı olarak yaşama kabiliyetini azaltır ve apoptozu artırır (28). *In-vivo* olarak sıçanlarda etanole prenatal maruz kalındığında miyokardiyal apoptozun arttığı görülmüştür (144). Yüksek doz alkolün kardiyomiyositler üzerindeki etkisini inceleyen Guan ve arkadaşları etanolün oluşturduğu intrasellüler ROT'nin mitokondrial zar potansiyelini azalttığını söylemektedirler ve etanol verilen grupların sitozolünde sitokrom c miktarını daha yüksek belirlemişlerdir (58). Astrosit hücre kültürlerinde asetaldehidin DNA fragmentasyonunu artırdığı tespit edilmiştir (69). Sinir hücrelerinde etanolün apoptozu artırdığı ve p-53 ün ekspresyonu up-regüle olduğu görülmüştür (114). Ayrıca akut verilen sitotoksik olmayan etanol konsantrasyonlarının p-53 protein düzeyini etkilemediği de görülmüştür (62). Sıçan kalp dokusunun kronik olarak hipoksiye maruz bırakılması sonucunda apoptozun arttığı fakat bcl-2 protein düzeyinin azaldığı görülmüş ancak başka bir araştırmada ise hipoksiye maruz kalan sıçan kardiyak miyositlerinde bcl-2 düzeyinin değişmediği görülmüştür (81,146). Etanole maruz kalan hücrelerde bcl-2 ve bcl-xl yıkılımının olduğu Nakayama ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (118). Primer kardiyomiyosit kültürlerinin etanole maruz bırakılması sonucunda bax proteinlerinin arttığı görülmüştür (28). Guo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada etanolle muamele edilen farelerin miyokardiyumunda Bax ve kaspaz 3 ekspresyonunun artması ve bcl-2 ekspresyonunun azalması apoptozun varlığını göstermektedir. Sitokrom c ve prokaspaz 9'un sitozolde artışı etanol indüklemeli apoptozda mitokondrial hücre ölümü

yolağının esansiyel rolünü göstermektedir. Kaspaz bağımsız apoptozda kritik bir rolü olan AIF'ün sitozoldeki miktarının artmayışı etanol indüklemeli hücre ölümünde etkisinin olmadığını göstermektedir. TNF- α , Fas reseptör, Fas L, kaspaz-8 ve pro-kaspaz-8'in ekspresyonunda artış olmaması etanolün oluşturduğu apoptotik yanıtta ölüm reseptörü yolağının bir minimal role sahip olduğunu göstermektedir (61).

2.3.2. Nekrotik hücre ölümü

Nekroz, hipoksi, kalp krizi, travma, alzheimer, huntington, parkinson ve amyotrofik lateral skleroz hastalıklarında tipik olarak oluşur (106,170). Hücre aşırı stres koşullarına maruz kaldığında, normal hücrel aktivite bozulması sonucu nekrotik hücre ölümü oluşur. Plazma zarı hasarı, endoplazmik retikulumda dilatasyon, mitokondrial şişme, sitoplazmanın geniş vakuolizasyonu nekrozun karakteristik morfolojisidir. Veziküllerin oluşumu olmaksızın hücre parçalanır. Hücrel içeriğin hücreler arası alana yayılması ve komşu hücrelere zarar vermesi bir inflamatuvar yanıtı uyandırır (95). Nekrotik hücre ölümünün moleküler mekanizması hakkında bilinenlere rağmen tamamen açıklanmış değildir. Deneysel kanıtlar nekrozun kalsiyum artışı ile oluştuğunu ve kaspazlardan bağımsız olduğunu göstermektedir. Onların yerine sitozolik kalpainler ve lizozomal katepsinler önemli rol oynar (169). Enerjinin bitmesi nekrozun bir potansiyel tetikleyicisidir. İskemi, hipoglisemi, oksijenin veya esansiyel besinlerin yokluğu zar potansiyelinin devam ettirilmesi için gerekli enerjinin kıtlığına neden olur. Böylece zar geçişinin bozulması ile kalsiyum konsantrasyonu artar (107). Kalsiyumun aşırı dolması oksidatif stres, mitokondrial disfonksiyon ve kalsiyum bağımlı proteazların aktivasyonu gibi ölümcül olayları tetiklemektedir. Proteazlar hücre ölümünün cellatları olarak düşünülebilir ve proteaz kaskadı intihara neden olarak hücre ölümünü oluşturur (169).

2.3.2.1. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar

Apoptotik hücreleri nekrotik hücrelerden ayıran birçok farklılıklar vardır. Morfolojik görünüm farklılıkları; hücrede büzülme, kromatin kondensasyonu, nükleozomal fragmentasyon ve plazma zarında baloncuklar. Apoptozun biyokimyasal

görünüşündeki farklılıkları; DNA fragmentasyonu, protein yarılması, mitokondrial zar geçirgenliğinde artış ve hücre zarı yüzeyinde fosfolipidlerin görünümü (129,189). Mitokondrial permeabilitedeki artış proapoptotik proteinlerin salınımına neden olur ve sonrasında apoptotik cisimcikler oluşur. Membran bağlı apoptotik cisimciklerin komşu hücreler veya makrofajlar tarafından tüketilmesiyle sonuçlanır. Apoptoz bir tek hücrenin ölüm olayıdır ve bir inflamatuvar yanıt uyarmaz. Apoptozun aksine nekroz, genetik olarak programlanmış bir fonksiyon değildir, nekroz komşu hücre gruplarında etkiler ve bir inflamatuvar yanıt oluşur (133). Nekroz ile hücrenin ölümü alarm sinyal moleküllerinin salınımına neden olur ve onlar naturel killer hücreler, dentritik hücreler ve makrofajlar üzerindeki reseptörleri uyarırlar. Bir dokudaki nekrotik hücrenin varlığı immün sistem tarafından bir tehlike olarak yorumlanır (171). Apoptozdan farklı olarak nekrozda organellerde şişme ve hücre zarı bütünlüğünün kaybı ile birlikte hücresel şişme vardır. DNA'nın yıkılımı nadirdir ve parçalanmış hücreler makrofajlar tarafından sindirilir (136).

2.3.3. Otofajik hücre ölümü

Otofajik hücre ölümünde en belirgin morfolojik değişiklik, sitoplazmada oluşan iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrili keseciklerin oluşmasıdır. Bu kesecikler sitoplazma parçaları ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) gibi organelleri içerirler. Sonunda otofaji kesecikleri lizozomla kaynaşır, içlerinde taşıdıkları yüklerin lizozomal enzimler tarafından parçalamasını sağlarlar. Bu hücre için hayati önem taşıyan bazı proteinlerin ve mitokondri gibi enerji metabolizmasında rol oynayan organellerin yıkımına yol açmaktadır (55,98). Otofajik hücre ölümünde, kromatin yoğunlaşması gibi çekirdeğe özgü değişiklikler apoptotik hücre ölümüne nazaran çok daha sonra olmaktadır. Ölüm kaspaz etkinliğine bağımlı olmadığından, ne DNA merdivenleri ne de apoptotik cisim oluşması gözlenmez. Ayrıca, otofajide ölü hücrelerin fagositoz tarafından temizlenmesi apoptozda görüldüğünden çok daha geç ve düzensiz bir biçimde olmaktadır. Otofajik hücre ölümü daha çok sitoplazmada gelişen bir hücre ölümüdür. Apoptozun en önemli hedefi ise DNA'nın bulunduğu hücre çekirdeğidir (9).

2.4. Apoptozda Rol Oynayan Proteazlar

2.4.1. Kaspazlar

Apoptozun cellatları kaspazlar geniş bir sistein proteaz ailesinin üyeleridir. 14 kaspaz belirlenmiştir. Prokaspazlar 3 yolla aktive olurlar. Birinci yol aktif olan diğer bir kaspaz aracılığı ile olur. İkinci yol oto kataliz ve üçüncü yol ise apaf-1, sitokrom c ve kaspaz 9'dan oluşan bir aktivatör protein aracılığı ile olur (67). Apoptozda rol oynayan kaspazlar başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2,8,9,10) ve efektör kaspazlar (kaspaz 3,6,7) olarak alt gruplara ayrılır. Başlatıcı kaspazlar kendini bölen adaptör aracılı aktive olurlar (178). Kaspaz kaskadı aktivasyonu başlatıcı kaspazların efektör kaspazları bölmesi ve aktive etmesidir. Effektör kaspazlar seçici ve sınırlı olarak hedef proteindeki aspartat kalıtlarından bölerler. Bu çoğu kez hedef proteinin inaktivasyonu ile sonuçlanır. Ancak kapalı bir negatif regülatör domainin yarılmasıyla direkt veya bir regülatör altbirimin inaktivasyonu ile indirekt olarak proteinler aktive olabilir. Kaspazlar, nükleer parçalanma ve hücre şeklinin kaybı için gerekli nükleer laminlerin parçalanmasından sorumludur (67).

Kaspazlar, nükleer DNA'yı parçalayan, kaspazla aktive olan DNAazı (CAD) aktive ederler. CAD nükleusda bir subünite bağlı inaktif (ICAD) halde bulunur. Effektör kaspaz 3 aktive olduğunda nükleusa göç eder ve inhibitör subüniteyi bölerek CAD'ı aktive eder. CAD nükleozomlar arasındaki DNA'yı kırarak DNA fragmentleri oluşturmaktadır (133). Fragmente olan DNA'lar apoptozun göstergesi olarak biyokimyasal ve moleküler teknikler ile incelenebilir (108).

2.4.2. Katepsinler

Lizozomlar hidrolitik enzimler içeren zarla çevrili organeller olup hücre içinde makromoleküllerin sindirilmesi için kullanılmaktadır. Yaklaşık 40 çeşit hidrolitik enzim içermektedirler (proteazlar, nükleazlar, lipazlar, glikozidazlar ve fosfolipazlar). Hepsi asit hidrolaz olarak bilinir çünkü optimum aktivite için asidik bir ortama ihtiyaç duyarlar. Lizozomal proteazlar endo ve ekzo peptidazlar olarak iki grupta incelenmektedirler. Endoproteazlar çoğunlukla sistein ve aspartik proteazlardır,

ekzoproteazlar ise sistein ve serin proteazlardır (180). Katepsinler, papain ailesi olarak adlandırılan C1 grubu sistein proteazlardır. Bu proteazlar kaspazlarla kıyaslandığında daha az kısıtlanmış bir substrat özgülüğüne sahiptir. Katepsinler inaktif proenzimler olarak sentezlenir ve post translasyonel olarak glikozillenir. Hücresel mannoz-6-fosfat reseptörleri kullanarak, lizozomal kompartmanlara doğru yönlendirilirler. Bazı hücreler önemli miktarda olgun ve prokatepsin salgılayabilir. Buna ek olarak katepsinler lizozomlardan sitoplazmaya salınabilirler ve normal durumlarda orada substratlarının bölünmesini katalize edebilir. ROS lizozomal geçirgenliğin bozulmasına neden olmaktadır (29). Lizozomların yapısının bozulması sonucu katepsinler sitoplazmaya sızmaktadır (82). Katepsinlerin lizozomlardan sitoplazmaya sızması, onların apoptoza katkıları için bir önkoşuldur (29). Sistein katepsinler pro-apoptotik protein olan Bid'i bölerek aktifleştirirler. Ayrıca katepsinler mitokondri dış zar potansiyelinin korunmasında rol oynayan anti-apoptotik protein Bcl-2'yi parçalar (145). Ge ve arkadaşları dilate kardiyomiyopati vakalarında katepsin B proteini ve mRNA salınımının arttığını tespit etmişlerdir. Katepsin B mRNA düzeyi ile apoptoz indeksi arasında pozitif korelasyon görmüşlerdir. Bu nedenle onlar dilate kardiyomiyopatinin patogeneğinde katepsin B'nin önemli olduğunu düşünmüşlerdir (48). Tsuchida ve arkadaşları sistein proteazların ve özellikle de katepsin B'nin miyokard infarktüsünde miyofibriler proteinlerin yıkımında rol aldığını göstermişlerdir (174). Etanolün lizozomlar üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle, katepsinlerin lizozomlardan sitoplazmaya sızmasına sebep olduğu Donohue ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (42).

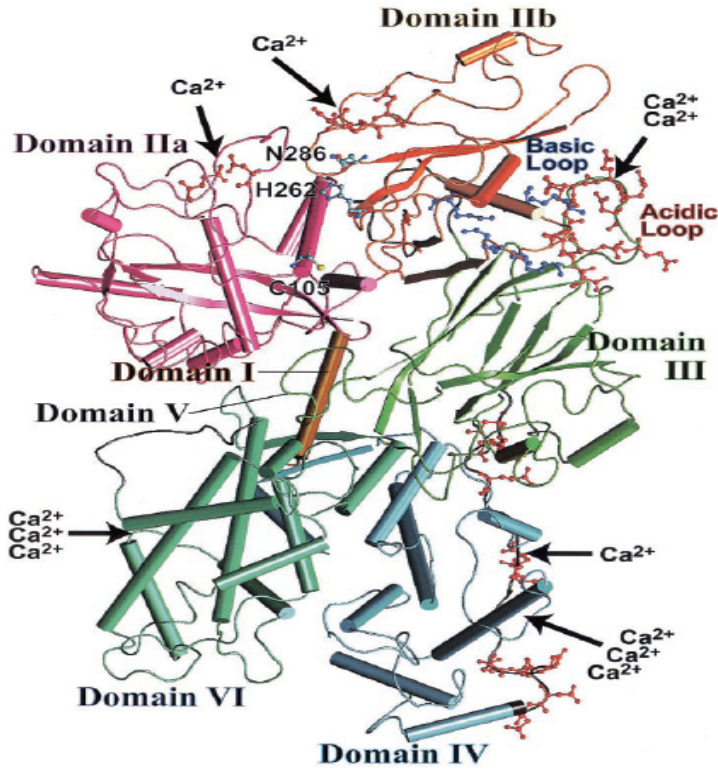
2.4.3. Kalpainler

Kalpainler kalsiyum bağımlı thiol-proteazlardır. Bu proteazlar sitoiskeletal membran bağlantılı, regülatör proteinlerin varyantlarıdır. Kalpainlerin birçok izoformları vardır. Kalpain ailesi üyeleri: mikro-kalpain (kalpain 1), mili-kalpain (kalpain 2), kalpain 10 ve doku-spesifik kalpainler ki şöyle, kalpain 3 (kas- spesifik c p94), kalpain 8 (mide nCl-2), kalpain 9 (sindirim kanalı nCl-4), lens Lp82, Lp85, retinal Rt88 ve korneal Cn94 gibi. μ -Kalpainlerin aktive olması için düşük mikromolar

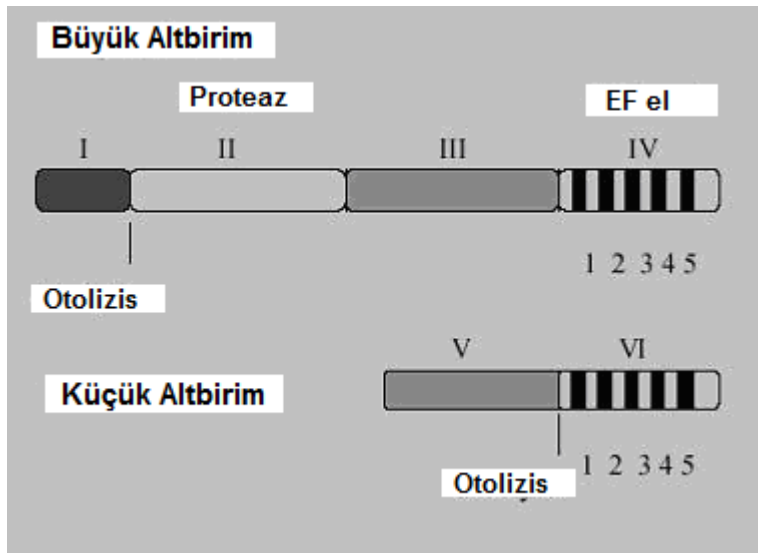
konsantrasyonlarda kalsiyum gereklidir, m-kalpainlerin aktive olması için yüksek milimolar konsantrasyonlarda kalsiyum gereklidir (85).

Kalpainler 80 kDa ve 30 kDa'luk subünitelerden oluşan heterodimerlerdir. 80 kDa'luk ünit katalitik yan birimi içerir ve her izozimde tektir. 30 kDa'luk ünit ise regülatör subünittir ve her iki izozim içinde de yer alır. 80 kDa'luk subünit dört domain (d1-d4), 30 kDa'luk subünit ise 2 domain (d5-d6) içerir (Şekil 2.9). Otoliz sırasında domain parsiyel olarak ortadan kaybolur. Domain proteaz alanıdır ve tipik kalmodulin bağlayıcı proteinlerle homologluk sergiler. Kalsiyum bağlayıcı domainlerle ilişkiye girer ve proteaz aktivitesi için gerekli olan domainleri serbestleştirir. En iyi karakterize edilmiş olan μ ve m kalpainlerdir (kalpain I ve II). μ kalpainler için 5-50 mikromol, m kalpainler için 200-1000 mikromol kalsiyum konsantrasyonlarında her iki kalpainde aktive olur ve parsiyel olarak otolize uğrarlar. *In-vivo* olarak her iki kalpaininde fizyolojik kalsiyum konsantrasyonlarında (100-300 mikromol) aktive olduğu görülür. Bununla birlikte fosfolipidler gibi diğer faktörlerde aktivasyon için ek bir rol oynayabilirler (87).

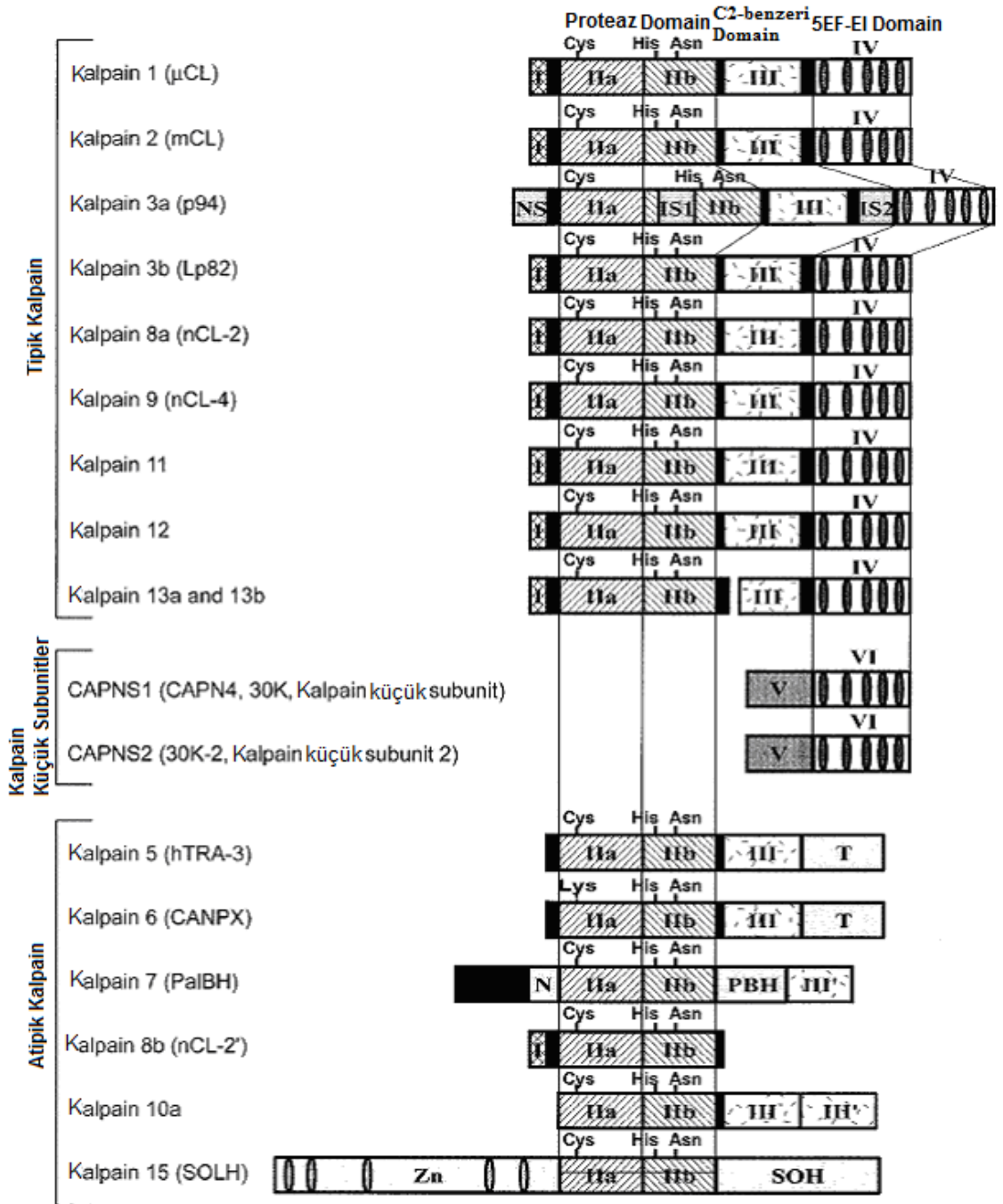
Domain 1, kalpain aktivasyonu sırasında sıklıkla yarılmayı yapan bir otolitik domainidir. Domain II de proteoliz için kritik önemi olan histidin, sistein ve asparajin kalıtlarının bulunduğu katalitik aktif bölge vardır. Domain III, fosfolipid ve kalsiyum bağlayan asidik lopa sahip bir C2 benzeri yapıdadır. C2-bölgesi yüz otuz aminoasit uzunluğunda kalsiyum bağlayıcı bir yapıdır. Domain IV, bir kalsiyum bağlayıcı penta EF-el motifi içerir ve bu kalsiyum bağlayan proteinlerin çoğuyla benzer özelliktedir (Şekil 2.10,11). EF-el yapısının bulunduğu bir proteine Ca^{+2} bağlanması, hidrofobik grupları yüzeye çıkararak büyük konformasyonel değişikliklere neden olur (Şekil 2.12) (8).



Şekil 2.9 Kalsiyum yokken insan kalpainin üç boyutlu yapısı (164)

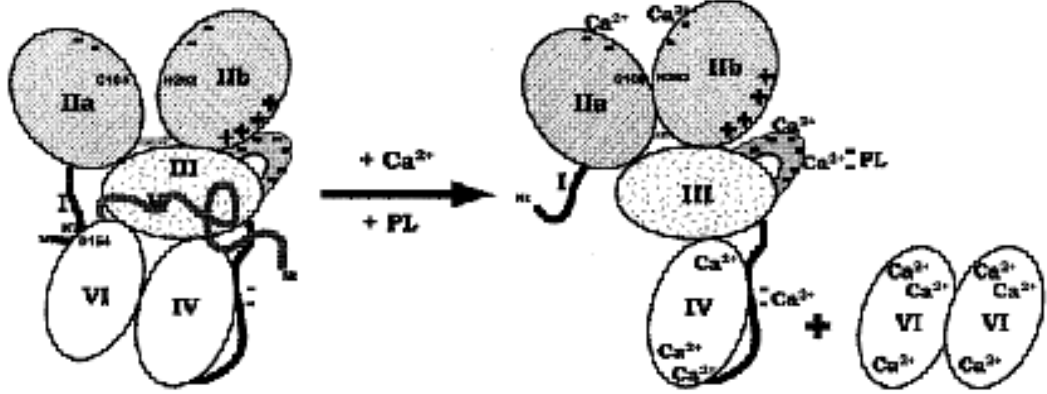


Şekil 2.10 Kalpainin şematik yapısı (87)



Şekil 2.11 İnsan kalpain ailesi üyelerinin domain yapıları.

Tipik kalpainler (80 K) 4 domain içerir, atipik kalpainlerde ise eksiktir veya yer değiştirmiştir. Kalpainlerin küçük subunitesi 2 domain (V ve VI) içerir (164).



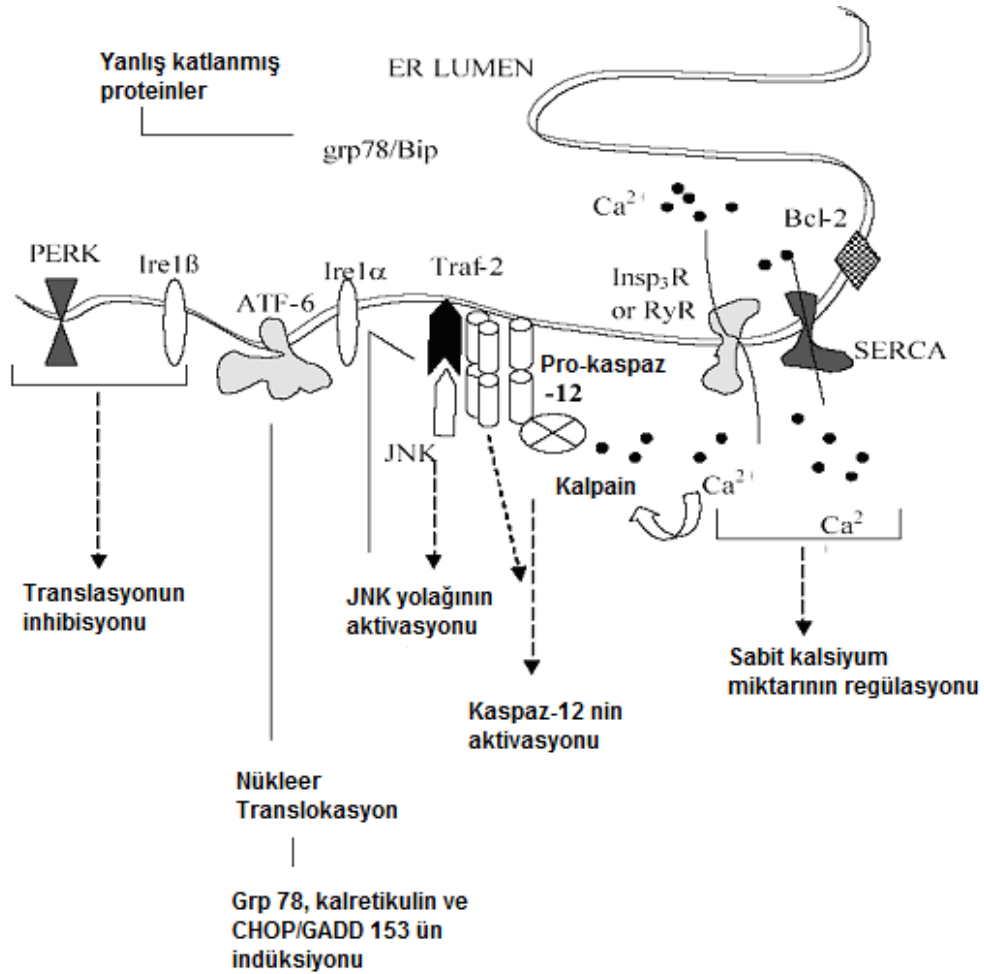
Şekil 2.12 Kalsiyum tarafından kalsiyumun aktivasyon mekanizması.

m-Kalpaine fosfolipidlerin bağlanması konformasyonel değişikliği indükler. Domain IIa ve IIb yakınlaşıp bağlanır, birlikte fonksiyonel katalitik bir bölge oluştururlar. Bu 30 kDa ve 80 kDa lık bölgelerin ayrışmasına neden olur. Böylece 30 K lık homodimer oluşumu ile sonuçlanır. K7 ve D154 kalsiyum iyonları yokken bir tuz köprüsü oluşturur (164).

Kalpainer hücre iskeleti ve sinyal iletiminde görev alan proteazlar olup, ayrıca hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, inflamasyon, iskemi, musküler distrofiler, kataraktogenez, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi diğer fizyolojik ve patofizyolojik proseslerde yer alırlar (94). Etanolün neden olduğu hücre ölümünde kalpainlerin aktive olduğu Rajgopal ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (139).

2.4.3.1. Endoplazmik retikulum ve kalsiyum

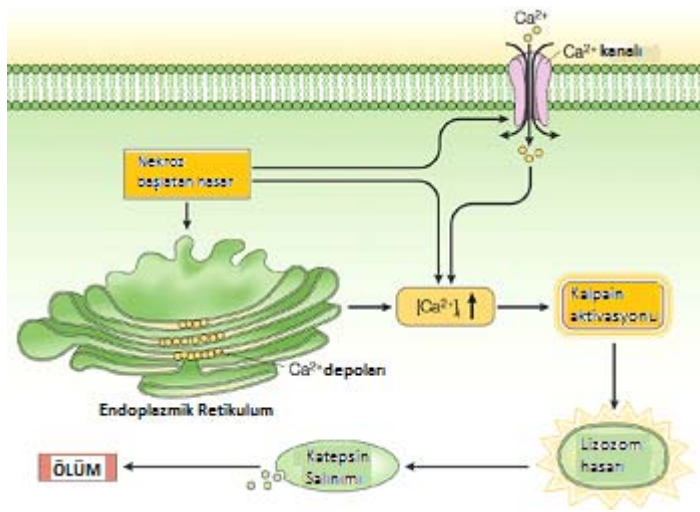
Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu, kalsiyum kanalları ve kalsiyum bağlayıcı proteinler ile ayarlanarak ER depolanır. Ca^{+2} depolanmasında endoplazmik retikulum depo görevi görür. Ca^{+2} , ER lümeninde serbest veya kalretikulin ve kalneksin gibi luminal proteinlere bağlı olarak bulunur. Ca^{+2} , sitozolden sarkoplazmik/endoplazmik Ca^{+2} -ATPaz (SERCA), ATP aracılı Ca^{+2} pompası konsantrasyon gradientine karşı ER lümenine Ca^{+2} taşır. İnozitol-1, 4, 5 trifosfat ($InsP_3$) reseptör/ Ca^{+2} kanalları veya ryanodine reseptör (RyR)/ Ca^{+2} kanalları kalsiyumun ER'dan salınımında önemlidir (Şekil 2.13). Sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış, kalpainlerin aktive olmasına neden olur. Ayrıca sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu artışı kalsinörin ve bad aktivasyonuna da neden olur (87).



Şekil 2.13 Endoplazmik retikulum, kalpain ve kalsiyumun apoptozdaki rolleri (87)

2.4.3.2. Kalpain-katepsin hipotezi

Nekrotik hücre ölümü durumunda aktive olmuş kalpainlerin lizozomal zarlara zarar verdiği belirlenmiştir. İskemik olaylardan sonra ilk görülen kalpainlerin, lizozomların zarına yerleşmesidir ve sonrasında da katepsinler sitoplazmaya sızar. Bu gözlemler kalpain-katepsin hipotezinin oluşumuna neden olur (Şekil 2.14). Kalsiyum aracılı kalpain aktivasyonu; lizozomların yırtılması, öldürücü katepsinlerin sızması ve hücrenin parçalanması ile sonuçlanır (166).



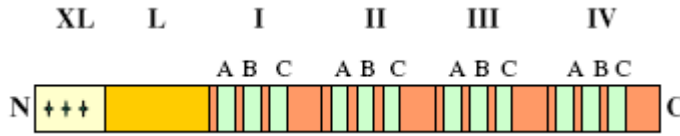
Şekil 2.14 Kalpain katepsin hipotezi (166).

2.4.3.3. Kalpain aktivasyonunun regülasyonu

Kalpain aktivitesi, otoproteolitik salınım, fosforilasyon, Ca^{+2} konsantrasyonu ve endojen inhibitör kalpastatin ile regüle edilir. Hücre içi kalsiyum seviyelerine kalpainlerin hassasiyeti zar fosfolipitleri sayesinde (87). Eksojen olarak da verilen kalpain inhibitörleri ile kalpain aktivasyonunun regüle edilmesine yönelik çalışmalarda vardır (35,182).

2.4.3.3.1. Kalpainler ve kalpastatin

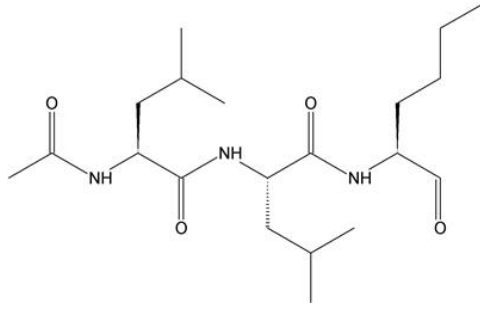
Kalpastatin (110 kDa), kalpainin endojen inhibitör proteindir. Kalpain haricinde diğer proteazları inhibe etmez. Kalpastatin, kalpain ile beraber sitozolde ve zarda bulunur. Kalpastatin dört adet inhibitör bölge içerir ve 1 molekül kalpastatin 4 molekül kalpaini inhibe eder (Şekil 2.15). Neonatal serebral hipoksi ve iskemide yapılan çalışmada kalpastatin'in hipoksiye karşılık olarak upregüle olduğu ve kalpaine karşı bir intihar substratı olduğu tespit edilmiştir (87).



Şekil 2.15 Kalpastatinin şematik diyagramı. XL domain de görülen +++ Protein kinaz A bağımlı fosforilasyon bölgeleridir (38).

2.4.3.3.2. Kalpain inhibitörleri

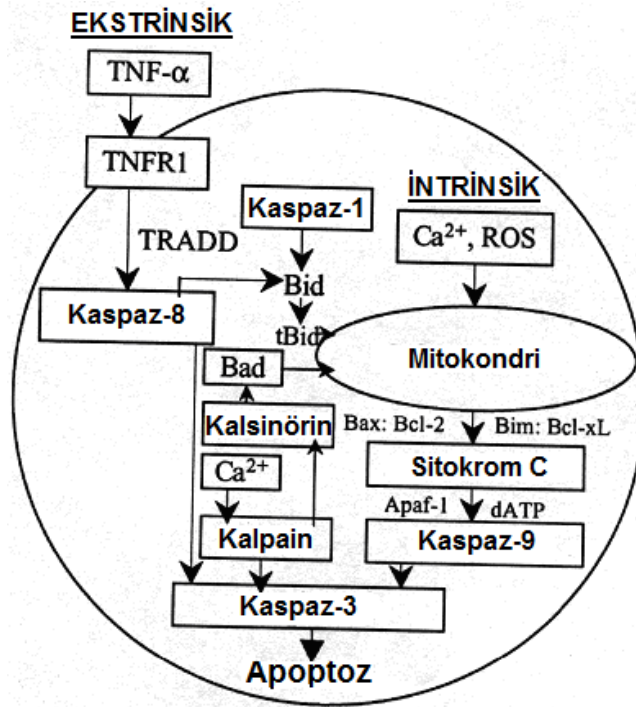
Bir düzineden fazla kalpain inhibitörü bilinmektedir. E64 (N-trans-epoksisüksinil-L-lösin 4-guanidinobutilamid), leupeptin (N-asetil-Leu-Leu-argininal), kalpain inhibitör I (N-asetil-Leu-Leu-norlösin), II (N-asetil-Leu-Leu-metiyoninal), AK295 (benziloksikarbonil-Leu-aminobutirik asit-CONH(CH₂)₃-morfolin), AK275 (benziloksikarbonil-Leu-aminobutirik asit-CONH-CH₂CH₃) gibi. En çok kullanılanlar peptid aldehytlerdir. Aldehyt son grubu sülfidril grubuna bağlanır. Bu bağlanma kalsiyuma bağımlı ve geri dönüşümlüdür. Kalpain inhibitör-1 hücre geçirgenliği olan bir inhibitördür. Ancak leupeptin hücre geçirgenliği çok az olan bir kalpain inhibitörüdür. Diğer bir inhibitör ise E64; bu da kovalent bağlarla sülfidril gruplarına geri dönüşümsüz olarak bağlanır (87). Aldehyd peptid olan Kalpain inhibitör-1, kalpainin aktif bölgesini bloke eder (Şekil 2.16) (27). Deneysel beyin hasarı, hipoksi ve santral sinir sistemi infeksiyonlarında kalpain artışını takiben kullanılan leupeptin, E64 ve A295 gibi kalpain inhibitörlerinin araşidonik asid metabolitlerinde azalma, plazmalojen ve Na-K ATP'az aktivitelerinde artma gibi biyokimyasal değişimlere neden olduğu ve santral nöroprotektif ve antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir (94).



Şekil 2.16 Kalpain İnhibitor I; N-[N-(N-Asetil-L-lösil)-L-lösil]-L-norlösilal.

2.4.3.4. Kalpain ve kaspazların apoptozdaki sinerjik rolleri

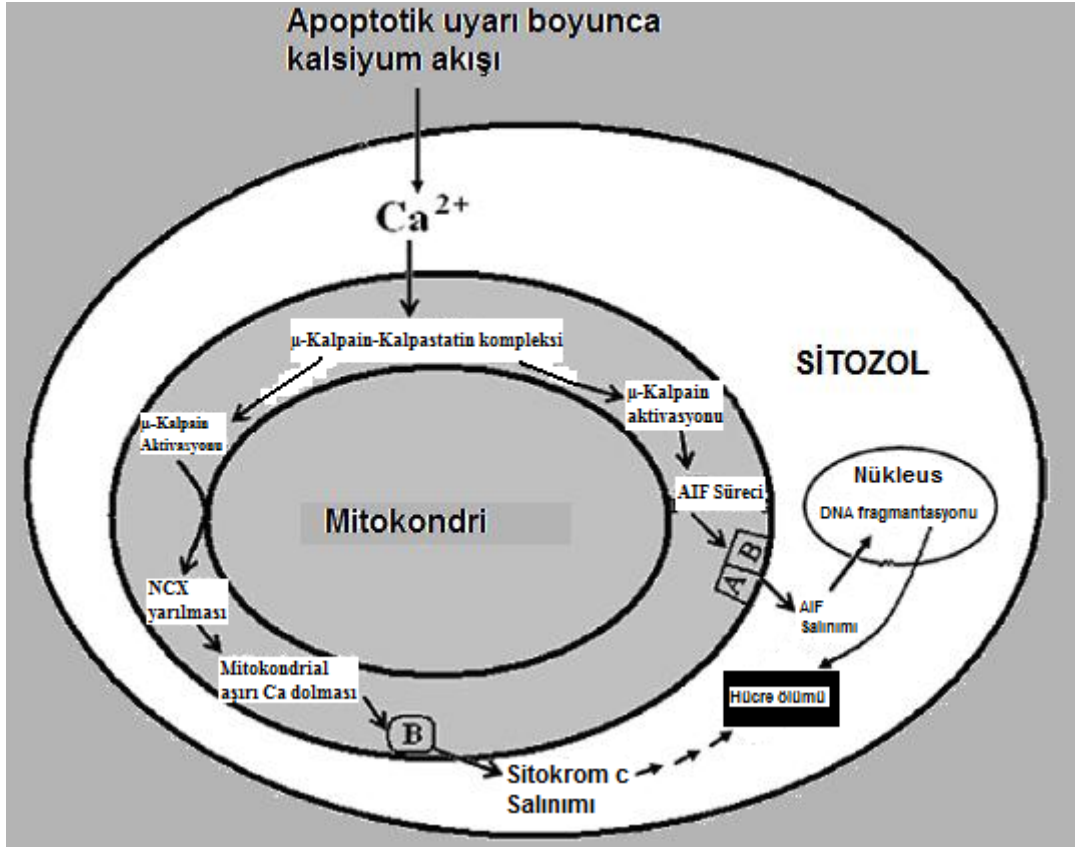
Kalpainler, kaspaz 9 ve prokaspaz 3'ün aktiflenmesini sağlayarak apoptoza katılır. Kaspaz 3'ün m-kalpain ile aktivasyonu doza bağımlı bir şekilde *in-vitro* olarak sitozolik fraksiyonlara inkübasyonu, kaspaz 3 proformlarının kalpainlerle beraber aynı ortamda tutulması ile ortaya konmuştur. Bu bir miktar aktif kaspaz 3'ün olmasını gerektirir ve kalpain inhibitörü kalpastatin ile engellenebilir. Blomgren ve arkadaşları kaspaz 3'ün, neonatal hipoksi-iskemi sonrası sinerjistik aktivasyonun m-kalpain vasıtasıyla olduğunu göstermiştir (Şekil 2.17) (91).



Şekil 2.17 Kalpain ve Kaspazların apoptozdaki rolleri (87).

2.4.3.5. Mitokondri içindeki kalpainler

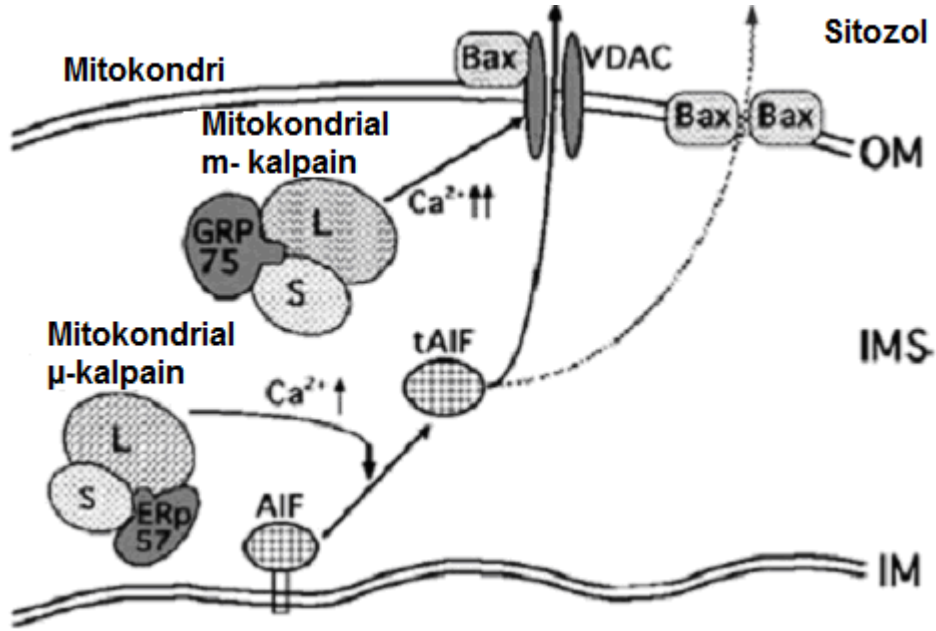
Kalpainler sitoplazmik enzimler olarak düşünülmesine rağmen son çalışmalar kalpainlerin mitokondride de var olduğunu göstermektedir. Mitokondriyal aspartat aminotransferaz ve AIF'ün kesilmesine karışirlar (124). Mitokondriyal μ -kalpainlerin biyokimyasal özellikleri sitozolik μ -kalpainlere benzer, 80 kDa'lık büyük katalitik alt ünitesi ile bir 28 kDa'lık düzenleyici küçük alt birimi vardır (84). Mitokondride kalpain 10'un varlığı ile ilgili çalışmalar artmaktadır. Kalpain 10 elektron taşıma zincirinin kompleks 1 alt ünitesini yarması ile kalsiyum indüklemeli mitokondrial disfonksiyona sebep olur. μ -Kalpain ve m-kalpainden farklı olarak mitokondrial kalpain 10, domain IV içermez (8). Tavşan, sıçan ve fare böbrek mitokondrilerinde moleküler kütlesi 75 kDa (kalpain 10a), 56 kDa (kalpain 10c veya 10d), ve 50 kDa (kalpain 10e) olan kalpain 10'u Giguere ve arkadaşları belirlemiştir (51). Fizyolojik ve patofizyolojik şartlar altında kalsiyum iyonu konsantrasyonu paylaşımına mitokondriden "sodyum kalsiyum değiştirici (NCX)" aracılı kalsiyum salınımının önemli bir katkısı olduğu gösterilmiştir (53). Mitokondrial kalsiyum konsantrasyonundaki artış mitokondrial kalpainleri aktive eder, akabinde apoptotik hücre ölümü tetiklenir. Mitokondrial kalsiyum konsantrasyonundaki bu artışta, μ -kalpainler tarafından NCX'in yarılması, mitokondrial majör kalsiyum fışkırması düz kas hücrelerinin ölümünde önemli rol oynayabilir (Şekil 2.18) (85).



Şekil 2.18 Mitokondrideki kalpain aracılı hücre ölümü modeli.

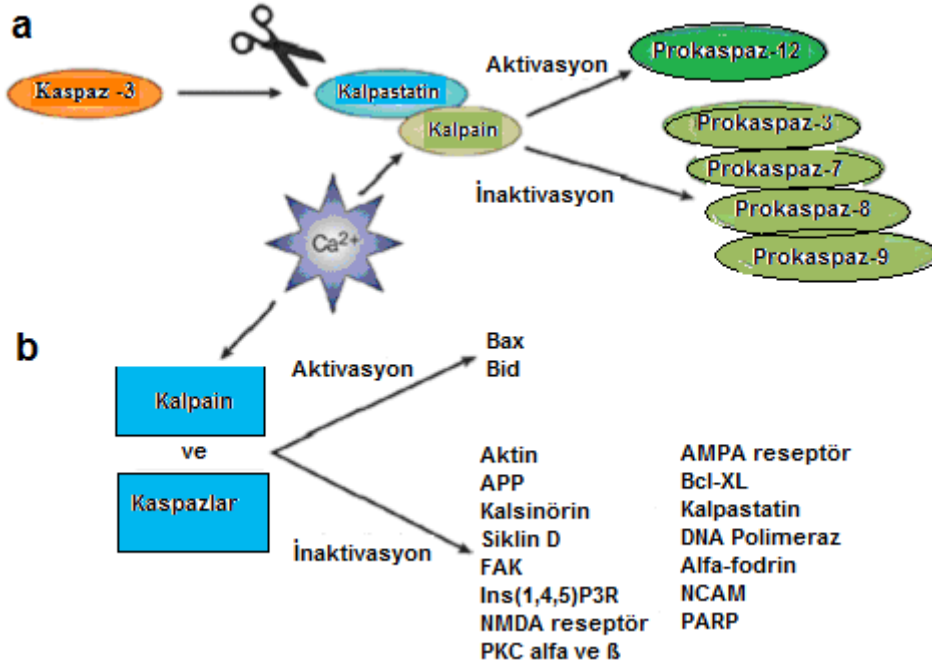
Bir apoptotik uyarı hücre içine kalsiyum akışına neden olur. Kalsiyum konsantrasyonundaki artış, AIF yapımına neden olan IMS/IM daki kalpain aktivasyonu ile sonuçlanır. Eş zamanlı olarak da mitokondrial NCX de yarıma, majör kalsiyum fıskırması olabilir ve mitokondrial kalsiyum aşırı dolması, sitokrom c salınımı olur. AIF ün yarıp 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 (85).

Mitokondrial μ-kalpainler olgun AIF'ü (62kDa) yarmaktadır ve tAIF (57kDa) mitokondri iç zarından zarlar arası bölgeye salınır. Bu mitokondrial μ-kalpainlerin AIF indüklemeli kaspaz bağımsız programlı hücre ölümü yolağında bir başlatıcı olduğunu göstermektedir (125). Ayrıca kalpainler mitokondrial geçiş porlarının oluşumunu artırarak AIF salınımında direkt rol alırlar. Voltaj bağımlı anyon kanallarının (VDAC) proteolitik süreci aracılığıyla sitozole tAIF'nin salınımında mitokondrial m-kalpainler önemli bir rol oynar. AIF, VDAC'ın yarıması ve Bax'ın mitokondrial birikimi aracılığı ile sitozole salınır (Şekil 2.19) (126).



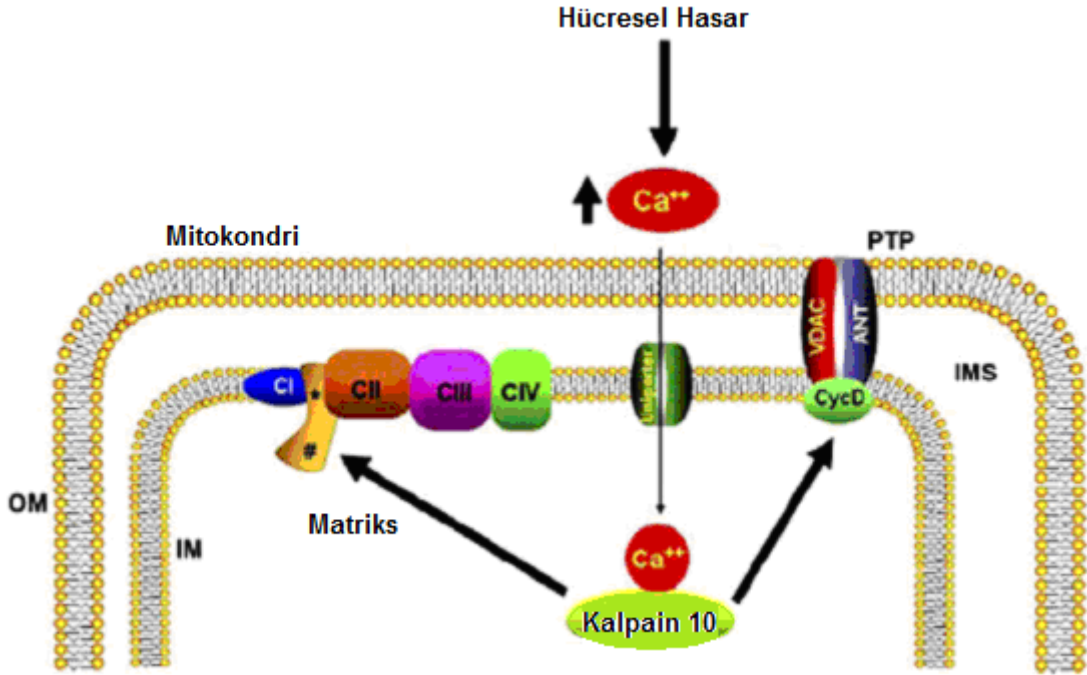
Şekil 2.19 AIF'ün oluşumu ve mitokondriden salınımı modeli. Bir apoptotik uyarıcı sitozol içine kalsiyum akışına neden olur. Kalsiyum konsantrasyonundaki artış mitokondri içine kalsiyum akışına neden olur. Bu da IMS içinde mitokondrial μ -kalpain aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktive olan mitokondrial μ -kalpain AIF'ü keser ve IM'den IMS'ye salınır. Mitokondrial kalsiyum düzeyinde meydana gelen daha fazla artışlar OM'deki Bax ile ilgili VDAC'ın yarılmasına neden olan mitokondrial m-kalpaini aktive eder. tAIF bu durumda VDAC/Bax-aracılı porlar veya Bax/Bax-aracılı porlar aracılığıyla sitozole salınır (85).

Kalpainler, kaspaz bağımlı programlı hücre ölümü yolağında proteazların kaspaz ailesi üyeleri ile direkt ve indirekt etkileşimler yaparak önemli rol oynayabilirler. Kalpainler Apaf 1'i yarmaktadır. Apaf-1'de meydana gelen kayıp, kaspaz 3 benzeri proteazların aktivitesindeki azalma ile koreledir. Kaspaz 9 üzerindeki kalpainlerin etkisi, aynı zamanda kaspaz 3'ü aktive etme yeteneğindeki kayıp ile sonuçlanır. Aksine kalpain prokaspaz 7'yi kaspaz 7 haline dönüşmesi için keser. Bu diğer kaspaz aktivitelerinden bağımsızdır (16). Kaspaz sistemi ve kalpainler arasındaki atışma aynı zamanda kalpastatin aracılığı ile de oluşur. Kaspazlar, kalpastatinin keserek onun inhibitör aktivitesini azaltırlar. Bu da kalpain ile kalpastatin sistemi arasındaki etkileşim sistemini düzenler. Her ne kadar kalpastatinin aşırı ekspresyonu başlangıçta kaspaz 3 aktivitesini artırsada (kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün kalpain aracılı yıkılımının engellenmesi) kalpastatin daha sonra kaspaz 3 tarafından yıkılır. Bu kalpain aktivitesinde ikincil artırıcı bir etki yaratır (Şekil 2.20) (16,85).



Şekil 2.20 Kalpain, kalpastatin ve kaspazlar arasındaki ilişki (123).

MPT (membran permabilite transisyonu) bir mitokondrial disfonksiyon formudur ve aşırı kalsiyum dolması, adenin nükleotid konsantrasyonunda azalma, mitokondri zar potansiyelinde azalma, oksidatif stresdeki artış ile oluşur, porların açılması ve mitokondrial şişme ile karakterizedir (Şekil 2.21). Kalpain 10'un aşırı salınımı mitokondrial bozulmayı ve şişmeyi uyarmaktadır, bu MPT ile uyumludur ve MPT inhibitörleri tarafından mitokondrial morfolojideki bu değişiklikler durdurulabilir (96). Kalpain inhibitörü kalpeptin tarafından MPT'nin % 30 inhibe edildiği görülmüştür (8).



Şekil 2.21 Kalsiyum ile indüklenen mitokondrial disfonksiyondan sonra kalpain 10 etkisinin ileri sürülen mekanizması (85).

Hasardan sonra oluşan sitozolik kalsiyum artışı nedeniyle, kalsiyum kanal *uniporter* aracılıyla mitokondriye kalsiyum geçer. Matriksdeki kalsiyum artışı, solunum defekti ile sonlanmasına neden olan kompleks 1'in 2 önemli alt ünitesinin (ND6* ve NDUFV2#) yarılmasını indükleyen mitokondrial kalpain 10'u aktive eder. Mitokondrial kalsiyumdaki artış aynı zamanda muhtemelen zar por proteinlerinin proteolizi boyunca MPT'nin indüklenmesinde de payı vardır (85).

2.4.3.5.1. Mitokondrial kalpainlerin regülasyonu

Akciğer düz kas mitokondrileri XL domainine sahip 145 kDa ağırlığında kalpastatin, ve L domainine sahip 110 ve 120 kDa ağırlığındaki kalpastatin içerdiğini son çalışmalarla gösterilmiştir (84). Fizyolojik kalsiyum konsantrasyonlarında μ -kalpain kalpastatin tarafından sıkıca düzenlenmektedir. Ozaki ve arkadaşları μ -kalpainlerin ERp57 tarafından regüle edildiğini göstermiştir (125). ERp57 protein disülfid isomeras ailesi üyesidir. ERp57 sitozolde, endoplazmik retikulumda ve çekirdekte bulunur. Yanlış katlanmış glikoproteinlerin disülfid bağlarının yeniden düzenlenmesinde ve katlanmanın doğrulanmasında görev yapar. m-Kalpain, ERp75 ile ilişkilidir. ERp75, ısı

şok protein 70 ailesinden olan önemli bir moleküler şaperondur. Mitokondrial m-kalpainin büyük alt biriminin yeniden katlanmasında ERp75 önemli rol oynar. Bu yeniden katlanma, muhtemelen fonksiyonel konformasyon formunda disülfid bağlarının oluşumunu içerir (85).

2.5. Miyokard Hasarının Biyokimyasal Belirteçleri

Akut göğüs ağrısından dolayı insanlar hastanelerin acil bölümlerine başvurmaktadır. Miyokard infarktüsünün teşhisi semptomlar, elektrokardiyogram (EKG) bulguları ve kardiyak testlerinden destek alır (128). Ama EKG sıklıkla diagnostik değildir (111) ve semptomlar atipik veya güvenilir olamaz (137). Miyokardiyal hücreler nekroza uğradıklarında zar bütünlüğü kaybolur ve hücre içi makromoleküler yapı, lenfatikler ile dolaşıma geçerler. Bunlara “serum kardiyak belirteçler” denir. Optimal bir özgünlük için; biyokimyasal belirteçlerin miyokarda yüksek oranda bulunması, buna karşılık başka dokuda ve serumda hiç bulunmaması gerekir. Optimal duyarlılık için ise miyokard hasarını takiben süratle seruma çıkması ve serumdaki miktarı ile hasarın derecesi arasında uyum olması gereklidir. Ayrıca ölçüm metodunun kolay ve ucuz olması ve tanıya olanak sağlayacak kadar yeterli sürede serumda yüksek düzeyde kalması gerekmektedir (150). Bu sebeplerden dolayı araştırmamızda geleneksel kardiyak testleri, özellikle de kreatin kinazın izoenzimi CK-MB (kreatin kinaz-MB) aktivitesi ve beyin natriüretik peptid (BNP) onikinci saatte ölçülebilecek en uygun testler olarak kullanıldı.

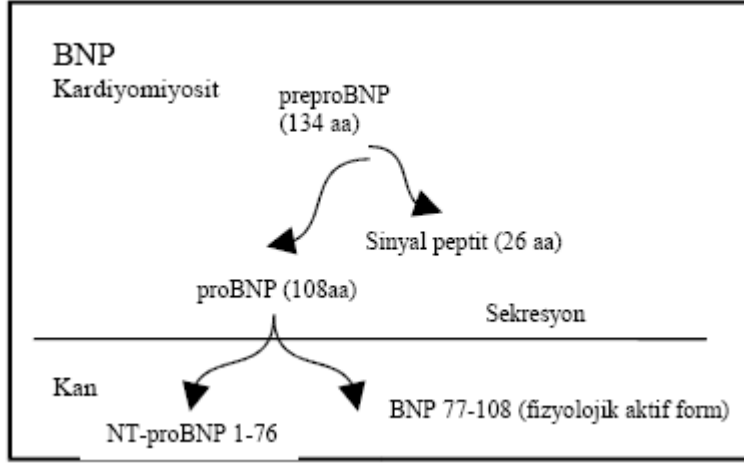
2.5.1. Kreatin kinaz-MB

Kreatin kinaz kas metabolizmasının temel bir enzimi olup ATP aracılı kreatinin fosforilasyonu geri dönüşümlü olarak katalize eder. CK alt birimleri; B (beyin) ve M (kas)'dır. İzoenzimleri BB (CK1), MB (CK2), MM (CK3)'dür. BB en fazla beyinde olmak üzere prostat, barsaklar, akciğer, mesane, uterus ve tiroide; MB %25-46 oranında kalp kasında ve %5'den az oranda iskelet kasında; MM en fazla iskelet ve kalp kasında bulunmaktadır. Normalde total CK aktivitesinin %94-98'ni MM fraksiyonu, %2-6'sını da MB fraksiyonu teşkil eder (66). Miyokard infarktüsü sonrasında serumda

total CK aktivitesi 4-6 saat içinde yükselmeye başlar. CK-MB göğüs ağrısı başladıktan yaklaşık 10-20 saat sonra maksimum düzeye ulaşır. CK-MB'nin yarı ömrü CK-3'ten daha kısa olduğundan total CK'dan daha hızlı azalır. CK-MB enziminin MB-1 ve MB-2 formu vardır. Miyokard infarktüsünde MB- 2 formu salınır (63).

2.5.2. Atrial ve beyin natriüretik peptidler (ANP ve BNP)

Atrial ve beyin natriüretik peptidler öncelikle kalpte üretilir. Her ikisinde öncül bir peptidin son ürünlerini temsil eder. Örneğin pro-ANP nin yarılmasıyla olgun ANP meydana gelir. Normalde BNP'nin temel salınım bölgesi kardiyak ventriküllerdir ve ANP'nin ise atriumdur (149). Miyosit içinde sentez edilen prepro BNP 134 aminoasitten oluşur. Pro BNP oluşturmak üzere 26 aminoasitlik bir sinyal peptidi ayrılır. Sonrasında 76 aminoasitlik kısım ayrılarak 32 aminoasitten oluşan BNP oluşur (Şekil 2.22) (25). Kalp dokusundan BNP'nin salınımı 6-12 saatte doruk noktasına ulaşır (119,163). ANP ve BNP'nin salınımının uyarılmasında hem ventriküler yapının hem de nörohormonal faktörlerin önemli olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Natriüretik peptidlerin biyosentezinin ve salınımının düzenlenmesinde; elektrolit dengesi, kan basıncı ve vazomotor halin kontrol edilmesini içeren kompleks bir mekanizma vardır. Miyokardiyal gerilme ANP ve BNP'nin salınımına neden olur. Endotelin 1, anjiotensin 2, katekolaminler, tiroid hormonları ve prostaglandinler natriüretik peptidlerin gen ekspresyonunu ve salınımını uyarır (149,183). Kardiyovasküler fonksiyonun kontrolünde hormonal sistemin en önemlilerinden biri olan natriüretik peptid sistem rol oynar. ANP ve BNP'nin fizyolojik etkileri arasında vazodilatasyon, natriürez, renin-anjiotensin-aldosteronun ve sempatik sinir sistemi inhibisyonu vardır. ANP ve BNP aynı zamanda nörotransmisyon, endokrin fonksiyonlar ve hücre çoğalması ile hipertrofinin regülasyonunda da etkindirler (46,149). Tüm memeli türlerinde natriüretik peptid genlerinin uyarılması kardiyak hipertrofinin bir göstergesidir ve klinik şiddetin belirteçidir (46,76). Natriüretik peptidler kimyasal maddelerin kalp üzerindeki etkilerini belirlemede kullanılabilir. Örneğin sıçanlarda sekiz haftalık etanol maruziyetinden sonra plazma BNP düzeyinde artış görülmüştür (175).



Şekil 2.22 BNP'nin sentez ve sekresyonu (21)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Cerrahi İşlem ve Operasyon Protokolü

Çalışmamızda 250–300 gr erkek Spraque-Dawley türü sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanlarındaki çalışmalar için ön denemeler gerçekleştirildi, etanol verilen sıçanlarda kalp üzerine etkiler gözlemlendikten sonra çalışmalara geçildi. Çalışmamızda kullanılan doku kalbin sol ventrikülüdür. Sol ventrikül izole edildiğinde çok küçük olduğu için (150-200 mg) ikişer grup oluşturularak 80 sıçan kullanıldı. Dolayısıyla 40 adet sıçan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda biyokimyasal analizler için kullanıldı. 40 adet sıçan ise Histoloji Anabilim Dalı'nda histolojik incelemeler için kullanıldı. Bu çalışmada yapılan bütün işlemler için Osmangazi Üniversitesi Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezinden izin alınarak etik kurul raporu düzenlendi (Kayıt no: 113/2009). Bu araştırma için gerekli kaynak, Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenen 201011003 nolu projeden sağlanmıştır.

3.1.1. Deney grupları

Kontrol grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanlara etanolla aynı kalorige maltoz solüsyonu verildi.

Etanol grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanlara 8g/kg etanol verildi.

Etanol + inhibitör grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanlara 8g/kg etanol ve 20 mg/kg kalpain inhibitörü verildi.

Çözücü grubu (n=10): Kalpain inhibitörünün çözüldüğü miktarda DMSO ve maltoz solüsyonu verildi.

3.1.2. Etanol infüzyonu

Etanol akut etki oluşturacak şekilde sıçanlara gavajla 8g/kg vücut ağırlığı olarak verildi. 12 saat sonra sıçanlardan serum ve doku örnekleri alındı. Etanolla eşit kaloriye denk gelmesi amacıyla kontrol ve çözücü grubuna da maltoz solüsyonu verildi (26,83,155).

3.1.3. İnhibitör

Kalpain inhibitörü olarak kalpain inhibitör 1 (N-asetil-lösin-lösin-norlösin) 20 mg/kg olarak etanol verilmesinden 15 dakika önce intraperitoneal yolla verildi. İnhibitör DMSO'da çözüldü. Çözücü grubuna da inhibitörün çözüldüğü miktarda DMSO intraperitoneal yolla verildi (35,182).

3.1.4. Anestezi

Etanol verilmesinden 12 saat sonra tüm sıçanlara anestezi madde olarak ketamin–ksilazin karışımı uygulandı (80,99).

3.1.5. Numunelerin saklanması

Biyokimyasal çalışmalar için dokular sıvı azot ile muamele edilip çalışma anına kadar -80 C° saklandı. Histolojik çalışmalar için dokular nötral formalinde 24–48 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyondan sonra dokuların rutin histolojik takipleri yapıldı.

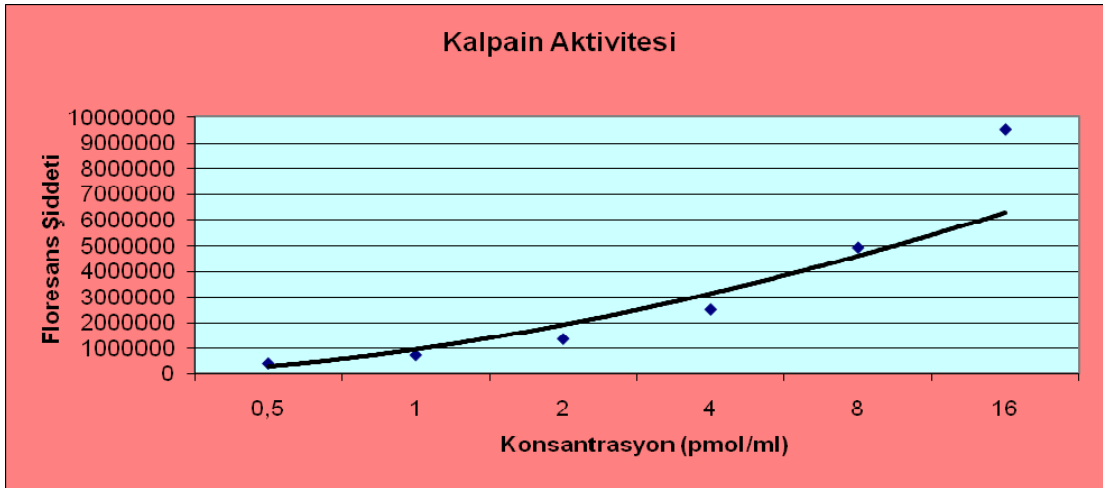
3.2. Biyokimyasal Ölçümler

3.2.1. Kalpain aktivasyonu ölçümü

Kalsiyum içeren ve içermeyen iki farklı tampondaki ölçüm sonuçlarının farkı kalpain aktivitesi sonucu olarak kullanıldı. 63.2 mM imadazole-HCl içeren 10 mM of 2-mercaptoethanol (pH 7.3) “ölçüm tamponu” olarak kullanıldı. Ölçüm tamponuna 20 mM Etilenbis(oksonitrilo)]tetra-asetat (EGTA) ve 25 mM Etilendiamintetraasetik asid (EDTA) ekleyerek pH'ı 7.3 olan “kalsiyumsuz tampon” olarak isimlendirildi. Ölçüm tamponuna 1.25 mM CaCl₂ (pH 7.3) eklenerek “kalsiyumlu tampon” elde edildi. Dokular “5 ml/g doku” oranında kalsiyumsuz tampona koyularak homojenize edildi. Daha sonra (14000 g, 4°C, 30 dakika) santrifüj edildi.

500 µl supernatant içeren 4 tüpün ilk ikisine 1.5 ml kalsiyumsuz tampon eklendi. Diğer ikisine 1.5 ml kalsiyumlu tampon eklendi. 37 C⁰ de 10 dakikalık preinkübasyondan sonra 10 µl substrat N-süksinil-Leu-Tyr-7-amino-4-metil kumarin (10 mM DMSO içinde) eklendi.

30 dakikalık inkübasyondan sonra bütün tüpler fluometrede 380 eksitasyon and 460 nm emisyonunda okundu. Kalpain aktivitesi kalsiyum bağımlı flurosans ve kalsiyum bağımlı olmayan flurosansın farkı olarak tespit edildi. A 7-amino-4-metil kumarin (AMC) ile kalibrasyon eğrisi çizildi (Grafik 3.1). Kalpain aktivitesi doku proteini ve dakikaya göre AMC salınımı olarak ifade edildi (110).

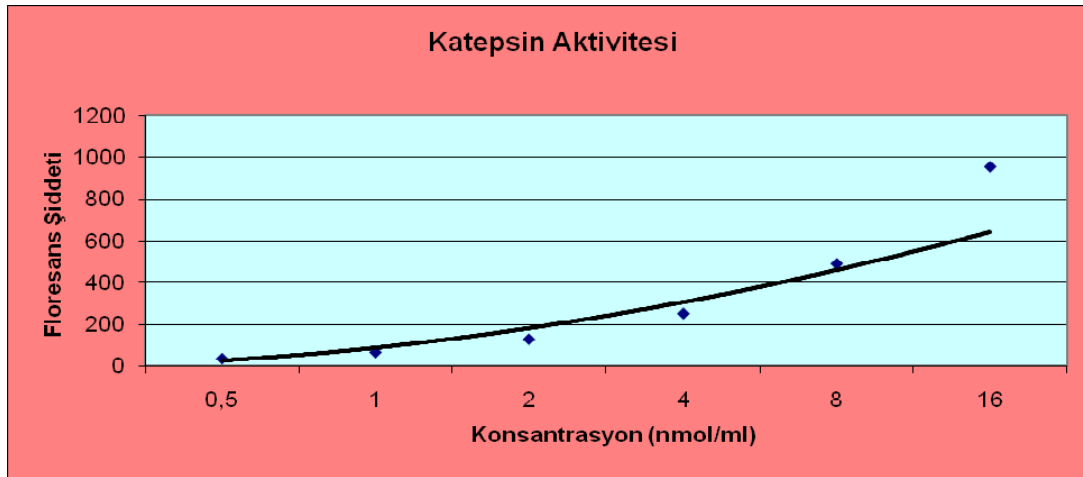


Grafik 3.1 Kalpain aktivitesi kalibrasyon eğrisi

3.2.2. Katepsin B ve L aktivite ölçümleri

Lizozomlardan sitoplazmaya sızan ve sağlam lizozomlarda kalan katepsinlerin tespit edilmesi hücre hasarı hakkında ip ucu verebilmektedir. Süpernatandan sitozolik fraksiyonun elde edilmesi için kalp dokusu homojenatı sükröz Tris-HCl tamponunda (0.32 M sükröz, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4) homojenizatör kullanılarak hazırlandı. Daha sonra homojenatlar +4 °C'de 5 dakika boyunca 1000 g'de santrifüj edildi. Pelletler ayrıldıktan sonra süpernatantlar +4 °C'de 20 dakika boyunca 10 000 g'de santrifüj edildi. Süpernatantlar sitozolik fraksiyon olarak kullanıldı. Pellet ise 1 ml Triton X 100 içeren tampon ile resüspanse edilerek lizozomal fraksiyon olarak kullanıldı (74). Sitozolik ve lizozomal fraksiyonlarda ayrı ayrı ölçülen katepsin aktivitelerinin birbirine oranı lizozomal hasarın miktarını göstermektedir.

Katepsin B ve L enzim aktivitesi Kirschke ve arkadaşlarının modifiye ettikleri yöntemle çalışıldı. Enzim aktivitesi metilkumarilamid substratı kullanılarak ölçüldü. 0.75 ml madde B (8.0 mM L-sistein), 0.90 ml madde C (% 0.1 (v/v) Brij 35 çözeltisi), 0.10 ml homojenat karıştırıldı. Üzerine 0.75 ml madde D (Katepsin L aktivitesi substratı olarak Z-Phe-Arg-7-Amido-4-Metilkumarin kullanarak, katepsin B aktivitesi Z-arg-arg-7-amido-4-metilkumarin kullanılarak) konulduktan sonra oluşan floresans 348 nm eksitasyon ve 440 nm emisyonunda spektrofotometrede ölçüldü (13). AMC'nin seri dilüsyonu ile kalibrasyon eğrisi çizildi ve sonuçlar nmol/ml olarak hesaplandı (Grafik 3.2). Sitozolik fraksiyonunun sonuçları lizozomal fraksiyona oranlandı.



Grafik 3.2 Katepsin aktivitesi kalibrasyon eğrisi

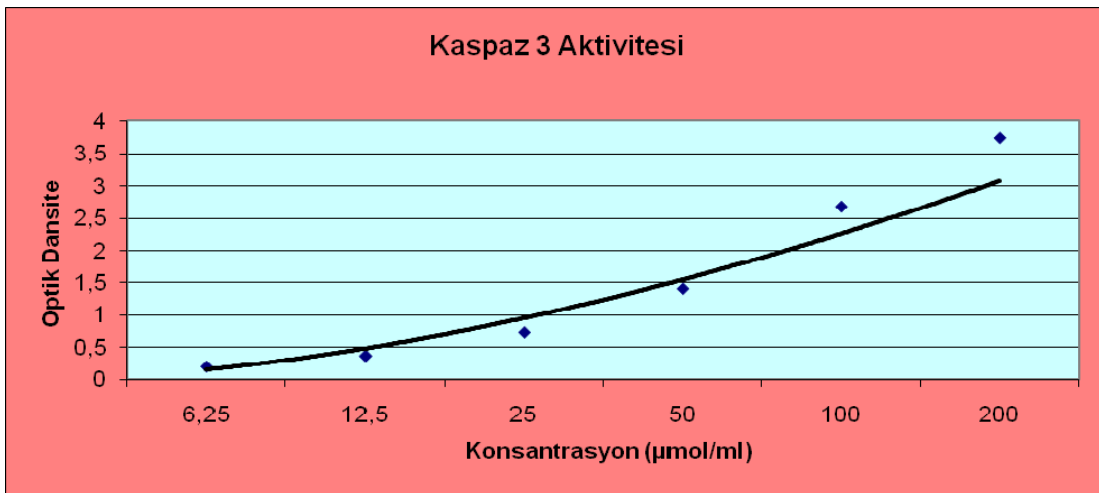
3.2.3. Kaspaz 3 aktivasyonu ölçümü

Kaspaz-3 aktivitesini ölçmek için ticari kit (Sigma CASP-3-C) kullanıldı. Bu kit, asetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilidin, p-nitroanilin (pNA) oluşacak şekilde kaspaz-3 tarafından hidrolizi ile oluşan pNA'nin absorbansının 405 nm'de ölçümü prensibine dayanmaktadır. Kalp doku örnekleri lizis tamponunda (250 mM HEPES, pH 7.4, %1 CHAPS, 50 mM DTT, 10 mM EDTA) homojenize (1/10) edilerek 3000 rpm'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi, süpernatantda santrifüj işlemi tekrarlandı. Süpernatant fraksiyonunda kaspaz-3 aktivitesi ölçüldü (190).

Kaspaz 3 aktivitesi ölçümü kısaca şu şekilde yapıldı:

1. 96'lık *plate* kuyucuklarına numune, kör ve standarttan 5 µl eklendi.
2. Üzerlerine 85 µl çalışma solüsyonundan (200 mM HEPES, pH 7.4, 1% CHAPS, 50 mM DTT, 20 mM EDTA) eklendi.
3. Kaspaz 3 substratı Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilidinden 10 µl eklendi.
4. 1 saat 37 C° de bekletildikten sonra elisa okuyucu ile 405 nm'de absorbanslar ölçüldü.

p-Nitroanilin kullanılarak kalibrasyon grafiği çizildi (Grafik 3.3). Doku protein içeriğinin ölçülmesiyle µmol pNA/ dakika/ mg protein olarak ifade edildi.



Grafik 3.3 Kaspaz 3 aktivitesi kalibrasyon eğrisi

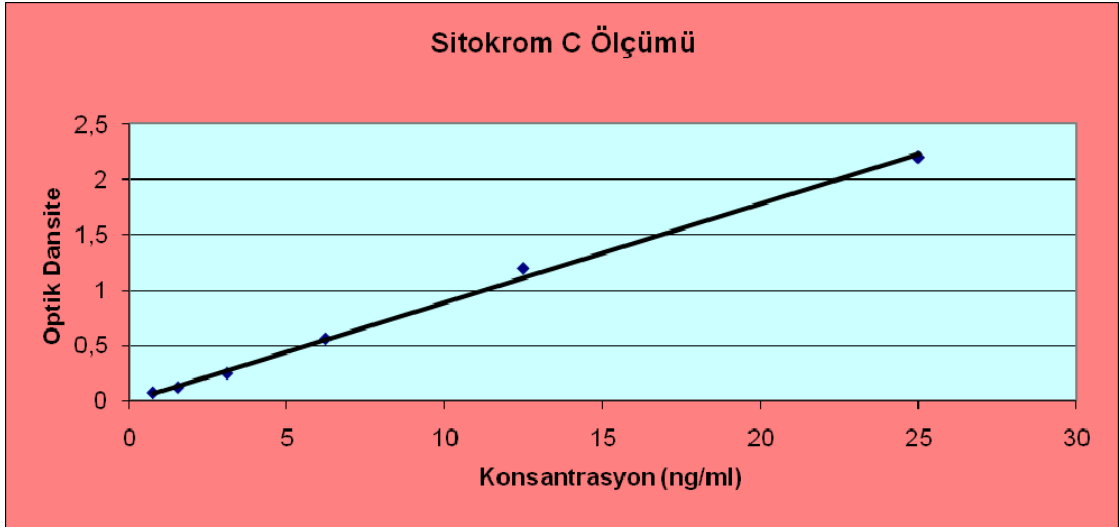
3.2.4. Sitokrom c salınımı ölçümü

Sitokrom c salınımı ölçümü için kalp dokusu tampon A (20 mmol/l HEPES-KOH, 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 dithiothreitol, 0.1 mmol/l fenilmetilsulfonil florid, 2 µg/ml of aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, ve 5 µg/ml pepstatin) içerisinde homojenize edildi. 800 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pellet tampon A ile resüspanse edildikten sonra tekrar 8000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra supernatant başka bir tüpe alındı. Pellet tampon A ile yıkandıktan sonra, tampon B (10 mmol/l TrisHCl, pH 8.0, 0.5% Nonidet P-40 ve 5 mmol/l CaCl₂ içeren) içerisinde çözüldü ve mitokondrial fraksiyon olarak kullanıldı. Supernatant ise 100000 g'de santrifüj edildi ve sonrasında supernatant sitozolik fraksiyon olarak kullanıldı (160). Hem mitokondrial fraksiyonda hem de sitozolik fraksiyonda ticari kit (R&D Sistemleri MCTC0) kullanılarak Sitokrom c ölçümü yapıldı. Sitozolik fraksiyonun mitokondrial fraksiyona oranı mitokondrial hasarın göstergesi olarak kullanıldı (56).

Sitokrom c ölçümü kısaca şu şekilde yapıldı:

1. Kitten çıkan *plate* de bulunan her bir kuyucuğa 75 µl konjugat solüsyonu (*Horseradish peroksidaz* bağlı sıçan/fare sitokrom c antikoru) eklendi.
2. 50 µl standart (200 ng sıçan/fare sitokrom c), kontrol, numune *plate* pipetlenip karıştırıldı. 2 saat oda ısısında bekletildi.
3. 400 µl yıkama solüsyonu ile her bir kuyucuk 5 kez yıkandı.
4. 100µl substrat (H₂O₂ ve Tetrametilbenzidin) eklenip 30 dakika oda ısısında bekletildi.
5. 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 (Grafik 3.4). Sitozolik fraksiyonun sonuçları mitokondrial fraksiyona oranlandı.



Grafik 3.4 Sitokrom c ölçümü kalibrasyon eğrisi

3.2.5. Serum BNP düzeyinin belirlenmesi

Serum BNP düzeyleri ticari kit (USCN Life Science) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm kısaca şu şekilde yapıldı:

Kitin içerisinden çıkan 96'lık *plate* standart, kör ve serum 100 µl pipetlendi. 2 saat 37 C⁰ de bekletildi.

Her bir kuyucuktaki sıvılar boşaltıldı. 100 µl solüsyon A (Biotin ile bağlanmış poliklonal BNP antikoru) pipetlendi. 1 saat 37 C⁰ de bekletildi.

Her bir kuyucuktaki sıvılar boşaltıldı. 350 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

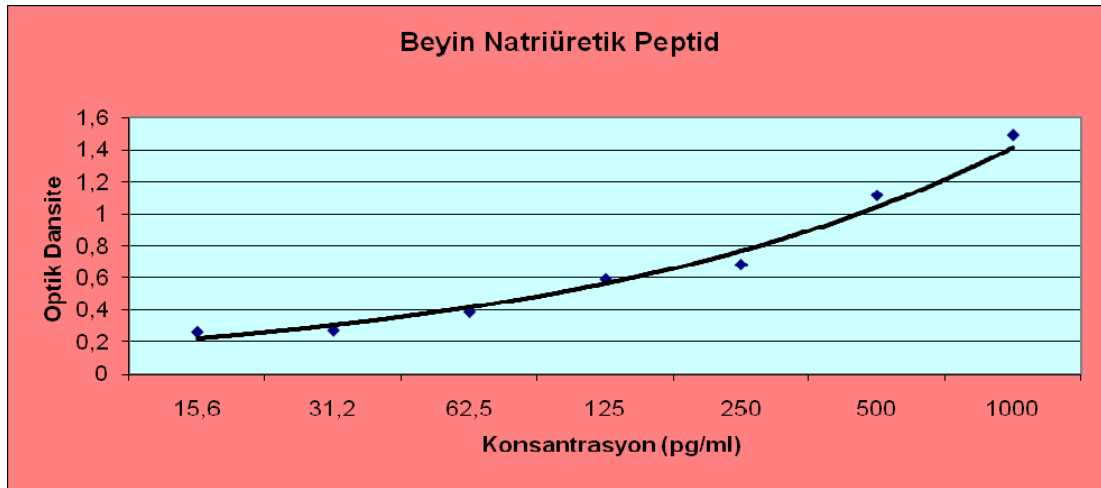
100 µl solüsyon B (*Horseradish peroksidaz bağlı avidin*) pipetlendi. 30 dakika 37 C⁰ de bekletildi.

Her bir kuyucuktaki sıvılar boşaltıldı. Her bir kuyucuk 350 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.

90 µl substrat solüsyonundan (Tetrametilbenzidin) her bir kuyucuğa pipetlendi. Işıktan korunarak 15 dakika bekletildi.

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 (Grafik 3.5). BNP sonuçları pg /ml olarak ifade edildi (186).



Grafik 3.5 Beyin Natriüretik Peptid Kalibrasyon eğrisi.

3.2.6. Serum CK-MB düzeyinin belirlenmesi

Serum CK-MB düzeyleri ticari kit (USCN Life Science) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm kısaca şu şekilde yapıldı:

Kitin içerisinden çıkan 96'lık *plate* standart, kör ve serum 100 µl pipetlendi. 2 saat 37 C⁰ de bekletildi.

Her bir kuyucuktaki sıvılar boşaltıldı. 100 µl solüsyon A (Biotin ile bağlanmış poliklonal CK-MB antikoru) pipetlendi. 1 saat 37 C⁰ de bekletildi.

Her bir kuyucuktaki sıvılar boşaltıldı. 350 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

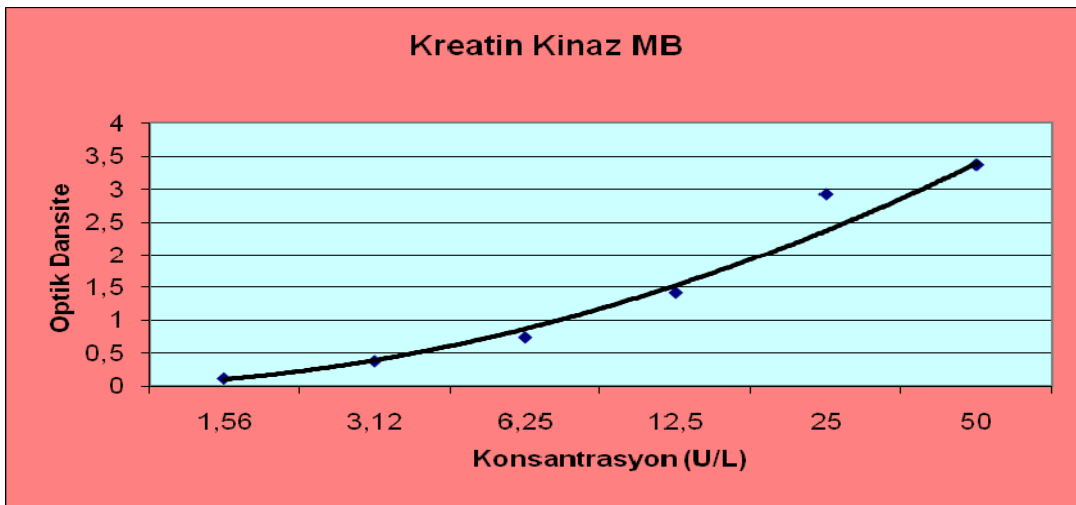
100 µl solüsyon B (*Horseradish peroksidaz bağlı avidin*) pipetlendi. 30 dakika 37 C⁰ de bekletildi.

Her bir kuyucuktaki sıvılar boşaltıldı. Her bir kuyucuk 350 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.

90 µl substrat (Tetrametilbenzidin) solüsyonundan her bir kuyucuğa pipetlendi. Işıktan korunarak 15 dakika bekletildi.

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(Grafik 3.6). CK-MB sonuçları U /L olarak ifade edildi (105).



Grafik 3.6 Serum CK-MB ölçümü kalibrasyon eğrisi

3.2.7. Doku protein miktarı ölçümü

Kalp dokusundan elde ettiğimiz homojenatların protein miktarını Bradford yöntemi ile ölçüldü (18).

Reaktifler:

1. Coomassie Brilliant Mavi G-250
2. Ethanol %95
3. Fosforik asit (H_3PO_4) %85

1 litre Bradford solüsyonu hazırlamak için;

1. Basamak: 1 litrelik kabda 100 mg G-250 Coomassie Mavisi boyası 50 ml %95'lik etanol kullanılarak çözüldü.
2. Basamak: Üzerine %85 lik fosforik asitten 100 ml eklendi.
3. Basamak: Distile su ile 1 litreye tamamlandı.

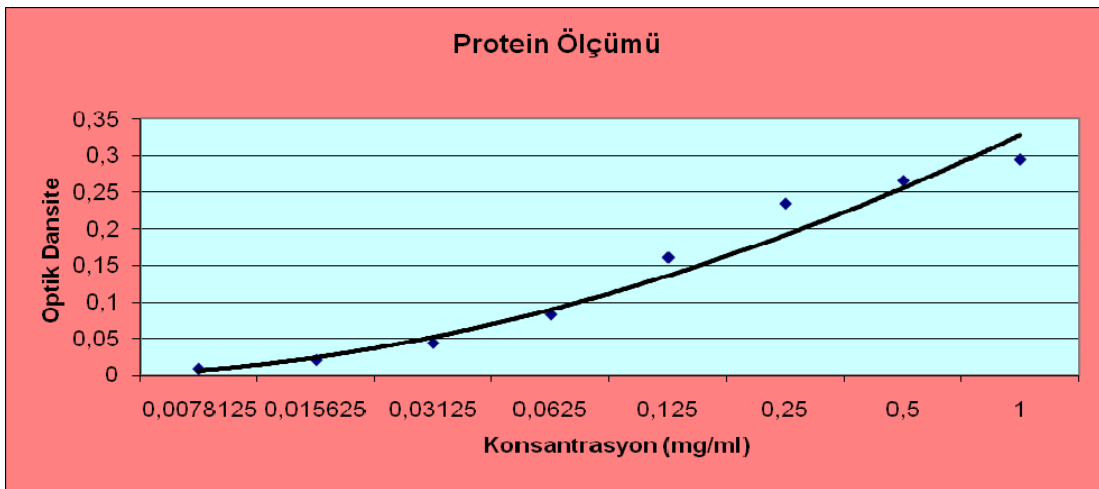
Bu solüsyon derişik stok solüsyondur. Işıktan korunarak oda ısısında saklanabilir.

Kullanımdan önce whatman filtre kağıdı ile süzüldü. 5 kez sulandırıldı.

Ölçüm:

100 µl örnek 5 ml solüsyon ile karıştırıldı. Vortekslendi. 5 dakika oda ısısında bekledikten sonra 595 nm spektrofotometrede ölçüldü.

Albumin ile seri dilüsyon yapılarak standartlar hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi çizildi (Grafik 3.7). Protein sonuçları mg/ml olarak ifade edildi.



Grafik 3.7 Doku protein ölçümü için albumin ile yapılan kalibrasyon eğrisi

3.3. Histolojik İncelemeler

3.3.1. Işık mikroskobu incelemesi

Kontrol, çözücü, alkol ve alkol + inhibitör gruplarını oluşturan tüm sıçanlardan kalp kası örnekleri alındı. Alınan kalp kası örnekleri formalin fiksatifinde 48 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'er dakika ksilolde bekletildi. Kalp kası örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin (HE) ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eosin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflaştırıldı ve şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapılarak sol ventrikül dokusu örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekildi. Bulguların değerlendirilmesinde nekroz, ödem, miyofibriller dejenerasyon, hemoraji ve infiltrasyona göre skorlama yapılmıştır (21). Skorlamada;

0: Hasar yok

2: Orta hasar

1: Az hasar

3: Çok hasar olarak değerlendirildi.

3.3.2. TUNEL Boyama Tekniği Protokolü

Apoptoz rutin histolojik teknikler ile gösterilebilir. Ancak apoptozu tespit etmek için daha hassas yöntemler bulunmaktadır. Apoptotik hücrelerin en erken evrelerde görülebilmesi için bu yöntemlerin başında TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labeling) yöntemi gelmektedir. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçalarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz aracılığıyla digoxigenin işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra digoxigenin işaretlenmiş yeni nükleotidler anti-digoxigenin konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili ile zıt boyama yapılarak işlem sonlandırılır. Araştırmamızda TUNEL aktivitesi deney ve kontrol gruplarına ait 4µm kalınlığındaki parafin kesitlerde çalışıldı. TUNEL incelemesinde TUNEL pozitif hücrelerin tüm hücrelere oranı sayılmıştır ve bu oranlar % olarak değerlendirip istatistik analiz yapılmıştır (160).

3.3.3. Kaspaz-3 ün immünohistokimyasal değerlendirilmesi:

Kaspaz-3 boyama prosedürü şu şekilde uygulandı. Araştırmamızda aktif kaspaz-3 aktivitesi, deney ve kontrol gruplarına ait 4µm kalınlığındaki parafin kesitlerde çalışıldı.

1. 2X5 dk ksilolde tutuldu.
2. 2X5 dk %95 alkolde tutuldu.
3. 1X5 dk %70 alkolde tutuldu.
4. 1X5 dk %50 alkolde tutuldu.
5. 1X5 dk %25 alkolde tutuldu.
6. 2X5 dk PBS de yıkama yapıldı.

7. Kesitler kaba yerleştirildi ve kesitleri kaplayacak kadar içine 0.01M sitrat tamponu dolduruldu. Daha sonra düdüklü tencere içine distile su konduktan sonra kesitlerin konulduğu kap düdüklü tencere içine yerleştirildi ve kaynatmaya bırakıldı. Kaynatma işleminde düdük çaldıktan sonra 3 dakika bekletildi ve kapatıldı. Kesitlerin soğuması için 20 dk oda sıcaklığında bekletildi.

8. 1x5 dk çeşme suyunda yıkandı
 9. Kesitler PBS e alındı.
 10. Doku sınırlayıcı kalem ile doku daire içine alınır.
 11. Hidrojen peroxidase (% 3'lük) 10dk
 12. Distile su
 - 13.13-Ultra V blok 5dk
 14. Primer antikor Chemicon rabbit poliklonal anti-aktive antikor oda ısısında 1 saat 50µl rabbit poliklonal anti-aktif kaspaz-3 antikor 1 ml dilüe solüsyonu
 15. Pbs 2x1 dk
 16. Sekonder antikor polivalentli biotinylated goat anti polivalent 30dk
 17. Pbs 2x1 dk
 18. Streptavidin peroksid 30dk. Polivalentli
 19. Pbs 2x1 dk
 20. AEC kromojen 30dk
 21. Akan çeşme suyu
 22. Hemotoksilen boyası 10sn
 23. Akan çeşme suyu
 24. Distile su
 25. Su bazlı kapatma sıvısı ile montaj gerçekleştirildi.
- Kaspaz 3'ün immünohistokimyasal boyanmasının değerlendirilmesinde, sitoplazmanın boyanmasına göre skorlama yapılmıştır (44).
- =0 +=1 +=2 +++=3

3.4. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizde Sigma Stat 3,5 ve SPSS 15.0 paket programları kullanıldı. Işık mikroskopu verilerinin değerlendirilmesinde kategorik yapıları için Pearson Chi Square testleri kullanıldı ve gruplar arası karşılaştırmada Tukey Test kullanıldı. Diğer biyokimyasal ve histolojik verilerin analizinde Sigma stat 3,5 programı One Way Anova kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal walls testi kullanıldı. Ortalama \pm SS kullanıldı. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. SONUÇLAR

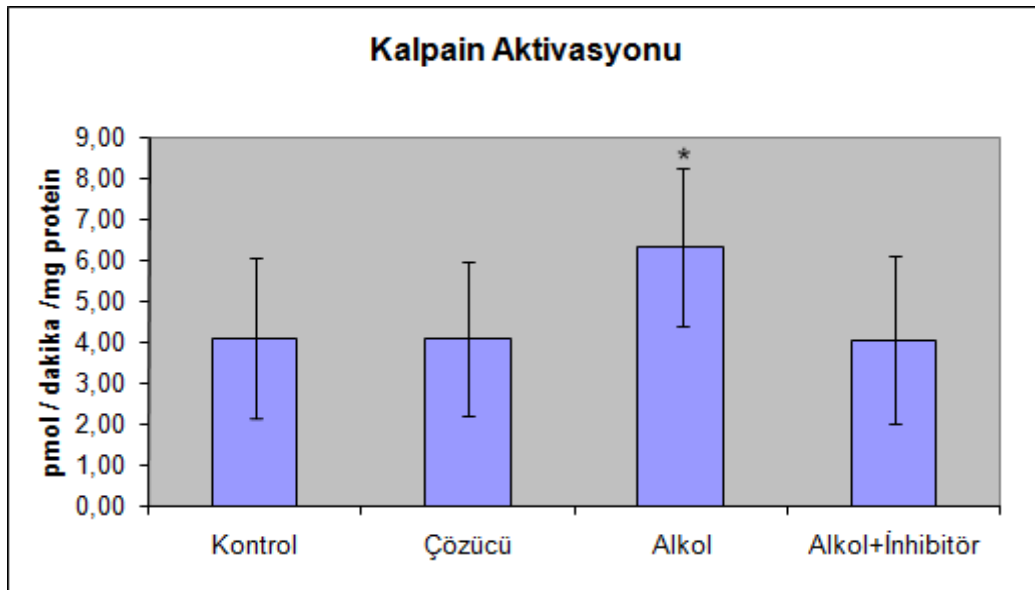
4.1. Biyokimyasal Sonuçlar

4.1.1. Kalpain aktivitesi

Çalışmamızda yüksek doz akut etanol uygulaması yaptığımız sıçanların kalp sol ventrikül dokusunda kalpain aktivitesini ölçüldü. Ölçümlerimizde kalsiyumlu ve kalsiyumsuz iki farklı tampon kullanarak iki farklı ortamda kalsiyum bağımlı ve kalsiyum bağımsız aktiviteler ölçüldü. Kalsiyum bağımlı aktiviteden kalsiyum bağımsız aktivite çıkarılarak kalpain aktivitesi belirlendi. Alkol grubu kalpain aktivitesi düzeyi kontrol ve çözücü grubuna göre yüksekti ve bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). İnhibitör grubunun kalpain aktivitesi düzeyi alkol grubuna göre azalmıştı. Ama bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). İnhibitör grubu kalpain aktivitesinin kontrol grubu kalpain aktivitesi düzeyine kadar düşmesi inhibitörün etkisini göstermektedir (Tablo 4.1 ve Grafik 4.1).

Tablo 4.1 Kalpain aktivitesi düzeyleri

	Ortalama	+SS
Kontrol	4,07	1,95
Çözücü	4,09	1,87
Alkol	6,31	1,91
Alkol+İnhibitör	4,05	2,04



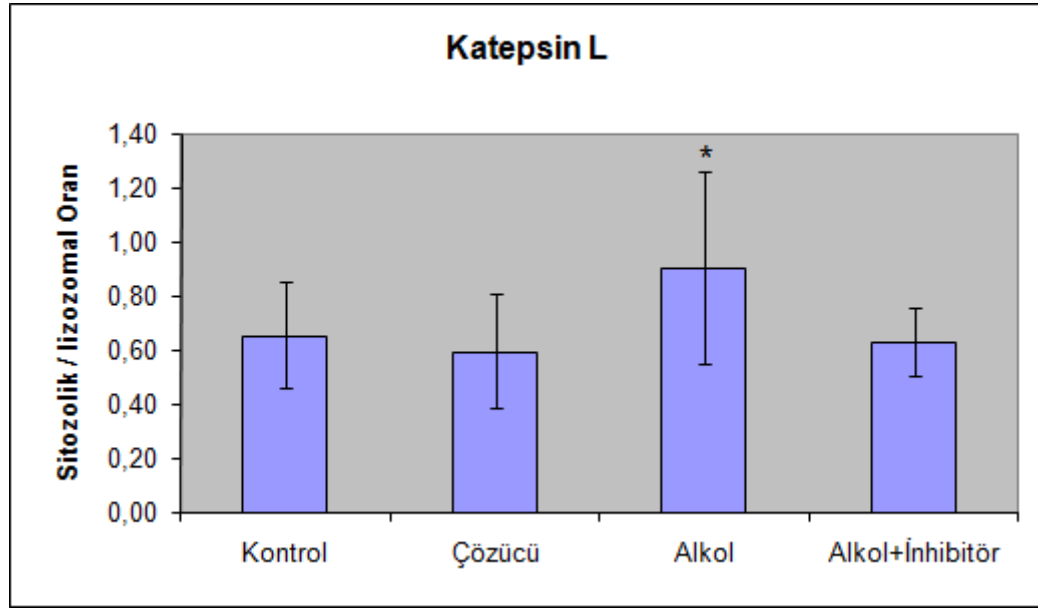
Grafik 4.1 Kalp dokusu kalpain aktivitesi düzeyleri. * $p<0,05$ Kontrol ve çözücü grubundan farklı

4.1.2. Katepsin L aktivitesi

Lizozomal hasarın göstergelerinden olan, sitozolik fraksiyonun katepsin L aktivitesinin lizozomal fraksiyonun katepsin L aktivitesine oranı, alkol grubunda diğer gruplara göre daha yüksekti ve bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). Ayrıca inhibitör grubunun katepsin sonuçlarının kontrol grubuna yakın düzeyde ölçülmesi ($p > 0,05$) tedavinin etkinliğini göstermektedir (Tablo 4.1 ve Grafik 4.2).

Tablo 4.2 Katepsin L aktivitesi sonuçlarının oranları

	Ortalama	\pm SS
Kontrol	0,65	0,20
Çözücü	0,60	0,21
Alkol	0,90	0,36
Alkol+İnhibitör	0,63	0,12



Grafik 4.2 Kalp dokusu katepsin L aktivitesi sitozolik fraksiyonun lizozomal fraksiyona oranı

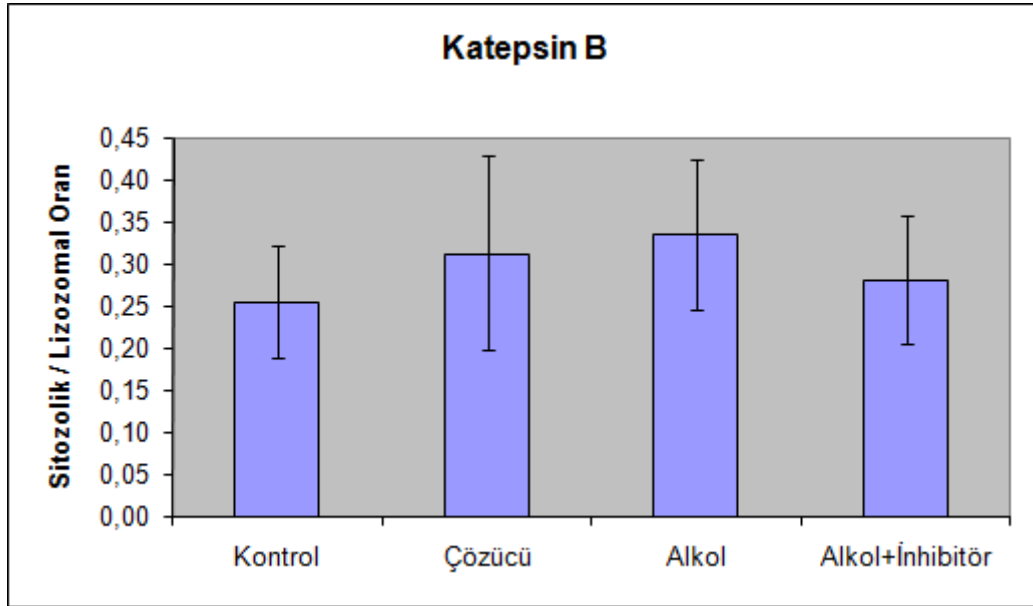
* $p < 0,05$ Kontrol, çözücü ve inhibitör grubundan farklı

4.1.3. Katepsin B aktivitesi

Katepsin B oranında alkol grubundaki yükseklik ılımlı düzeydeydi. İstatiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). İnhibitör grubu katepsin B oranı kontrol grubu düzeyine yakın bir seviyede idi. Bir başka deyişle kontrol grubu ile inhibitör grubu arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$), (Tablo 4.3 ve Grafik 4.3).

Tablo 4.3 Katepsin B aktivitesi sonuçlarının oranları

	Ortalama	\pm SS
Kontrol	0,26	0,07
Çözücü	0,31	0,12
Alkol	0,34	0,09
Alkol+İnhibitör	0,28	0,08



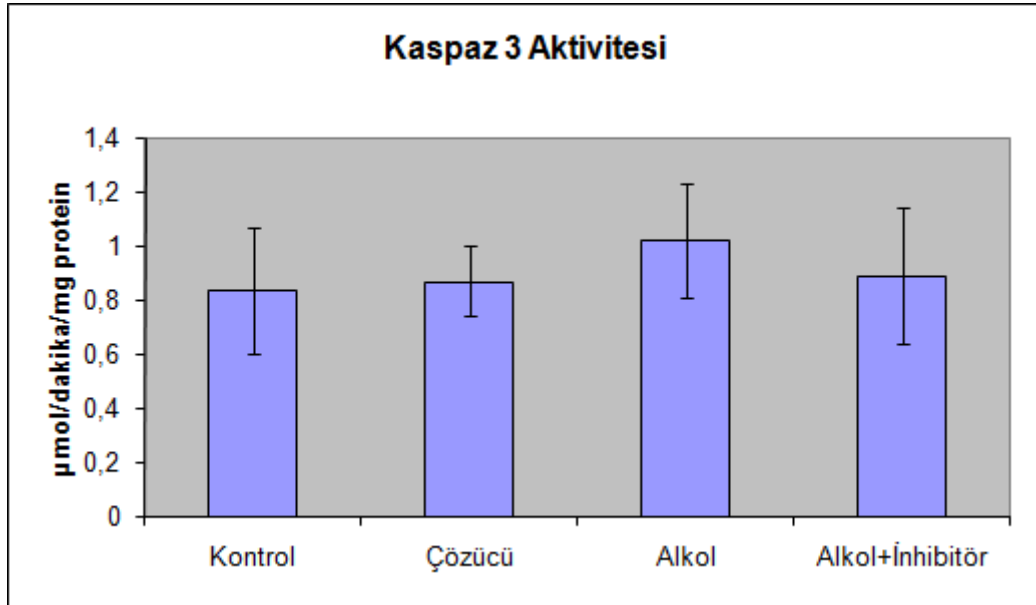
Grafik 4.3 Kalp dokusu katepsin B aktivitesi sitozolik fraksiyonun lizozomal fraksiyona oranı

4.1.4. Kaspaz 3 aktivitesi

Alkol grubu kaspaz 3 aktivitesi diğer gruplara göre daha yüksekti. Ama bu yükseklik ılımlı düzeydeydi ve istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Kontrol grubu ile inhibitör grubu kaspaz 3 düzeyleri arasında da anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$) ve bu farkın olmayışı bize kalpain inhibitörü tedavisinin hücre ölümü üzerindeki etkinliğini gösteriyor olabilir (Tablo 4.4 ve Grafik 4.4).

Tablo 4.4 Kaspaz 3 aktivitesi düzeyleri

	Ortalama	\pm SS
Kontrol	0,83	0,23
Çözücü	0,87	0,13
Alkol	1,02	0,21
Alkol+İnhibitör	0,89	0,25



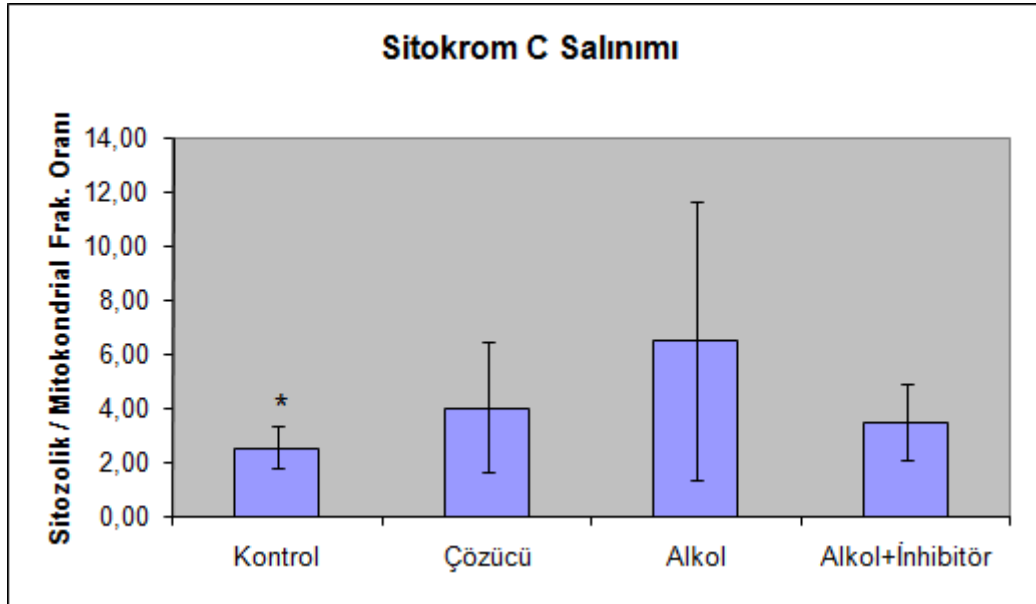
Grafik 4.4 Kalp dokusu kaspaz 3 aktivitesi düzeyleri

4.1.5. Sitokrom c salınımı

Kontrol grubu sitokrom c salınımı oranları çözücü grubu, alkol grubu ve tedavi grubuna göre daha düşüktü ve bu istatistik olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). İnhibitör grubu sitokrom c sonuçları alkol grubuna göre azalmıştı ama bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$), (Tablo 4.5 ve Grafik 4.5).

Tablo 4.5 Sitokrom c salınımı sitozolik/mitokondrial fraksiyon oranları

	Ortalama	\pm SS
Kontrol	2,54	0,76
Çözücü	4,04	2,39
Alkol	6,49	5,14
Alkol+İnhibitör	3,48	1,42



Grafik 4.5 Sitokrom c salınımı sitozolik fraksiyonun mitokondrial fraksiyona oranı

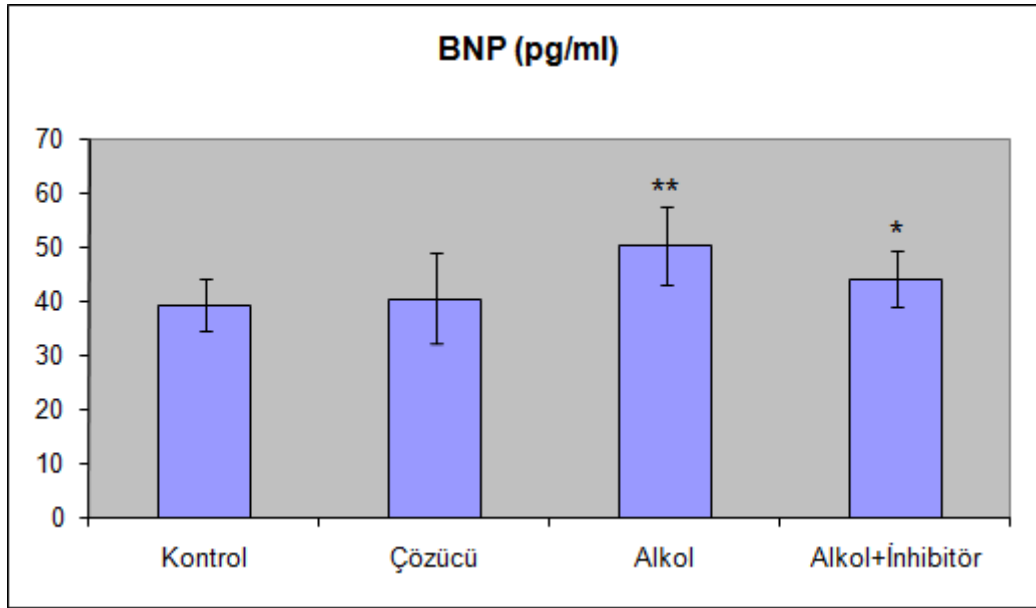
* $p < 0,05$ Alkol grubu, çözücü grubu ve alkol+inhibitör grubundan farklı

4.1.6. Serum BNP düzeyi

Alkol grubu serum BNP düzeyleri kontrol ve çözücü grubuna göre çok önemli düzeyde yüksekti ($p<0,01$). İnhibitör grubu serum BNP düzeyleri ise alkol grubuna göre önemli miktarda azalmıştı ($p<0,05$). Kontrol grubu ile inhibitör grubu BNP düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$), (Tablo 4.6 ve Grafik 4.6).

Tablo 4.6 Serum BNP düzeyleri

	Ortalama	\pm SS
Kontrol	39,28	4,70
Çözücü	40,45	8,34
Alkol	50,24	7,32
Alkol+İnhibitör	44,22	5,22



Grafik 4.6 Serum BNP düzeyleri

* $p<0,05$ Alkol grubundan farklı

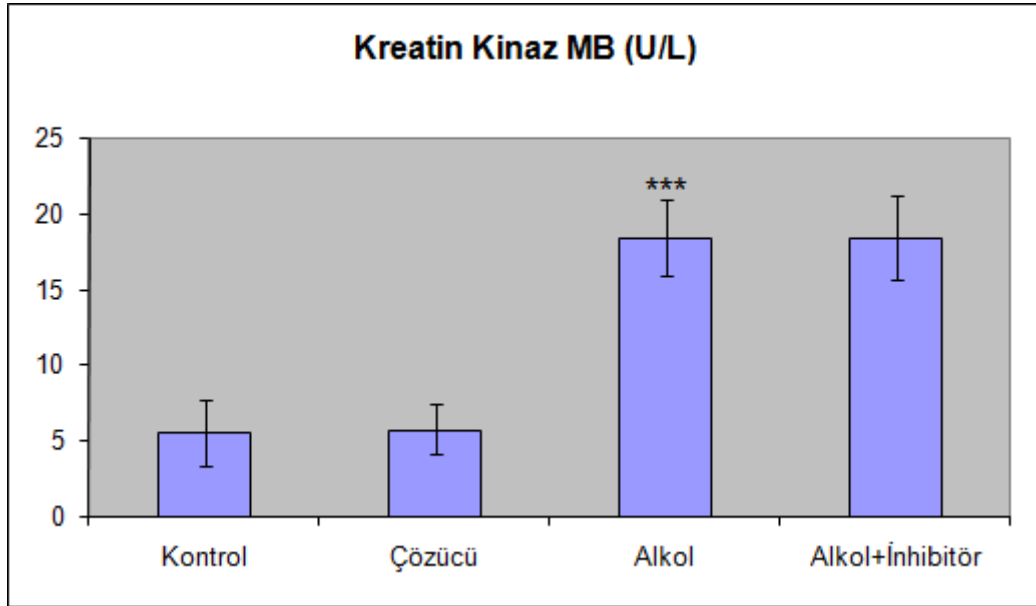
** $p<0,01$ Kontrol ve çözücü grubundan farklı

4.1.7. Serum CK-MB düzeyi

Alkol grubu serum CK-MB düzeyleri kontrol ve çözücü grubuna göre çok önemli düzeyde yüksekti ($p<0,001$). Aynı şekilde inhibitör grubu CK-MB düzeyleri de kontrol ve çözücü grubuna göre çok yüksekti. ($p<0,001$). Alkol grubu ve İnhibitör grubu CK-MB düzeyleri arasında istatistiksel bir fark yoktu ($p>0,05$), (Tablo 4.7 ve Grafik 4.7).

Tablo 4.7 Serum CK-MB düzeyleri

	Ortalama	\pm SS
Kontrol	5,497	2,23
Çözücü	5,74	1,68
Alkol	18,36	2,52
Alkol+İnhibitör	18,41	2,73



Grafik 4.7 Kreatin Kinaz-MB sonuçları

*** $p<0,001$ Kontrol ve çözücü grubundan farklı

4.2. Histolojik Sonuçlar

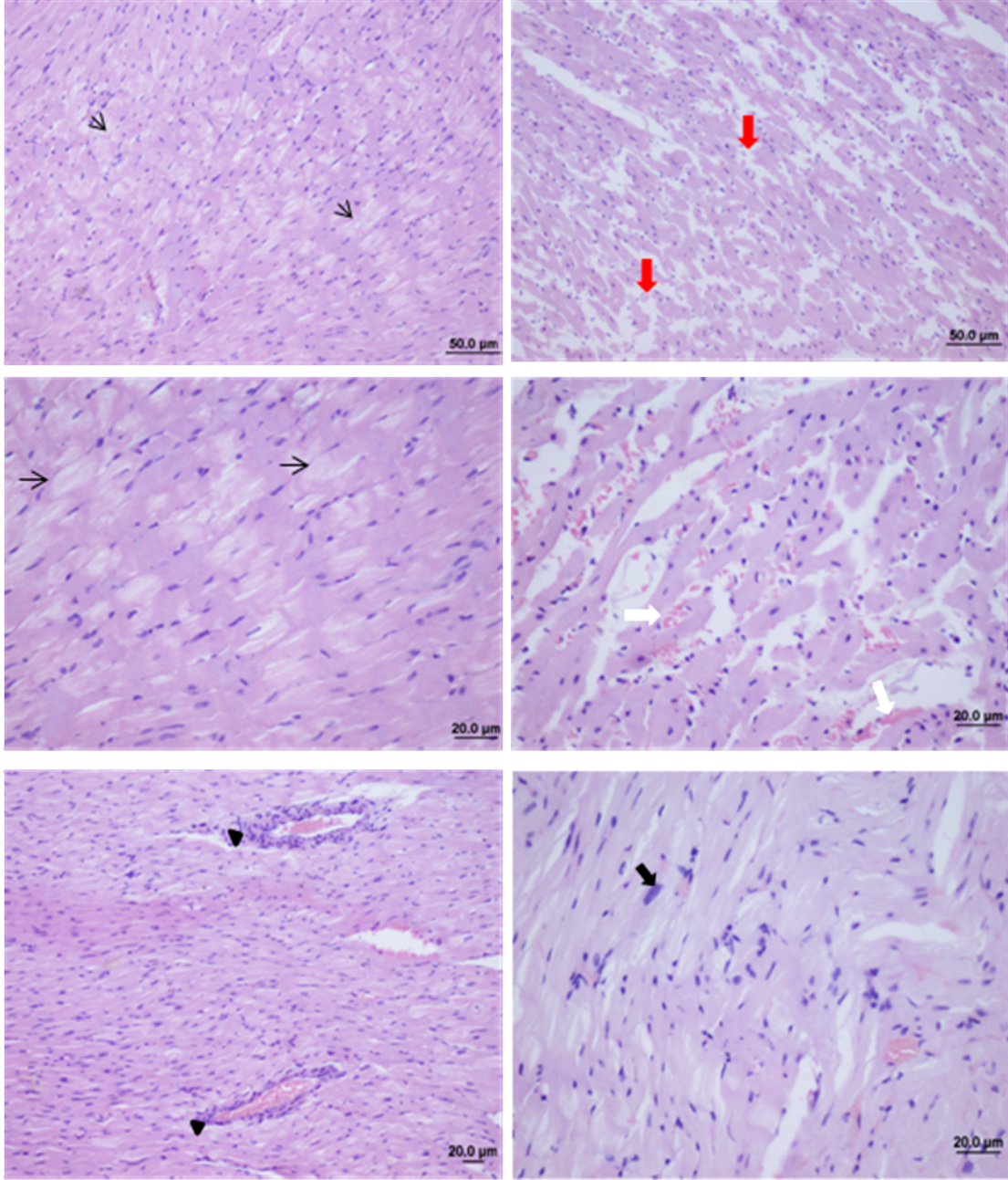
4.2.1. Işık mikroskobu incelemesi

Işık mikroskobu incelemesinde nekroz, ödem, miyofibriler dejenerasyon, hemoraji ve inflamasyona göre skorlama yapılmıştır ve bu veriler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. (Tablo 4.8). Nekroz açısından incelendiğinde alkol grubundaki nekroz miktarı diğer gruplara göre çok fazlaydı ve nekrozdaki bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.001$). İnhibitör + alkol grubunda nekroz miktarı azalmıştı ve kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak fark yoktu ($p > 0.05$). Grupların ışık mikroskobu incelemesinde ödem görünümü bakımından anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi. Miyofibriler dejenerasyon alkol grubunda çok artmıştı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.001$). Alkol grubu ile kıyaslandığında, inhibitör + alkol grubunda önemli bir iyileşmeyi gösterecek şekilde miyofibriler dejenerasyonda azalma görüldü ($p < 0.01$). Hemoraji ve inflamasyon bakımından gruplar arasında istatistiksel bir fark yoktu ($p > 0.05$), (Tablo 4.8).

Tablo 4.8 Işık mikroskobu görüntüleri skorlama sonuçları

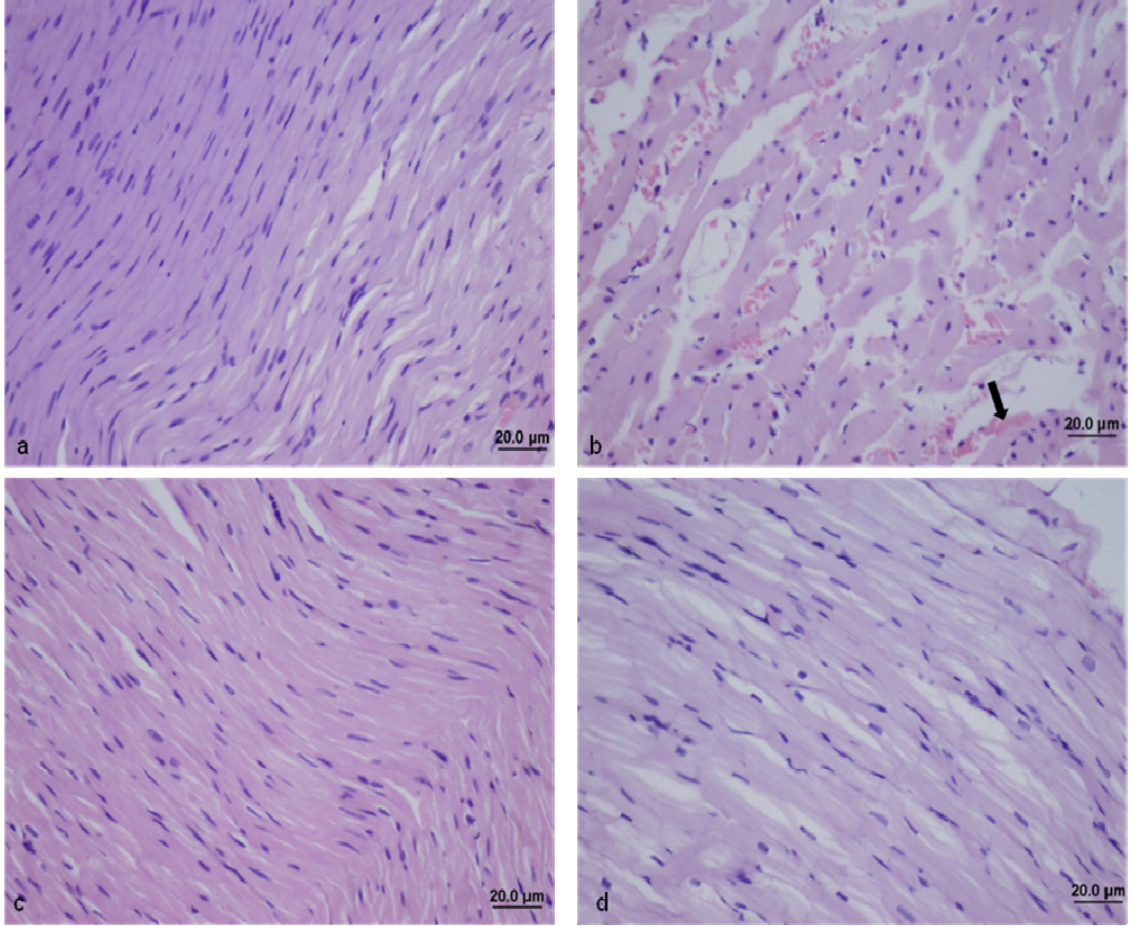
	Nekroz	Ödem	Miyofib dej	Hemoraji	İnflamasyon
Kontrol	0,2 ± 0,42 ^{***}	0,2 ± 0,63	0,1 ± 0,31 ^{***}	0,4 ± 0,69	0,1 ± 0,31
Çözücü	0,1 ± 0,31 ^{***}	0,1 ± 0,31	0,3 ± 0,48	0,5 ± 0,7	0,8 ± 0,91
Alkol	1,5 ± 0,97	2,0 ± 0,63	1,4 ± 1,07	1,0 ± 0,81	0,8 ± 0,91
Alkol+İnhibitör	0,3 ± 0,67 ^{***}	0,1 ± 0,31	0,2 ± 0,42 ^{**}	0,2 ± 0,42	0,1 ± 0,31

** Alkol grubundan farklı $p < 0.01$ *** Alkol grubundan farklı $p < 0.001$



Şekil 4.1 Alkol grubuna ait kalp dokusu örneklerinin ışık mikroskobu incelemesi görüntüleri (HE, bar 50.0 µm, 20.0 µm).

Bu grupta farklı büyütmelerdeki tüm preparatlarda kas hücrelerinde miyofibriller dejenerasyon gözlemlendi. Kas liflerinde yer yer kopmalar (kırmızı ok) ve nekrotik lifler (ince ok) görüldü. Perivasküler inflamasyon (ok başı), vasküler kongesyon ve interstisyel hemoraji (beyaz ok) dikkat çekti. Ayrıca bazı preparatlarda nükleer hipertrofi (siyah kalın ok) gözlemlendi (Şekil 4.1).



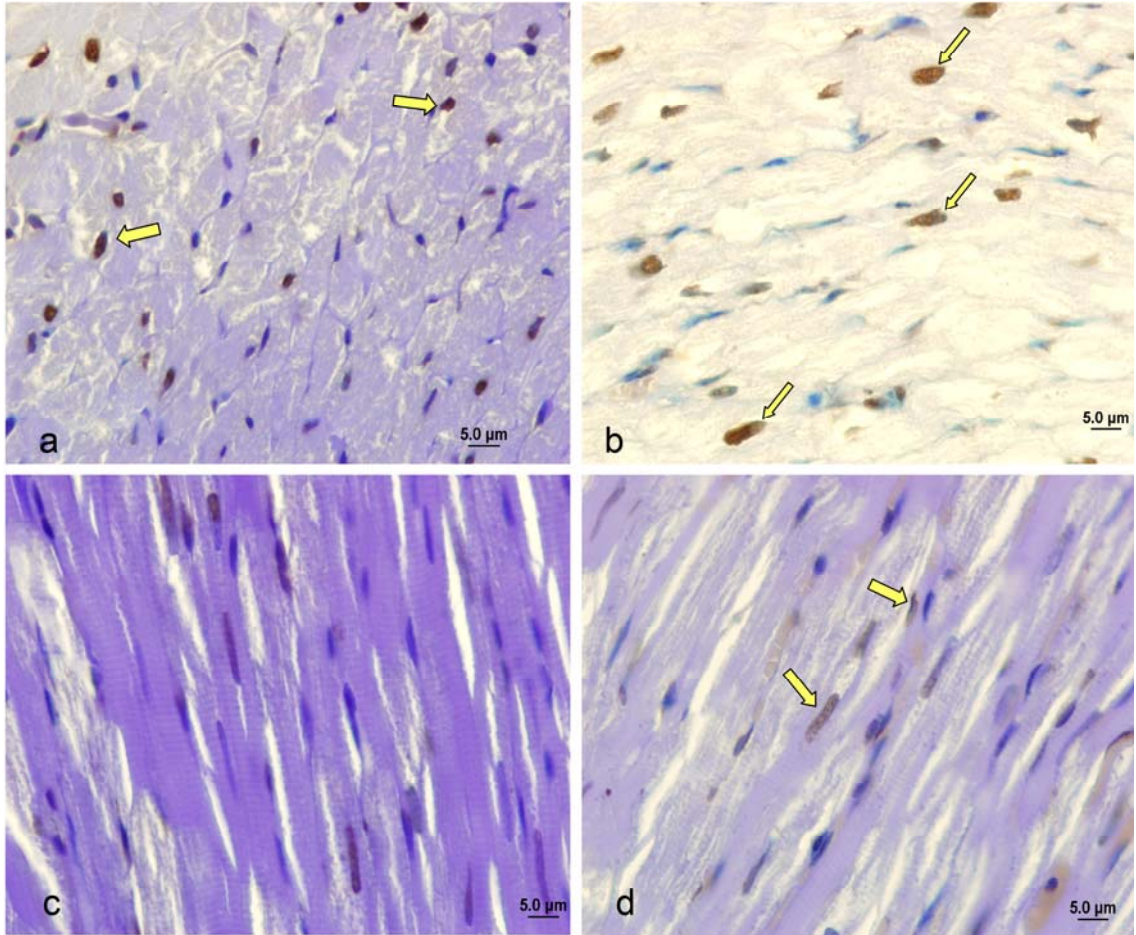
Şekil 4.2 Kalp dokusu tüm gruplara ait ışık mikroskobu görüntüleri. (a) Kontrol grubu, (b) alkol grubu, (c) inhibitör grubu, (d) çözücü grubu (HE, bar 20.0 µm).

Kalp kası hücrelerinin ışık mikroskobik incelemelerinde kontrol grubunda normal histolojik yapıdaki kas hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.2a). Alkol grubunda kas hücrelerinde miyofibriller dejenerasyon ve interstisyel hemoraji (siyah ok) görüldü (Şekil 4.2b). İnhibitör grubunda normale yakın kas hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.2c). Çözücü grubunda da normal görünümlü kas hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.2d).

4.2.2. TUNEL bulguları

Kontrol ve çözücü gruplarında Şekil 4.3a ve 4.3d' de görüldüğü gibi TUNEL (+) hücre sayısı azdır. Alkol grubunda ise şekil 4.3b' de görüldüğü gibi TUNEL (+) hücre sayısı oldukça artmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı görülmüştür. İnhibitör grubunda ise şekil 4.3c' de görüldüğü gibi TUNEL (+) hücre sayısı kontrol grubuna benzerdir.

TUNEL (+) hücrelerin hepsi apoptotik olmayabilir. DNA kırıklarının yol açtığı durumlarda TUNEL (+) hücreler görülebilir. Bu nedenle yapılan kaspaz 3 boyamasında şekil 4.3a, 4.3c, 4.3d' de görüldüğü gibi aynı grupların TUNEL boyamasıyla uyumlu şekilde hafif boyanmalar görülmüştür. Alkol grubuna ait kuvvetli kaspaz 3 boyaması şekil 4.3b de aynı grupların TUNEL boyamasıyla uyumlu şekilde görülmektedir.



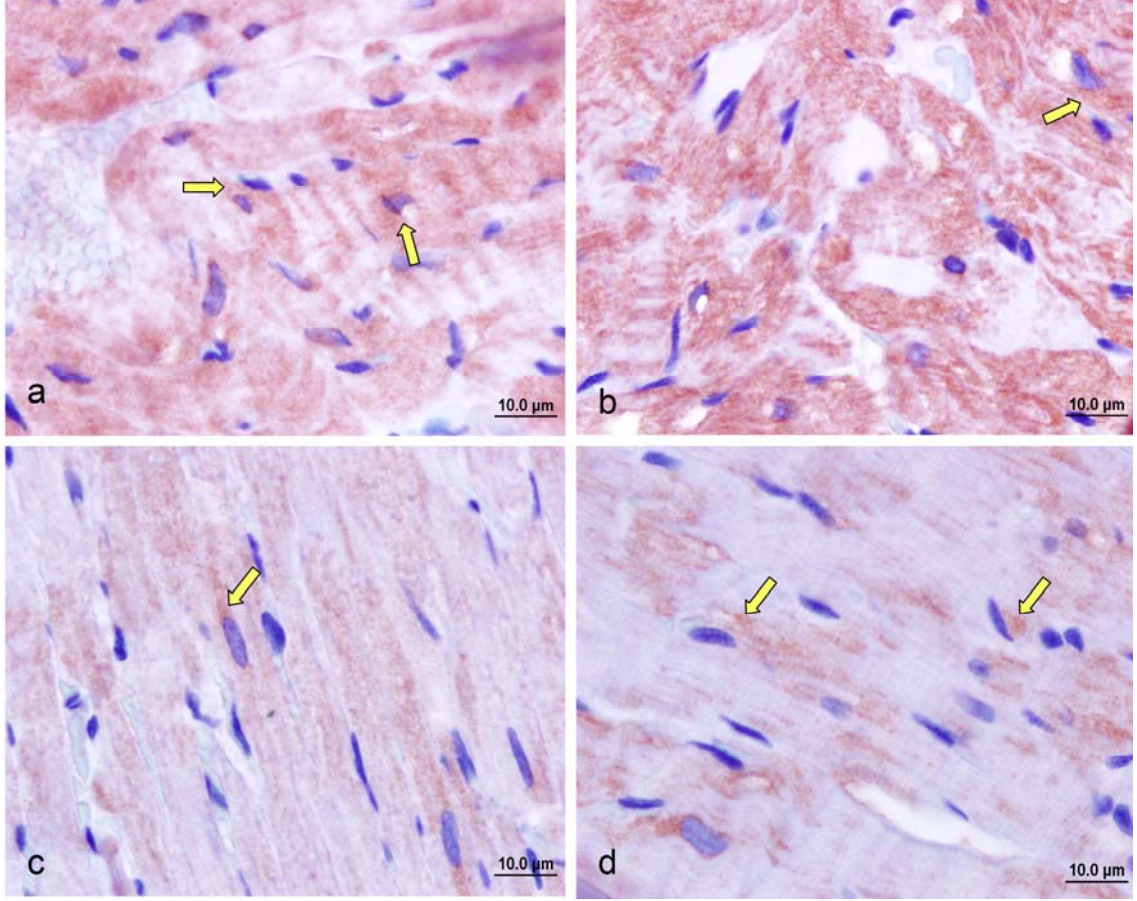
Şekil 4.3 Kontrol grubu(a), inhibitör grubuna (c) ve çözücü grubu(d) ait TUNEL immünohistokimyasal boyaması. Miyokard hücrelerinde az sayıda TUNEL (+) hücreler görülmektedir. Bar 5µm. Alkol grubuna(b) ait TUNEL immünohistokimyasal boyamasında miyokard hücrelerinde çok sayıda TUNEL (+) hücreler görülmektedir (TUNEL, bar 5.0 µm).

TUNEL incelemesinde TUNEL pozitif hücrelerin tüm hücelere oranı sayılmıştır. Her preparatta 3 sahanın sayım sonuçları kullanılmıştır. Elde edilen oranlar % olarak değerlendirilip istatistik analiz yapılmıştır (Tablo 4.9). Alkol grubu TUNEL pozitiflik oranı; kontrol grubu ve çözücü grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$). Alkol grubunda görülen bu yüksek TUNEL pozitiflik oranı inhibitör verilen grup da çok önemli düzeyde azalmıştı ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$).

Tablo 4.9 TUNEL pozitif hücrelerin tüm hücelere oranlarından elde edilen veriler. Alkol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel fark vardır ($p<0,001$).

	Ortalama	+SS	p
Kontrol	35,96	7,79	p<0.001
Çözücü	32,17	6,61	
Alkol	58,82	11,2	
Alkol+İnhibitör	23,28	8,48	

4.2.3. Kaspaz 3 immünohistokimyasal incelemesi



Şekil 4.4 Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması ışık mikroskobu görüntüleri. Kontrol grubu (a), inhibitör grubu (c) ve çözücü grubuna (d) ait Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyamasında miyokard hücreleri sitoplazmasında hafif boyanmalar görülmektedir. Alkol grubuna (b) ait miyokard hücreleri sitoplazmasında kuvvetli boyanmalar görülmektedir (Bar 10 µm).

Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyamasında kontrol grubu, inhibitör grubu ve çözücü grubuna ait miyokard hücreleri sitoplazmasında hafif boyanmalar görülmektedir. Alkol grubuna ait miyokard hücreleri sitoplazmasında kuvvetli boyanmalar görülmektedir (Şekil 4.4).

Kaspaz 3'ün immünohistokimyasal boyanmasının değerlendirilmesinde sitoplazmanın boyanmasına göre skorlama yapılmıştır. Bu skorlamaların verileri istatistiksel olarak analiz edildi. Tablo 4.10 da görüldüğü gibi alkol grubu kaspaz 3 aktivitesi, kontrol grubuna göre yüksek bulundu ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Alkol grubunda görülen yüksek kaspaz 3 aktivitesi alkol + inhibitör grubunda azalmıştı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu görüldü ($p<0,05$).

Tablo 4.10 Kaspaz 3'ün immünohistokimyasal boyanması sonucu elde edilen skorlama sonuçlarının istatistiksel analizi. Analizde Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve çoklu karşılaştırması Dunn's metoduyla yapıldı. Alkol grubu ile kontrol ve inhibitör grubu arasında istatistiksel fark görüldü ($p<0,05$).

	Medyan	%25 Persentil	%75 Persentil	p
Kontrol	1	0,83	1,165	$p<0,05$
Çözücü	1	1	1,248	$p>0,05$
Alkol	2	1,75	2,248	$p<0,05$
Alkol+İnhibitör	1	0,67	1	$p<0,05$

5. TARTIŞMA

Alkol kullanımı, batı toplumlarında iskemik olmayan kardiyomiyopatinin en büyük nedenidir. Alkolik kardiyomiyopati, genişlemiş sol ventrikül, normal veya azalmış sol ventrikül duvar kalınlığı ve artmış sol ventrikül kütlesi ile karakterizedir (131). Alkol, kasılma proteinlerinin yapı ve fonksiyonlarını değiştirerek onların çapraz bağ oluşturması ve güç üretimini etkiler. Kardiyak kasılma proteinlerinin sentezinde değişiklikler yapar. Kardiyak miyofibril proteinlerinin sentezi azalır (135). Miyozin adenozin trifosfataz aktivitesi azalır (112). Alkol kullanımından sonra miyoflamentteki kalsiyum duyarlılığı azalır (132). Alkol kalsiyum kanallarının up-regülasyonuna neden olur. Alkolün oluşturduğu hücre kalsiyum konsantrasyonundaki artış, kalp uyarı eşiğinin yükselmesine neden olur (131).

Etanole maruz kalma sonucunda oluşan kardiyak hasarın mekanizması bilinmemektedir ama diğer birçok organda etanolla ilişkili hasarda apoptoz önemli rol oynar (76). Düşük konsantrasyonlardaki etanol uygulamaları kalp dokusu hücre yaşam yollarını aktive ederken, yüksek miktarlardaki etanol proapoptotik yolları aktive eder. Etanol ve asetaldehidin kardiyak hücre adaptasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunu ve kardiyak apoptozu etkilediği görülmüştür (92). Çeşitli hayvan kardiyomiyopati modellerinde ve insan çalışmalarına ait bildirimlerde, alkol indüklemeli kardiyak disfonksiyonunun en temel nedeni olarak miyosit kaybının olabileceği görülmektedir (131). Capasso ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre 8 ay kronik etanol tüketen sıçanların sol ventrikülünde önemli bir miktarda miyosit kaybı görülmüştür (24). Chen ve arkadaşlarının yaptığı neonatal miyosit kültürlerinde, akut alkol konsantrasyonunun proapoptotik protein Bax düzeyini ve kaspaz 3 enzim aktivitesini artırarak apoptoza neden olduğu görülmüştür (28). Alkol tüketimi intrasellüler organel disfonksiyonuna neden olmaktadır. Alkolün mitokondri üzerindeki etkileri kristalların dejenerasyonu, mitokondri solunumunda azalmalar ve mitokondri tarafından kalsiyum tutulmasındaki bozukluklardır. Alkol, sarkoplazmik retikulumda kalsiyum bağlanması ve kalsiyumun alınıp bırakılması üzerinde etkilidir. Sarkoplazmik retikulumda şişmeye neden olur (131).

5.1. Kalpain Aktivitesi Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu mekanik, metabolik ve regülatör prosesler gibi çeşitli hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde bir ikinci haberci olarak merkezi rol oynar (15,30). Miyokardiyumda kalsiyum konsantrasyonunun kontrolündeki bir sıkıntı çeşitli miyokardiyal fonksiyonların bozulmasıyla sonuçlanır ve hücrenin hayatta kalmasını etkiler. Miyokardiyal iskemi veya hipoksi boyunca miyokardiyal kalsiyum konsantrasyonunda karakteristik bir yükselme oluşur (10). Benzer şekilde etanolün de hücre kalsiyum depoları üzerinde destabilize edici etkisi vardır (39). Bu miyokardiyal hücre ölümünde kilit olaydır ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonuna bağımlı enzimlerin aktivasyonu ile sonuçlanır. Miyokardiyal kalsiyum konsantrasyonundaki artış, miyokardiyal proteinlerde hasara neden olacak kalpainleri aktive edebilir ve miyosit ölümüne götürür, miyokardiyal yapı ve fonksiyon kaybıyla sonuçlanır (152).

Çalışmamızda yüksek doz akut etanol uygulaması yaptığımız sıçanların kalp sol ventrikül dokusunda kalsiyum bağımlı kalpain aktivitesi ölçüldü ve alkol grubu kalpain aktivitesi sonuçlarımız kontrol ve çözücü grubuna göre daha yüksek bulundu. Alkol grubunda görülen kalpain aktivitesindeki artışın, etanolün hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırıcı etkilerinden dolayı olabileceğini düşünüyoruz (39). Meydana gelen bu yüksek kalpain aktivitesini ve sonrasında oluşacak hücre ölümünü engellemek amacıyla kalpain inhibitörü kullandığımız alkol + inhibitör grubunda, kalpain aktivitesi düzeyinin azaldığı görülmüştür. Fakat sonuçlarımızın standart sapmaları yüksek olduğu için bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. İnhibitör grubu kalpain aktivitesinin kontrol grubu ve çözücü grupları ile hemen hemen aynı seviyede görülmesi, kullandığımız kalpain inhibitörünün etkinliğini göstermektedir. Bu durum doku hasarını azaltmayı amaçladığımız çalışmamızın odak noktasıdır. Çünkü miyokard infarktüsü, hipertansif kardiyomiyopati ve iskemi reperfüzyon hasarını içeren çeşitli patolojik durumlarda kalpain aktivitesinin arttığını gösteren sayısız çalışma yapılmış (10,86,89,121,151,158,168) ve kalpain inhibitörlerinin etkinliği gösterilmiştir. Miyokard dokusunda Sandmann ve arkadaşları kalpain inhibitör CAL 9961 kullanarak kalpain indüklemeli miyokardiyal hasarı sınırlayabilmişlerdir ve miyokard infarktüsü sonrası kardiyak yapısal bütünlük korunmuştur (152). Diğer bir çalışmada ise kalpain inhibitörü olan kalpeptinin kardiyomiyosit kaybını önlemede potansiyel bir terapötik ajan gibi işe

yarayabileceğini ve kardiyak hipertrofi boyunca miyokard yapı ve fonksiyonlarını koruyabileceğini göstermişlerdir (104).

5.2. Katepsin L ve B Aktivitesi Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi

Daha önce yapılan çalışmalar alkolik kalp kası hastalığının gelişiminde, lizozomal enzimlerdeki değişikliklerin katkı sağladığını göstermektedir (134). Etanol serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (162) ve oluşan reaktif oksijen türleri lizozomal destabilizasyona neden olmaktadır (187). Böylece etanol, katepsinlerin lizozomlardan sitozole sızmasına neden olmaktadır (142). Bizim çalışmamızda lizozomal enzimlerden katepsin L ve B düzeyine bakıldı. Lizozomlardan sitozole geçen katepsinleri ölçtüğümüz gibi aynı zamanda lizozomal fraksiyonda kalan katepsinler de ölçüldü. Sitolik fraksiyonun lizozomal fraksiyona oranı lizozomal hasarın belirteci olarak kullanıldı. Alkol grubu katepsin L aktivitesi oranı, kontrol ve çözücü grubuna göre yükselmişti ve bu yükseklik istatistik olarak anlamlıydı. Alkol grubunun katepsin B aktivitesi oranı da kontrol ve çözücü grubuna göre yükselmişti ama bu yükseklik ılımlı düzeydeydi, istatistik olarak anlamlı değildi. Bu sonuçlarımız etanolün lizozomlar üzerindeki hasarlayıcı etkisini ortaya koyar niteliktedir. Bu etki etanolün serbest radikaller üzerinden gerçekleştirdiği lizozomal sızma olabileceği gibi, etanolün oluşturduğu kaspaz aktivasyonunun sonucuyla da olabilir. Çünkü kaspaz 8, kaspaz 9, Bid, ve Bax saflaştırılmış lizozomlardan katepsinlerin salınımını tetikleyebilir. Fakat ne kaspaz 8 ne de bid yalnız başına izole edilmiş lizozomların zarlarını permeabilize edemez. Lizozomal zar bütünlüğündeki kayıp, Bid'in yok edilmesiyle engellenememektedir. Bax ve Bak gibi faktörlerin gerçekten gerekli olduğu düşünülmektedir (79).

Kalpain inhibitörü verdiğimiz alkol + inhibitör grubu katepsin aktivitesi oranlarında belirgin azalmalar gördük. İnhibitör grubunun katepsin L oranı seviyesi alkol grubuna göre istatistik olarak anlamlı miktarda azalmıştı. İnhibitör grubunun katepsin B oranı seviyesi de alkol grubuna göre azalmıştı ama bu düşüş ılımlı düzeydeydi ve istatistik olarak anlamlı değildi. İnhibitör verilen gruplarda

lizozomlardan sitozole geçen katepsinlerin miktarında azalmalar görülmesi kalpain inhibitörünün faydalı etkilerini göstermektedir. Çünkü kalpainler aktive olduklarında lizozomların zarlarına saldırılmaktadır ve lizozomlardan katepsinlerin sitozole sızmasına neden olmaktadır (166). Katepsin kalpain hipotezi denilen bu olayın, kalpain inhibitörü kullanımı ile engellenebileceğini sonuçlarımız göstermektedir.

Lizozomal enzimlerin hücre sitoplazmasına salınması bir hücre içi yıkım olayları döngüsünü başlatıyor olabilir. Bu lizozomal enzimler: 1. Doğrudan mitokondrilere saldırarak sitokrom c salınımını uyarabilir. 2. Doğrudan ya da dolaylı olarak mitokondrial ROS oluşumu artışına (ve lizozomal destabilizasyonda oksidant kaynaklı artışa) sebep olabilir. 3. Hem mitokondri hem de lizozomlara saldırarak fosfolipaz A2 gibi litik proenzimleri aktive edebilir. 4. Bid ve/veya diğer apoptotik proteinleri aktive edebilir. 5. Direkt olarak pro-kaspazları aktive edebilir (187).

5.3. Mitokondriden Sitokrom C Salınımı Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi

İskelet kası hücreleri gibi kardiyomiyositlerin de çok enerji gereksinimleri vardır ve bu yüzden yüksek yoğunlukta mitokondri içerirler. Kardiyomiyosit mitokondrileri üzerindeki bu fazla iş yükünün bir sonucu olarak (52) veya etanol gibi kimyasal maddelerin tüketilmesiyle proapoptotik faktörler sitozole sızmaktadır (131) ve bunlar apoptozu indüklemektedir. Böylece bu hücrelerde mitokondri bağımlı apoptoz uyarılmaktadır. Son çalışmalar göstermektedir ki sitokrom c aracılı apoptoz kardiyomiyositlerde çok önemlidir (52). Sitokrom c salınımı, kaspaz 9 ve 3'ün aktivasyonu ve apoptoza götüren nükleer fragmentasyon ile sonuçlanır (20). Biz çalışmamızda etanolün mitokondri üzerinde etkilerini gözlemek amacıyla ve mitokondri sağlamlığını belirleyebilmek için mitokondriden sitozole sızan sitokrom c salınımını elisa yöntemiyle ticari kit kullanarak ölçtük. Sitolde yaptığımız ölçümlerin bir sağlaması olarak 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 (20) bizim çalışmamızda da bu

oran mitokondrial hasarı temsil etmektedir ve alkol grubunda görülen yükseklik ile etanolün mitokondri üzerindeki etkisini belirlemiştir. Kalpain inhibitörünün etkisiyle alkol + inhibitör grubu sitokrom c salınımının ılımlı düzeyde azaldığı görülmektedir. Bu azalma kalpain inhibitörünün mitokondrial kalpainler üzerindeki etkisinden dolayı olabilir. Çünkü mitokondrial kalpainlerin aktivasyonunun sitokrom c salınımına yol açtığını gösteren yayınlar vardır (85). İnhibitör grubu sitokrom c sonuçları, kontrol ve çözücü grubuna yakın düzeyde görülmüştür ve istatistik olarak bir fark görülmemiştir. Etanol verilmeyen kontrol ve çözücü grubunda sitokrom c salınımı oranları düşük düzeyde kalmıştır.

5.4. Kaspaz 3 Aktivitesi Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi

Sitozole salınan sitokrom c, kaspaz 3'ün aktivasyonu için gerekli kaspaz 9 aktivasyonunda görev aldığı için (52) bu sonuçlarımız kaspaz 3 sonuçlarını da etkilemiştir. Alkol grubunda görülen sitokrom c oranlarındaki yüksekliği alkol grubundaki kaspaz 3 yüksekliği takip etmiştir. Kaspaz 3 aktivitesini biyokimyasal ve immünohistokimyasal olarak iki farklı metotla ölçtük. Biyokimyasal olarak ölçtüğümüz kaspaz 3 aktivitesi alkol grubunda, diğer gruplara göre daha yüksekti ama bu yükseklik ılımlı düzeydeydi ve istatistik olarak anlamlı değildi. İmmünohistokimyasal metotla çalıştığımız kaspaz 3 aktivitesi ise alkol grubunda çok yüksekti ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı bir fark oluşmuştu. Alkol grubunun kaspaz 3 düzeyinin yüksek olmasının diğer bir sebebi ise etanolün kaspaz 3 aktivitesi üzerindeki etkisi olabilir. Çünkü etanolün kaspaz 3 aktivitesini indükleyerek hücre ölümüne neden olduğunu gösteren birçok araştırma vardır (28,88,122,184). Biyokimyasal metotla ölçtüğümüz inhibitör grubunun kaspaz 3 aktivitesi alkol grubuna göre daha düşüktü ve kontrol grubuna çok yakın düzeydeydi, istatistik olarak aralarında anlamlı bir fark yoktu. İmmünohistokimyasal metotla elde edilen kaspaz 3 aktivitesi sonuçlarına göre; alkol grubu ile karşılaştırıldığında inhibitör grubunda kaspaz 3 aktivitesi daha düşüktü ve bu düşüş istatistik olarak anlamlı düzeydeydi. İnhibitör grubunda görülen kaspaz 3 aktivitesi düzeyindeki azalma kalpain inhibitörünün hücre ölümü üzerindeki koruyucu etkisini göstermektedir. Çünkü daha önce yapılmış çalışmalarda kalpainlerin prokaspaz 3'ü aktive ettiği gösterilmiştir ve kalpain inhibitörleri kullanarak kalpainlerin ve dolaylı

olarak da kaspaz 3'ün aktivasyonunun engellenmesi ile hücre ölümü üzerindeki koruyucu etkisi gösterilmiştir (140,165).

5.5. DNA Fragmentasyonu Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi

Birçok yaygın kardiyak hastalıklarının önemli bir unsuru olarak kabul görmüş gerçek apoptozdur. Kardiyak miyositlerinin apoptozu hem iskemik hemde iskemik olmayan kardiyomiyopatilerin bir özelliğidir. Kardiyak miyositlerin kaybı normal yaşlanmayla da görülmektedir (77). Çalışmamızda etanole maruz kalan kalbin sol ventrikülünde oluşan apoptotik hücre ölümü ile ilgili birçok kanıtlar sunuyoruz; kalpain aktivitesi, katepsin oranları, kaspaz 3 aktivitesi ve sitokrom c salınımı gibi. Bütün bu kanıtların bir araya gelerek ortaya çıkardıkları sonuç olan DNA fragmentasyonunu biz TUNEL metoduyla histokimyasal olarak belirledik. DNA kırıklarının olduğu hücreler TUNEL pozitif olarak belirlendi ve tüm hücrelere oranlanıp yüzdeleri hesaplandı. Etanol verdiğimiz alkol grubunun sol ventrikül dokusunda DNA fragmentasyonunun kontrol ve çözücü grubuna göre çok fazla olduğu görüldü ve artış istatistik olarak anlamlıydı. Bu sonuçlarımız akut etanol tüketiminin neden olduğu DNA fragmentasyonunu gösteren birçok çalışmayla da uyumludur (4,64,69,102,109,188). Kalpain inhibitörü verilen alkol + inhibitör grubunda görülen TUNEL pozitif hücrelerin miktarında alkol grubuna göre istatistik olarak belirgin bir azalma görülmüştür. DNA fragmentasyonunda görülen bu azalma hücre ölümü üzerinde kalpain inhibitörünün etkisini göstermektedir. Kalpain inhibitörünün bu etkisini birçok mekanizma ile açıklayabiliriz. Kalpain aktivasyonunun inhibisyonu ile kalpainlerin kaspaz 3 aktivasyonu üzerindeki etkisini (140,165) azaltmış olabilir. Mitokondrial kalpainlerin mitokondri aracılı hücre ölümünde etkinliği çok fazladır (85) ve kalpain inhibitörü kullanımı bu yolu etkilemiş olabilir. Ayrıca hücre ölümünde önemli rolü olan kalpainlerin lizozomlar üzerindeki etkisi de (166) kalpain inhibitörleri ile engellenmiş olabilir.

5.6. Serum BNP Düzeyleri Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi

Alkolün epinefrin ve norepinefrin düzeyini artırarak nörohormonal sistemi etkilediği görülmüştür (131). Devamlı ve yüksek norepinefrin düzeyi miyokard üzerinde miyosit hipertrofisi, toksitite ve apoptozu içeren yan etkiler gösterir (19). Oluşabilecek bu hipertrofi, yüksek alkol intoksikasyonunda kalp ağırlığının vücut ağırlığına olan oranın artmasındaki sebeplerdendir (131). Akut alkol intoksikasyonu takiben kardiyak hipertrofisinin uyarılması üzerinde adrenalin ve noradrenalinin etkisinin olduğunu Adams ve Hirst çalışmalarında göstermiştir (1). Hayvan ve insan modellerinde nörohormonlar kalp üzerinde olumsuz etkiler göstermektedir. Renin anjiotensin sistemi ve natriüretik peptidlerin düzeyi hastalığın gidişatı ile koreledir fakat bu kalp hastalıklarının bir nedeni olmaktan ziyade bir sonucudur (72). Alkol kullanımını müteakip sol ventrikülün yapısı ve fonksiyonunda bir değişiklik olup olmadığını araştıran Kim ve arkadaşları renin-anjiyotensin sistemin aktivasyonunun artması tarafından alkolün direkt neden olduğunu görmüşlerdir. Onlar sol ventrikül dokusu anjiyotensin-konverting enzim (ACE) düzeyini ve plazma ACE düzeyini ölçmüşlerdir (90). Sol ventrikül miyokardiumundaki natriüretik peptidler ANP ve BNP kalp duvarında artan bir gerilimi yansıtır (130).

Çalışmamızda miyokard hasarının belirteçlerinden olan BNP düzeyi 12. saatte alınan kanların serumunda ölçüldü. Yüksek miktarda etanol verilen alkol grubunun serum BNP düzeylerinin çok önemli düzeyde arttığını gördük ve bu artış istatistik olarak anlamlıydı. BNP'nin regülasyonunda etanol tüketiminin etkisini araştıran Wigle ve arkadaşları da plazma BNP düzeylerini kontrol grubuna göre yüksek olduğunu görmüşlerdir (175). Guillaume ve arkadaşları etanol verdikleri sıçanların atrial BNP konsantrasyonlarında yükselme görmüşlerdir (60). Kalpain inhibitörü verdiğimiz inhibitör + alkol grubu serum BNP düzeyleri alkol grubuna göre düşmüştü ve bu düşüş istatistik olarak anlamlıydı. Böylece kalpain inhibitörü kullanımının etkisi serum BNP düzeylerinde de görülmektedir.

5.7. Serum CK-MB Düzeyleri Üzerinde Etanol ve Kalpain İnhibitörünün Etkisi

CK hem iskelet hem de kardiyak kasında mevcuttur ve miyosit nekrozu oluştuğunda kana salınır. Total CK, miyokardiyal nekrozun bir sensitiv markıdır ama spesifitesi çok azdır çünkü iskelet kasında yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (138). Miyokardiyumdaki total CK aktivitesinin %10-30'u CK-MB dir. Kalbe ait damarların kan akımının kesilmesi ile oluşturulan akut miyokardiyal hasardan 5 saat sonra CK-MB'nin 5 kat arttığı tespit edilmiştir (7). Yeni kardiyak markırlarla karşılaştırıldığında CK-MB, klinik uygulamada yüksek yararlılığı olan altın standarttır. İlk semptomlardan sonra ilk 24 saatteki ölçümlerin miyokardiyal hasar yönünden yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu iddia edilmektedir (138). Bizim CK-MB ölçümlerimizde akut etanol toksitesini oluşumundan oniki saat sonra alınan kanların serumlarında yapılmıştır. Etanol verilen alkol grubunda görülen yüksek CK-MB aktivitesi kardiyomiyopati tablosunu göstermektedir. Fakat alkol + inhibitör grubunda görülen yüksek CK-MB aktivitesi etanolün oluşturduğu kardiyomiyopatiye karşı verilen inhibitör tedavisinin başarılı olmadığını göstermektedir. Miyokardiyal nekrozun bir belirteci olan CK-MB üzerinde kalpain inhibitörünün etkisinin görülmemesi bir hayli ilginçtir. Bunun sebebinin zaman ile ilgili olabileceğini düşünüyoruz. Çünkü onikinci saatte alınmış olan kanlar alkol grubunun en yüksek değerini temsil etmiyor olabilir ve düşme eğiliminde olduğu değerleri gösterebilir.

5.8. Işık Mikroskobu İncelemeleri

Işık mikroskobu incelemesi nekroz, ödem, miyofibriler dejenerasyon, hemoraji ve inflamasyona göre yapılmıştır. Alkol grubu nekroz miktarı kontrol grubuna göre çok fazla görülmüştür. Alkol grubu ile karşılaştırıldığında ışık mikroskobu görüntülerine göre alkol + inhibitor grubunda nekroz açısından belirgin bir azalma görülmüştür. Bu bize kalpain inhibitörünün nekroz üzerindeki etkisini göstermektedir. Çünkü kalpainlerin şiddetli aktivasyonu nekroza neden olmaktadır (179). Kalpain inhibitör 1 ile kalpain aktivasyonunun azaltılması nekrotik hücre ölümünü engelleyebileceğini ortaya koymaktadır. Miyofibriler dejenerasyon bakımından ışık mikroskobu sonuçları diğer

gruplara göre alkol grubunda önemli bir artış olduğunu göstermiştir. Alkol grubu ile kıyaslandığında alkol + inhibitör grubundaki miyofibriler dejenerasyonda azalma, kalpain inhibitörünün tedavi edici etkisinin olabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlara ek olarak ödem, hemoraji ve infiltrasyon yönünden de kalp kası dokuları incelendiğinde, kalpain inhibitörü verilen grupta bir iyileşme görülmektedir. Fakat bu iyileşme ılımlı düzeydedir, istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark oluşturmamıştır.

5.9. Miyokardiyum Üzerinde Kalpain Aktivasyonu ve İnhibisyonunun Etkisi

Kalpain aktivasyonu, kasılma bozukluğuna ve subsellüler yeniden şekillenmeye neden olacak sayısız spesifik kardiyomiyosit proteinlerinin yarılmasıyla sonuçlanır (157). Kalpain aktivasyonu ve miyofibriler protein yarılmasını sıklıkla apoptotik yolların aktivasyonu takip eder. Hücre ölümünden önce kardiyomiyositlerde kasılma bozukluğu oluşur (32). Kalpainların diğer hedefleri endoplazmik retikulumun çeşitli düzenleyici proteinlerini, sarkolemma proteinlerini, fokal adhezyon kompleks proteinlerini ve sitoskeletal proteinlerini içerir (103). Bu yüzden programlı hücre prosesi, kasılma fonksiyonu hakkındaki zararlı etkileri nedeniyle iki yolla beklenir. İlki hücre ölümü prosesinden önce yapısal ve kasılma proteinlerinin her ikisinin de parçalayabilen kalpain ve kaspazlar gibi proteazların aktivasyonu aracılığı ile olur, hücrelerin kasılma kaybı ölümlerinden hemen öncedir. İkincisi kalpteki kardiyomiyositlerin sayısındaki azalma, miyokardiyumda kalan yaşayanlar üzerinde iş yükünün artışı tarafından bir sarsıntıya neden olacaktır; bu sırasıyla miyokardiyumdaki patolojik değişikliklere katkı sağlar, böylece ventriküler fonksiyonların kaybına neden olur (93). Enfarktüs sonrası miyokardiyumda görülen programlı hücre ölümü ile kalp bozukluğunun kötüleşmesi koraledir (103). Bu bilgiler ışığında ventriküler geometri ve fonksiyonunun korunması için potansiyel bir mekanizma olarak; kalpain aracılı kardiyomiyosit ölümünün engellenmesi yoluyla yaptığımız miyokard hasarı kalpain inhibitörü tedavisinin başarısını görüyoruz.

Etanolla muamele edilen farelerin miyokardiyumunun sitozolünde sitokrom c ve prokaspaz 9'un artışı etanol indüklemeli apoptozda mitokondrial hücre ölümü yolağının esansiyel rolünü göstermektedir (61). Alkolik kardiyomiyopatide görülen apoptozun mekanizması ile ilgili farklı bir görüş ise aşırı alkol tüketimi ROS oluşumuna bağımlı

oksidatif stres aracılığı ile kalpain 1'in aktivasyonuna neden olmaktadır. Kalpain 1'in aktivasyonu kardiyomiyositlerde apoptoza neden olur. Oksidatif stres, sarkolemmal Ca^{+2} -pompa ATPaz'ı ve NaK ATPaz'ı üzerinde hasar oluşturabilir. Böylece meydana gelen Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış ile kalpain aktivasyonu indüklenir. Diğer bir görüşe göre; kalpainler etkisini Bcl-xL, Bcl-2, Bid, Bax, NF-kB, ve p53 gibi pro ve anti apoptotik moleküller üzerinden gerçekleştirir. Alkol tüketen deney gruplarında kalpainlerin inhibisyonu Bcl-xL ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. Bu sayede Bad ekspresyonunun bloklanması ile kardiyomiyositlerde apoptoz engellenmektedir. Kalpain aktivasyonu kardiyomiyositlerde nekroza katkı sağladığı için, kalpain inhibisyonu bu yönde de etki gösterecektir (78). Kalpain aktivasyonu ve inhibisyonunun apoptoz ve nekroz üzerindeki bu etkileri bizim sonuçlarımızla uyum göstermektedir.

Ventriküler geometri ve fonksiyonunun korunması için potansiyel bir mekanizma olarak; kalpain aracılı kardiyomiyosit ölümünün engellenmesini amaçlayan miyokard hasarında kalpain inhibitörü tedavisi yeni çalışma modellerine, moleküler çalışmalara yeni yaklaşımlar getireceği ve tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkı sunacağı sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada biyokimyasal ve histolojik testler kullanılarak, akut yüksek doz alkolün kalp dokusu üzerinde oluşturduğu hasarla meydana gelen kardiyomiyopati belirlenmiştir. Miyokard hasarı serum belirteçleri CK-MB ve BNP düzeylerinin yükseldiği görülmüştür. Kalp dokusunda biyokimyasal metotlarla ölçülen kalpain, katepsin ve kaspaz 3 aktiviteleri ile sitokrom c salınımının arttığı ve böylece hücre ölümü yolağının aktivasyonu gözlenmiştir. Histolojik metotlarla incelediğimiz kaspaz 3 aktivitesi, DNA fragmantasyonu ve ışık mikroskobu incelemeleri, biyokimyasal verilerimizi destekler niteliktedir. Bu sonuçlarımız alkolün neden olduğu kardiyomiyopati modelini kanıtlar özelliğindedir. Ayrıca literatürde yer alan alkol indüklemeli kardiyomiyopati bilgilerini desteklemekte ve onlara katkı sağlamaktadır.

Bu çalışmada elde edilen veriler, alkol indüklemeli kardiyomiyopati 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 neden olduğu hücre ölümü belirteçlerinden kalpain, katepsin ve kaspaz aktiviteleri ile sitokrom c salınımında azalmalar görülmüştür. Benzer şekilde immünohistokimyasal kaspaz 3 aktivitesinde, DNA fragmantasyonu ve ışık mikroskobu incelemelerinde morfolojik olarak belirgin iyileşmeler görülmüştür. Böylece kalpain inhibitörlerinin alkolik kardiyomiyopati gibi farklı bir alanda kardiyoprotektif etkinliği tespit edildi ve bu bulguların sonraki çalışmalar için bir basamak oluşturacağına inanıyoruz.

Sonuç olarak, alkol ve diğer nedenlerin indüklediği kardiyomiyopati modellerinde miyokard hasarının azaltılmasında kalpainlerin inhibisyonunun kardiyoprotektif etkisinin olabileceğini sorgulayan *in-vivo* hayvan modelleri, *in-vitro* hücre modelleri ve ileri moleküler çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Adams, M.A., Hirst, M., 1986, Ethanol-induced cardiac hypertrophy: correlation between development and the excretion of adrenal catecholamines, *Pharmacol Biochem Behav*, 24, 33-38p.
2. Akvardar, Y., Uçku, R., 2010, Alkol kullanım sorunları nasıl önlenir? Alkol kullanım bozukluklarının tanı ve tedavisinde kısa müdahale yaklaşımı, *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 11, 51-59s.
3. Altunkaynak, B.Z., Özbek, E., 2008, Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6, 2, 93 -104p.
4. Andrews, D.L., Williams, G.S., Mahoney, J.C., West, J.R., 1999, DNA fragmentation during exposure of rat cerebella to ethanol under hypoxia imposed in vitro, *J Neurobiol*, 38, 1, 82-92p.
5. Antar, V., 2005, Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan Qvd-Oph'nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi, *Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği*, 37s.
6. Anversa, P., Leri, A., Li, B., Liu, Y., Di Somma, S., Kajstura, J., 2000, Ischemic cardiomyopathy and the cellular renin-angiotensin system. *J Heart Lung Transplant*, 19, 1-11p.
7. Apple, F.S., 1999, Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase-MB, *Clinica Chimica Acta*, 284, 151-159p.
8. Arrington, D.D., Van Vleet, T.R., Schnellmann, R.G., 2006, Calpain 10: a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction, *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, 6, 1159-1171p.
9. Arslan, D.Ö., Korkmaz, G., Gözüaçık, D., 2011, Autophagy: a cellular stres and a cell death mechanism, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2, 4, 184-194p.
10. Arthur, G.D., Belcastro, A.N., 1997, A calcium stimulated cysteine protease is involved in isoproterenol induced cardiac hypertrophy, *Mol. Cell. Biochem*, 176, 241 – 248p.
11. Aslan, F., Apoptozis ve Gözdeki Yeri, *Uzmanlık Tezi. EÜTF*, 5-13s.
12. Bahadır, H., Mehr, M.S., 1990, Sağkan, O., Apoptoz ve kardiyovasküler system, *Türk kardiyoloji dergisi*, 20, 304-309s.
13. Barrett A.J., Kirschke H., 1981 *Methods Enzymology*, 80, 535-538p.
14. Beckemeier, M.E., Bora, P.S., 1998, Fatty acid ethyl esters: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism, *J Mol Cell Cardiol*, 30, 2487-2494p.
15. Berridge, M.J., Bootman, M.D., Lipp, P., 1998, Calcium, a life and death signal. *Nature*, 395, 645 – 648p.
16. Bevers M.B., Neumar R.W., 2008, Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration, *J Cereb Blood Flow Metabol*, 28, 655-673p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

17. Bing R.J., 1978, Cardiac metabolism: its contributions to alcoholic heart disease and myocardial failure, *Circulation*, 58, 965-970p.
18. Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 7, 72, 248-54p.
19. Bristow, MR., 2000, Adrenergic receptor blockade in chronic heart failure, *Circulation*, 101, 558–569p.
20. Burgess, D., H., Svensson, M., Dandrea, T., Gronlund, K., Hammarquist, F., Orrenius, S., and 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, 256–261p.
21. Burns, M.J., Dickson, E.W., Sivilotti, M.L., Cuenoud, H., 2001, Phentolamine Reduces Myocardial Injury and Mortality in a Rat Model of Phenylpropanolamine Poisoning, *J Toxicol Clin Toxicol*, 39, 2, 129-34p.
22. Caballería, J., 2003, Current concepts in alcohol metabolism, *Ann Hepatol*, 2, 2, 60-68p.
23. Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Dinotta, F., Bates, T.E., Calvani, M., Stella A.M.G., 2001, Effects of acetyl-L-carnitine on the formation of fatty acid ethyl esters in brain and peripheral organs after short-term ethanol administration in rat. *Neurochem Res*, 26, 167-174p.
24. Capasso, J.M., Li, P., Guideri, G., 1992, Myocardial mechanical, biochemical and structural alterations induced by chronic ethanol ingestion in rats, *Circ Res*, 71, 346–356p.
25. Ceylan, C., 2005, Akut Miyokard İnfarktüsünde Serum Nt-Probnp Düzeyi Ve Sol Ventrikül Ejeksiyon Fraksiyonu İlişkisi, *Uzmanlık Tezi, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi*, 14-17s
26. Chandrasekhar, R., Huang, H.M, Sun, G.Y., 1988, Alterations in rat brain polyphosphoinositide metabolism due to acute ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther*, 245, 1, 120-123p.
27. Chatterjee, P.K., Brown, P.A., Cuzzocrea, S., Zacharowski, K., Stewart, K.N., Mota-Filipe, H., McDonald, M.C., Thiernemann, C., 2001, Calpain inhibitor-1 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *Kidney International*, 59, 3, 2073–2083p.
28. Chen, D.B., Wang, L., Wang, P.H., 2000, Insulin-like growth factor I retards apoptotic signaling induced by ethanol in cardiomyocytes, *Life Sci*, 67, 1683-1693p.
29. Chwieralski, C.E., Welte, T., Bühling, F., 2006, Cathepsin-regulated apoptosis, *Apoptosis*, 11, 2, 143-149p.
30. Clapham, D.E., 1995, Calcium signalling, *Cell*, 80, 259 -268p.
31. Colantoni, A., Idilman, R., De Maria, N., La Paglia, N., Belmonte, J., Wezeman, F., Emanuele, N., Van, Thiel, D.H., Kovacs, E.J., Emanuele, M.A., Hepatic apoptosis and proliferation in male and female rats fed alcohol: role of cytokines, *Alcohol Clin Exp Res*, 2003, 27, 1184-1189p.
32. Communal, C., Sumandea, M., De Tombe, P., Narula, J., Solaro, R.J., Hajjar, R.J., 2002, Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes, *Proc Natl Acad Sci*, 99, 6252–6256p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

33. Condorelli, G., Morisco, C., Stassi, G., Notte, A., Farina, F., Sgaramella, G., De Rienzo, A., Roncarati, R., Trimarco, B., Lembo, G., 1999, Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat, *Circulation*, 99, 3071-3078p.
34. Coultas, L., Stasser, A., 2003, The role of the Bcl-2 protein family in cancer, *Semin Cancer Biol*, 13, 115–123p.
35. Cuzzocrea, S., McDonald, M.C., Mazzon E., Siriwardena D., Serraino, I., Dugo, L., Britti, D., Mazzullo, G., Caputi, A.P., and Thiemermann, C., 2000, Calpain Inhibitor I Reduces the Development of Acute and Chronic Inflammation *Am J Pathol*, 157, 6, 2065–2079p.
36. Çelik, S., Görgülü Ş., Tezel, T., 2002, Alkol Tüketimi ve Koroner Kalp Hastalığı, *Türk Kardiyol Dern Arş*, 30, 634-639p.
37. Dancy, M., Maxwell, J.D., 1986, Alcohol and dilated cardiomyopathy, *Alcohol Alcohol*, 21, 185-198p.
38. Dargelos, E., Poussard, S., Brule, C., Daury, L., Cottin, P., 2008, Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: A possible role of calpains in sarcopenia, *Biochimie*, 90, 359-368p.
39. Delbridge, L.M., Connell, P.J., Harris, P.J., Morgan, T.O., 2000, Ethanol effects on cardiomyocyte contractility, *Clinical Science*, 98, 401–407p.
40. Diker, E., 2009, Kardiyomiyopatiler 11. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi 30 Eylül 4 Ekim Medicana International Ankara Hastanesi, Kardiyoloji Bölümü, Ankara
41. Dispersyn, G.D., Borgers, M., 2001, Apoptosis in the heart: about programmed cell death and survival, *News Physiol Sci* 16, 41-47p.
42. Donohue, T.M., Curry-McCoy T.V., Nanji A.A, Kharbanda, K.K., Osna, N.A., Radio, S.J., Todero, S.L., White, R.L., Casey, C.A., 2007, Lysosomal leakage and lack of adaptation of hepatoprotective enzyme contribute to enhanced susceptibility to ethanol-induced liver injury in female rats, *Alcohol Clin Exp Res*. 31, 11, 1944-52p.
43. Eriksson, C.J.P., 2001, The role of acetaldehyde in the actions of alcohol, *Alcohol Clin Exp Res*, 25, 15-32p.
44. Fenwick, M.A., Hurst, P.R., 2002, Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles, *Reproduction*, 124, 5, 659-665p.
45. Fernandez-Sola, J., Estruch, R., Grau, J.M., Pare, J.C., Rubin, E., Urbano-Marquez, A., 1994, The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy. *Ann Intern Med*, 1, 120, 7, 529-36p.
46. Filippatos, G.S., Gangopadhyay, N., Lalude, O., Parameswaran, N., Said, S.I., Spielman, W., Uhal, B.D., 2001, Regulation of apoptosis by vasoactive peptides, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281, 749-761p.
47. Finkel, E., 2001, The mitochondrion: Is it central to apoptosis, *Science*, 292, 5517, 624–626p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

48. Ge, J., Zhao, G., Chen, R., Li, S., Wang, S., Zhang, X., Zhuang, Y., Du, J., Yu, X., Li, G., Yang, Y., 2006, Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy, *Eur J Heart Fail*, 8,3,284-289p.
49. Gerschenson, L.E., Rotello, R.J., 1992, Apoptosis: a different type of cell death, *FASEB J*, 6, 2450–2455p.
50. Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjel, A.A., 2005, Targeting apoptosis pathways in cancer, *CA Cancer J Clin*, 55,178–194p.
51. Giguere, C.J., Covington, M.D., Schnellmann, R.G., 2008, Mitochondrial calpain 10 activity and expression in the kidney of multiple species, *Biochem Biophys Res Commun*, 366, 1, 258-62p.
52. Gill, C., Mestril, R., Samali, A., 2002, Losing heart: the role of apoptosis in heart disease a novel therapeutic target. *FASEB J*, 16, 135-146p.
53. Gobbi, P., Castaldo, P., Minelli, A., Salucci, S., Magib, S., Corcione, E., Amoroso, S., 2007, Mitochondrial localization of Na⁺/Ca²⁺ exchangers NCX1–3 in neurons and astrocytes of adult rat brain in situ, *Pharmacol Res*, 56, 556–565p.
54. Goldberg, I.J., Mosca, L., Piano, M.R., Fisher, E.A., 2001, Wine and Your Heart. A science advisory for healthcare professionals from the nutrition committee, council on epidemiology and prevention, and council on cardiovascular nursing of the American Heart Association, *Circulation*, 103, 472-75p.
55. Gozuacik, D., Kimchi, A., 2007, Autophagy and cell death, *Curr Top Dev Biol*, 78, 217-25p.
56. Grunnet, L.G., Aikin, R., Tonnesen, M.F., Paraskevas, S., Blaabjerg, L., Størling, J., Rosenberg, L., Billestrup, N., Maysinger, D., Mandrup-Poulsen, T., 2009, Proinflammatory Cytokines Activate the Intrinsic Apoptotic Pathway in β -Cells, *Diabetes*, 58, 8, 1807-15p.
57. Grutkoski, P.S.C., Albina, J., Biffi, W., et al. 2005, Apoptosis in the critically ill, In: Fink MP, Vincent JL, Kochanek PM, eds. *Textbook of Critical Care*, 5th ed., 195–201p.
58. Guan, Zp, Lui, C.Y., Morkin, E., Bahl, J.J., 2004, Oxidative stress and apoptosis in cardiomyocyte induced by high-dose alcohol. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44, 6, 696-702p.
59. Guerra, S., Leri, A., Wang, X., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Kajstura, J., Anversa, P., 1999, Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res*, 85, 856-866p.
60. Guillaume, P., Jankowski, M., Gutkowska, J., Gianoulakis, C., 1996b, Effect of chronic moderate ethanol consumption on heart brain natriuretic peptide, *Eur J Pharmacol*, 316, 49-58p.
61. Guo, R., Ren, J., 2010, Alcohol dehydrogenase accentuates ethanol-induced myocardial dysfunction and mitochondrial damage in mice: role of mitochondrial death pathway. *PLoS One*, 18, 5, 1, 8757p.
62. Guo, W., Baluda, M.A., Park, N.H., 1997, Ethanol upregulates the expression of p21 WAF1/CIP1 and prolongs G1 transition via a p53-independent pathway in human epithelial cells, *Oncogene*, 15, 1143-1149p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

63. Güzel, S., 2008, Akut Miyokard İnfarktüsünde Serum Matriks Metalloproteinaz – 9 Düzeyleri, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 15s.
64. Han, JY., Joo, Y., Kim, YS., Lee, YK., Kim, HJ., Cho, GJ., Choi, WS., Kang, SS., 2005, Ethanol induces cell death by activating caspase-3 in the rat cerebral cortex, *Mol Cells.*, 31, 20, 2, 189-95p.
65. Harcombe, A.A., Ramsay, L., Kenna, J.G., Koskinas, J., Why, H.J., Richardson, P.J., Weissberg, P.L., Alexander, G.J., 1995, Circulating antibodies to cardiac protein- acetaldehyde adducts in alcoholic heart muscle disease, *Clin Sci*, 88, 263-268p.
66. Harıkcı, E.M., Erbaycu, A.E., Çakan, A., Dereli, M.Ş., Özsöz, A., Kalenci, D., 2001, The evaluation of serum creatin kinase (total-CK) and creatin kinase MB (ck-MB) levels in lung cancer, *Solunum*, 3, 300-305p,
67. Hengartner, M.O., 2000, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407, 6805, 770–776p.
68. Hintz, K.K., Relling, D.P., Saari, J.T., Borgerding, A.J., Duan, J., Ren, B.H., Kato, K., Epstein, P.N., Ren, J., 2003, Cardiac overexpression of alcohol dehydrogenase exacerbates cardiac contractile dysfunction, lipid peroxidation, and protein damage after chronic ethanol ingestion, *Alcohol Clin Exp Res*, 27, 1090-1098p.
69. Holownia, A., Ledig, M., Braszko, J.J., Menez, J.F., 1999, Acetaldehyde cytotoxicity in cultured rat astrocytes, *Brain Res*, 833,202-208p.
70. Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Karl, I.E., 2003, Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand J Infect Dis*, 35, 9, 585–592p.
71. Hunter, J.J., Chien, K.R., 1999, Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure, *N Engl J Med*, 341, 1276-1283p.
72. Iacovoni, A., De Maria, R., Gavazzi, A., 2010, Alcoholic cardiomyopathy, *J Cardiovasc Med*, 11, 12, 884-92p.
73. Imhof, A., Koenig, W., 2003, Alcohol inflammation and coronary heart disease, *Addict Biol*, 8, 271-277p.
74. İşlekel, H., İşlekel, S., Güner, G., Ozdamar, N., 1999, Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia–reperfusion, *Brain Res*, 2, 843, 18-24p.
75. İltter, T., Tekin, F., 2005, Alkol Metabolizması Güncel Gastroenteroloji 9/1
76. Jänkälä, H., 2005, The Effects Of Ethanol And Acetaldehyde On Apoptosis And Expression Of Modulatory Genes In Heart, Helsinki
77. Jänkälä, H., Eklund, KK., Kokkonen, JO., Kovanen, PT., Linstedt, KA., Härkönen, M., Mäki, T., 2001, Ethanol infusion increases ANP and p21 gene expression in isolated perfused rat heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 23, 281, 2, 328-333p.
78. Jing, L., Jin, C.M., Li, S.S., Zhang, F.M., Yuan, L., Li, W.M., Sang, Y., Li, S., Zhou, L.J., 2012, Chronic alcohol intake-induced oxidative stress and apoptosis: role of CYP2E1 and calpain-1 in alcoholic cardiomyopathy, *Mol Cell Biochem*, 359, 1, 2, 283-292p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

79. Johansson, A.C., Appelqvist, H., Nilsson, C., Kågedal, K., Roberg, K., Ollinger, K., 2010, Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization, *Apoptosis*, 15, 5, 527-540p.
80. 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, 739-48p.
81. Jung, F., Weiland, U., Johns, R.A., Ihling, C., Dimmeler, S., 2001, Chronic hypoxia induces apoptosis in cardiac myocytes: a possible role for bcl-2-like proteins, *Biochem Biophys Res Comm*, 286, 419-425p.
82. Kaasik, A., Rikk, T., Piirsoo, A., Zharkovsky, T., Zharkovsky, A., 2005, Up-regulation of lysosomal cathepsin L and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium, 22, 5, 1023-31p.
83. Kannan, M., Wang, L., Kang, Y.J., 2004, Myocardial Oxidative Stress and Toxicity Induced by Acute Ethanol Exposure in Mice, *Exp Biol Med*, 229, 553-559p.
84. Kar, P., Chakraborti, T., Samanta, S., Chakraborti, S., 2008, Submitochondrial localization of associated mu-calpain and calpastatin, *Arch Biochem Biophys*, 15, 470, 2, 176-186p.
85. 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, 1-7p.
86. Kawada, T., Masui, F., Kumagai, H., Koshimizu, M., Nakazawa, M., Toyono-Oka, T., 2005, A novel paradigm for therapeutic basis of advanced heart failure—assessment by gene therapy, *Pharmacol Ther*, 107, 31–43p.
87. Kaya, M., 2005, Bir Kalpain İnhibitörü Olan Ak295'in Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Uzmanlık Tezi, 32-37s.
88. Kelkar, S., Dong, Q., Xiao, Y., Joshi-Barve, S., McClain, C.J., Barve, S.S., 2002, Ethanol enhances activation-induced caspase-3 dependent cell death in T lymphocytes, *Alcohol Clin Exp Res*, 26, 3, 363-370p.
89. 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. *Eur J Pharmacol*, 528, 124–131p.
90. Kim, S.D., Beck, J., Bieniarz, T., Schumacher, A., Piano, M.R., 2001, A rodent model of alcoholic heart muscle disease and its evaluation by echocardiography, *Alcohol Clin Exp Res*, 25, 457–463p.
91. Klas, B., 2001, Synergistic activation of Caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia, *J. Biologic Chem*, 276, 10191-10198p.
92. Krenz, M., Cohen, M.V., Downey, J.M., 2002, The protective and anti-protective effects of ethanol in a myocardial infarct model, *Ann NY Acad Sci*, 957, 103-114p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

93. Kunapuli, S., Rosanio, S., Schwarz. E.R., 2006, "How do cardiomyocytes die?" Apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes, *J Card Fail*, 12, 381–391p.
94. Kuralay, F., Çavdar, Z., 2006, İnflamatuvar medyatörlere toplu bir bakış, *Genel Tıp Derg*, 16, 3, 143-152s.
95. Leist, M., Jaattela, M., 2001, Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 589-598p.
96. Lemasters, J.J., Qian, T., He, L., Kim, J.S., Elmore, S.P., Cascio, W.E., Brenner, D.A., 2002, Role of Mitochondrial Inner Membrane Permeabilization in Necrotic Cell Death, Apoptosis, and Autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 4, 5, 769-81p.
97. Letai, A., 2005, Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death, *J Clin Invest*, 115, 2648–2655p.
98. Levine, B., Yuan, J., 2005, Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, 115, 2679-88p.
99. Li, S.Y., Fang, C.X., Aberle, N.S. 2nd, Ren, B.H., Ceylan-Isik, A.F., Ren, J., 2005, Inhibition of PI-3 kinase/Akt/mTOR, but not calcineurin signaling, reverses insulin-like growth factor I-induced protection against glucose toxicity in cardiomyocyte contractile function, *J Endocrinol*, 186, 3, 491-503p.
100. Li, S.Y., Li, Q., Shen, J.J., Dong, F., Sigmon, V.K., Liu, Y., Ren, J., 2006, Attenuation of acetaldehyde-induced cell injury by overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) transgene in human cardiac myocytes: role of MAP kinase signaling, *J Mol Cell Cardiol*, 40, 2, 283-94p.
101. Liang, Q., Carlson, E.C., Borgerding, A.J., Epstein, P.N., 1999, A transgenic model of acetaldehyde overproduction accelerates alcohol cardiomyopathy, *J Pharmacol Exp Ther*, 291, 766-772p.
102. Liu, J., Tian, Z., Gao, B., Kunos, G., 2002, Dose-dependent activation of antiapoptotic and proapoptotic pathways by ethanol treatment in human vascular endothelial cells, *J Biol Chem*, 277, 20927-20933p.
103. Mani, S.K., Balasubramanian, S., Zavadzkas, J.A., Jeffords, L.B., 2009, Rivers WT, Zile MR, Mukherjee R, Spinale FG, Kuppuswamy D. Calpain inhibition preserves myocardial structure and function following myocardial infarction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297, 5, 1744-1751p.
104. Mani, S.K., Shiraishi, H., Balasubramanian, S., Yamane, K., Chellaiah, M., Cooper, G., Banik, N., Zile, M.R., Kuppuswamy, D., 2008, In vivo administration of calpeptin attenuates calpain activation and cardiomyocyte loss in pressure-overloaded feline myocardium, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, 314–326p.
105. Martinou, P., Bonora, R., Pagani, F., Calarco, M., 1986, Evaluation of a commercial immunoenzymometric assay kit for creatine kinase MB isoenzyme determination using monoclonal antibodies, *J Clin Chem Clin Biochem*, 24,1, 97-102p.
106. Mattson, M.P., 2000, Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1, 2, 120-9p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

107. Mattson, M.P., 2003, Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders, *Neuromolecular Med*, 3, 2, 65-94p.
108. Mauria, A., O'Brien, DVM and Rebecca Kirby, DVM, DACVIM, DACVECC, 2008, Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18, 6, 572-585p.
109. McAlhany, R.E., West, JR., Miranda, RC., 2000, Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) prevents ethanol-induced apoptosis and JUN kinase phosphorylation, *Brain Res Dev Brain Res*, 119, 209-216p.
110. 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 I reduces the activation of nuclear factor-kB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock, *FASEB J*, 15, 1, 171-186p.
111. McQueen, M.J., Holder, D., El-Maraghi, N.R., 1983, Assessment of the accuracy of serial electrocardiograms in the diagnosis of myocardial infarction, *Am Heart J*, 105, 258-261p.
112. Meehan, J., Piano, MR., Solaro, RJ., et al. 1999, Heavy long-term ethanol consumption induces an alpha-to beta-myosin heavy chain isoforms transition in rat. *Basic Res Cardiol*, 94, 481-488p.
113. Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., et al. 1997, Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes, *Nature*, 385, 353-357p.
114. Monte, S.M., Ganju, N., Banerjee, K., Brown, N.V., Luong, T., Wands, J.R., 2000, Partial rescue of ethanol-induced neuronal apoptosis by growth factor activation of phosphoinositol-3-kinase, *Alcohol Clin Exp Res*, 24, 716-726p.
115. Morgan, H.E., Gordon, E.E., Kira, Y., Chua, H.L., Russo, L.A., Peterson, C.J., McDermott, P.J., Watson, P.A., 1987, Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. *Ann Rev Physiol*, 49, 539-543p.
116. Morishima, N.N.K., Takenouchi, H., Shibata, T., et al. 2002, An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis, *J Biol Chem*, 277, 37, 34287-34294p.
117. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., Editörler: Dikmen, N., Özgünen, T., 2002, *Harper'ın Biyokimyası*. Nobel Kitabevi. 25. Baskı. 278-279s.
118. Nakayama, N., Eichhorst, S.T., Müller, M., Krammer, P.H., 2001, Ethanol-Induced Apoptosis in Hepatoma Cells Proceeds via Intracellular Ca²⁺ Elevation, Activation of TLCK-Sensitive Proteases, and Cytochrome c Release, *Experimental Cell Research*, 269, 202-213p.
119. Niedner, M.F., Foley, J.L., Riffenburgh, R.H., Bichell, D.P., Peterson, B.M., Rodarte, A., 2010, B-type natriuretic peptide: perioperative patterns in congenital heart disease, *Congenit Heart Dis*, 5, 3, 243-55p.
120. Niemelä, O., Parkkila, S., Worrall, S., Emery, P.W., Preedy, C.R., 2003, Generation of aldehyde-derived protein modifications in ethanol-exposed heart. *Alcohol Clin Exp Res*, 27, 1987-1992p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- 121.Okada, K., Minamino, T., Tsukamoto, Y., Liao, Y., Tsukamoto, O., Takashima, S., Hirata, A., Fujita, M., Nagamachi, Y., Nakatani, T., Yutani, C., Ozawa, K., Ogawa, S., Tomoike, H., Hori, M., Kitakaze, M., 2004, Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis, *Circulation*, 110, 705–712p.
- 122.Olney, JW., Tenkova, T., Dikranian, K., Muglia, LJ., Jermakowicz, WJ., D'Sa C., Roth, KA., 2002, Ethanol-induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain, *Neurobiol Dis*, 9, 2, 205-219p.
- 123.Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P., 2003, Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 7, 552-565p.
- 124.Ozaki, T., Tomita, H., Tamai, M., Ishiguro, S., 2007, Characteristics of mitochondrial calpains, *J. Biochem*, 142, 365–376p.
- 125.Ozaki, T., Yamashita, T., Ishiguro, S., 2008, ERp57-associated mitochondrial micro-calpain truncates apoptosis-inducing factor, *Biochim Biophys Acta*, 1783, 1955–1963p.
- 126.Ozaki, T., Yamashita, T., Ishiguro, S., 2009, Mitochondrial m-calpain plays a role in the release of truncated apoptosis-inducing factor from the mitochondria, *Biochim Biophys Acta*, 1793, 12, 1848-1859p.
- 127.Ozcan, 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, 6s.
- 128.Palomäki, P., Miettinen, H., Mustaniemi, H., Lehto, S., Pyörälä, K., Mähönen, M., Tuomilehto, J., 1994, Diagnosis of acute myocardial infarction by MONICA and FINMONICA diagnostic criteria in comparison with hospital discharge diagnosis, *J Clin Epidemiol*, 47, 659–696p.
- 129.Perl, M., Chung, C.S., Ayala, A., 2005, Apoptosis, *Crit Care Med*, 33, 12, 526–529p.
- 130.Petermann, I., Mayer, C., Stypmann, J., Biniossek, ML., Tobin, DJ., Engelen, MA., Dandekar, T., Grune, T., Schild, L., Peters, C., Reinheckel, T., 2006, Lysosomal, cytoskeletal, and metabolic alterations in cardiomyopathy of cathepsin L knockout mice, *The FASEB Journal*, 20, 1266-1268p.
- 131.Piano, M.R., 2002, Alcoholic cardiomyopathy: incidence, clinical characteristics, and pathophysiology, *Chest*, 121, 1638-1650p.
- 132.Piano, MR., Schwertz, DW., Solaro, RJ., et al. 1999, Effect of pimobenden and isoproterenol in the alcoholic myocardium, *J Cardiovasc Pharmacol*, 33, 237–242p.
- 133.Power, C., Fanning, N., Redmond, H.P., 2002, Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review, *Shock*, 18, 3, 197–211p.
- 134.Preedy, V.R., Pate, V.B., Why, H.J.F., Corbett, J.M., Dunn, M.J., Richardson, P.J., 1996, Alcohol and the heart: biochemical alterations, *Cardiovascular Research*, 3, 1, 139- 147p.
- 135.Preedy, VR., Peters, TJ., 1990, The acute and chronic effects of ethanol on cardiac muscle protein synthesis in the rat in vivo, *Alcohol*, 7, 97–102p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

136. Proskuryakov, S., Gabai, V., Konoplyannikov, A., et al. 2005, Immunology of apoptosis and necrosis, *Biochemistry*, 70, 12, 1310–1320p.
137. Puleo, P.R., Meyer, D., Wathen, C., Tawa, C.B., Wheeler, S., Hamburg, R.J., Ali, N., Obermueller, S.D., Triana, J.F., Zimmerman, J.L., et al. 1994, Use of a rapid assay of subforms of creatine kinase MB to diagnose or rule out MI, *N Engl J Med*, 331, 561–566p.
138. Rajappa, M., Sharma, A., 2005, Biomarkers of cardiac injury: an update, *Angiology*, 56, 6, 677-91p.
139. Rajgopal, Y., Vemuri, M.C., 2002, Calpain activation and a-spectrin cleavage in rat brain by ethanol, *Neuroscience Letters*, 321, 187–191p.
140. 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, 115-126p.
141. Regan, T.J., 1984, Alcoholic cardiomyopathy, *Prog Cardiovasc Dis*, 27, 141-152p.
142. Reilly, M.E., Mantle, D., Salisbury, J., Peters, T.J., Preedy, V.R., 2000, Comparative effects of acute ethanol dosage on liver and muscle protein metabolism, *Biochemical Pharmacology*, 60, 1773–1785p.
143. Ren, J., Brown, R.A., Influence of chronic alcohol ingestion on acetaldehyde-induced depression of rat cardiac contractile function, 2000, *Alcohol Alcohol*, 35,6, 554-560p.
144. Ren, J., Wold, L.E., Natavio, M., Ren, B.H., Hannigan, J.H., Brown, R.A., 2002, Influence of prenatal alcohol exposure on myocardial contractile function in adult rat hearts: role of intracellular calcium and apoptosis, *Alcohol Alcohol*, 37, 30-37p.
145. Repnik, U., Turk, B., 2010, Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death, *Mitochondrion*, 10,6, 662-669p.
146. Riva, C., Chevrier, C., Pasqual, N., Saks, V., Rossi, A., 2001, Bcl-2/bax protein expression in heart, slow-twitch and fast-twitch muscles in young rats growing under chronic hypoxia conditions, *Mol Cell Biochem*, 226, 9-16p.
147. Robbins SL CR., 2005, Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 7th edn. Philadelphia: Elsevier Saunders
148. Rosengren, A., Wilhelmsen, L., Wedel, H., 1988, Separate and combined effects of smoking and alcohol abuse in middle aged men, *Acta Med Scand*, 223, 111-118p.
149. Ruskoaho, H., 2003, Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure, *Endocrine Rev*, 24, 341-356p.
150. Sağlam, İ., 2006, Akut Koroner Sendromda Pro-Bnp Düzeyinin; Ekokardiyografiyle Predikte Edilen İnfarkt Alanı İle İlişkisi, *Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü*, 25-30s.
151. Saitoh, T., Nakajima, T., Takahashi, T., Kawahara, K., 2006, Changes in cardiovascular function on treatment of inhibitors of apoptotic signal transduction pathways in left ventricular remodeling after myocardial infarction, *Cardiovasc Pathol*, 15, 130–138p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

152. 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, 1951-8p.
153. Sarma, J.S.M., Shigeaki, I., Fisher, R., et al., 1976, Biochemical and contractile properties of heart muscle after prolonged alcohol administration, *J Mol Cell Cardiol*, 8, 951-972p.
154. Setshedi, M., Wands, J.R., Monte, S.M., 2010, Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease, *Oxid Med Cell Longev*, 3, 3, 178-185p.
155. Sheeba, M.S., Asha, V.V., 2006, Effect of *Cardiospermum halicacabum* on ethanol-induced gastric ulcers in rats, *J Ethnopharmacol*, 15, 106, 1, 105-110p.
156. Siddiq, T., Salisbury, J.R., Richardson, P.J., Preedy, V.R., 1993, Synthesis of ventricular mitochondrial proteins in vivo: effect of acute ethanol toxicity, *Alcohol Clin Exp Res*, 17, 894-899p.
157. Singh, R.B., Dandekar, S.P., Elimban, V., Gupta, S.K., Dhalla, N.S., 2004, Role of proteases in the pathophysiology of cardiac disease, *Mol Cell Biochem*, 263, 241-256p.
158. Singh, R.B., Dandekar, S.P., Elimban, V., Gupta, SK., Dhalla, NS., 2004, Role of proteases in the pathophysiology of cardiac disease, *Mol Cell Biochem*, 263, 241-256p.
159. Smith, C., Marks, A.D., Lieberman, M., Editörler: İnal, M.E., Atik U., Aksoy N., Haşimi, A., Marks' 2007, *Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım. Güneş Tıp Kitabevi 2. Baskı* 458-471s.
160. Soeda, 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, 4, 1115-1123p.
161. Sparagna, G.C., Jones, C.E., Hickson-Bick, D.L., 2004, Attenuation of fatty acid-induced apoptosis by low-dose alcohol in neonatal rat cardiomyocytes, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287, 5, 2209-2215p.
162. Sun, A.Y., Ingelman-Sundberg, M., Neve, E., Matsumoto, H., Nishitani, Y., Minowa, Y., Fukui, Y., Bailey, S.M., Patel, V.B., Cunningham, C.C., Zima, T., Fialova, L., Mikulikova, L., Popov, P., Malbohan, I., Janebova, M., Nespor, K., Sun, G.Y., 2001, Ethanol and Oxidative Stress, *Alcohol Clin Exp Res*, 25, 5, 237-243p.
163. Suo, M., Hautala, N., Földes, G., Szokodi, I., Tóth, M., Leskinen, H., Uusimaa, P., Vuolteenaho, O., Nemer, M., Ruskoaho, H., 2002, Posttranscriptional control of BNP gene expression in angiotensin II-induced hypertension, *Hypertension*, 1, 39, 3, 803-808p.
164. Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., Sorimachi, H., 2004, Structure, Activation, and Biology of Calpain, *Diabetes*, 53, 1, 12-18p.
165. Swapan, K.R., Edward, L.H., Naren, L.B., 2003, Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors, *Brain Res., Reviews*, 42, 169-185p.
166. Syntichaki, P., Tavernarakis, N., 2003, The Biochemistry Of Neuronal Necrosis: Rogue Biology, *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 672-684p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

167. Szegezdi, E., Fitzgerald, U., Samali, A., 2003, Caspase-12 and ER-stressmediated apoptosis: the story so far. *Ann NY Acad Sci*, 1010, 186–194p.
168. Takahashi, M., Tanonaka, K., Yoshida, H., Koshimizu, M., Daicho, T., Oikawa, R., Takeo, S., 2006, Possible involvement of calpain activation in pathogenesis of chronic heart failure after acute myocardial infarction, *J Cardiovasc Pharmacol*, 47, 413–421p.
169. Tavernarakis, N., 2006, Proteolytic pathways in necrotic cell death, *BTi*
170. Taylor, J.P., Hardy, J., Fischbeck, K.H., 2002, Toxic proteins in neurodegenerative disease, *Science*, 14, 296, 5575, 1991-1995p.
171. Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level, *Nat Rev*, 9, 231–241p.
172. Thomas, G., Haider, B., Oldewurter, H.A., et al., 1980, Progression of myocardial abnormalities in experimental alcoholism, *Am J Cardiol*, 46, 233-41p.
173. Thum, T., Borlak, J., 2000, Gene expression in distinct regions of the heart, *Lancet*, 355, 979-983p.
174. Tsuchida K., Aihara H., Isogai K., Hanada K., 1986, Shibata N. Degradation of myocardial structural proteins in myocardial infarcted dogs is reduced by Ep459, a cysteine proteinase inhibitor, *Biol Chem Hoppe Seyler*, 367,39-45p.
175. Wigle, D.A., Pang, S.C., Watson, J.D., Sarda, I.R., Radakovic, N.N., Flynn, TG., 1993c, Chronic ethanol treatment increases the circulating plasma levels of B-type natriuretic peptide (BNP-45) in the rat. *Am J Hypertens*, 6,719- 722p.
176. Worrall, S., Niemelä, O., Parkkila, S., Peters, T.J., Preedy, V.R., 2001, Protein adducts in type I and type II fi bre predominant muscles of the ethanol-fed rat: preferential localisation in the sarcolemmal and subsarcolemmal region, *Eur J Clin Invest*, 31, 723-730p.
177. Worrall, S., Richardson, P.J., Preedy, V.R., 2000, Experimental heart muscle damage in alcohol feeding is associated with increased amounts of reduced- and unreduced- acetaldehyde, and malondialdehyde-acetaldehyde protein adducts, *Addict Biol*, 5, 421-427p.
178. Yang, X., Chang, H.Y., Baltimore, D., 1998, Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization, *Mol Cell*, 1, 2, 319–325p.
179. Yemişçi, M., Gürer, G., Dalkara, T., 2004, İskemik inmede gelişen fizyopatolojik olaylar, *Türkiye Klinikleri Nöroloji*, 2, 1p.
180. Yerlikaya, A., Dokudur, H., 2009, Protein Yıkımının Önemi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 35, 2, 93-99s.
181. Yılmaz, İ., 2005, Erişkin Ratlarda Deneysel Varikozel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi; Ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi Ve Süresinin Tunel Yöntemi İle Değerlendirilmesi, *Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği*, 12-24s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

182. Yoshikawa, Y., Hagihara, H., Ohga, Y., Nakajima-Takenaka, C., Murata K.Y., 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, 4, 1690-1698p.
183. Yoshimura, M., Yasue, H., Ogawa, H., 2001, Pathophysiological significance and clinical application of ANP and BNP in patients with heart failure, *Can J Physiol Pharmacol*, 79, 730-735p.
184. Young, C., Roth, KA., Klocke, BJ., West, T., Holtzman, DM., Labruyere, J., Qin, YQ., Dikranian, K., Olney, JW., 2005, Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration, *Neurobiol Dis*, 20, 2, 608-614p.
185. Zhang, D., Gaussin, V., Taffet, G.E., Belaguli, N.S., Yamada, M., Schwartz, R.J., Michael, L.H., Overbeek, P.A., Schneider, M.D., 2000a, TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice, *Nat Med*, 6, 556-563p.
186. Zhang, R., Lu, W., Xie, J., Bai, J., Xu, B., 2011, Renalase deficiency in heart failure model of rats--a potential mechanism underlying circulating norepinephrine accumulation, *PLoS One*, 31,6,1, 14633.
187. Zhao, M., Antunes, F., Eaton, J.W., Brunk. U.T., 2003, Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis, *Eur J Biochem.*, 270, 18, 3778-3786p.
188. Zhou, Z., Sun, X., Kang, Y.J., 2001, Ethanol-Induced Apoptosis in Mouse Liver Fas- and Cytochrome c-Mediated Caspase-3 Activation Pathway, *AJP*, 159, 1, 329-338p.
189. Ziegler, U., Groscurth, P., 2004, Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 19, 124–128p.
190. 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 :Kazım Kartkaya
Doğum tarihi ve yeri :01.03.1981 Eskişehir
Uyruğu :TC
Medeni durumu :Evli
İletişim adresleri :Kırmızı Toprak M. Yenice S. Erdoğan Apt. No:6/2
Tel :05053044113

Eğitim Durumu

1987-1992 24 Kasım İlkokulu
1992-1995 Emek Orta Okulu
1995-1999 Eskişehir Sağlık Meslek Lisesi-Laboratuar Bölümü
1999-2001 OGÜ Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu-Tıbbi Laboratuar Bölümü
2001-2003 OGÜ Fen Edebiyat Fakültesi-Biyoloji Bölümü
Yabancı Dili: İngilizce

Mesleki Deneyim

2001-2005 Sosyal Sigortalar Kurumu Başkanlığı Eskişehir Doğum Evi ve Kadın Hastalıkları Hastanesi
2005-2009 Sağlık Bakanlığı Eskişehir Zübeyde Hanım Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi
2009-2011 Sağlık Bakanlığı Eskişehir Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi
2011- 2012 Sağlık Bakanlığı Eskişehir Devlet Hastanesi

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Yok

Yayınlar

Makaleler

1. Ozden, H., Durmaz, R., Kanbak, G., Uzuner, K., Aral, E., **Kartkaya, K.**, Kabay, S.C., Atasoy, M.A., 2011, Erythropoietin prevents nitric oxide and cathepsin-mediated neuronal death in focal brain ischemia, *Brain Res*, 25, 1370, 185-193p.
2. Kanbak, G., Dokumacioglu, A., Tektas, A., **Kartkaya, K.**, Erden, Inal, M., 2009, Betaine (trimethylglycine) as a nutritional agent prevents oxidative stress after chronic ethanol consumption in pancreatic tissue of rats, *Int J Vitam Nutr Res*, 79, 2, 79-86p.
3. Degirmenci, S., Akalin, A., **Kartkaya, K.**, Kanbak, G., 2008, Chronic alcohol consumption augments loss of sialic acid residues and alters erythrocyte membrane charge in type II diabetic patients, *J Biochem Mol Toxicol*, 22, 5, 320-327p.
4. Durmaz, R., Ozkara, E., Kanbak, G., Arslan, O.C., Dokumacioğlu, A., **Kartkaya, K.**, Atasoy, M.A., 2008, Nitric oxide level and adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage, *Turk Neurosurg*, 18, 2, 157-164p.
5. Durmaz, R., Ozden, H., Kanbak, G., Aral, E., Arslan, O.C., **Kartkaya, K.**, Uzuner, K., 2008, The protective effect of dexanabinol (HU-211) on nitric oxide and cysteine protease-mediated neuronal death in focal cerebral ischemia, *Neurochem Res*, 33, 9, 1683-1691p.
6. Kanbak, G., Arslan, O.C., Dokumacioglu, A., **Kartkaya, K.**, Inal, M.E., 2008, Effects of chronic ethanol consumption on brain synaptosomes and protective role of betaine, *Neurochem Res*, 33, 3, 539-544p.

Sözlü Bildiri

1. Kanbak, G., **Kartkaya, K.**, Özçelik, E., Güvenal, A.B., Kabay, S.C., Arslan, G., Durmaz, R. Travmatik Beyin Hasarında, İlimli Akut Alkol Tüketiminin Sistein Proteaz Aracılı Apoptoz ve Nitrik Oksit Üzerinde Nöroprotektif Etkisi. 21. Ulusal Biyokimya Kongresi, 28-31 Ekim 2009, İstanbul
2. 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. **Kartkaya, K.**, Değirmenci, S., Arslan, O.C., Sogut, İ., Kanbak, G. Effects of alcohol consumption on nitric oxide and homocysteine levels of patients with type II diabetes mellitus. XV. Congress of Balkan journal of clinical laboratory. 04-07 September 2007, Antalya
2. Şentürk, H., Bayramoğlu, G., Canbek, M., Kanbak, G., Engür, S., **Kartkaya, K.**, Bayramoğlu, A. Trinitrobenzen Sülfonik Asit (TNBS) ile Meydana Getirilmiş Deneysel

Kolit Nedenli Oksidatif Stres Hasarına Karşı Gallik Asitin Koruyucu Rolünün Belirlenmesi.
20. Ulusal Biyoloji Kongresi. 21-25 Haziran 2010, Denizli

Bilimsel Etkinlikler

PROJE NO	PROJEDEKİ GÖREVİ	PROJE ADI	BAŞLAMA/ BİTİŞ TARİHİ	ALINAN DESTEK MİKTARI(TL)
200611009 (BAP)	Araştırmacı	Tip 2 diyabetiklerde alkol kullanımının membran yapı ve fonksiyonları üzerine olan etkileri., Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi	28.04.2006/ 29.06.2007	1.904,73
200719040 (BAP)	Araştırmacı	Sıçanlarda renal İskemi-Reperfüzyon Sırasında Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Karşı, Gallik asidin Olası Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi., Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi	2007/2009	119.427,00
200711028 (BAP)	Araştırmacı	Kronik Alkol Tüketen Ratlarda Pseudomonas Aeruginosa ile İndüklenmiş Pnömoni Modelinde Biyokimyasal Hücresel Hasar Göstergeleri ve İn-Situ Hücre Ölümü, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi	29.06.2007/ 26.06.2009	15.534,00
200819002 (BAP)	Araştırmacı	Bazı makrofunguslardan Elde Edilen Ekzopolisakkaritlerin (EPS) sıçanlarda alkolik Karaciğer Üzerine Etkileri., Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi	01.02.2008/ 01.02.2011	156.100,81
109S510 (TÜBİTAK 1002)	Araştırmacı	Prenatal Alkol Kullanımı Sonucunda Sıçan Beyinlerinde Oluşan Nöroapoptozun Folik Asit ve Betain ile Önlenmesinin Araştırılması., TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi	15.06.2010/ 15.06.2011	24.395,00
201011003 (BAP)	Araştırmacı	Akut alkol alımına bağlı olarak ortaya çıkan kardiyomyopatiye, bir kalpain inhibitörü olan N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal'ın kardioprotektif etkisi., Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi	11.01.2010/ 11.01.2012	86.347,00

Katılan kurslar ve eğitim :

V. Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim Günleri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi. 27-28 Kasım 2006.



ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :16. 06. 2009
TOPLANTI SAYISI :20
DOSYA KAYIT NUMARASI :113
KARAR NUMARASI :113
ARAŞTIRMACILAR: Prof. Dr.Güngör KANBAK
Prof. Dr. Eriuç ARAL
Kazım KARTKAYA
Dr. Dilek BURUKOĞLU
Arş.Gr. Dr. M.canr ÖZER
Ayşegül OĞLAKÇI

HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI :Sprague Dawley (erkek), 80 adet

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim elemanlarından Prof. Dr. Güngör KANBAK'ın araştırma yürütücüsü olduğu 113/2009 kayıt numaralı ve "Akut alkol alımına bağlı olarak ortaya çıkan kardiyomiyopatide, bir kalpain inhibitörü olan N-Acetyl-L-leucyl-L-norleucinal'ın kardiyoprotektif etkisi"konulu çalışma; Dency Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtilen öneriler doğrultusunda yapılması kabul edilerek onaylanmasına karar verilmiştir

Prof. Dr .Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan GÜNEŞ (Üye)

Yrd.Doç. Dr. Onur ÖZELMAS (Üye)

Vet. Hek. Sümmani DEMİRCİ (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Doç. Dr. Emel ULUPINAR (Üye)

Doç.Dr. Ömür KİÇİOĞLU (Üye)

Yrd.Doç.Dr Engin YILDIRIM (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)



GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim elemanlarından **Prof. Dr. Güngör KANBAK**'ın araştırma yürütücüsü olduğu 113/2009 kayıt numaralı ve "*Akut alkol alınma bağı olarak ortaya çıkan kardiyoniyopatide, bir kalpain inhibitörü olan N-Acetyl-L-leucy-L-norleucinal'ın kardiyoprotektif etkisi*" konulu çalışma tarafımızdan değerlendirilmiştir. Çalışmada, 80 adet Sprague Dawley Sıçan (erkek), kullanılacağı belirtilmiştir. Sıçanlara gavajla etanol verilmesinden 12 saat sonra ketamin + ksilazin anestezisi altında kan alınacaktır. Kalp çıkarılarak hayvanların hayatına son verileceği belirtilmiştir. Kan ve doku örneklerinde histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılacaktır. Kullanılan yöntemler uluslar arası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir.

Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.