

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANA BİLİM DALI



SIÇANLARDA İZOPROTERENOL İLE OLUŞTURULAN
KARDİYOTOKSİSİTEDE KOENZİM Q10'UN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Sinem İNAL

Danışman

Doç. Dr. Yonca Betil KABAK

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.19.013 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Sinem İNAL tarafından, Doç. Dr. Yonca KABAK danışmanlığında hazırlanan “SIÇANLARDA İZOPROTERENOL İLE OLUŞTURULAN KARDİYOTOKSİSİTEDE KOENZİM Q10'UN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 20.3.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Mustafa Yavuz GÜLBAHAR Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. Yonca Betil KABAK Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Şerife TÜTÜNCÜ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Hasan ÖZEN Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. Funda YILDIRIM İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet

Hayır

20/03/ 2023
Sinem İNAL

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: SIÇANLARDA İZOPROTERENOL İLE OLUŞTURULAN KARDİYOTOKSİSİTEDE KOENZİM Q10'UN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 11.02.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

20 /03 / 2023
Doç. Dr. Yonca Betil KABAK

ÖZET

SIÇANLARDA İZOPROTERENOL İLE OLUŞTURULAN KARDİYOTOKSİSİTEDE KOENZİM Q10'UN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sinem İNAL

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Patolojisi Ana Bilim Dalı

Doktora, Mart/2023

Danışman: Doç. Dr. Yonca Betil KABAK

Çalışmanın amacı, koenzim Q10'un (CoQ10) sıçanlarda izoproterenol (IP) ile indüklenen kardiyotoksistide kardiyomiyositler, telositler ve gelişmesi muhtemel kök hücreler üzerine koruyucu etkilerinin belirlenmesidir.

Çalışmada 60 adet Sprague Dawley sıçan kullanıldı. Her grupta 10'ar adet olmak üzere toplam 6 grup oluşturuldu. Grup I: Kontrol, Grup II: Serum fizyolojik (SF) uygulanan kontrol grubu, Grup III: Yağ uygulanan kontrol grubu, Grup IV: IP grubu, Grup V: CoQ10 grubu, Grup VI: IP+CoQ10 grubu olarak sınıflandırıldı. IP, SF içerisinde çözündürülerek 85 mg/kg dozda intraperitoneal yolla çalışmanın 8. ve 9. günlerinde 2 doz uygulanırken, CoQ10 zeytinyağı içerisinde çözündürülüp deney süresince 20 mg/kg dozda oral gavaj ile uygulandı. Deney sonunda alınan kalp dokusu örnekleri değerlendirildi. Kalpteki proliferasyon ve mitozun değerlendirilmesi amacıyla PCNA ve Histon H3 antikorları kullanıldı. Progenitör hücreler ile telositlerin varlığı da c-Kit, CD34, CD45 ve vimentin antikorlarıyla ortaya kondu. PCR ve western blot yöntemleriyle de protein ve gen ekspresyonları belirlendi.

CoQ10 uygulamasının kalpte izoproterenol'ün neden olduğu dejenerasyon, nekroz, yangısal infiltrasyon, fibrozis bulgularını azalttığı görüldü. Kalp hasarının onarım sürecinde, kalpte postmitotik olduğu bilinen kardiyomiyositlerde, PCNA ve Histon H3 gibi hücre siklusu aktivatörlerinin uyarılmasının rol oynadığı belirlendi. Kök hücrelerin erişkin kalbinde oldukça sınırlı sayıda bulunmasına rağmen, c-Kit ve CD34 kök hücrelerinin CoQ10'un pozitif etkisiyle arttığı ortaya kondu ($P<0,05$). Özellikle kalpte rejenerasyonda önemli etkileri olan telositlerin varlığı CD34-c-Kit, CD34-Vimentin ikili immunohistokimyasal boyamalarla görüntülendi.

CoQ10'un, izoproterenol'ün indüklediği kardiyotoksistite sonucu oluşan kardiyak lezyonları hafiflettiği, kalpte intersitisyel hücreler ile çok sınırlı sayıda kardiyomiyositte hücre siklusu aktivatörlerini uyardığı, kalpteki progenitör hücrelerin sınırlı sayıda da olsa artışına etkisi olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: CoQ10, Kalp, Kök hücre, İzoproterenol, Telosit

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF COENZYME Q10 ON ISOPROTERENOL-INDUCED CARDIOTOXICITY IN RATS

Sinem İNAL

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Pathology

Ph.D., March/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yonca Betil KABAK

The aim of this study is to determine the protective effects of Coenzyme Q10 (CoQ10) on cardiomyocytes, telocytes, and stem cells with developing potential in isoproterenol (IP) induced cardiotoxicity in rats.

Sixty Sprague-Dawley rats were used in the study. Rats were separated into 6 groups (N=10). Group I: Control, Group II: Saline control, Group III: Oil control, Group IV: IP, Group V: CoQ10, Group VI: IP and CoQ10. Isoproterenol dissolved in saline and administered intraperitoneally at 85mg/kg dosage twice at the 8th and 9th days; CoQ10 dissolved in olive oil and administered by oral gavage at 20 mg/kg daily. Heart tissue samples collected at the end of the study and evaluated. Histon H3 and PCNA antibodies were used to evaluate the proliferation and mitosis in the heart. The presence progenitor cells and telocytes were determined using c-Kit, CD34, CD45, and vimentin antibodies. Western blot and PCR assays were used to evaluate protein and gene expressions.

CoQ10 reduced the degeneration, necrosis, inflammatory infiltration and fibrosis induced by isoproterenol on the heart. The stimulation of cell cycle activators, like Histon H3 and PCNA, was determined to play a role during cardiac injury repair in the cardiomyocytes that were known to be postmitotic. Although stem cells are scarcely found in the adult heart, an increase was found in the c-Kit and CD34 stem cells with the positive effect of CoQ10 ($P<0,05$). The presence of telocytes, which play an important role in cardiac regeneration, visualised using double CD34-c-Kit and CD34-vimentin immunofluorescent staining.

The results indicate that CoQ10 ameliorate cardiac lesions caused by isoproterenol, induced the limited number of cell cycle activators in cardiomyocytes and interstitial cells and has a positive effect on the increase of progenitor cells in the heart.

Keywords: CoQ10, Heart, Isoproterenol, Stem cell, Telocyte

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince tecrübe ve birikimlerinden faydalandığım, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, değerli danışman hocam Doç. Dr. Yonca Betil KABAK başta olmak üzere, bilgisini ve desteğini asla esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR' a, Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ' e, Prof. Dr. Murat YARIM'a ve Prof. Dr. Mahmut SÖZMEN'e, doktora tez izleme komitesinde yer alan değerli hocam Prof. Dr. Şerife TÛTÛNCÛ'ye,

Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı'nda görev alan çalışma arkadaşlarım Dr. Efe KARACA, Araş Gör. Nilüfer KURUCA ve Doktora Öğrencileri M. Taha KAYA ve Betül AKÇA'ya ve değerli arkadaşım Dr. Öğrt. Üyesi Sedef Selviler SİZER'e,

Her zaman yanımda olan değerli eşim Dr. Öğr. Üyesi Kâmil Serdar İNAL'a ve canım kızım Doğa İNAL'a ve beni yetiştiren canım annem ve babama sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Sinem İNAL

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kalbin Anatomisi	3
2.2. Kalbin Katmanları	4
2.2.1. Perikard ve Epikard	4
2.2.2. Miyokard	5
2.2.3. Endokard	6
2.3. Kardiyak İletim Sistemi	6
2.4. Deneysel Olarak İzoproterenol ile Miyokard İnfarktüsü Oluşturulması.....	6
2.5. Kardiyak Progenitör Hücreler	8
2.5.1. c-Kit+ Kardiyak Progenitör Hücreler.....	9
2.5.2. Kardiyak Yan Küme Hücreleri	10
2.5.3. Sca-1 ⁺ Kardiyak Progenitör Hücreler.....	11
2.5.4. Isl-1 ⁺ Hücreler	11
2.5.5. “Kardiyosfer” Progenitör Hücreleri	12
2.5.6. Epikardiyumdan Köken Alan Hücreler.....	12
2.6. Koenzim Q10	12
2.7. İmmunohistokimyasal Belirteçler	14
2.7.1. Histone H3 (phospho S10) ekspresyonu	14
2.7.2. c-Kit Ekspresyonu	14
2.7.3. CD34 Ekspresyonu.....	15
2.7.4. CD45 Ekspresyonu.....	15
2.7.5. PCNA Ekspresyonu.....	15
2.7.6. Vimentin Ekspresyonu	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Proje Kapsamındaki Deney Hayvanlarının Temini	17
3.2. Histopatolojik İncelemeler	18
3.3. İmmunohistokimyasal İncelemeler	19
3.4. İmmunofloresan İncelemeler.....	21
3.5. Western Blot Yöntemi.....	22
3.5.1. Kalp Dokularından Protein Ekstraksiyonu.....	22
3.5.2. Lowry Protokolü	22
3.5.3. Modifiye Dot Blot Yöntemi	22
3.5.4. SDS-PAGE Yöntemi ve İmmunoblotting.....	23
3.6. RT-PCR.....	25
3.6.1. RNA İzolasyonu.....	25
3.6.2. cDNA Sentezi.....	25
3.6.3. Real-Time PCR Analizleri	25
3.7. İstatistiksel Analizler.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Sıçanların Ağırlık Verileri.....	27
4.2. Histopatolojik Bulgular	27
4.2.1. Hematoksilen-eozin Boyamalar	27
4.2.2. Crossman’ın Trikrom Boyamaları	31
4.2.3. PTAH Boyamaları.....	34

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	35
4.3.1. Histon H3 İmmunohistokimyasal Bulguları	35
4.3.2. PCNA İmmunohistokimyasal Bulguları	38
4.3.3. c-Kit İmmunohistokimyasal Bulguları.....	40
4.3.4. CD34 İmmunohistokimyasal Bulguları	44
4.4. İmmunofloresan Boyamalar.....	46
4.4.1. c-Kit/CD34 İkili İmmunofloresan Boyamalar	46
4.4.2. CD34/Vimentin İkili İmmunofloresan Boyamalar	48
4.4.3. c-Kit/CD45 İkili İmmunofloresan Boyamalar	49
4.5. Protein Ekspresyonları	49
4.5.1. Dot Blot.....	49
4.5.2. CD34 Protein Ekspresyonu	50
4.5.3. c-Kit Protein Ekspresyonu	51
4.6. RT-PCR.....	51
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKÇA.....	62
EKLER.....	71
ÖZ GEÇMİŞ.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

AEC	: 3-Amino-9-Etilkarbazol
ATP	: Adenozin Trifosfat
CoQ10	: Koenzim Q10
CPC	: Kardiyak Progenitör Hücreler
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole
F/E	: Fibroblastik / Endotelyal
FITC	: Fluorescein İsothiocyanate
H3	: Histon3
H&E	: Hematoksilen Eozin
IP	: İzoproterenol
Isl-1	: Adacık-1
IVS	: İnterventriküler Septum
kDA	: Kilodalton
KM	: Kardiyomiyosit
MI	: Miyokard İnfarktüsü
PCNA	: Çoğalan Hücre Nükleer Antijeni
PDGFR-β	: Trombosit Türevli Büyüme Faktörü Reseptörü-Beta
PTAH	: Fosfotungustik Asit Hematoksilen
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SBP	: Streptavidin-Biotin Peroksidaz
Sca-1	: Kök hücre antijeni-1
SCF	: Kök Hücre Faktörü
SDS-Page	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SF	: Serum Fizyolojik
TGF	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Dünya genelinde kardiyovasküler sistem hastalıkları önde gelen ölüm nedenlerinden biri olup her yıl milyonlarca insan kalp krizi nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Dünya sağlık örgütü (DSÖ) verilerine göre, yılda yaklaşık 17,9 milyon insanın kardiyovasküler hastalıklardan öldüğü bildirilmiştir (WHO, 2022). Kardiyovasküler sistem hastalıkları arasında yüksek tansiyon, koroner kalp hastalığı, konjestif kalp yetmezliği gibi patolojiler yer almaktadır. Hipertansiyon, dislipidemi, diyabet, obezite, fiziksel aktivitenin azlığı ve sigara kullanımı kalp hastalıkları oluşumundaki önemli risk faktörlerindedir (Jayaraj et al., 2018).

Miyokard infarktüsü (MI) dünya çapında en sık görülen iskemik kalp hastalığıdır (Goyal et al., 2015; WHO, 2022). Genellikle kalp krizi olarak bilinen MI, kalbin bir bölümüne kan akışı kesildiğinde ortaya çıkar ve miyokard bölgesinde nekroz oluşur. Miyokard infarktüsü sonrasında, kardiyomiyositler geri dönüşsüz bir hasara uğrar ve bu durum kalp yetmezliği ile sonuçlanabilir (Kloner, 2015). Bu nedenle hasarlı miyokardiyumu onarmak veya yenilemek için hücre temelli tedaviler geliştirilmektedir (Nour et al., 2017). Günümüzde, miyokard koruyucu veya miyokard hasarının onarımı için klasik tedaviye alternatif olabilecek tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlar arasında antioksidan kullanımının öne çıktığı dikkati çekmektedir (Mokni et al., 2012).

Kalp hastalıklarındaki alternatif tedavi yaklaşımlarının temelinde, klasik literatürdeki memeli kardiyomiyositlerinin doğumdan kısa süre sonra çoğalma yeteneklerini kaybettikleri bilgisi önemli yer tutmaktadır. Diğer yandan, elde edilen yeni veriler kalpte, normal yaşlanma sürecinde ve patolojik stres durumlarında yeni kardiyomiyositlerin gelişebileceğini göstermektedir. Yeni şekillenen kardiyomiyositlerin miyokardiyumda bulunan prekürsör kardiyak miyosit hücrelerinden ya da kemik iliğinden köken aldıkları bildirilmiştir (Beltrami et al., 2003). Kalp ile birlikte başka dokularda da bulunduğu yeni keşfedilen telosit adı verilen hücreler, kalpte sinir sonları, kapillarlar ve diğer intersitisyel hücrelere ek olarak kardiyomiyosit prekürsörleriyle de yakın ilişki içindedirler (Mirancea, 2016; Popescu and Faussone-Pellegrini, 2010). Kardiyak rejenerasyonu sürdürmek için kök hücreler ve progenitör hücreler ile destekleyici interstisyel bir ağ oluştururlar (Gherghiceanu and Popescu, 2010). Bununla birlikte, kardiyak telositlerin fonksiyonel rolü ve miyokard infarktüsü sırasında kardiyak telosit popülasyonundaki olası

değişiklikleri hala araştırılmaktadır (Nour et al., 2017). Bu doğrultuda çeşitli nedenlerle oluşan kardiyomiyosit kayıplarını azaltmak hatta ortadan kaldırmak için çeşitli tedavi seçenekleri araştırılmaktadır.

Koenzim Q10 (CoQ10), K ve E vitaminine benzer yapıya sahip, yağda çözünebilen bir kuinon antioksidandır (Liang et al., 2017). CoQ10, hücre membranında ve mitokondride etkili, membran fosfolipitlerini peroksidasyondan koruyan güçlü bir antioksidandır. Ayrıca, serbest radikal kaynaklı oksidatif hasardan, membran proteinleri ve mitokondriyal DNA'yı da korumaktadır (Forsmark-Andrée et al., 1997).

Profilaktik olarak kullanılan CoQ10'un antioksidan etkinliği ve hücre içi elektron taşıma fonksiyonu sayesinde kardiyomiyositler üzerinde koruyucu etkisi ve infarktüs bölgesinde kök hücreler ile telosit proliferasyonuna etkisinin araştırılması, miyokard infarktüsünde CoQ10'un profilaktik etkisinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu tez çalışmasında, kanser, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, kalp yetmezliği gibi hastalıklarda antioksidan etkinliği bilinen CoQ10'un, sıçanlarda IP ile oluşturulan miyokard infarktüsü sonrasında koruyucu/iyileştirici etkinliği ortaya konularak, bu konuda uygulanan standart tedaviye katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Bu amaçla akut miyokard infarktüsü oluşturulan kalp kaslarında meydana gelen değişiklikler üzerine CoQ10'un etkinliği öncelikle rutin histopatolojik yöntemlerle incelenmiştir. Ayrıca, CoQ10 kullanımının, akut MI sonrası iyileşme sürecinde postmitotik olduğu bilinen kardiyomiyositlerde ve fibroblastik/endotelial kökenli hücrelerde mitozu uyarıcı etkisi araştırılmıştır. Bölgedeki prekürsör hücrelerin varlığı immunohistokimyasal, immunofloresan, western blot ve PCR yöntemleri ile belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalbin Anatomisi

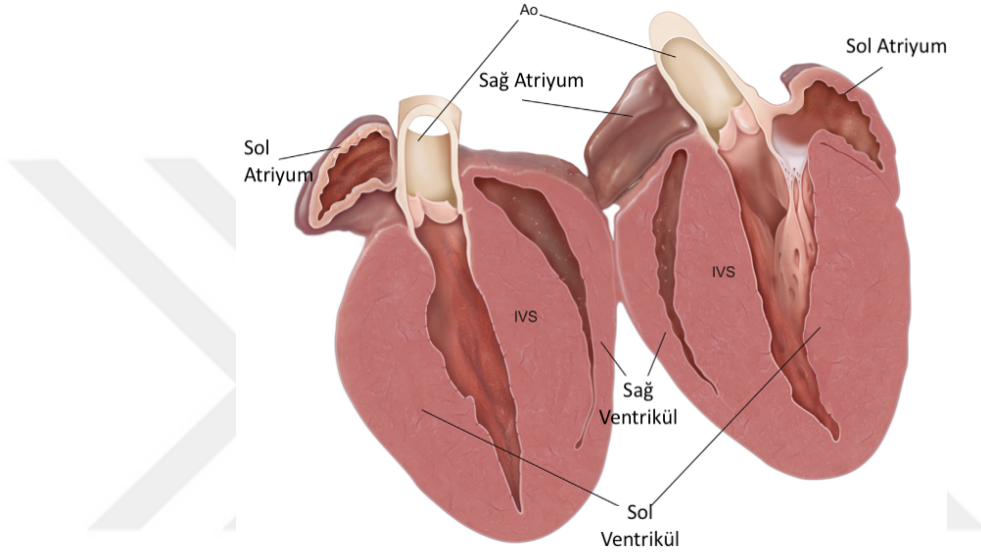
İki atriyum ve iki ventrikuldan oluşan kalp göğüs boşluğunda aorta ile columna vertebralis'e, trunkus pulmonalis ile akciğerlere, v. kava kaudalis ile diyaframa ve v. kava kranialis ile göğüs boşluğu girişine bağlanır. Perikardiyum adı verilen fibroseröz bir kese içinde bulunan kalp ayrıca at ve otçullarda ligamentum sternoperikardiaka ile sternuma, domuz ve etçillerde ligamentum frenikoperikardiakum ile diyafragmaya bağlıdır. Kalp, göğüs boşluğunun biraz solunda bulunur. Hayvanın yaşına ve cinsine göre göğüs boşluğundaki konumu değişiklik gösterir. Sığırdı ve domuzda 3.-5. kostalar arasında ve dik pozisyonda iken tek tırnaklılarda orta derecede dik konumda ve 3.-6. kostalar arasında yer alır. Etçillerde ise daha yatık durumda ve 3.-7. kostalar arasında bulunur (Dursun, 2008).

Deney hayvanlarında kalbin yeri genel olarak 3.-5. kostalar arasındadır. Sıçan kalbi koni şeklinde olup lateral uzantısı, kranialde 3. kostanın kaudal kenarına, ventralde sternuma ve dorsakaudalde 5. kostanın kaudal kenarına kadar uzanır (Hebel and Stromberg, 1986). Fare kalbinin apeks kordis bölümü sivri olup, kalp yassı görünümündedir. Bazis kordis'in çevresi yaklaşık 2 cm boyutundadır (Çalışlar, 1978). Sıçan ve fare kalpleri sırasıyla yaklaşık 0,5–2,5 g ve 0,10–0,15 g ağırlığındadır. Sıçan kalbi vücut ağırlığının yaklaşık %0,2-0,5'i iken, fare kalbinin ağırlığı %0,4-0,6'sı kadardır. Sol ventrikülün serbest duvarı sıçanlarda 1,5-2,7 mm farelerde ise yaklaşık 1,5-1,8 mm kalınlığındadır ancak ölçümler yaşa, cinsiyete ve ırka göre değişim gösterebilir. Hem sıçanlarda hem de farelerde interventriküler septum, sol ventrikül serbest duvarı ile yaklaşık olarak aynı kalınlıktadır ve sağ ventrikül serbest duvarı tipik olarak sol ventrikül serbest duvarının yaklaşık üçte biri kalınlığındadır. Buna karşılık, her iki atriyal duvar da ventriküler duvarlardan çok daha incedir ve bazı bölgelerde yalnızca birkaç hücre tabakası kalınlığında olabilir (Buetow and Laflamme, 2018). Tavşanda kalp koni şeklindedir. Yaklaşık 3-3,5 cm uzunlukta olup, vücut ağırlığının % 0,2-0,4'ünü kapsamaktadır (Çalışlar, 1978).

İnsanda kalp, 2/3'ü orta hattın solunda olacak şekilde göğüs kafesinde oblik bir pozisyon alır (Weinhaus and Roberts, 2005). Ağırlığı yaklaşık 200–350 g veya yağsız vücut ağırlığının yaklaşık %0,4–0,45'idir. Sol ventrikül serbest duvarı, sağ ventrikül serbest duvarı ve interventriküler septum sırasıyla 1,2–1,5 cm, 0,4–0,5 cm ve 1,2–1,5 cm kalınlığındadır (Buetow and Laflamme, 2018).

2.2. Kalbin Katmanları

Kalp perikard denilen fibroelastik bir kese içinde bulunur. Kalbin duvarı epikardiyum, miyokardiyum ve endokardiyum olmak üzere üç katmandan oluşur. Yapısal olarak, kalpte kan akışı sırasına göre dört ana kan damarı (vena kava, pulmoner arter, pulmoner ven ve aorta), dört boşluk (sağ atriyum, sağ ventrikül, sol atriyum ve sol ventrikül) ve dört kapak bulunur (triküspit, pulmonik semilunar, mitral ve aortik semilunar) (Şekil 2.1.) (Miller and Gal, 2017).



Şekil 2.1. Fare kalbinin longitudinal kesit yüzeyi, sol ventrikül, sağ ventrikül, interventriküler septum (IVS), sağ atriyum, sol atriyum ve Aorta'nın (Ao) görünümü (Buetow and Laflamme, 2018)

2.2.1. Perikardiyum ve Epikardiyum

Normalde az miktarda berrak, seröz sıvı içeren perikardiyum, kalbi çevreleyen keseyi oluşturan bir dış ve bir de iç seröz tabakadan oluşur (Miller and Gal, 2017). Bu bileşenlerden ilki perikardiyum fibrozum diğeri perikardiyum serozum'dur. Fibröz bağ dokudan oluşan perikardiyum fibrozum, kalbi tamamıyla kapladıktan sonra kalbin apeks kordis kısmında bir ligament meydana getirir. Seröz katman ise lamina parietalis ve lamina visseralis olmak üzere iki katmandan oluşur (Dursun, 2008).

Kalbin en dış tabakası olan epikardiyum, visseral perikardiyum olarak da bilinir. Paryetal perikardiyum, fibröz perikardiyum ile kaynaşmıştır. Perikardiyal boşluğun tüm iç yüzeyi mezotelyum ile kaplıdır. Subepikardiyal tabaka miyokardiyuma bağlanır ve ince bir fibröz bağ doku, bol miktarda yağ dokusu (iyi beslenmiş hayvanlarda) ve çok sayıda kan damarı, lenfatik damar ve sinirden oluşur (Miller and Gal, 2017).

2.2.2. Miyokardiyum

Kalbin kas katmanı olan miyokardiyumun hem iskelet kaslarına hem de düz kaslara benzer özellikleri bulunmaktadır. Kalp kası iplikleri birbirlerine yanal uzantılar ile bağlanmış durumdadır. Atriyumda yüzeysel kas katmanı sirküler seyirlidir ve her iki atriyumu beraber sarar. Daha derin katmandaki kas tabakası ise her bir atriyumun tavanında önden arkaya doğru seyrederek. Ventrikülün kas katmanı ise üç tabakadan oluşur. Kaslar orta tabakada dairesel seyrederken dış ve iç tabakada uzunlamasına seyrederek (Dursun, 2008). Miyokardiyum, birbirleriyle belli bir bağlantı içinde olan “kardiyak miyosit” veya “kardiyomiyositler” denilen hücre kümelerinden oluşur. Bu hücre tabakaları atrioventriküler kapakçıklar, aort ve pulmoner arterin başlangıcını çevreleyen kalbin fibröz iskeletine bağlanırlar. Miyokard kalınlığı her bölmedeki mevcut basınç ile ilişkilidir; atriyumlar ince, ventriküller ise daha kalın duvarlıdır (Miller and Gal, 2017).

Yetişkin hayvanlarda, sol ventrikül duvarının kalınlığı sağ ventrikülün kalınlığının yaklaşık üç katıdır, çünkü sistemik dolaşımında basınç pulmoner devirden daha fazladır. Kalbe arteriyel kan sol ve sağ koroner arterlerden sağlanır. Arterler kalp üzerinde subepikardiyumda ilerler ve miyokard boyunca zengin bir kılcal yatak sağlayan intramiyokardiyal arterlerle sonlanır. Uzun kardiyak kas hücrelerine paralel olma eğiliminde olan kılcal damarlar arasında geniş anastomozlar oluşur. Miyokardiyumun histolojik olarak enine kesitinde kılcal damar alanının kas hücrelerininine oranı yaklaşık 1:1'dir. Kardiyomiyositlerin, enerji gereksinimleri oksidatif fosforilasyona bağımlıdır. Bu durum koroner arterler tarafından sağlanan sürekli bir oksijen kaynağı gerektirir (Miller and Gal, 2017).

Miyokardiyum, kan ve lenfatik damarlar, sinirler, fibroblastlar, histiyositler, mast hücreleri, perisitler, ilkel mezenkimal kök hücreler, kollajen fibriller, elastik lifler ve asit mukopolisakkaritlerini içeren bağ dokunun hücre dışı matris elemanları ile çevrili kalp kası hücrelerinden oluşur. Kardiyak kas hücreleri kontrakte miyositler ve iletim sisteminin özel lifleri olmak üzere iki popülasyona ayrılabilir. Kardiyomiyositler, merkezi konumlu ve uzunlamasına seyreden çekirdeklere sahiptir. 60-100 µm uzunluğunda ve 10-20 µm çapında, düzensiz silindirik bir şekle sahiptir. Hayvanlardaki miyositler daha küçüktür ve daha az sarkoplazmaya sahiptir. Atriyal miyositler ventriküler miyositlerden daha küçüktür. Bitişik miyositler, interkalat disk olarak bilinen özel kavşaklar ile uçtan uca birleşir. Yaşlı hayvanların miyositleri

genellikle büyük poliploid çekirdeklere sahiptir. Miyofibriller birçok sarkomerin uçtan uca bağlanmasıyla oluşur (Miller and Gal, 2017).

2.2.3. Endokardiyum

Kalbin en iç tabakasıdır ve kalp kapakçıkları, korda tendinealar ve papiller kaslar gibi çıkıntılı yapıları içerir. Atriyumdaki endokard ventriküllerinkinden daha kalındır ve bu nedenle dış bakıda normal olarak beyaz-gri renkte görünür. Endokardiyumun yüzeyi, ince bir vaskülarize bağ dokusu üzerinde bulunan endotel tabakadan oluşur. Subendokardiyal tabaka kan damarları, sinirler ve bağ dokuyu içerir. Purkinje lifleri her iki ventrikül boyunca subendokardiyumda dağılır. Kalp kapakçıkları fibröz halkalara bağlanır. Kapakçıklar kalpten kan akışını düzenlemek için açılır ve kapanır (Miller and Gal, 2017).

2.3. Kardiyak İletim Sistemi

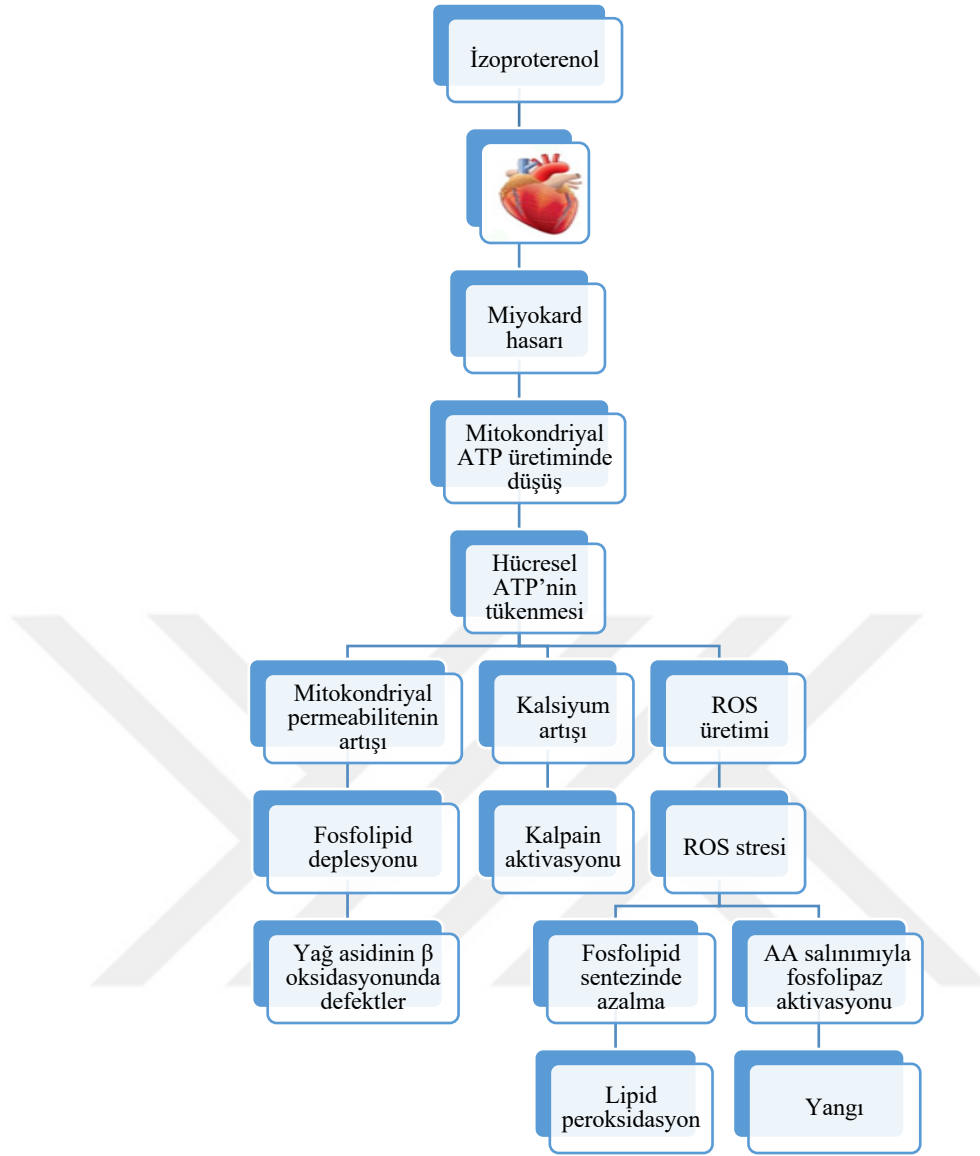
Kalbin innervasyonunda otonom sinir sistemi görev alır. Ayrıca, kalbin kendine özgü uyarı merkezleri de bulunmaktadır ve kalbin ritmik kontraksiyonlarında rol oynar. Nodus sinuatrialis ve nodus atrioventrikularis olmak üzere başlıca iki uyarı merkezi bulunur. İlk uyarı nodus sinuatrialis'e oradan da nodus atrioventrikularis'e ulaşır. Buradan his demetleri aracılığıyla kalp kasına iletilir. Septum interventrikulare kas kitlesinin içerisinde his demetleri sağ ve sol (krus dekstrum ve sinistrum) olmak üzere iki dala ayrılır. Krus dekstrum ve sinistrum'un son dalları, Purkinje iplikleri adıyla subendokardiyal yayılarak sonlanır (Dursun, 2008).

2.4. Deneysel Olarak İzoproterenol ile Miyokard İnfarktüsü Oluşturulması

İzoproterenol (IP) bir sempatomimetik β -adrenerjik reseptör agonistidir. Katekolaminlerin düşük konsantrasyonlarının, pozitif bir inotropik etki uygulayarak kalp fonksiyonunun düzenlenmesinde yararlı olduğu bilinmektedir (Upaganlawar et al., 2011). Ancak yüksek dozları kalp kasında nekroz ve infarktüse yol açarak miyokarda ciddi strese neden olur (Sushamakumari et al., 1989). IP kaynaklı miyokardiyal infarktüs, yaygın olarak kullanılan deneysel bir modeldir. Bu model sıçanlarda kalp fonksiyon bozukluklarının değerlendirilmesi için standart bir yöntem olarak kabul edilmiştir (Wexler, 1978). Yapılan çalışmalarda IP kaynaklı nekroz, en çok sol ventrikülün subendokardiyal bölgesinde ve interventriküler septumda saptanmıştır. Sıçanlarda sürekli IP infüzyonunun, kardiyak hipertrofide gözlenen benzer tipik kardiyak gen ekspresyonunu ortaya çıkardığı bildirilmiştir (Boluyt et al.,

1995).

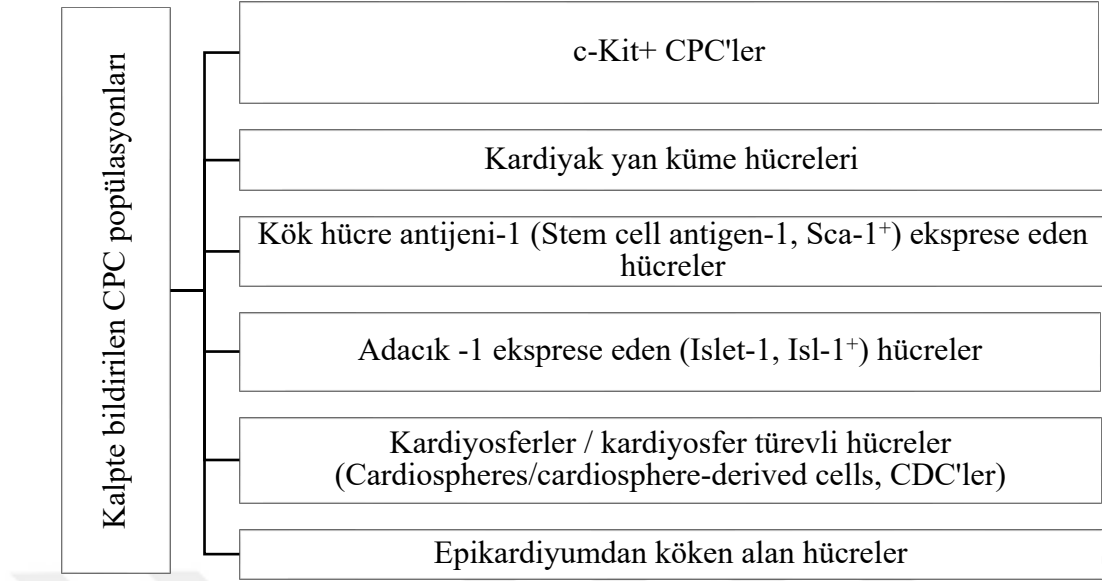
İzoproterenol'ün kardiyotoksik etki mekanizmaları arasında hipoksi, iskemi, koroner yetmezlik, yüksek enerjili fosfat depolarının azalması, intraselüler kalsiyumun artışı, elektrolit değişikliği ve oksidatif stres yer almaktadır (Şekil 2.2). Oksidatif stres, katekolaminlerin toksik etkilerini gösterdiği ana mekanizmalardan biridir. Oksidatif stresle serbest oksijen radikalleri oluşur. Oksitlenmiş ürünler, çeşitli proteinlerin sülfidril grupları ile etkileşime girme kabiliyetine sahiptir. Ayrıca, süperoksit anyonların ve ardından hidrojen peroksitin üretilmesine de yol açar. Bu durum mikrozomal geçirgenliğe, mitokondriyal Ca alımına ve ATP üretiminde azalmaya neden olur. Sonuç olarak yüksek derecede reaktif hidroksil radikalleri oluşur ve bu radikaller protein, lipit ve DNA gibi hücrel makromoleküllerin hasarına neden olur (Bindoli et al., 1992; Dhalla et al., 2000; Takeo et al., 1980).



Şekil 2.2. İzoproterenolün oluşturduğu kalp hasarının mekanizması (AA: araşidonik asit) (Siddiqui et al., 2016)

2.5. Kardiyak Projenitör Hücreler

Kardiyak progenitör hücreler (Cardiac progenitor cells, CPC), kalp boyunca (atriyum, ventrikül, epikardiyum veya perikardiyumda) yayılım gösteren heterojen bir hücre grubudur (Le and Chong, 2016). Kalpte bildirilen progenitör hücre popülasyonları Şekil 2.3'te gösterilmiştir. Fizyolojik koşullar altında, kardiyak kök hücrelerin pasif olduğu düşünülür ve kardiyomiyosit yenilenmesine önemli bir katkısı olduğu düşünülmemektedir. Ancak, hasardan sonra aktive olup yeni miyositlere veya vasküler hücrelere farklılaşabilirler (Hsieh et al., 2007; Senyo et al., 2013).



Şekil 2.3. Kalpte bildirilen CPC popülasyonları (Le and Chong, 2016)

Doğumdan sonraki ilk haftalarda kardiyomiyositler çoğalma yeteneklerini kaybeder. Bu nedenle, yetişkin kalbi, iskemik veya diğer hasarlardan sonra rejenerasyon yapamaz. Kalpte hasara karşı oluşan değişiklikler, kalan kardiyomiyositlerin hipertrofisi ve nekrotik bölgelerde fibrotik skar dokusunun oluşmasıyla sınırlıdır (van Amerongen and Engel, 2008). Ancak, son yıllardaki çalışmalar, kardiyomiyositlerin çeşitli koşullarda (yaşlanma sürecinde ve bazı patolojik durumlarda) çoğalabildikleri gösterilmiştir. Miyokardiyumda bulunan prekürsör kardiyak hücrelerin yeni kardiyomiyositlere dönüşebildiği bildirilmiştir (Ahuja et al., 2007; Pasumarthi and Field, 2002; Tseng et al., 2006).

2.5.1. c-Kit+ Kardiyak Progenitör Hücreler

Kalpte ilk bildirilen Kardiyak kök hücre (Cardiac stem cell, CSC) kök hücre faktörü reseptörü c-Kit ekspresyonuna dayanarak tanımlanmıştır. c-Kit+ CSC'ler, CD34, CD31, CD45 veya triptaz eksprese etmez, bu yönden c-Kit+ endotel progenitör hücrelerden ve mast hücrelerinden ayrılırlar. Kardiyak kök hücreler kardiyomiyosit, düz kas hücreleri ve endotelyal hücreler oluşturabilme yeteneğine sahip multipotent, kendi kendini yenileyebilir hücrelerdir (Beltrami et al., 2003; Messina et al., 2004). Erişkin kalbinde, CSC'lerin çoğunun, çok düşük bir yoğunlukta (her 10.000 miyosit başına 1 hücre) atriyum ve ventriküler apekte yer aldığı bildirilmiştir (Beltrami et al., 2003).

Beltrami ve arkadaşları ilk kez 2003 yılında, tüm kardiyak soylara farklılaşma

ve infarktüsli miyokardiyumu rejenere etme potansiyeline sahip c-Kit⁺, Lin⁻ ve CD45⁻ hücreler izole etmiştir (Beltrami et al., 2003). Birçok çalışmada, c-Kit⁺ kardiyak progenitör hücrelerin infarktüs boyutunu azalttığı ve çeşitli miyokard infarktüsü modellerinde kalp fonksiyonunu iyileştirme potansiyeli olduğu doğrulanmıştır (Dawn et al., 2005).

İlk olarak 2009 yılında tanımlanan telositler, tüm kalp katmanlarının interstisyumunda tespit edilen özel stromal hücrelerdir. Telositler, telopod adı verilen belirgin ve çok ince hücresel uzantıları sayesinde diğer interstisyel hücrelerden ayrılan benzersiz bir fenotipe sahiptir. Bu telopodların ortalama uzunluğu on ila yüz mikron arasındadır (Popescu and Fausson-Pellegrini, 2010).

Daha önce Kajal benzeri hücre olarak bilinen telositlerin kalpte eşit olarak dağılmadığı bildirilmiştir. Genel olarak atriyumun ventriküllerden daha fazla telosit içerdiği düşünülmektedir (Gherghiceanu and Popescu, 2012; Hinescu et al., 2006; Popescu et al., 2006). İntramiyokardiyal telositler ise, insan kalbinde interstisyel hücrelerin % 1'inden daha azını temsil etmektedir (Popescu et al., 2015). Az sayıda olmalarına rağmen intramiyokardiyal telositler, kardiyomiyositler ve çevresindeki stromal hücreler (endotel hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, Schwann hücreleri, perisitler vb.) ile etkileşime girerek üç boyutlu bir ağ oluşturmaya katkıda bulunmaktadır (Kostin, 2016).

Hematopoietik kök hücre belirteci CD34, mezenkimal hücre belirteci vimentin, miyokardiyal kök hücre belirteçleri Sca-1 ve c-Kit kardiyak telositleri belirlemek için en çok kullanılan belirteçler arasındadır (Chang et al., 2015). Geniş bir immunofenotipe sahip olan telositlerin, tek bir spesifik belirteci bulunmadığından, diğer interstisyel hücre tiplerinden ikili immun boyamalar ile ayırt edilebilmektedirler (Díaz-Flores et al., 2013; Mou et al., 2013). Kardiyak telositler CD34⁺/Vimentin⁺, CD34⁺/PDGFR- β ⁺, ve CD34⁺/CD117⁺ hücreler olarak tanımlanır (Crețoiu and Popescu, 2014). Böylece, sadece vimentin ve PDGFR- β eksprese eden fibroblastlardan ayrımı yapılabilir (Bei et al., 2015; Chang et al., 2015).

2.5.2. Kardiyak Yan Küme Hücreleri

Kardiyak yan küme hücrelerinin varlığı ilk olarak fare miyokardında bildirilmiş, kök hücre benzeri aktivite gösterdiği ve kardiyomiyosite farklılaşma potansiyeli olduğu tespit edilmiştir (Hierlihy et al., 2002). Rodentlerde bu hücreler, Sca-1⁺, c-Kit⁺, CD34⁺, CD31⁻ ve CD45⁻ hücreler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, kendi kendini

yenileme potansiyelleri, Notch ve TGF gibi hücre döngüsü düzenleyicilerinin ekspresyonu ile doğrulanmıştır (Hierlihy et al., 2002; Martin et al., 2004; Pfister et al., 2005). *In vivo* olarak, green fluorescent protein pozitif yan küme hücreleri, yetişkin sıçanlara intravenöz infüze edildiğinde, hasarlı kalpte kardiyomiyositlere, endotelial ve düz kas hücrelerine farklılaştığı belirlenmiştir (Oyama et al., 2007). Kardiyak yan küme hücreleri, doğası gereği heterojen olabilir, farklı alt popülasyonlar içerebilir. Bu hücrelerin VE-kaderin (vascular endothelial cadherin), CD31, CD34 ve Sca-1 ekspresyonu bildirilmiştir (Yamahara et al., 2008). Sıçanda miyokard infarktüsünde, kalpte yan küme hücrelerinin %4,4 kardiyomiyositlere, %6,7 endotel hücrelerine ve %29 düz kas hücrelerine farklılaştığı bildirilmiştir (Matsuura et al., 2004).

2.5.3. Sca-1⁺ Kardiyak Progenitör Hücreler

Kök hücre antijen-1, Ly6 gen ailesinin 18-kDa'lık bir fare glikozil fosfatidilinositol bağlantılı hücre yüzey proteini olup, aktive lenfositlerde identifiye edilmiş bir antijendir (Yutoku et al., 1974). Yetişkin kalbinde c-Kit, CD34 ve CD45 gibi diğer kök antijenlerle birlikte progenitör hücreleri izole etmek için kullanılmıştır (Matsuura et al., 2004). *In vivo* çalışmalarda Sca-1⁺ CPC'lerin potansiyelleri geniş bir şekilde araştırılmıştır. Fare kalbinde her 30.000 hücrenin birinde Sca-1⁺/CD31⁻ hücre saptanmış olup bunların kalpteki hücrelerin %2'sini oluşturduğu bildirilmiştir (Pfister et al., 2005). Ayrıca, transplante edilen Sca-1⁺/CD31⁻ hücrelerin, kalpte yeniden şekillenme süreçleri üzerinde yararlı etkiler gösterdiği ve MI sonrasında, miyokardiyal neovaskülarizasyonu teşvik ederek, parakrin etkilerle kardiyomiyosit rejenerasyonuna aracılık ettiği bildirilmiştir (Wang et al., 2006).

2.5.4. Isl-1⁺ Hücreler

Isl-1, kalp gelişimi sırasında ifade edilen bir LIM-homeodomain transkripsiyon faktörüdür. Isl-1'den yoksun fare kalplerinde, sağ ventrikülün tamamen yokluğu ve kulakçığın kısmi kaybı gibi ciddi kalp kusurları görülmüştür (Cai et al., 2003). Yakın zamanlarda, Isl-1, özel kardiyak progenitörleri veya kardiyoblastları tanımlamak için bir belirteç olarak tanımlanmıştır. Laugwitz ve arkadaşları sıçan, fare ve insan miyokardında yerleşik öncüler olarak Sca-1, c-Kit ve CD31 için negatif olan Isl-1⁺ hücrelerinin bir alt popülasyonunu tanımlamışlardır. Bu hücreler doğum sonrası yaşlarda nadir görülmekle birlikte, kalp başına yaklaşık 500-600 hücrede bulunmaktadır. Atriyumlarda kümeler halinde ve ventriküllerde ise dağınık halde bulunmaktadır (Laugwitz et al., 2005).

2.5.5. “Kardiyosfer” Projenitör Hücresleri

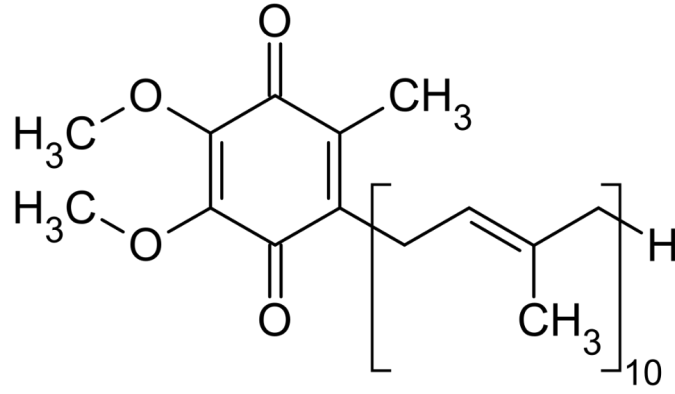
"Kardiyosferler" olarak adlandırılan başka bir CPC hücre topluluğu tanımlanmıştır. Kardiyosferler *in vitro* olarak self adherent kümeler halinde büyüyen farklılaşmamış hücrelerdir. İlk olarak postnatal murin kalp kültürlerinden ve insan kalbinde ventriküler biyopsilerden izole edilmiştir. Son derece klonojenik olan bu hücrelerin, c-Kit, Sca-1, CD31 ve CD34 gibi kök ve endotel progenitör belirteçlerini ekspresye ettiği ve farklı aşamalarda buradaki kardiyovasküler kök hücrelerin bir karışımını içerdiği görülmüştür (Messina et al., 2004; Miyamoto et al., 2010; Smith et al., 2007).

2.5.6. Epikardiyumdan Köken Alan Hücresler

Yetişkin kalbin yenilenmesi için belirgin bir potansiyele sahip bir başka kardiyak progenitör hücre kaynağı da epikardiyumdur. Epikardiyumdan köken alan hücreler epitelden mezenkimal dönüşüme uğrar, epikardiyumdan ve subepikardiyumdan ayrılarak farklılaşmadan önce miyokarda göç eder. Hem embriyonik hem de yetişkin kalbinde epikardiyumdan köken alan hücreler çok potansiyelli olup, koroner düz kas hücreleri, adventisyal fibroblastlar ve kardiyomiyositler oluşan en az üç hücre tipi meydana getirebilmektedir (Tomanek, 2005).

2.6. Koenzim Q10

Koenzim Q10, insan vücudundaki hemen hemen her hücrede doğal olarak bulunan temel bir bileşiktir. Doğada her yerde bulunması ve kinon yapısı nedeniyle, CoQ10 aynı zamanda ubiquinone olarak da bilinir (Garrido-Maraver et al., 2014). Ubiquinone adı “her yerde bulunan kinon” anlamına gelir. İnsanda koenzim Q10 formu, bir kinolin grubu ve 10 izoprenil birimi içerir (Şekil 2.4). Kimyasal olarak Q10 2,3-dimetoksi-5-metil-6-dekaprenil-1,4-benzokinon olarak adlandırılmıştır (Overvad et al., 1999).



Şekil 2.4. CoQ10'un kimyasal yapısı

CoQ10, lipitte çözünen ve antioksidan olarak görev yapan bir maddedir. Mitokondride elektron taşıma sisteminin temel bir aracıdır. Hücresel solunum ve ATP üretimi için yeterli miktarda CoQ10 gereklidir (Garrido-Maraver et al., 2014). Q10 mitokondride elektron ve proton taşıyıcısı olarak önemli bir rol oynar. İç mitokondriyal zaradaki Q10 miktarını değiştiren durumlara bağlı olarak elektron taşıma oranı da değişir, böylece ATP üretimi etkilenir. Q10, sırasıyla hem okside olmuş hem de indirgenmiş ubiquinone ve ubiquinol formlarında bulunur (Overvad et al., 1999). Bazı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, Q10 takviyesinden sonra düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunda azalma görülmüştür (Allema et al., 1995; Kaikkonen et al., 1997). Ayrıca, E vitamini üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu bildirilmektedir (Thomas et al., 1996).

CoQ10, hayvanların yanı sıra mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunmaktadır. Q10 formu insanlarda ve memelilerin çoğunda bulunur (Ramasarma, 1985). Bununla birlikte, Q9 birincil formdur, farelerde ve sıçanlarda bulunur. Q6, Q7 ve Q8 maya ve bakterilerde bulunur (Overvad et al., 1999). Q10, birçok dokuda değişken miktarlarda bulunur. İnsan dokularındaki en yüksek konsantrasyonlar kalp, böbrek ve karaciğerde sırasıyla yaklaşık 110, 70 ve 60 µg/g dokuda ve en düşük konsantrasyon ise 8 µg/g, akciğer dokusunda bulunur (Ernster and Forsmark-Andree, 1993)

CoQ10'un biyosentezi üç ana adımdan oluşmaktadır. Esansiyel aminoasit olan tirozin veya fenilalaninden halka yapısının sentezi, mevanolat yolu ile asetil-CoA kalıntılarından izoprenoid yan zincirinin oluşumu ve son olarak, Golgi cisimciğinde bu yapıların poliprenil-transferaz enzimiyle yoğunlaştırılması sonucu CoQ10 meydana gelmektedir (Olson and Rudney, 1983).

CoQ10 eksikliğiyle ilişkili birçok hastalığın (mitokondriyal hastalıklar, fibromiyalji, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, diabetes

mellitus, infertilite ve periodontal hastalık) tedavisinde CoQ10 takviyesinin yararlı olabileceği bildirilmektedir (Garrido-Maraver et al., 2014).

2.7. İmmunohistokimyasal Belirteçler

2.7.1. Histone H3 (phospho S10) ekspresyonu

Hücre çoğalması, hücrelerin içeriklerini kopyalayıp bölündükleri düzenli bir olaylar dizisidir. Bu döngü hücre siklusu olarak bilinir, siklinler ve siklin bağımlı kinazlar tarafından düzenlenmektedir (Tyson et al., 1996). Uygun şartlar altında siklin ve siklin bağımlı kinazların salınımının uyarılması ile kardiyomyositlerin hücre siklusuna yeniden girip çoğalma yeteneği kazandıkları bildirilmiştir (Busk et al., 2005).

Bu veriler, postmitotik olduğu düşünülen kardiyomyositlerin, uygun bir uyarım ile tekrar çoğalma yetenekleri kazanabildiklerini göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Fosfohiston-H3 mitozdaki hücreleri gösteren oldukça duyarlı bir belirteçtir (Hans and Dimitrov, 2001).

Kromatin, yapısında DNA ve histon proteinleri olan, nükleozom olarak bilinen birimlerden oluşmaktadır. Her bir nükleozom, etrafında iki süper sarmal DNA'nın sarıldığı bir çekirdek histon oktamereninden (H2A, H2B, H3 ve H4'ten) oluşmaktadır (van Holde, 1988). Mitoz sürecinde kromatin yoğunlaşması belirgindir. Mitoz sırasında, histon H3 tüm ökaryotlarda Ser10'da fosforile edilir. Ser10 fosforilasyonu ile hücre bölünmesi sırasındaki kromozom yoğunlaşması arasında güçlü bir ilişki vardır. Geç G2 fazında, histon H3'ün fosforilasyonu yalnızca perisentromerik kromatin üzerinde gerçekleşir. Mitoz ilerledikçe, bu kromozomlar boyunca yayılır ve profazda tamamlanır. Mitozun sonunda, H3 histonu defosforile edilir (Hendzel et al., 1997; Prigent and Dimitrov, 2003).

2.7.2. c-Kit Ekspresyonu

c-Kit reseptörü (CD117), tirozin kinaz aktivitesine ait 145 kDa moleküler ağırlığa sahip tip I transmembran glikoproteinidir. Tip III reseptör tirozin kinaz ailesinin önemli bir üyesidir (Majumder et al., 1988).

c-Kit reseptörü farklı dokularda dağılım gösterir. Bu hücre tipleri arasında, hematopoietik hücreler, germ hücreleri, mast hücreleri, melanom hücreleri ve gastrointestinal sistem Kaval hücreleri bulunmaktadır. Sağlıklı insanlarda, kemik iliği kök hücrelerinin yaklaşık %1-4'ü, CD34+ pozitif hematopoietik hücrelerin %60-75'i

c-Kit reseptörünü de eksprese eder. Yetişkin fare oositleri c-Kit reseptörünü eksprese ederken, çevresindeki granüloza hücreleri kök hücre faktörü (Stem cell factor, SCF) eksprese etmektedir. B hücresi progenitörlerinin yaklaşık %85'i c-Kit reseptörünü de eksprese eder, ancak hücre farklılaşması ve olgunlaşması ile yavaş yavaş ekspresyon kaybolur. CD4-, CD8-, CD3- B hücrelerinin de yaklaşık %30'u, c-Kit reseptörünü eksprese etmektedir. Ayrıca, c-Kit reseptörü deri uzantılarında, meme epitel hücrelerinde ve beyindeki küçük nöronlarda da bulunmuştur (Liang et al., 2013).

2.7.3. CD34 Ekspresyonu

CD34, 110 KDa bir transmembran hücre yüzeyi glikoproteinidir (Diaz-Flores et al., 2014). CD34 miyeloid ve lenfoid seri hematopoietik progenitör hücrelerde, endotelial hücrelerde ve bazı organlardaki stromal hücrelerde eksprese edilmektedir. Bununla birlikte mast hücreleri, eozinofiller, kas satellite hücreleri, kıl folikülü kök hücreleri ve nöronlarda da eksprese edilmektedir (Nielsen and McNagny, 2008). Kalpte rejenerasyonda önemli rol oynayan telositlerin CD34/c-Kit, CD34/Vimentin için pozitif olduğu bildirilmiştir (Crețoiu and Popescu, 2014).

2.7.4. CD45 Ekspresyonu

CD45, tüm lenfo-hematopoietik hücrelerde eksprese edilen yüksek moleküler ağırlıklı bir glikoproteindir. CD45, protein tirozin fosfataz aktivitesi sergiler ve hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Miyeloid T ve B hücre soyunun normal ve malign hücrelerinde bulunur. B lenfositlerin CD45 ekspresyonu, kemik iliğinde normal hücre olgunlaşması sırasında artarken olgun hücrelerde stabil kalmaktadır (Hendrickx and Bossuyt, 2001). İnsanlarda yapılan bir çalışmada, atriyumda çok az sayıda c-Kit+ hücre popülasyonunun olduğu ve bu hücrelerden, CD45 ekspresyonu sergileyenlerin mast hücresi, CD45- hücrelerin ise endotelial progenitör hücreler olduğu bildirilmiştir (Sandstedt et al., 2010).

2.7.5. PCNA Ekspresyonu

Çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA), DNA replikasyonu, DNA onarımı ve hücre döngüsü kontrolünde rol alan 36 kDa'lık bir proteindir. Konsantrasyonu hücrenin proliferatif durumu ile doğrudan ilişkilidir. Hücre döngüsünün G1 fazında artar, G1/S fazında zirveye ulaşır, G2'de azalır ve M fazında düşük seviyelere inmektedir (Celis and Celis, 1985; Kurki et al., 1986). PCNA'nın CDK2-siklin-A kompleksi ile etkileşime girdiği biyokimyasal çalışmalarda bildirilmiştir. Bu etkileşim

hücre döngüsünde S fazına özgüdür (Koundrioukoff et al., 2000).

2.7.6. Vimentin Ekspresyonu

Vimentin, fibroblastlar, endotelyal hücreler, makrofajlar, melanositler, Schwann hücreleri ve lenfositler gibi birçok hücrede bulunan bir ara filamenttir. Moleküler ağırlığı yaklaşık 57 kD'dir (Robinson-Bennett and Han, 2006). Kardiyak telositlerin CD34/Vimentin için pozitif olduğu bildirilmiştir (Crețoiu and Popescu, 2014).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Proje Kapsamındaki Deney Hayvanlarının Temini

Çalışmanın deney bölümünde kullanılan 6,5 aylık 60 adet yetişkin erkek Sprague Dawley sıçan OMÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Ortam sıcaklığı 23°C ve nispi nem oranı %50±5 havalandırılmalı bir laboratuvarında, 12'şer saatlik aydınlık ve karanlık ışık koşulları uygulandı. Hayvanlar standart sıçan pelet yemi ve su ile *ad libitum* olarak beslendi. Deney öncesinde sıçanların 7 gün süreyle normal oda sıcaklığında uygun şartlarda, yeterli yem ve su verilerek ortama adaptasyonları sağlandı ve tüm sıçanlar tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Her grupta 10 sıçan olmak üzere toplam altı grup oluşturuldu. Deney süreci boyunca yapılan işlemler Tablo 3.1. de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmadaki grupların sınıflandırılması ve yapılan uygulamalar

Grup	Sıçan (n)	Grup	İşlem
1	10	Kontrol grubu	Tartım ve numaralandırma işlemleri dışında herhangi bir işlem yapılmamıştır.
2	10	SF uygulanan kontrol grubu (Taşıt Grubu)	Çalışmanın 8. ve 9. günlerinde 1 mg/kg %0,9'luk NaCl, SF (izoproterenol'ün solventi) periton içi yol ile uygulandı.
3	10	Yağ uygulanan kontrol grubu (Taşıt Grubu)	23 gün boyunca günde bir kez zeytinyağı (400 g ağırlığındaki bir sıçana 1 ml doz hesabıyla) (CoQ10'un solventi) oral gavaj ile uygulandı. (Şekil 3.1.)
4	10	IP uygulanan grup	Çalışmanın 8. ve 9. günlerinde 85 mg/kg dozda IP, SF içinde çözdürülerek periton içi yol ile uygulandı.
5	10	CoQ10 uygulanan grup	23 gün boyunca, günde bir kez 20 mg/kg/gün dozunda zeytinyağında çözdürülen CoQ10 oral gavaj ile uygulandı.
6	10	IP ve CoQ10 kombinasyonu uygulanan grup	23 gün boyunca günde bir kez oral 20 mg/kg/gün dozunda CoQ10 oral gavaj ile, çalışmanın 8. ve 9. günlerde 85 mg/kg dozda IP, SF içinde çözdürülerek periton içi yol ile uygulandı.

SF: Serum fizyolojik, IP: İzoproterenol, CoQ10: Koenzim Q10, n: sayı

Deney boyunca sıçanlar belli aralıklarla tartılarak doz hesapları yeniden düzenlendi. Deney sonunda (çalışmanın 24. gününde), ketamin-ksilazin anestezisi altında ötenazi işlemi gerçekleştirildi. Hayvanların kalpleri çıkarılarak, ventriküller ve atriyumlar görülecek şekilde horizontal olarak kesilip iki eşit parçaya ayrıldı. Eşit olarak kesilen kalp dokularının bir yarımı histopatolojik analizler için ayrıldı, kalan

kalp dokusu dondurulup, western blot analizleri (her gruptan 5 hayvana ait kalp örnekleri) yapılıncaya kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı. Diğer 5'er hayvandan alınan kalp dokuları da PCR analizleri için ağırlıkları ölçülerek, üzerine ağırlığının 10 katı kadar RNAlater Stabilization Solüsyonu (AM7020, Invitrogen) eklendi. Analizler yapılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Histopatolojik ve immunohistokimyasal analizlerde kullanılacak olan kısımları ise %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildikten sonra rutin alkol ksilol serilerinden geçirilerek parafine bloklandı.



Şekil 3.1. Oral gavaj uygulanması

3.2. Histopatolojik İncelemeler

Hazırlanan bloklardan mikrotomda (Leica, RM2125RT) 5 mikron kalınlığında kesilen örnekler, hematoksilin-eozin (H&E), fosfotungustik asit hematoksilin (PTAH) ve Crossman trikrom boyama yöntemleri ile boyandı (Crossmon, 1937; Luna,

1968a, 1968b). Boyanan kesitler araştırma mikroskobu altında (Nikon, Eclipse E600) incelenerek değerlendirildi ve Nikon digital-sight görüntüleme sistemi (Nikon DS Camera Head DS-5M) ile görüntülendi.

H&E boyama ile kardiyomiyositlerde dejenerasyon, nekroz, yangısal hücre infiltrasyonları ve fibrozis gibi kalpte meydana gelen histopatolojik değişiklikler Tablo 3.2. belirtilen şekilde değerlendirildi.

Tablo 3.2. Kalp parankimindeki histopatolojik bulguların skorlama kriterleri (Bertinchant et al., 2000'den modifiye edilmiştir)

Derece	Histopatolojik Değişiklikler	Skor
Normal	Histopatolojik değişiklik olmayan normal kalp yapısı	-
Hafif	Hafif yangısal hücre infiltrasyonu, fokal kardiyomiyosit hasarı veya sınırlı multifokal dejenerasyon	+
Orta	Kardiyomiyositlerde dejenerasyon, nekroz, yangısal hücre infiltrasyonu, intersitisyel fibrozis	++
Şiddetli	Kardiyomiyositlerde dejenerasyon, nekroz, yangısal hücre infiltrasyonu, yaygın intersitisyel fibrozis	+++

Crossman trikrom boyama ile özellikle izoproterenol uygulanan gruplarda meydana gelen fibrozisin değerlendirilmesinde, kollajen yoğunluğu temel alındı. Şekillenen fibrozisin büyüklüğü, Image J programı (Wayne Rasband & contributors – NIH, USA, versiyon 1.53e) kullanılarak total ventriküler alana fibrotik alan oranı hesaplanmak sureti ile ölçüldü. PTAH boyama ise, normal ve nekrotik kardiyomiyositlerdeki sitriasyon varlığının değerlendirilmesi amacıyla yapıldı.

3.3. İmmunohistokimyasal İncelemeler

Bu amaçla hazırlanan 4-5 µm kalınlığındaki kesitler 3-aminopropyltriethoxysilane (APES, Sigma-Aldrich) ile kaplanmış adeziv lamlara alındı. Boyamada Ultravision large volume detection system (Thermo Scientific, USA) kiti öngörülen standart prosedüre göre uygulandı. Primer antikorlar, üretici firmanın önerisi ve denemeler doğrultusunda belirlenen oranlarda fosfat tampon solüsyonu (PBS, pH 7,4) ile sulandırılarak kullanıldı. Kullanılan primer antikorların özellikleri Tablo 3.3.'de belirtilmiştir.

APES kaplı lamlardaki kesitler, ksilen ile deparafinize edilerek seri alkollerde

dehidre edildi. Antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması için kesitler sitrat tampon (pH 6.0) ile mikrodalga fırında 600 watt'da 15 dakika tutuldu. Endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için metanolde hazırlanmış %0,3'lük H₂O₂'de 10 dakika bekletildi. Spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için kesitler protein bloklama solüsyonunda 5 dakika inkübe edildi.

Tablo 3.3. İmmunohistokimyasal ve immunofloresan boyamalarda kullanılan antikorların detayları

Antikorun ismi	Üretici Firma ve Katalog Numarası	Özellikleri	Dilüsyon IHC	Dilüsyon IF
Anti-Histone H3	Abcam ab47297	Rabbit poliklonal	1:250	-
PCNA	Thermo Scientific PA5-27214	Rabbit poliklonal	1:100	-
c-Kit	Santa Cruz sc-365504	Mouse monoklonal	1:50	1:100
CD34	Aviva Systems Biology ARP60994_P050	Rabbit poliklonal	1:100	1:250
Vimentin	Abcam ab8978	Mouse monoklonal	1:250	1:500
CD45	Abcam ab10558	Rabbit poliklonal	1:100	1:100
FITC	Thermo Fisher Scientific 65-6111	Goat anti-Rabbit IgG	-	1:100
Rhodamin	Sigma, AP124R	Goat Anti-Mouse IgG	-	1:200
DAPI	Sigma, D9542	-	-	1:100

Kesitler antikorlarla +4 °C de bir gece inkübe edildi. Kesitlere biotinle işaretli sekonder antikor damlatılarak 10 dakika bekletildikten sonra streptavidin peroksidaz enzimi ile 10 dakika inkübe edildi. Protein bloklanması aşaması haricinde tüm aşamalardan sonra kesitler 3 defa 5 dakika PBS (pH: 7,4) ile yıkandı. Kromojen olarak 3-amino-9-etilkarbazol (Invitrogen, AEC, Camarillo, USA) mikroskop altında kontrollü olarak uygulandı. Kesitlerin çekirdek boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Daha sonra cc/mount aqueous mounting medium (Sigma-Aldrich, C9368) ile kaplanarak lamel kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi. Pozitif kontrol olarak c-Kit ve CD34 antikorları için rat kemik iliği dokusu, CD45 için dalak, vimentin antikorları için internal kontrol olarak kalbin subendokardiyum ve subepikardiyumu kullanıldı. Negatif kontrol için kesitler primer antikor yerine PBS ile inkübe edildi.

PCNA ve Histon H3 immunohistokimyasal boyamaların değerlendirilmesi, incelenen alandaki pozitif hücrelerin sayılarına göre yapıldı. Bu antikorlar için, x20'lik objektifte sol ventrikül, sağ ventrikül ve interventriküler septumda 10'ar olmak üzere toplamda 30'ar alan incelenerek totalde 4,35 mm² alan değerlendirildi. PCNA ve

Histon H3 antikorları için rat bağırsak dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

c-Kit ve CD34 antikorları için, tüm kalp kesitinde morfolojisi telosit tanımlamasına uyan, ince sitoplazmik uzantıya sahip sitoplazmasında granüller bulunmayan (mast hücre ayrımı nedeniyle) hücrelerin tümü sayıldı.

3.4. İmmunofloresan İncelemeler

Kalpte telositleri belirlemek amacıyla ikili immunofloresan boyamalar yapıldı. Tüm kalp kesitinde telosit morfolojisine uygun olan CD34+/c-Kit+ ve CD34+/Vimentin+ olan hücreler telosit olarak değerlendirildi. Telositlerin CD45 ekspresyonu olmadığı için c-Kit+/CD45+ olan hücreler mast hücresi, c-Kit+/CD45- hücreler kök hücre olarak belirlendi.

İmmunofloresan incelemeler için alınan kesitler deparafinize ve dehidre edildikten sonra mikrodalga fırında sitrat tampon (pH: 6.0) ile 20 dakika kaynatıldı. Ardından PBS ile yıkandı. Spesifik olmayan boyanmaları önlemek için protein bloklama solüsyonunda 5 dakika bekletildi.

Kesitler c-Kit ile +4 °C de bir gece inkübe edildikten sonra goat anti-mouse rhodamin sekonder antikoru ile karanlık ortamda 30 dk inkübe edilip PBS ile yıkandı. Nikon, Eclipse E600 floresan ataçmanlı mikroskopta c-Kit antikoru ile kırmızı renkte boyanan hücreler incelendikten sonra tekrar 5 dk protein bloklama işlemi yapıldı.

İkinci antikor olarak Anti-CD34 ve CD45 antikorları ile kesitler 1 saat oda ısısında ve karanlık ortamda inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra tüm kesitler goat anti-rabbit FITC antikoru ile karanlık ortamda 30 dk inkübe edilip PBS ile yıkandı. Tüm kesitler 4, 6-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride (DAPI) ile çekirdek boyaması yapıp fluoromount (F4680, Sigma- Aldrich) kullanılarak kapatıldı.

Deparafinizasyondan antikor inkübasyonuna kadar olan işlemler CD34/vimentin ikili immunofloresan boyamaları için de aynı aşamalar kullanılarak yapıldı. CD34 antikoru ile +4 °C de bir gece inkübe edildikten sonra PBS ile yıkandı. Goat anti rabbit FITC antikoru ile karanlık ortamda 30 dk inkübe edilip PBS ile tekrar yıkandı. Vimentin antikoru ile 1 saat oda ısısında ve karanlık ortamda inkübe edildi. Goat anti mouse rhodamin sekonder antikoru ile karanlık ortamda 30 dk inkübe edilip PBS ile yıkandı. DAPI ile çekirdek boyaması yapıp fluoromount (F4680, Sigma- Aldrich) kullanılarak kapatıldı. Floresan ataçmanlı mikroskopta immunofloresan boyamalar değerlendirildi. Kesitlerde tüm kalpte her iki antikor için de yapılan ikili boyamalardaki pozitif hücrelerin görüntüsü ve çekirdek boyamaları kaydedildi. Elde

edilen ikili ve çekirdek boyama fotoğrafları Photoshop (Adobe, versiyon 6.0) programında birleştirilerek değerlendirildi.

3.5. Western Blot Yöntemi

Western blot analizleri için her bir gruptan 5'er örnek seçildi. Bu yöntem kalp dokusunda c-Kit (Santa Cruz, sc-365504) ve CD34 (Santa Cruz, sc-7324) proteinlerinin düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Bu teknikte kontrol proteini olarak aktin seçildi ve bu amaçla anti-aktin mouse monoclonal (EMD Millipore, MAB1501) antikoruna kullanıldı.

3.5.1. Kalp Dokularından Protein Ekstraksiyonu

Çalışmada kontrol ve deney gruplarından alınan kalp örnekleri tartıldı. Bistüri ile makro parçalama işlemi yapıldı. Sonrasında her bir örneğe ağırlıklarının 10 katı kadar RIPA lizis tamponu ve proteaz inhibitörü (Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets, EDTA-free / Thermo Scientific, A32961) eklendi.

Örnekler homojenizatör (Bio-Gen, PRO200) ile 2 dakika süre ile homojenize edildi. Her homojenizasyon işleminin ardından prob iki defa %70'lik alkol ve ardından 2 defa distile su ile dikkatlice temizlendi. Elde edilen homojenat ependorflara aktarılıp +4 °C'de rotator'da (Mini Labroller, Labnet Int.) bir saat süre ile inkübe edilip ardından 15 dakika +4 °C'de 14.000 rpm'de (Nüve, NF800R) santifüj edildi. İşlem sonunda elde edilen supernatant yeni ependorflara aktarılarak -20 °C'de muhafaza edildi. Örneklerdeki total protein miktarını belirlemek için Lowry Protokolü uygulandı.

3.5.2. Lowry Protokolü

Mikroplatte belirlenen kuyucuklara 100 µl standart (BSA), kör ve numune pipetlendi. Örnekler çift çalışıldı. Her bir kuyucuğa 200 µl Biuret Master Mix (Tablo 3.4.) eklendi. Üzeri kapatılarak orbital karıştırıcıda 10-15 dk inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyucuğa 20 µl 1 N Folin & Ciocalteu's reaktifi (Sigma-Aldrich, F9252) eklenip ve üzeri kapatılarak 30 dk inkübasyona bırakıldı. Microplate Reader'da (Biotek) 650 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu (Lowry et al., 1951).

3.5.3. Modifiye Dot Blot Yöntemi

Western blot tekniğın uygulanması öncesi kalp örneklerinden ekstrakte edilen hedef proteinleri ve kullanılacak antikorların uygun dilüsyonlarını belirlemek üzere Abcam firmasının dot blot protokolünden modifiye edilen yöntem kullanıldı (Abcam,

2022):

1. Nitrosellüloz membranlar, örnek sayısına göre ince uzun dikdörtgenler şeklinde kesildi. 5'er dakika distile su ve transfer membranda bekletildi.
2. Kalp örneklerinden elde edilen 1 µl protein örnekleri kesilen membranların (PVDF membran, Thermo Scientific, 88518) üzerine dikkatlice damlatılıp kurumaya bırakıldı.
3. 30 dakika süre ile bloklama işlemi yapıp membranlar farklı dilüsyonlardaki CD34, c-Kit ve Aktin antikorları ile 1'er saat inkübe edildi.
4. Membranlar 2x15 dakika TBS-Tween solüsyonunda çalkalayıcıda yıkandı.
5. Primer antikorlara uygun 1:1000 dilüsyondaki sekonder antikorlar ile 30 dakika süre ile inkübe edildi. Ardından, tekrar 2x15 dakika TBS-Tween solüsyonunda çalkalayıcıda yıkandı.
6. Western blot detection reagent (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, 34579) ile 2 dakika süre ile dot'lar görünür hale gelinceye kadar inkübe edildi. Membran distile su ile kısa süre yıkanıp, ChemiDoc XRS System (Biorad)'de görüntülendi. Elde edilen görüntüler doğrultusunda, western blot aşamasında kullanılacak olan CD34, c-Kit ve Aktin antikorları için uygun dilüsyonlar belirlendi.

İşlem sonrası kalp dokusu örneklerinden ekstrakte edilen proteinler aşağıda aşamaları belirtilen Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) yöntemi ile incelendi.

3.5.4. SDS-PAGE Yöntemi ve İmmunoblotting

İlk olarak 4x yükleme tamponu (Tablo 3.4) hazırlandı. Yükleme tamponu örnekler ile karıştırılıp her bir kuyucuğa 50 µg oranında protein yüklenecek şekilde ayarlandı. Sonrasında örnekler vortekslenip termal çalkalayıcıda (Biosan, TS100 C) 100 °C'de 5 dk bekletilerek denatüre edildi ardından buz içine konuldu. 2000 devirde 10 saniye süre ile santrifüj edildi.

TGX Stain-Free FastCast Acrylamide %7,5'lük (Biorad, 1610181) kit protokolüne göre jel hazırlanarak, iki cam kaset arasına döküldü ve standı yerleştirildi. Yaklaşık yarım saat polimerizasyon işlemi için bekletildi. Hazırlanan jel Mini-Protean Tetra Cell elektrofrezis cihazına (Biorad) yerleştirerek cihaz üzerindeki belirtilen çizgiye kadar tanka Running tampon solüsyonu eklendi (Tablo 3.4). Jel üzerindeki tarak çıkarılarak oluşan kuyucuklardan ilkinde 8 µl protein marker (Thermo Scientific,

26619) diğ er kuyucuklara da 25'er µl örnekler yüklendi. Koş turma için güç kaynağı (Labnet Int, Power Station 300) voltajı ilk olarak 160 V'da 12 dk, daha sonra 200V da 45 dakika olacak şekilde ayarlandı. Marker jelin kenarına geldiğinde koş turma iş lemi tamamlandı. Jel boyutuna uygun büyüklükte kesilen PVDF membran (PVDF Transfer Membrane, Thermo Scientific, 88518) önce absolut metanol ile 5 dk inkübe edilip ardından 5dk distile su ile yıkandı. Sonra jel, membran ve jele uygun kesilmiş filtre kâğıtları (Western Blotting Filter Paper 7 cm x 8,4 cm Thermo Scientific; 84783) beraber transfer tamponu (Tablo 3.4) içerisinde 5 dk bekletildi. Blot cihazının (Thermo Scientific, PierceG2 Fast Blotter) alt ve üst tablası distile su ile silinip kurulandı. Blot cihazının alt tablasına 2 kat filtre kâğıdı yerleştirilip üzerlerinden deney tüpü veya kalınca bir pipet yardımı ile hafifçe bastırılarak hava kabarcıkları alındı. Üzerine PVDF membran ve bunun da üzerine jel dikkatlice konulduktan sonra en üste tekrar 2 kat filtre kâğıdı konuldu. Merdane yardımı ile hava kabarcıkları tekrar alındı. Blot cihazı 25V, 1.0A ve 60 dk ya ayarlanarak transfer iş lemi yapıldı. Membran %3'lük yağsız süt tozu ile hazırlanan bloklama solüsyonunda 30 dk inkübe edildi. Bloklama ardından belirlenen oranlarda sulandırılan primer antikorlar ile +4°C'de bir gece süre ile Rocker rotator'da (Biosan Rocker-Shaker, MR-12) inkübe edildi. Membran üç kez 15'er dk TBS-Tween ile çalkalayıcıda yıkandı. Sonra, membran primer antikora uygun olarak seçilen ve bloklama solüsyonu ile 1:1000 oranında sulandırılan sekonder antikor (Goat anti- Mouse IgG, HRP, Thermo Scientific, 31430) ile 60 dk çalkalayıcıda inkübe edildi. Membran üçer kez 15'er dk TBS-Tween ile yıkandı. Ardından, western blot detection reagent (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, 34579) ile 2 dakika süre ile bantlar görünür hale gelinceye kadar inkübe edildi. Membran distile su ile kısa süre yıkayıp, ChemiDoc XRS System (Biorad)'de görüntülendi ve bantların kalınlıkları aktin bandına göre oranlanarak analiz edildi.

Tablo 3.4. Western blot yönteminde kullanılan solüsyonların hazırlanması

Solüsyon	Hazırlanışı
RIPA lizis tamponu	5 ml %10 sodyum deoksikolat, 1,5 ml Tris HCl pH 7.6, 0.5 ml %10 SDS, 0,5 ml IGEPAL'e distile su eklenerek karışım 50 ml'ye tamamlandı
4x yükleme tamponu	250µl 4x stok Laemmli Protein yükleme boyası, 90 µl %20 SDS, 10 µl %100 Beta-merkaptolanol
Running tamponu	2 lt distile su, 200 ml 10X Tris-glycine, 10 ml %20 SDS
Biuret Master Mix	0,5 ml %1 CuSO ₄ , 0,5 ml %2 Na-tartarat x 2H ₂ O, 50 ml %2 Na ₂ CO ₃ solüsyonu ile karıştırıldı

RIPA: Radyoimmünopresipitasyon Assay, **HCL:** Hidroklorik Asit, **SDS:** Sodyum Dodesil Sülfat

3.6. RT-PCR

3.6.1. RNA İzolasyonu

Sıçanlardan alınan kalp dokuları homojenizatör (Bio-Gen, PRO200) yardımıyla homojenize edildikten sonra RNA ekstraksiyon işlemi GF-1 total RNA ekstraksiyon kiti (Vivantis) protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonrası RNA değerleri Colibri Nanodrop (Titertek-Berthold) cihazında RNA-40 değeri ile ölçüldü.

3.6.2. cDNA Sentezi

Çıkan RNA ölçüm sonuçlarına göre cDNA çeviri aşamasında kullanılacak RNA hacimleri belirlendi ve cDNA sentez işlemi VERITI (Applied Biosystem) cihazında RTPL12 2-Step RT-PCR (Vivantis) kiti ile gerçekleştirildi. cDNA sentezi için oligod(T) primer olarak kullanıldı. RNA primer miksi 65°C'de 5 dakika inkube edildikten sonra 4°C'de 10 dakika bekletildi. Bu aşamada cDNA sentez miksi tüplere eklendi ve 42°C 60 dakika bekletildi. Son olarak enzim inaktivasyonu için 85°C'de 5 dakika bekletilerek işlem tamamlandı.

3.6.3. Real-Time PCR Analizleri

Housekeeping gen ile üç ayrı gen bölgesi çalışıldı. Bu gen bölgeleri Universal ProbeLibrary' den seçildi. Analizlerde tablodaki primerlerden yararlanıldı (Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. Real-Time PCR analizlerinde kullanılan primerlerin özellikleri

Gen	Baz Dizilimi	Referans
CD45	F: CTGCCAGAGGAGCTGACACT R: TACTCTCTTCGGGCACACCT	GenBank XM_006249910.2
CD117 (c-Kit)	F: AGACGTACAGATCCAGAATG R: TGCTCTTTGCTGTTACCTT	(Jeong et al., 2020)
CD34	F: TACCATGGGGCTGGGTAG R: TCTCCGAGGCAACAGAAGTC	GenBank NM_001107202
Aktin	F: CGTTGACATCCGTAAAGACC R: GATAGAGCCACCAATCCACA	(Cao et al., 2006)

BrightGreen 2X qPCR MasterMix-No Dye (ABM, Kanada) kit standart protokolü takip edilerek 95 °C’de 10 dakika enzim aktivasyonu ve 35 döngü 95 °C 15 saniye denatürasyon ve 60 °C’de 60 saniye bağlanma/uzama ile 7500 Fast (Applied Biosystem, ABD) real-time cihazında kurulumlar gerçekleştirildi. Sonuç olarak belirlenen uygun threshold ve baseline değerleriyle Ct eldesi sağlandı. $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplamalar yapıldı (Livak and Schmittgen, 2001).

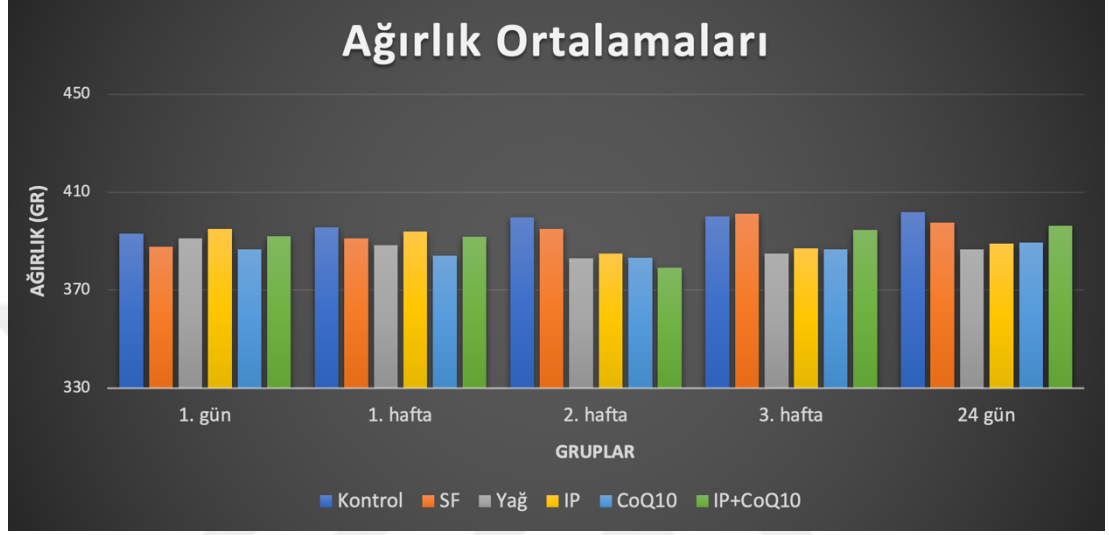
3.7. İstatistiksel Analizler

Tez çalışmasından elde edilen verilerin hipotez testlerine ait varsayımların incelenmesinde; normal dağılımın kontrolünde Shapiro-Wilk testi, varyansların homojenliğinde ise Levene testi kullanıldı. Varsayım kontrollerine uygun olarak, 6 farklı gruba ait ortalamaların karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ve Kruskal-Wallis testlerinden yararlandı. Farklılıkların belirlenmesine amacıyla yapılan çoklu karşılaştırmalarda; Tukey, Dunnett ve Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF) testleri kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler Ortalama±Standart Hata ve Ortanca (Q1-Q3) olarak gösterildi. Analizlerin tamamı SPSS 26 (Chicago, Illinois, USA, SPSS Inc.) istatistiksel paket programı ile yürütüldü ve kullanılan tüm analizlerde anlamlılık kriteri olarak $P<0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sıçanların Ağırlık Verileri

Çalışma boyunca belli aralıklarla gerçekleştirilen tartımlarda elde edilen canlı ağırlıkların değişimi Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Tüm hayvanların ortalama canlı ağırlıkları

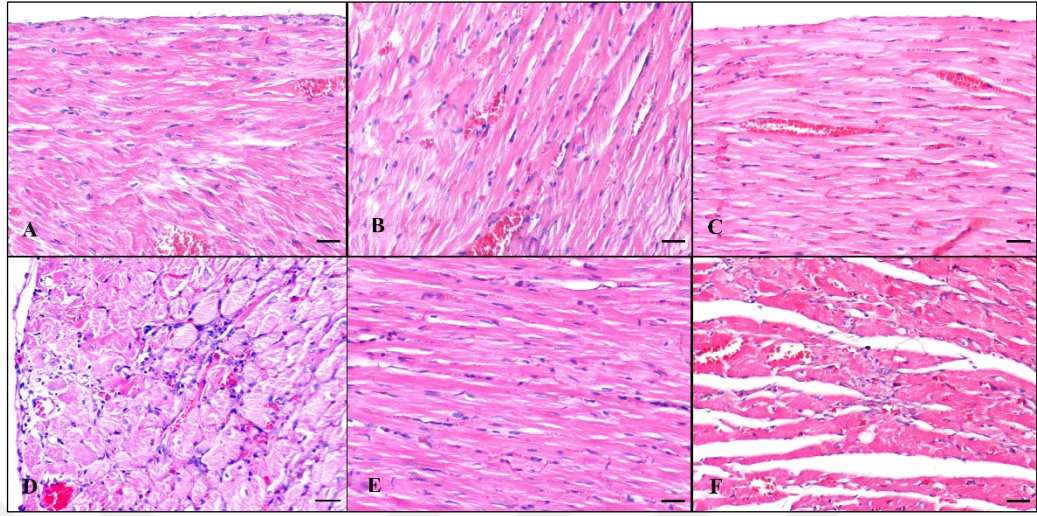
Kontrol ve SF gruplarındaki sıçanların zamana bağlı ağırlık ortalamalarının paralel seyrettiği gözlemlendi. Yağ ve CoQ10 gruplarında 2. haftada ağırlık ortalamalarında sırasıyla %2,1 ve %0,9'luk kilo kaybı görülürken, 3. hafta ve deney sonuna doğru tekrar ağırlık artışı görüldü. IP ve IP+CoQ10 gruplarında 2. haftada sırasıyla %2,5 ve %3,3'lük ağırlık kaybı belirlenirken, 3. hafta ve deney sonuna kadar tekrar ağırlık artışı görüldü. Deney sonu ağırlık ortalamaları 2. haftadaki ağırlıklarla karşılaştırıldığında, IP grubunda ortalama %1'lik, IP+CoQ10 grubunda ise %4,6'lık bir artış belirlenmiştir.

4.2. Histopatolojik Bulgular

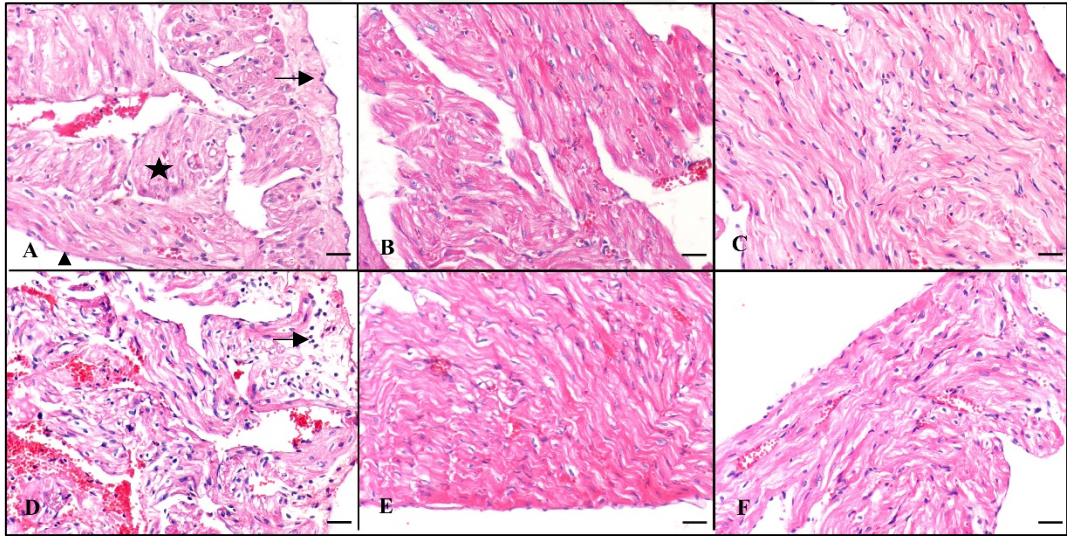
4.2.1. Hematoksilen-eozin Boyamalar

Grupların H&E boyamaları Tablo 3.1’de belirtilen şekilde değerlendirildi. Tüm grupların atriyum, ventrikül, interventriküler septum bölümleri ayrı ayrı incelendi (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Kontrol, SF, yağ ve CoQ10 uygulanan gruplarda normal kalp histolojisiyle uyumlu olarak, uzun oval çekirdek yapısına sahip çizgili kalp kası hücreleri görüldü. İnce bir vaskülarize endomizyum tabakasıyla ayrılan bu hücrelerin demetler oluşturduğu ve birbirleriyle interkalat disklerle bağlandığı

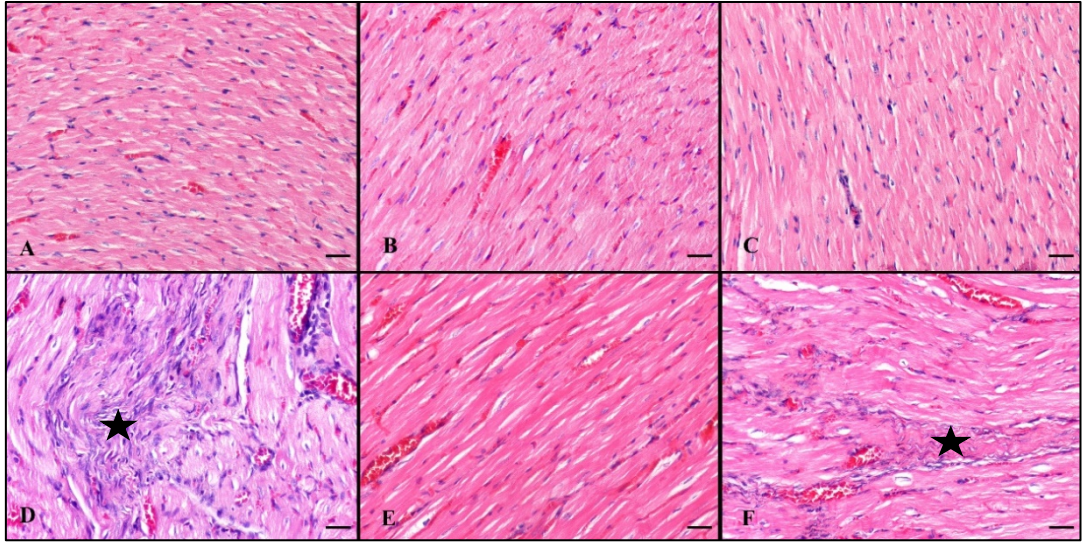
görüldü. Ventriküler miyokardiyumda kardiyomiyositlerde şişkinlik, dejenerasyon ve nekroz gibi değişikliklere rastlanmadı.



Şekil 4.2. Sol ventrikül miyokardiyumunun H&E boyamaları A) Birbirleriyle anastomoz yapan ve düzenli organizasyon sergileyen kardiyomiyositlerin uzunlamasına görünümü, Kontrol grubu B) SF grubu C) Yağ grubu D) Kardiyomiyositler arasında bulunan hücresel infiltrasyon, IP grubu E) CoQ10 grubu F) Kalp kası lifleri arasında bulunan hücresel infiltrasyon, IP+CoQ10 grubu, Bar: 30 µm

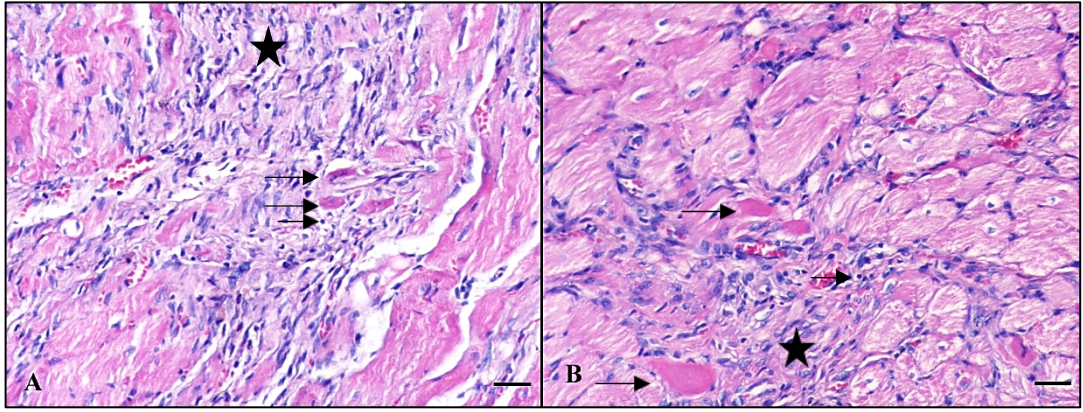


Şekil 4.3. Sağ/Sol atriyumların H&E boyamaları A) Kontrol grubu (atriyum epikardiyumu (ok), atriyum miyokardiyumu (yıldız), atriyum endokardiyumu (ok başı) B) SF grubu C) Yağ grubu D) Atriyumda subepikardiyal yerleşimli mononükleer yangısal hücre infiltrasyonu ve ödem (ok), IP grubu E) CoQ10 grubu F) IP+CoQ10 grubu, Bar: 30 µm

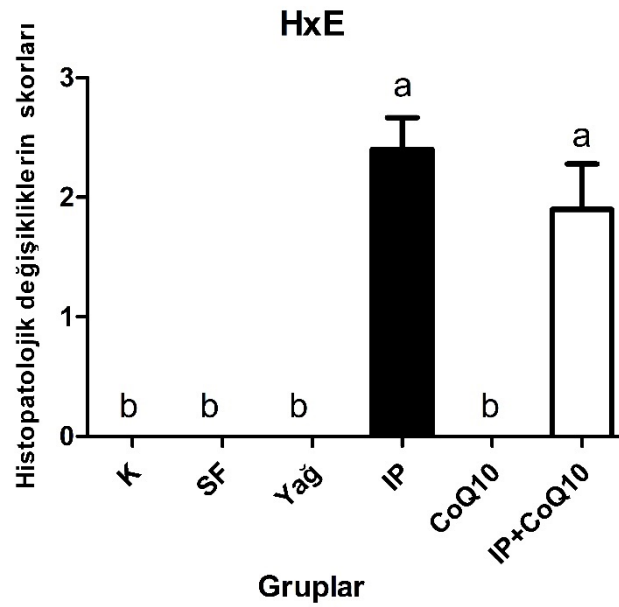


Şekil 4.4. İnterventriküler septumun H&E boyamaları A) İnce bir endomizyumla ayrılan uzunlamasına seyreden kas liflerinin görünümü, Kontrol grubu B) SF grubu C) Yağ grubu D) Miyokardiyumda fibrozis (yıldız), IP grubu E) İnce bir endomizyumla ayrılan uzunlamasına seyreden kas liflerinin görünümü, CoQ10 grubu F) Kas lifleri arasında fibrozis (yıldız), IP+CoQ10 grubu, Bar: 30 µm

İzoproterenol grubu yangısal hücre infiltrasyonu açısından değerlendirildiğinde, ventriküler miyokardiyumda, kas demetleri arasında, damar çevrelerinde ödeme beraber çoğunluğu lenfosit ve az sayıda nötrofil hücrelerinden oluşan interstisyel yangısal hücre infiltrasyonlarına rastlandı. Ayrıca, aynı alandaki miyokardiyumda hipereozinofilik sitoplazma ve koyu çekirdeğe sahip nekrotik kardiyomiyositler dikkati çekti (Şekil 4.5). IP + CoQ10 grubunda benzer lezyonların IP grubuna göre daha sınırlı olduğu görüldü. IP ve IP+CoQ10 grubunda oluşan histopatolojik değişikliklerin diğer gruplara göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$) (Şekil 4.6).

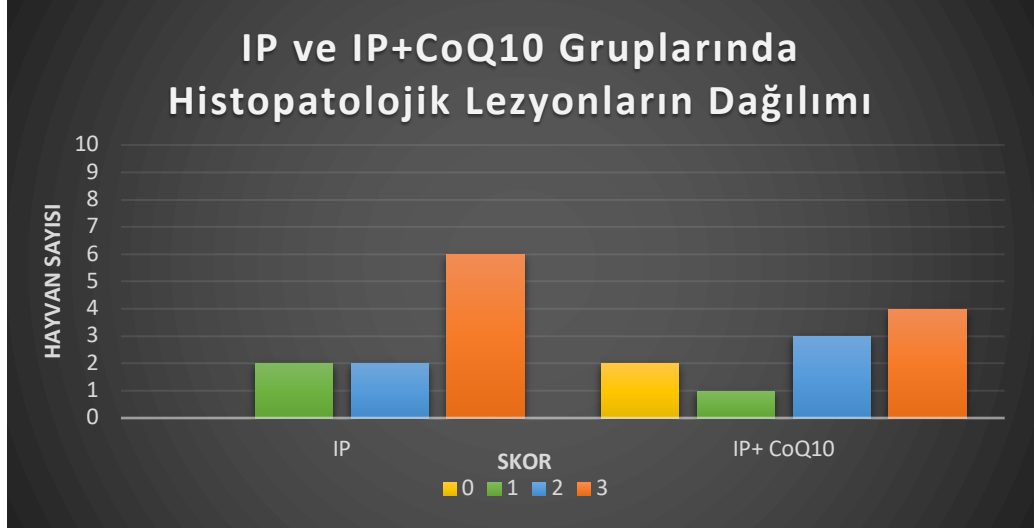


Şekil 4.5. Ventrikül miyokardiyumunda H&E boyaması, Sol ventriküler miyokarda nekrotik kardiyomiyositler (uzun ok), fibrozis (yıldız) ve yangısal hücre infiltrasyonları (kısa ok) A), B) IP grubu, Bar: 30 µm



Şekil 4.6. Histopatolojik değişikliklerin skorlanması a,b: Farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (P<0,05)

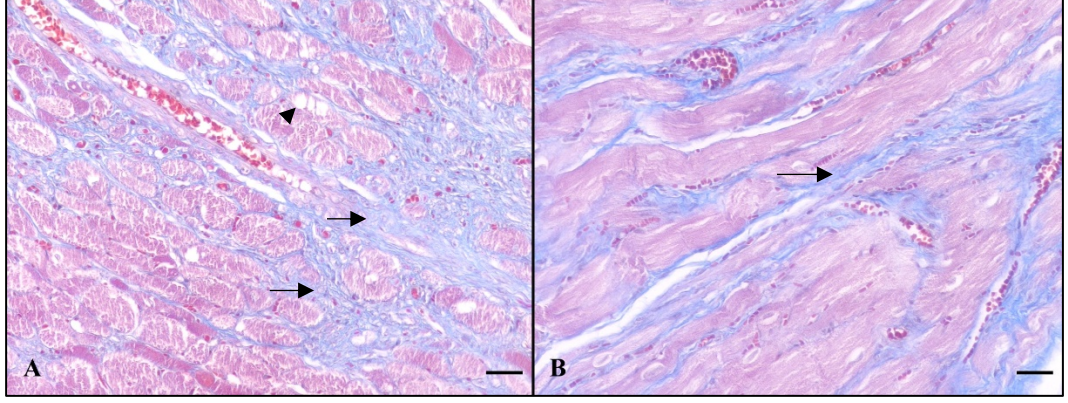
IP grubundaki sıçanların skorlanması; 6'sında (+++) ve 2'sinde (++) ve 2'sinde de (+) olarak değerlendirildi. IP + CoQ10 grubunda ise bu durum, sıçanların 4'ünde (+++), 3'ünde (++) , 1'inde (+) ve 2 sıçanda da yangıya ve fibrozise rastlanmadı. Diğer gruplarda lezyon görülmediği için sadece 2 grup kıyaslanarak frekans dağılımları grafikte gösterildi (Şekil 4.7).



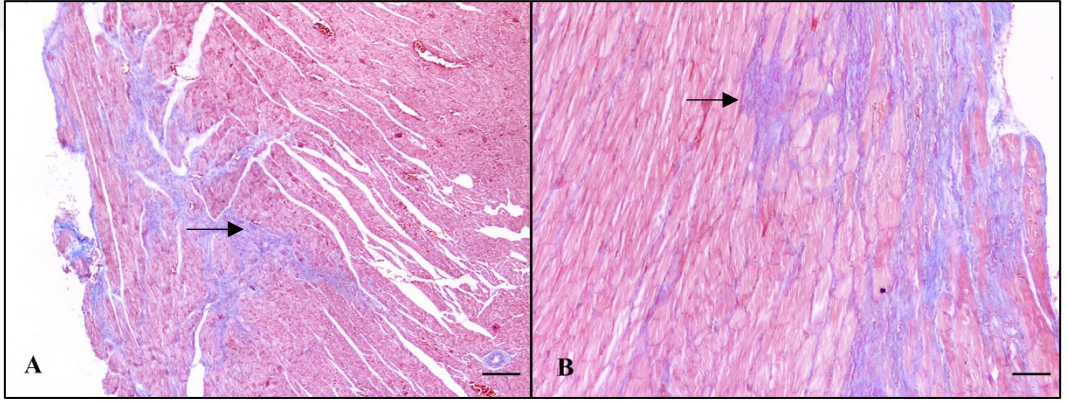
Şekil 4.7. Kalp parankimindeki histopatolojik bulguların H&E boyamalara göre skorların dağılım grafiği

4.2.2. Crossman'ın Trikrom Boyamaları

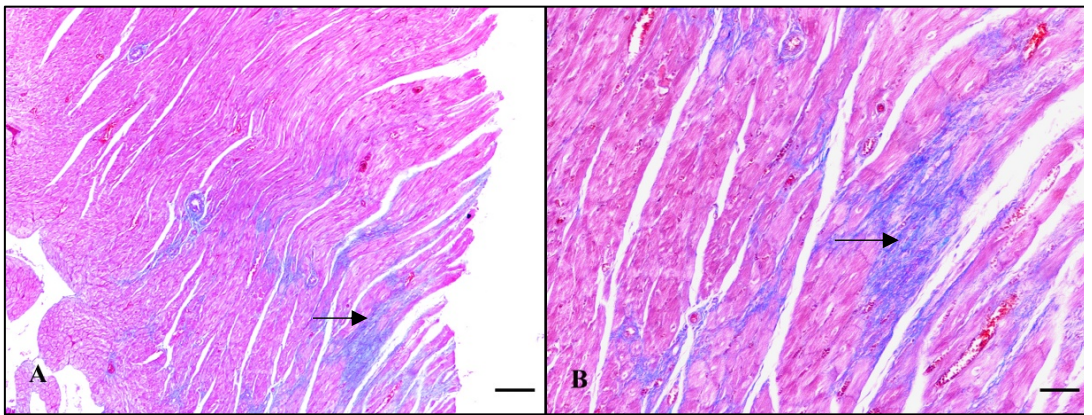
Trikrom boyanan kesitlerde IP grubunda, kalp parankiminde özellikle interventriküler septum ve sol ventriküler miyokardiyum boyunca kardiyomiyositler arasında fibrotik alanlara ilişkin yoğun boyanmalar dikkati çekti. Genelde ventrikülün apeksinde fibrozisin arttığı belirlendi (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). IP grubundaki üç sıçanda fibrotik değişikliklerin kalbin bazisinden apeksine kadar kaslar arasında dağılım gösterdiği görüldü. IP+CoQ10 grubunda ise fibrozise daha çok sol ventrikül ve özellikle de apeks bölgelerinde rastlandı (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Ancak gruptaki 2 sıçanda ventrikülün orta hattında da fibrozis şekillenmişti. Total ventriküler alandaki fibrotik alan yüzdesinin, IP ve IP+ CoQ10 gruplarındaki artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$). Kontrol, SF, yağ ve CoQ10 gruplarında arteriollerin adventisyal tabakalarında ve kalp kapakçıklarında normal düzeylerde kollajen gözlenmekle birlikte, diğer bölgelerde fibrozise ilişkin boyanmalar saptanmadı. Aynı şekilde bu boyanmalara IP ve IP+CoQ10 gruplarında da rastlandı (Şekil 4.12). IP grubunda IP+ CoQ10 kıyasla daha fazla fibrozis alanı belirlendi ($P<0,05$) (Şekil 4.13).



Şekil 4.8. Ventrikül miyokardiyumundaki Crossman Trikrom Boyaması, İntersitisyel fibrozis (ok) ve dejenere kardiyomiyositlerde vakuolizasyon (ok başı), A) IP grubu B) IP+ CoQ10 grubu, Bar: 30 µm



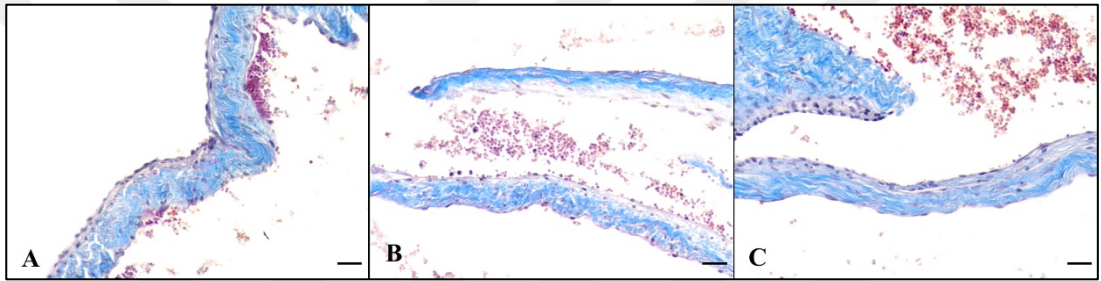
Şekil 4.9. Ventrikül miyokardiyumundaki Crossman Trikrom Boyaması, A) Ventriküler miyokarda fibrotik alanlar (ok) B) Kalbin apeksinde fibrotik alanlar (ok) IP grubu, Bar: 150 µm



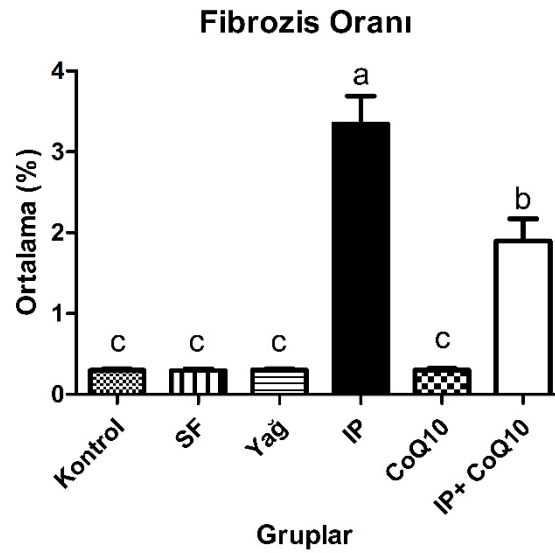
Şekil 4.10. Ventrikül miyokardiyumundaki Crossman Trikrom Boyaması, Ventriküler miyokarda fibrozis (ok) A) IP+ CoQ10 grubu, Bar: 150 µm B) IP+ CoQ10 grubu, Bar: 60 µm



Şekil 4.11. Crossman Trikrom Boyaması, IP+ CoQ10 grubundan kalbin longitudinal kesitinin subgros görünümü (oklar: fibrozis)



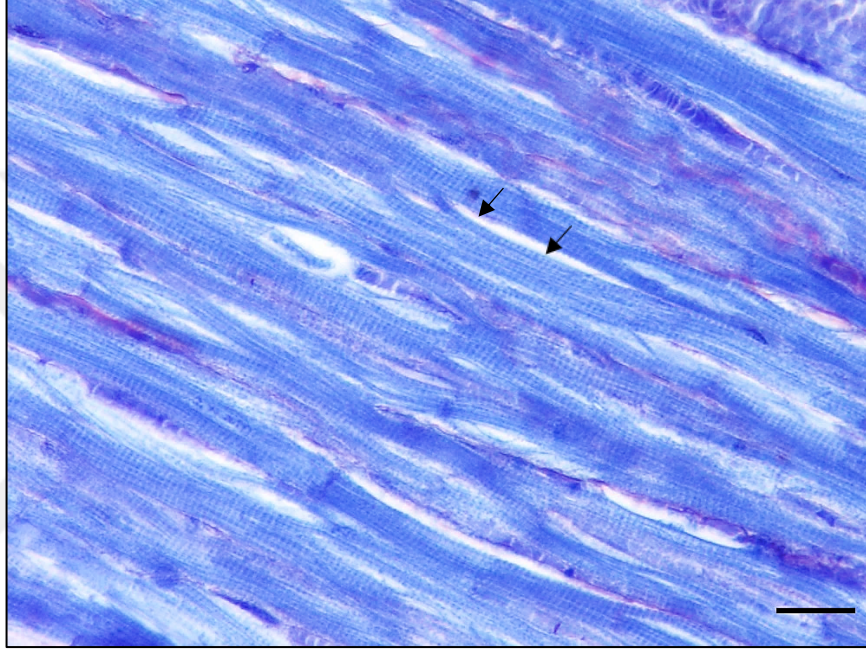
Şekil 4.12. Atrioventriküler valvülün Crossman Trikrom Boyamaları, A) Kontrol grubu, B) IP grubu, C) IP+CoQ10 grubu, Bar: 30 µm



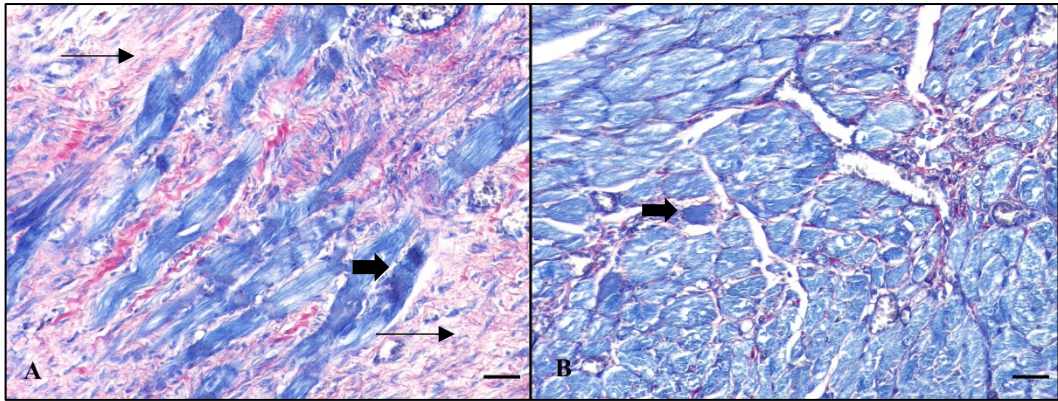
Şekil 4.13. Kalpteki fibrozisin total ventriküler alana oranı. a,b,c: Farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P < 0,05$)

4.2.3. PTAH Boyamaları

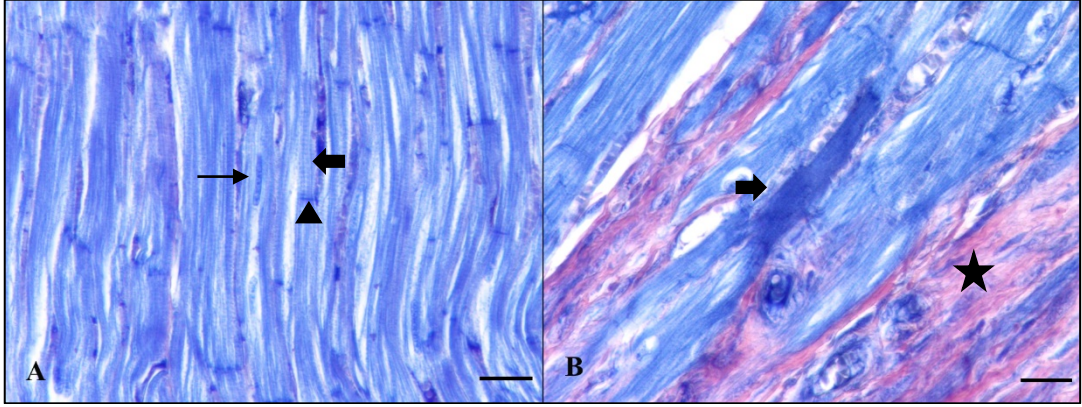
PTAH boyaması, kalp kasındaki sitriasyon yapısının belirlenmesinde, ayrıca fibrin ve kollajeni göstermek için kullanılmaktadır. Kontrol, SF, yağ ve CoQ10 gruplarında kardiyomiyositlerde sitriasyon normal şekilde görülürken, IP ve IP+CoQ10 gruplarındaki nekrotik kardiyomiyositlerde sitriasyonun bozulduğu ve sitoplazmanın daha homojen görüldüğü dikkati çektir (Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.14. PTAH boyaması, Sol ventrikül miyokardiyumundaki kalp kasının normal sitriasyon yapısının görünümü (oklar), CoQ10 grubu Bar: 20 μ m



Şekil 4.15. PTAH boyaması, A) Ventrikül miyokardiyumunda yıkılmış kardiyomiyositlerin yerini alan yoğun fibrotik doku (uzun oklar) ve nekrotik kardiyomiyosit (kısa ok), IP grubu, Bar: 30 μ m B) Kalbin apeksinin görünümü, sınırlı sayıda nekrotik kardiyomiyosit (kısa ok), IP+CoQ10 grubu, Bar: 30 μ m

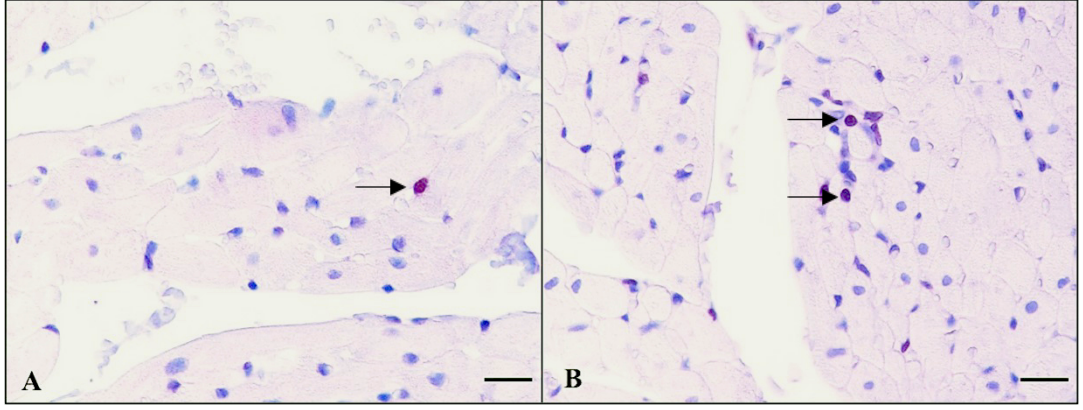


Şekil 4.16. PTAH boyaması, A) Sol ventriküler miyokardiyumun görünümü, uzunlamasına seyreden kalp kasının uzun-oval çekirdeği (uzun ok), iki kalp kasını birbirine bağlayan interkalat disk (ok başı), normal striasyon yapısının görünümü (kısa ok), Kontrol grubu B) Sol ventriküler miyokardiyumda nekrotik kardiyomiyositlerde striasyon kaybı (homojen görünüm, kısa ok), fibrozisli alanlar (yıldız), IP grubu, Bar: 20 µm

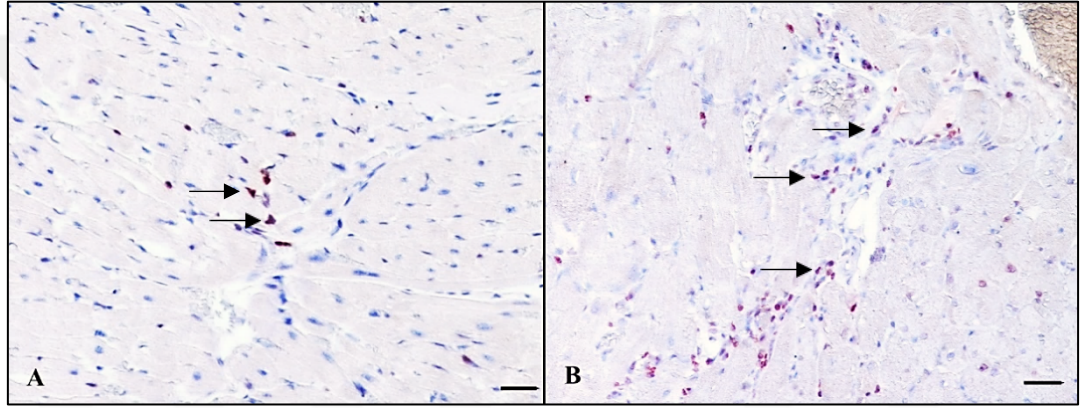
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.3.1. Histon H3 İmmunohistokimyasal Bulguları

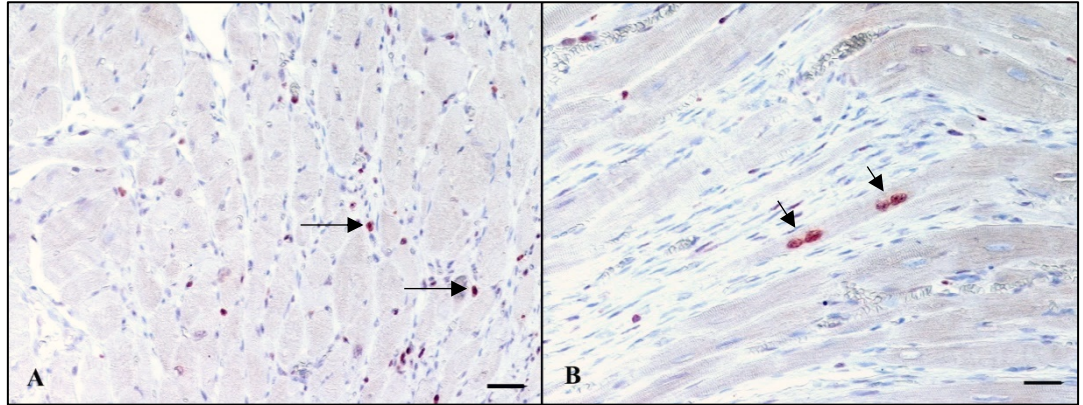
Histon H3 antikoruna ile kalpte mitozaya giren hücreler incelenerek kalpte olası rejenerasyon değerlendirildi. Pozitif hücre sayılarını belirlemek için sol ventrikül, sağ ventrikül ile interventriküler septum bölgelerinden hazırlanan kesitlerde 10'ar farklı alan incelendi. Kontrol, SF, yağ ve CoQ10 gruplarında sınırlı sayıda kardiyomiyosit çevresindeki fibroblastik/endotelial (F/E) oldukları düşünülen hücrelerin çekirdeklerinde immunopozitiflik görüldü (Şekil 4.17). Benzer şekilde, IP ve IP+ CoQ10 gruplarında genellikle ventriküler kardiyomiyositler arasında bulunan intersitisyel (F/E) hücrelerde immunopozitiflik saptandı (Şekil 4.18). Ayrıca, fibrozisin olduğu sol ventrikül ve interventriküler septumdaki fibroblastik hücrelerde de nükleer immunopozitiflik görüldü. Bununla birlikte fibrozisin olduğu bölgeye komşu az sayıda kardiyomiyosit çekirdeğinde Histon H3 immunopozitifliğine rastlandı (Şekil 4.19).



Şekil 4.17. A) Sağ ventrikül miyokardiyumunda Histon H3 immunopozitif hücre, Kontrol grubu B) İnterventriküler septumda sınırlı sayıda Histon H3 immunopozitif hücreler, Kontrol grubu, Bar: 20 µm, Streptavidin-Biotin Peroksidaz (SBP)/AEC



Şekil 4.18. A) Sol ventrikül miyokardiyumunda Histon H3 immunopozitif hücreler SF grubu, B) Miyokardiyumda perivasküler ve intersitisyel hücrelerde Histon H3 immunopozitifliği, IP grubu, Bar: 30 µm, SBP/AEC

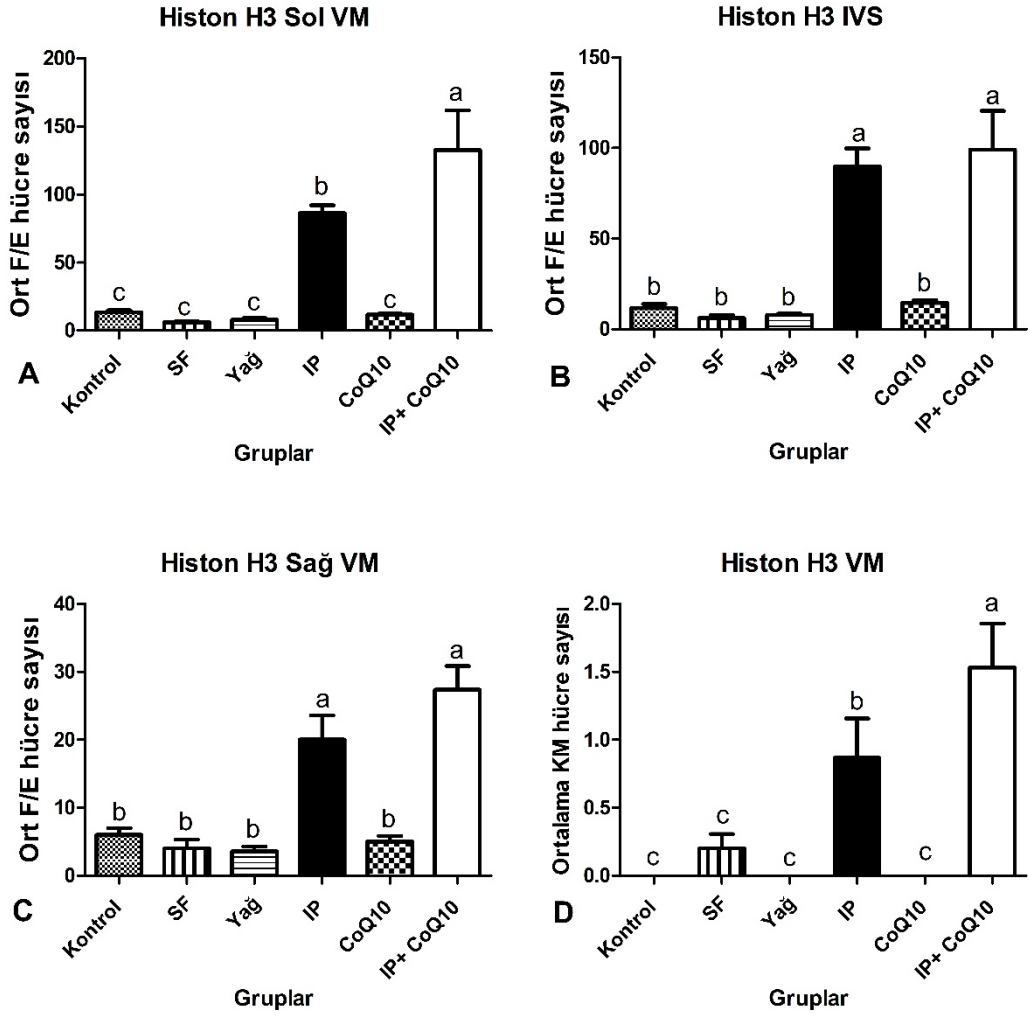


Şekil 4.19. Sol ventrikül miyokardiyumunda kardiyomiyositlerin çevresindeki intersitisyel hücrelerde Histon H3 immunopozitifliği (uzun oklar) IP+CoQ10 grubu, B) Fibrotik alandaki kardiyomiyosit çekirdeğindeki Histon H3 immunopozitifliği (kısa oklar) IP+CoQ10 grubu, Bar: 30 µm, SBP/AEC

İntersitisyel hücrelerde Histon H3 immunopozitifliğinin gruplar arası farklılıkları grafiklerde gösterildi (Şekil 4.20). Kontrol, SF, yağ ve CoQ10 gruplarında

az sayıda immunopozitif hücreye rastlanırken, IP ve IP+CoQ10 gruplarında bu sayı belirgin şekilde artmıştır. Histon H3 immunopozitifliği; sol ventrikülde F/E hücrelerinde değerlendirildiğinde, IP ve IP+CoQ10 grupları ile diğer tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$). IP+CoQ10 grubunun IP grubuna göre artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($P<0,05$). İnterventriküler septum ve sağ ventriküldeki F/E hücrelerdeki immunopozitiflik değerlendirildiğinde; kontrol, SF, yağ ve CoQ10 grupları ile IP ve IP+CoQ10 grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$) (Şekil 4.20A ve Şekil 4.20B).

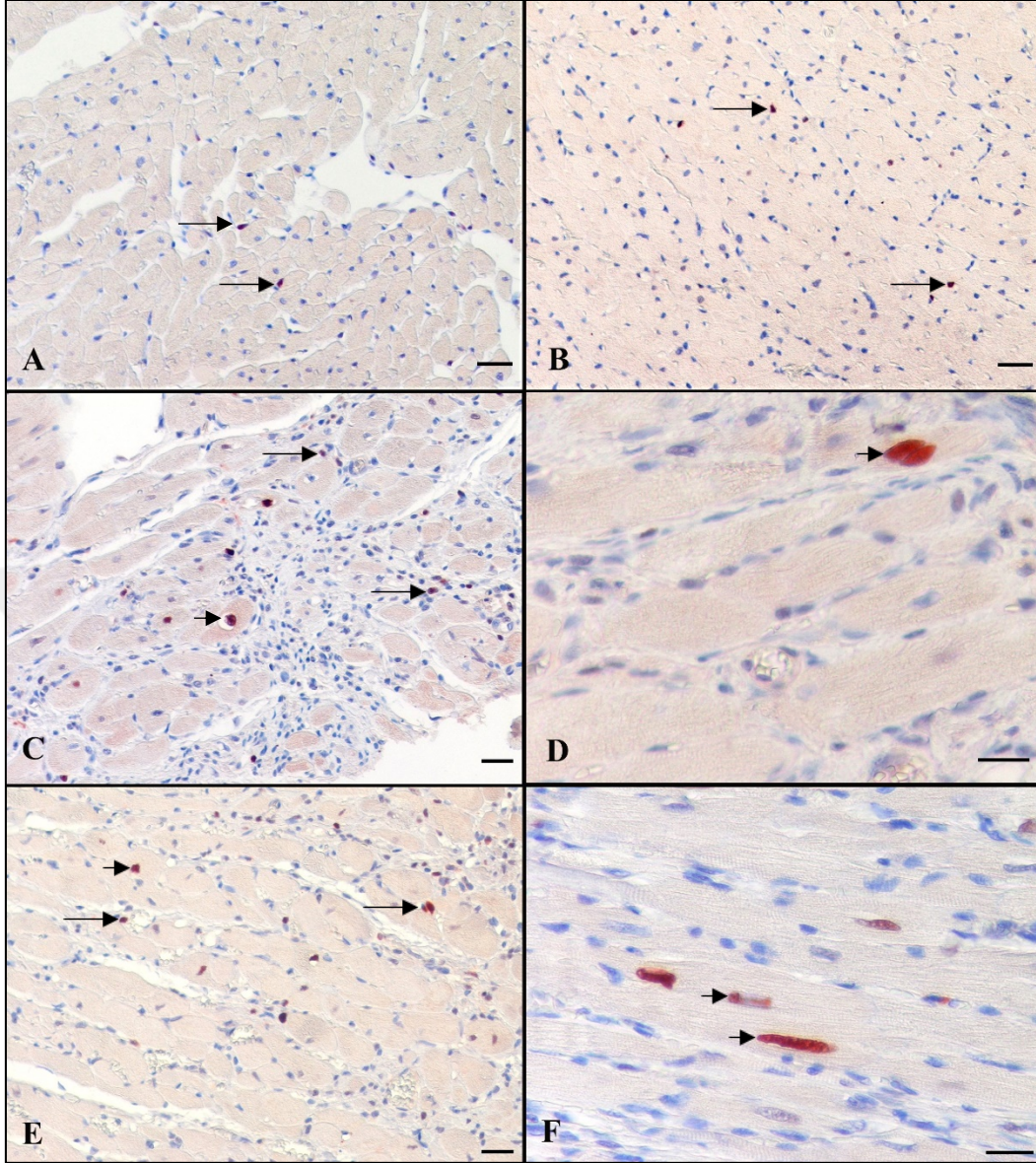
Kardiyomiyositlerde Histon H3 immunopozitifliği oldukça az görüldü. IP grubunda sırasıyla sol ve interventriküler septumda ortalama 1,4 ve 1,2 immunopozitif kardiyomiyosit saptanırken, IP+CoQ10 grubunda ise ortalama 1,6 ve 2,4 immunopozitif kardiyomiyosit sayıldı. Tüm ventriküler alandaki ortalama kardiyomiyosit sayısı gruplar arasında değerlendirildiğinde, IP+CoQ10 grubunun IP grubuna göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.20D) ($P<0,05$).



Şekil 4.20. Histon H3 immunopozitif boyanma grafikleri A) Sol ventriküldeki ortalama Histon H3 immunopozitif F/E hücre sayısı, B) IVS'da ortalama Histon H3 immunopozitif F/E hücre sayısı, C) Sağ ventriküldeki ortalama Histon H3 immunopozitif F/E hücre sayısı, D) Tüm ventriküldeki Histon H3 immunopozitif KM sayısının gruplar arası ortalama dağılımı. a,b,c: Farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0,05$).

4.3.2. PCNA İmmunohistokimyasal Bulguları

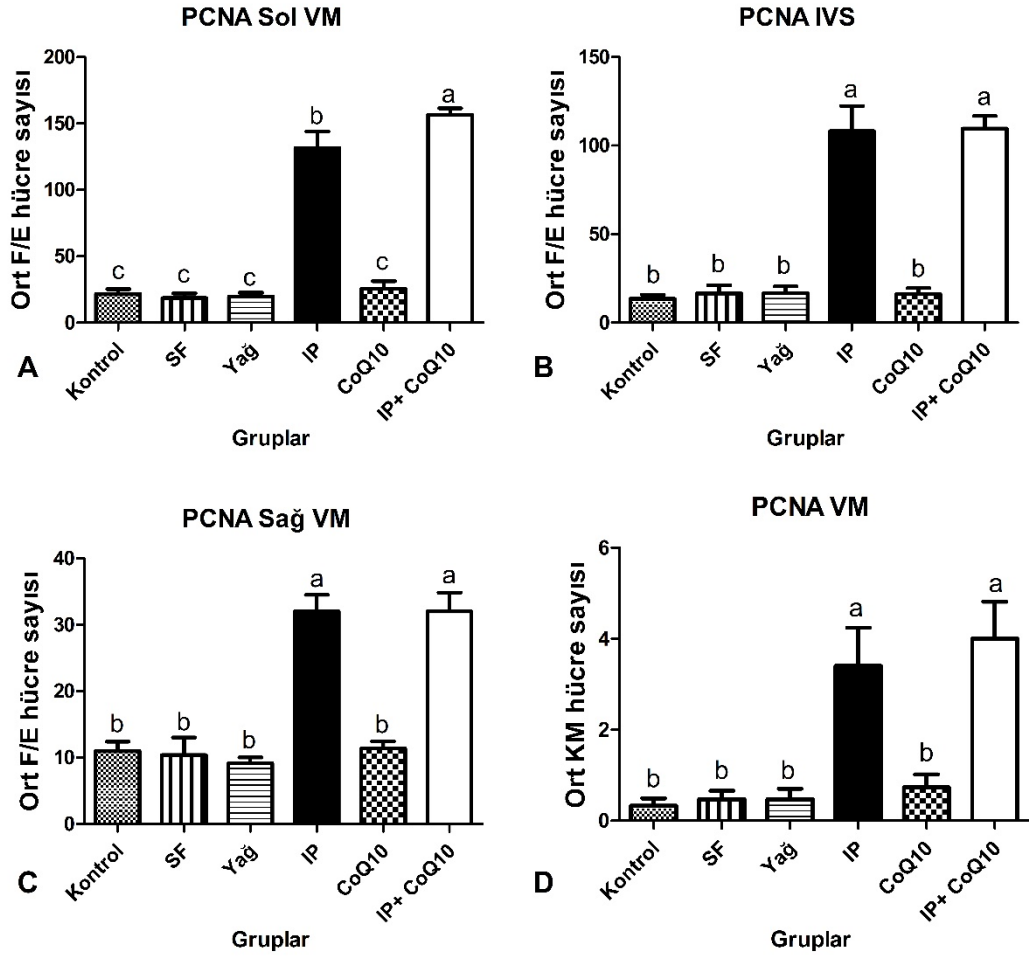
PCNA antikoru ile kalpte prolifere olan hücreler değerlendirildi. Yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, Histon H3 boyamalarına paralel şekilde, ventriküler miyokardiyumda bulunan F/E morfolojili intersitisyel hücrelerde ve az sayıda kardiyomiyositte nükleer immunopozitiflik görüldü (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. A) Sol ventrikül miyokardiyumunda bulunan PCNA immunopozitif intersitisyel hücreler (oklar) Kontrol grubu, Bar: 30 μ m, B) PCNA immunopozitif intersitisyel hücreler (oklar) CoQ10 grubu, Bar: 30 μ m, C) Kalbin apeksinde PCNA immunopozitif kardiyomiyosit (kısa ok) ve intersitisyel hücreler (oklar) IP grubu, Bar: 30 μ m, D) İnterventriküler septumda PCNA immunopozitif kardiyomiyosit (kısa ok) IP grubu, Bar: 20 μ m, E) Miyokardiyumda PCNA immunopozitif kardiyomiyosit (kısa ok) ve intersitisyel hücreler (oklar) IP+CoQ10 grubu, Bar: 30 μ m, F) PCNA immunopozitif kardiyomiyositler (kısa oklar) IP +CoQ10 grubu, Bar: 20 μ m

PCNA antikoruna ile boyanan kesitlerde, sağ ventriküler miyokardiyumda ve interventriküler septumda kontrol, SF, yağ, CoQ10 gruplarına göre IP ve IP+CoQ10 gruplarında immunopozitif intersitisyel ile fibroblastik hücrelerde belirgin artış görülürken, her iki grup arasında istatistiksel bir farka rastlanmadı (Şekil 4.22B ve 4.22C). Ancak, sol ventriküler miyokardiyumda IP grubuna göre IP+CoQ10 grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P<0,05$) (Şekil 4.22A).

IP grubunda sol ventriküler miyokardiyumda ortalama 6,2 ve IP+CoQ10 gruplarında ise 6,4 kardiyomiyositte pozitiflik görüldü. Bu oran interventriküler septumda IP gruplarında ortalama 3,6 iken IP+CoQ10 gruplarında 4,8 ve sağ ventrikül miyokardiyumda ise her iki grupta da ortalama 0,8 kardiyomiyositte immunopozitifliğe rastlandı. Tüm ventriküler alandaki ortalama kardiyomiyosit immunopozitifliği grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.22D).

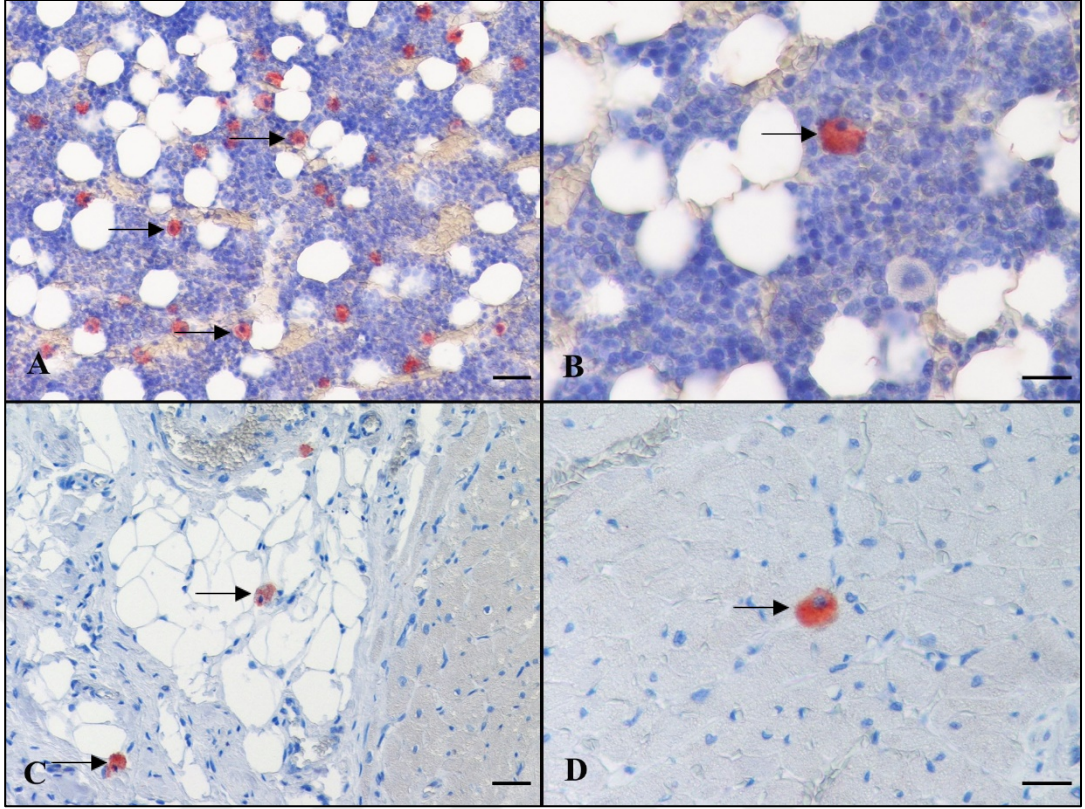


Şekil 4.22. PCNA immunopozitif boyanma grafikleri; A) Sol ventriküler miyokardda ortalama PCNA immunopozitif F/E hücre sayısı, B) IVS'da ortalama PCNA immunopozitif F/E hücre sayısı, C) Sağ ventriküler miyokardda ortalama PCNA immunopozitif F/E hücre sayısı, D) Tüm ventriküldeki PCNA immunopozitif KM sayısının gruplar arası ortalama dağılımı. Gruplar arası ortalama dağılımı. a,b,c: Farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (P<0,05).

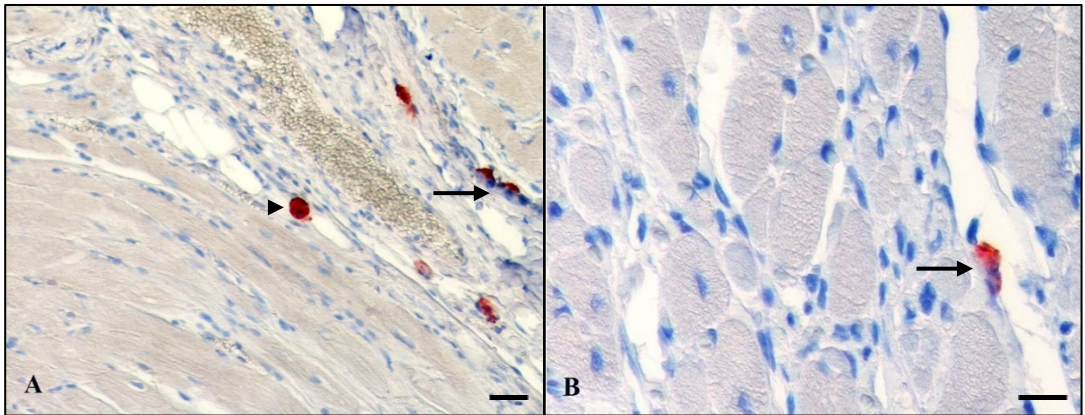
4.3.3. c-Kit İmmunohistokimyasal Bulguları

Kontrol, SF, yağ ve CoQ10 gruplarında c-Kit immunopozitif hücelere çoğunlukla damar çevrelerinde, ventriküler miyokardiyum intersitisyumunda,

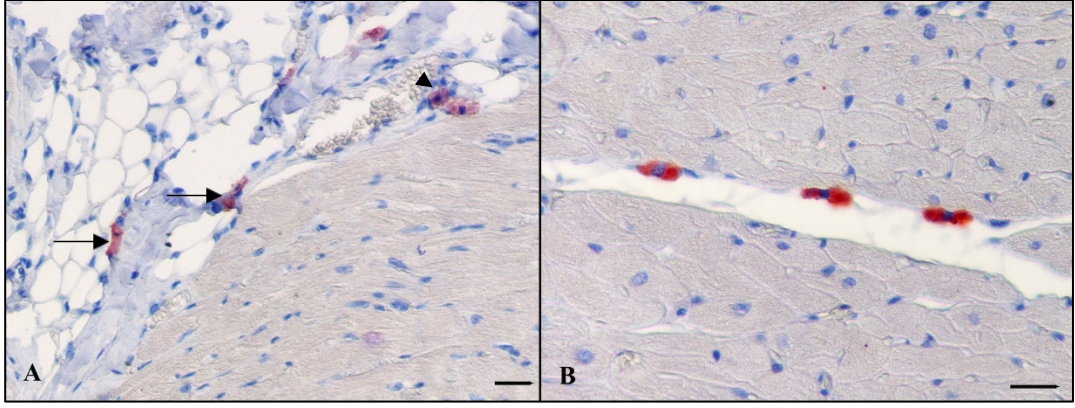
epikardiyumda ve sulkus koronaryus çevresindeki subepikardiyal yağ dokuda lipositlerin arasında rastlandı. Kalpteki pozitif hücrelerin büyük bir çoğunluğunun sitoplazmik tarzda boyandığı görüldü (Şekil 4.23A ve Şekil 4.23B). Kalpte immunopozitif hücrelerin genelde bol sitoplazmalı, yuvarlak bir çekirdeğe sahip olmaları ve sitoplazmalarının c-Kit ile pozitif boyanmasından dolayı bu hücreler mast hücreleri olarak değerlendirildi (Şekil 4.23C ve Şekil 4.23D). Çok sınırlı sayıda hücre c-Kit immunopozitif reaksiyon sergilediğinden, tüm kalp kesitinde morfolojisi telosit tanımlamasına uyan, ince sitoplazmik uzantıya sahip sitoplazmasında granüller bulunmayan (mast hücre ayrımı nedeniyle) ve sitoplazmik boyanan hücrelerin (Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26) tümü sayıldı. Bu morfolojideki c-Kit immunopozitif hücreler; kontrol, SF, yağ gruplarında ortalama $0,6\pm0,22$, CoQ10 grubunda ortalama $0,7\pm0,21$, IP ve IP+CoQ10 gruplarında ise sırasıyla ortalama $1\pm0,26$ ve $1,4\pm0,16$ olarak belirlendi. IP+CoQ10 grubundaki c-Kit immunopozitif hücre sayısının kontrol, SF, yağ ve CoQ10 gruplarına göre artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P<0,05$) (Şekil 4.27).



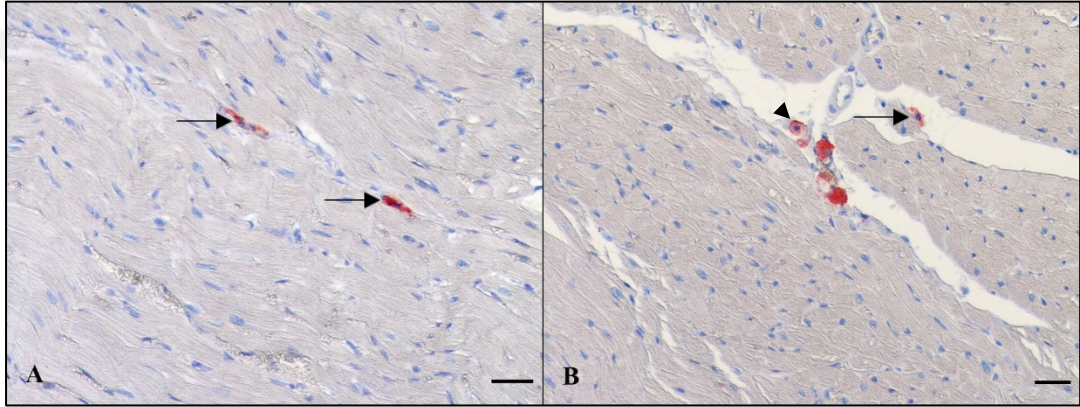
Şekil 4.23. A) Pozitif kontrol dokusu olan rat kemik iliğinde c-Kit immunopozitif hücreler, Bar: 30µm, B) Rat kemik iliğinde c-Kit immunopozitif hücreler, Bar: 20 µm C) Kalpteki subepikardiyal yağ dokuda c-Kit immunopozitif granüllü mast hücresi SF grubu, Bar: 30 µm D) Ventriküler intersitisyumda c-Kit immunopozitif sitoplazması granüllü mast hücresi SF grubu, Bar: 20 µm



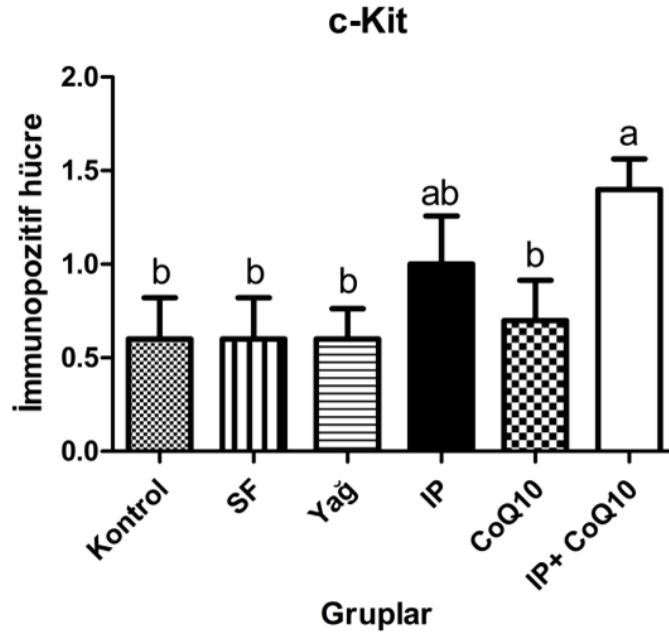
Şekil 4.24. A) Atriyoventriküler bölgede c-Kit+ hücre (ok), mast hücresi (ok başı) IP+CoQ10 grubu, Bar: 30 µm, B) Sol ventrikül miyokardiyumda c-Kit+ hücre (ok) IP+CoQ10 grubu, Bar: 20 µm



Şekil 4.25. A) Subepikardiyal yağ dokuda bulunan c-Kit+ hücreler (oklar), mast hücresi (ok başı) IP grubu, Bar: 30 μ m, B) Sol ventriküler miyokarda intersitisyumda bulunan c-Kit+ hücreler IP grubu, Bar: 20 μ m



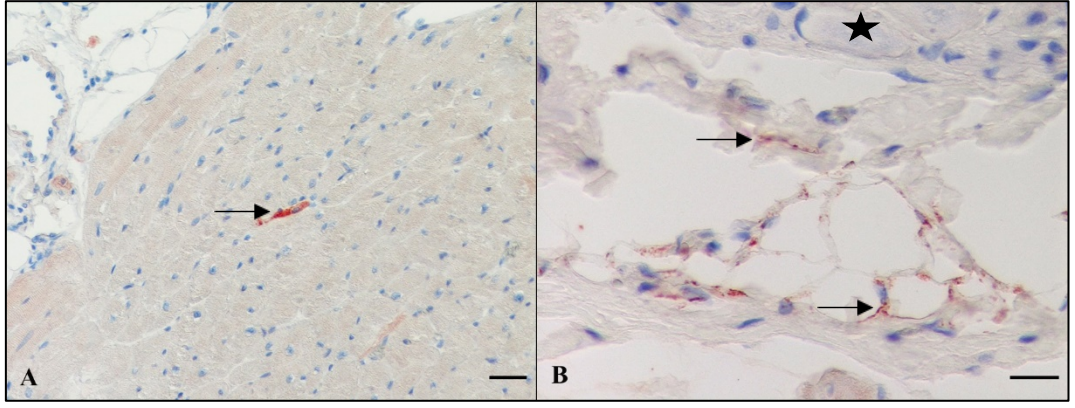
Şekil 4.26. A) Sol ventrikül miyokardiyumunda granül içermeyen sitoplazmik uzantıları bulunan c-Kit+ hücreler (oklar) Kontrol grubu, Bar: 30 μ m B) Sağ ventriküler miyokardiyumda c-Kit+ hücre (ok), mast hücresi (ok başı) CoQ10 grubu, Bar: 20 μ m



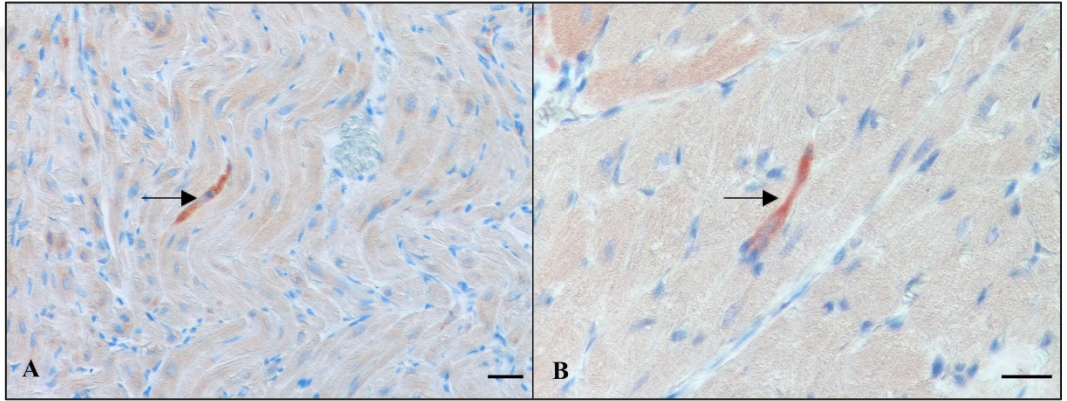
Şekil 4.27. Tüm kalpteki c-Kit immunopozitif hücrelerin gruplar arası dağılımı. a,b: Farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0,05$).

4.3.4. CD34 İmmunohistokimyasal Bulguları

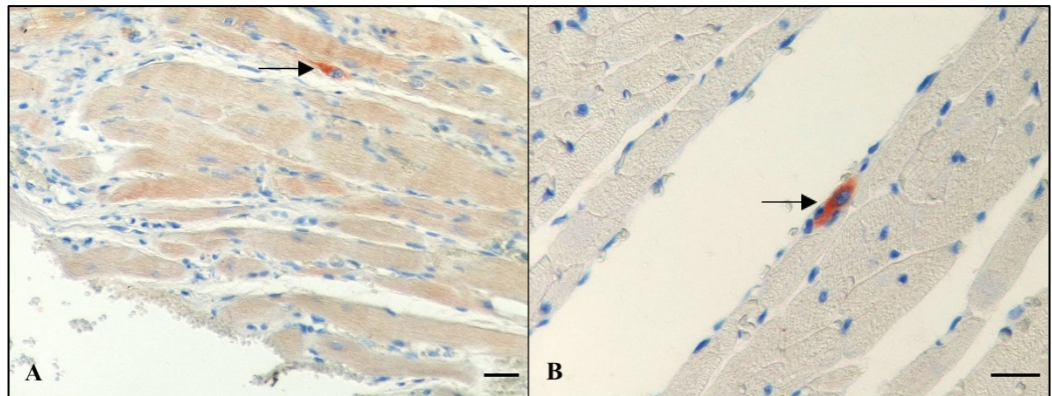
CD34 antikoruna ile yapılan immunohistokimyasal boyamaların sonucu; kontrol, SF, yağ ve CoQ10 gruplarında; sağ/sol atriyal ve ventriküler miyokardiyum katmanlarında intersitisyel yerleşimli, interventriküler septumda musküler arter çevresinde, sulkus koronaryus çevresinde subepikardiyal yağ dokuda ve anulus fibrosus'da sitoplazmik ince uzun uzantılara sahip immunopozitif hücrelere rastlandı. SF grubunda buna ek olarak 2 hayvanda interatriyal septumdaki ganglionların olduğu bölgede bağ dokuda da immunopozitif hücrelere rastlandı (Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31). Bu alanlara ek olarak, IP+CoQ10 grubunda bir sığanda interventriküler septumda yangısal alan çevresinde subendokardiyal yerleşimli, bir sığanda da ventriküler miyokardiyumdaki yangısal hücre infiltrasyonu çevresinde immunopozitiflik gözlemlendi. Fibrozis alanında immunopozitifliğe rastlanmadı. Ayrıca, tüm gruplarda granüllü geniş sitoplazmaya sahip immunopozitif mast hücreleri görüldü. IP+CoQ10 grubundaki CD34 immunopozitif hücrelerin kontrol ve yağ gruplarına göre sayısal artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$) (Şekil 4.32).



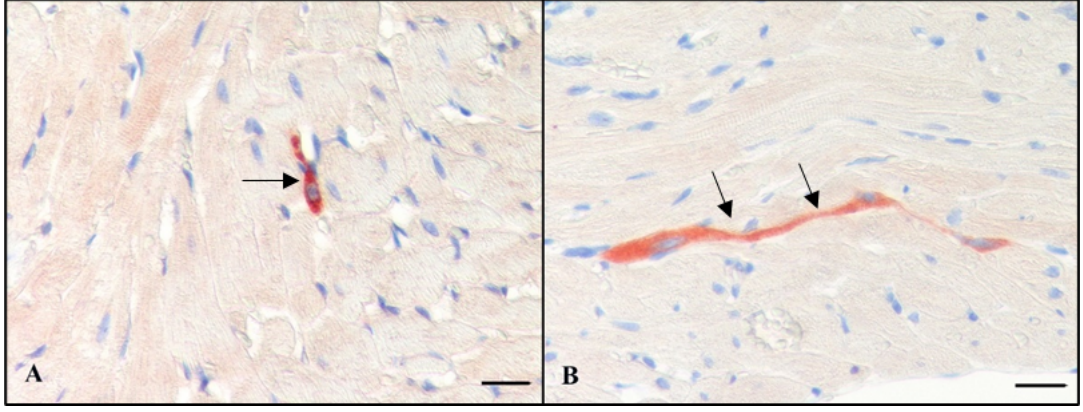
Şekil 4.28. A) Ventrikül miyokardiyumunda CD34+ hücre (ok) Kontrol grubu, Bar: 30 μ m B) Septum interatriale ganglionların (yıldız) periferindeki bağ dokuda CD34+ hücreler (oklar) SF grubu, Bar: 20 μ m



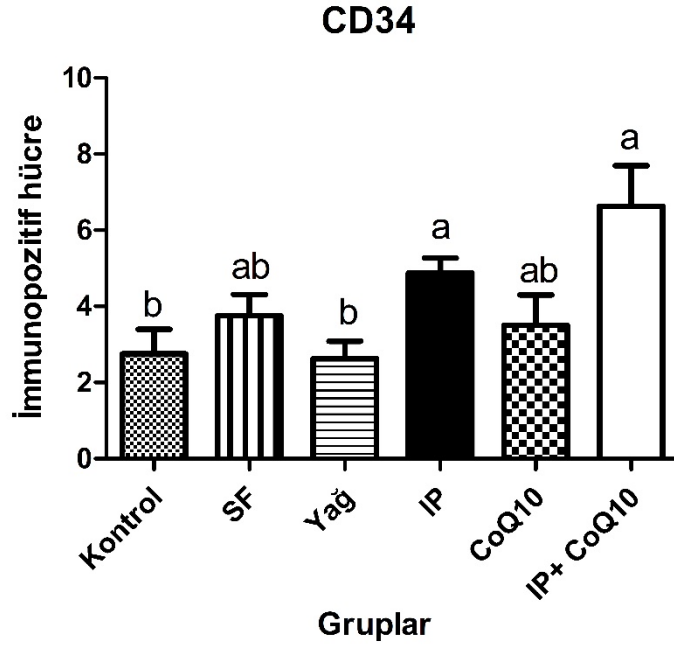
Şekil 4.29. A) Atriyumda kardiyomiyositler arasında yerleşim gösteren CD34+ hücre (ok) IP grubu, Bar: 30 μ m B) Ventriküler miyokardiyumda kardiyomiyositler arasında yerleşim gösteren CD34+ hücre (ok), IP grubu, Bar: 20 μ m



Şekil 4.30. A) Sol ventrikülde yangı ve fibrotik alanın çevresinde CD34+ hücre (ok) IP+CoQ10 grubu, Bar: 30 μ m B) Sol ventrikülde CD34+ hücre (ok) IP+CoQ10 grubu, Bar: 20 μ m



Şekil 4.31. A) Ventrikül miyokardiyumunda interstisyel yerleşimli hücrelerde sitoplazmik ince uzun uzantıları bulunan CD34+ hücre (ok) SF grubu, Bar: 20 μ m, B) Ventrikül miyokardiyumunda intersitisyel yerleşimli sitoplazmik uzantıları bağlantılı CD34+ hücreler (oklar) Yağ grubu, Bar: 20 μ m



Şekil 4.32. Tüm kalpteki CD34 immunopozitif hücrelerin gruplar arası dağılım grafiği, a,b,c: Farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P < 0,05$)

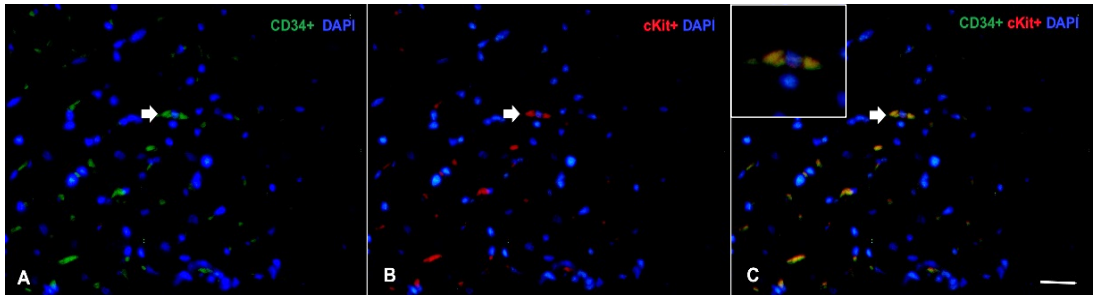
4.4. İmmunofloresan Boyamalar

Telositleri belirlemek amacıyla ikili immunofloresan boyama yapıldı. IP ve IP+CoQ10 gruplarında diğer gruplara göre daha fazla telosite rastlandı.

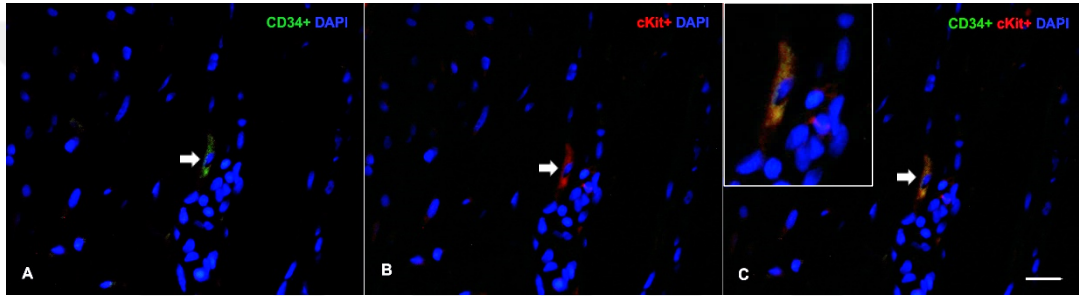
4.4.1. c-Kit/CD34 İkili İmmunofloresan Boyamalar

Atriyum ve büyük damarların çevresinde, sulkus koronaryus bölgesinde subepikardiyal yerleşimli yağ doku içerisinde, kalp kapaklarında, atriyum ve

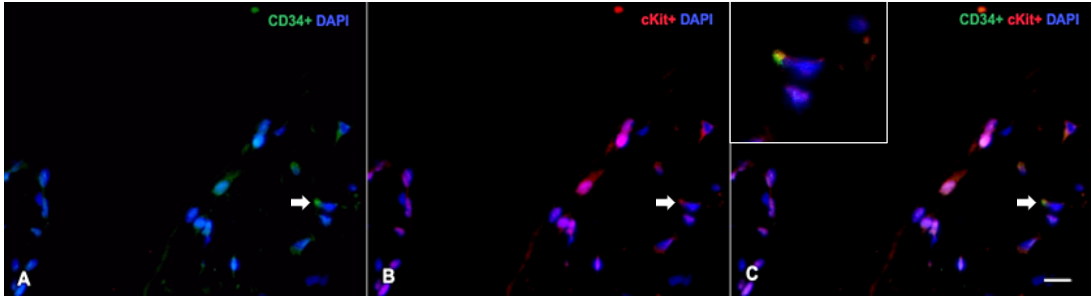
ventriküler miyokarda sitoplazmik boyanma sergileyen immunopozitif hücelere rastlandı (Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35 ve Şekil 4.36).



Şekil 4.33. Ventriküler miyokardiyumda kardiyomiyositler arasında bulunan immunopozitif hücre IP grubu A) CD34 (FITC, yeşil) + DAPI (mavi) B) c-Kit (Rhodamine, kırmızı) + DAPI (mavi), C) CD34+c-Kit+DAPI immunopozitif hücre, Bar 20 µm

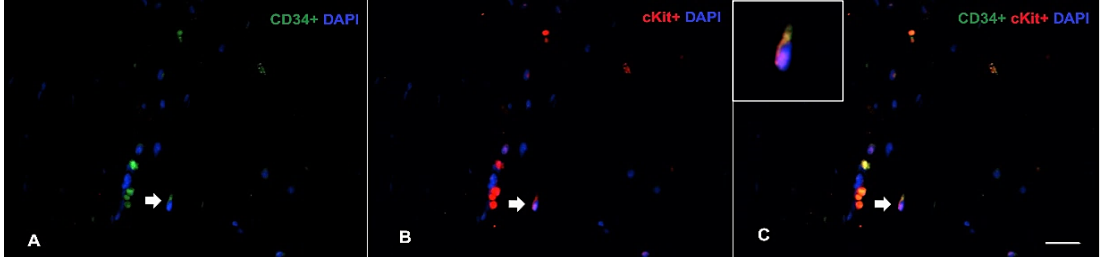


Şekil 4.34. Atriyumda büyük damarlara yakın alanda bulunan telosit Kontrol grubu, A) CD34 (FITC, yeşil) + DAPI (mavi), B) c-Kit (Rhodamine, kırmızı) + DAPI (mavi), C) CD34+c-Kit+DAPI immunopozitif hücre, Bar: 20 µm



⇒

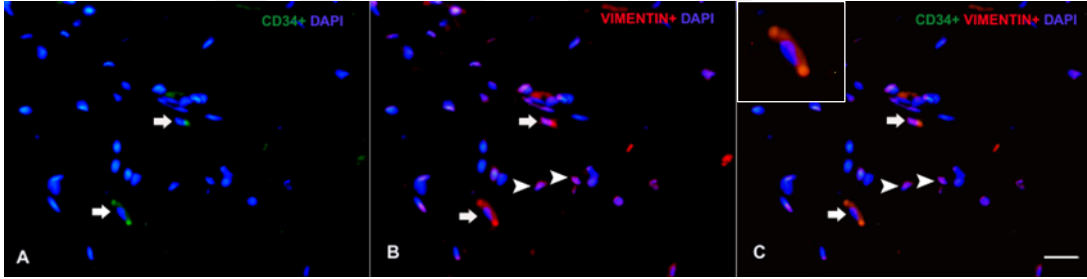
Şekil 4.35. Kalp kapağında immunopozitif hücre CoQ10 grubu, A) CD34 (FITC, yeşil) + DAPI (mavi) B) c-Kit (Rhodamine, kırmızı) + DAPI (mavi), C) CD34+c-Kit+DAPI immunopozitif hücre, Bar: 10 µm



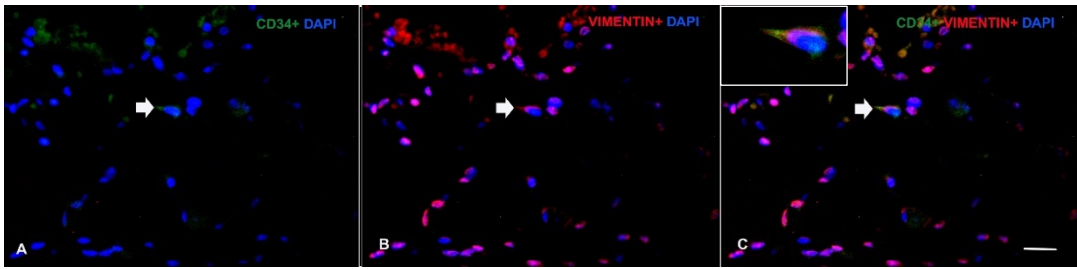
Şekil 4.36. Atriyumda immunopozitif hücre CoQ10 grubu, A) CD34 (FITC, yeşil) + DAPI (mavi) B) c-Kit (Rhodamine, kırmızı) + DAPI (mavi), C) CD34+c-Kit+DAPI immunopozitif hücre, Bar: 20 μ m

4.4.2. CD34/Vimentin İkili İmmunofloresan Boyamalar

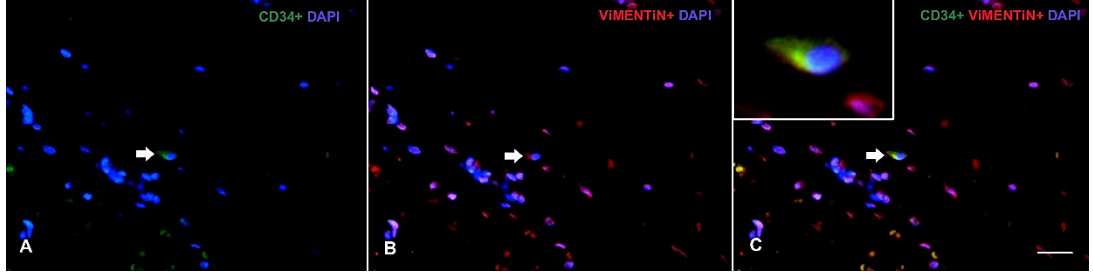
Subepikardiyal bölgede ve ventriküler miyokardiyumda interstisyel yerleşimli sitoplazmik tarzda boyanan CD34+/Vimentin+ hücrelere rastlandı (Şekil 4.37, Şekil 4.38 ve Şekil 4.39).



Şekil 4.37. Subepikardiyal yağ dokuda immunopozitif hücreler, CoQ10 grubu A) CD34 (FITC, yeşil) + DAPI (mavi), B) Vimentin (Rhodamine, kırmızı), (ok başı: sadece vimentin immunopozitif hücreler) + DAPI (mavi), C) CD34+Vimentin+DAPI immunopozitif (ok) hücre, Bar: 20 μ m



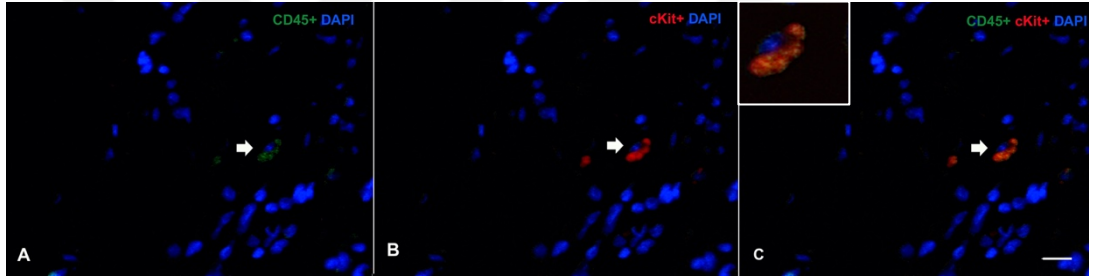
Şekil 4.38. Sol ventrikülde intersitisyel yerleşimli immunopozitif hücre IP grubu, A) CD34 (FITC, yeşil) + DAPI (mavi), B) Vimentin (Rhodamine, kırmızı) + DAPI (mavi), C) CD34+Vimentin+DAPI immunopozitif hücre, Bar: 20 μ m



Şekil 4.39. Ventriküler miyokardiyumda immunopozitif hücre, IP+CoQ10 grubu A) CD34 (FITC, yeşil) + DAPI (mavi), B) Vimentin (Rhodamine, kırmızı) + DAPI (mavi), C) CD34+Vimentin+DAPI immunopozitif hücre Bar: 20 μ m

4.4.3. c-Kit/CD45 İkili İmmunofloresan Boyamalar

c-Kit ve CD45 için yapılan ikili immunofloresan boyamalarda kök hücre belirteci c-Kit pozitif, CD45 negatif olan hücreler kök hücre olarak belirlendi. İki belirteci de eksprese eden hücreler mast hücresi olarak değerlendirildi (Şekil 4.40).

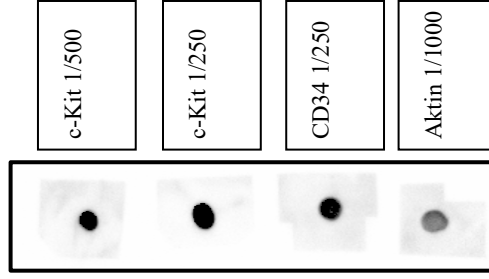


Şekil 4.40. Ventriküler miyokardiyum intersitiumunda immunopozitif hücre IP+CoQ10 grubu, A) CD45 (FITC, yeşil) + DAPI (mavi), B) c-Kit (Rhodamine, kırmızı) + DAPI (mavi), C) CD45+ c-Kit+DAPI immunopozitif mast hücresi, Bar: 20 μ m

4.5. Protein Ekspresyonları

4.5.1. Dot Blot

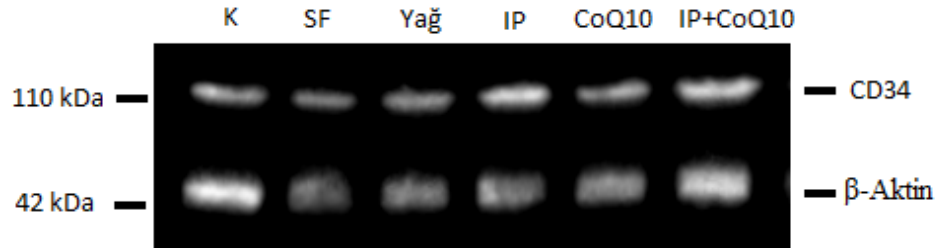
Dot blot tekniğine göre kalp örneklerinden ekstrakte edilen proteinlerin yoğunluğu ve antikorların sulandırma oranları belirlendi. Buna göre Western blot aşamasında kullanılacak olan CD34, c-Kit ve aktin antikorları için uygun sulandırma oranları sırasıyla 1/250, 1/250 ve 1/1000 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.41).



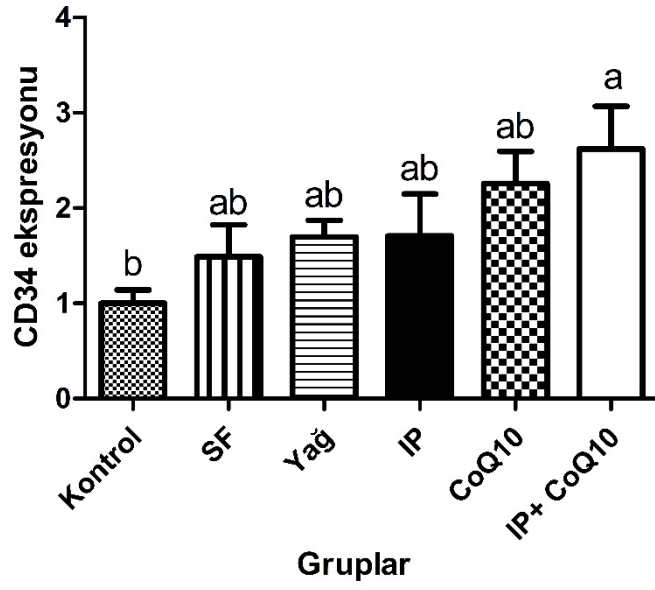
Şekil 4.41. Bio-Rad Chemidoc Image Lab Software ile alınan Dot blot görüntüsü

4.5.2. CD34 Protein Ekspresyonu

Tüm gruplardan alınan örneklerdeki Western blot analizlerine göre, CD34 proteini yaklaşık 110 kDa ağırlıklı bantta eksprese edildi. CD34 proteinin, aynı örnekler için housekeeping proteini olan beta aktin'e göre normalizasyonu yapılarak fold change'i hesaplandı ve her iki protein için elde edilen bantlar Şekil 4.42.'de gösterildi. Buna göre IP+CoQ10 grubunda protein ekspresyonun diğer gruplara göre arttığı görüldü. Bu artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($P<0,05$) (Şekil 4.43.).



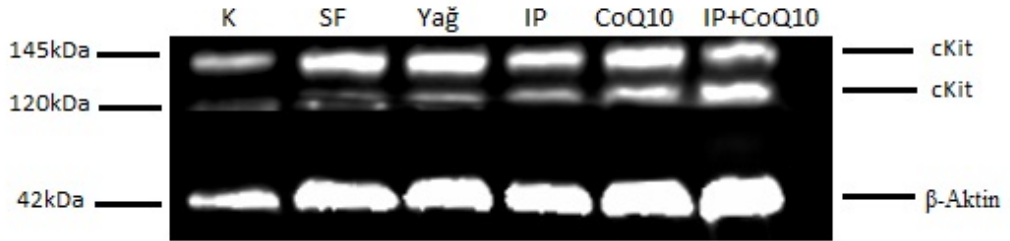
Şekil 4.42. Grupların CD34 ve Beta aktin protein ekspresyonları



Şekil 4.43. Grupların CD34 ekspresyonlarının beta aktin ve kontrole göre oranı. a,b: Farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($P<0,05$)

4.5.3. c-Kit Protein Ekspresyonu

Western blot analizlerde, c-Kit proteinin yaklaşık 120 kDa ve 145 kDa'da olmak üzere 2 ayrı bantta eksprese edildiği gözlemlendi. c-Kit ve housekeeping protein beta aktin proteinleri için elde edilen bantlar Şekil 4.44'te gösterilmiştir.



Şekil 4.44. Grupların c-Kit ve Beta aktin protein ekspresyonları

4.6. RT-PCR

RT-PCR ile elde edilen genlerin beta aktin ve kontrol gruplarına göre ekspresyonlarının istatistiksel verileri tabloda verilmiş olup (Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3), gruplar arası istatistiksel fark bulunmamıştır ($P>0,05$).

Tablo 4.1. c-Kit geninin, kontrol grubu ve beta aktine göre kalp dokularında belirlenen ekspresyon düzeylerinin istatistiksel verileri (P>0,05)

Grup	Ort±SE	Ortanca (Q1-Q3)	Minimum	Maksimum
Kontrol	1,07±0,16	1,19 (1,01-1,29)	0,47	1,38
SF	1,22±0,24	1,21 (0,93-1,51)	0,68	1,78
Yağ	1,18±0,12	1,18 (1,05-1,29)	0,69	1,72
IP	1,42±0,11	1,49 (1,43-1,52)	0,91	1,67
CoQ10	1,54±0,15	1,56 (1,27-1,87)	0,96	1,96
IP+CoQ10	1,34±0,1	1,28 (1,28-1,45)	1,04	1,64

Tablo 4.2. CD34 geninin, kontrol grubu ve beta aktine göre kalp dokularında belirlenen ekspresyon düzeylerinin istatistiksel verileri (P>0,05)

Grup	Ort±SE	Ortanca (Q1-Q3)	Minimum	Maksimum
Kontrol	0,93±0,03	0,91 (0,88-0,99)	0,87	1
SF	1,09±0,18	0,88 (0,83-1,27)	0,76	1,7
Yağ	1,18±0,16	1,06 (0,88-1,37)	0,8	1,83
IP	1,31±0,06	1,34 (1,2-1,4)	1,09	1,58
CoQ10	1,3±0,1	1,23 (1,09-1,52)	1,06	1,6
IP+CoQ10	1,76±0,63	1,13 (1,06-1,33)	0,95	4,9

Tablo 4.3. CD45 geninin, kontrol grubu ve beta aktine göre kalp dokularında belirlenen ekspresyon düzeylerinin istatistiksel verileri (P>0,05)

Grup	Ort±SE	Ortanca (Q1-Q3)	Minimum	Maksimum
Kontrol	1,06±0,16	1,23 (0,72-1,28)	0,62	1,43
SF	1,11±0,17	0,98 (0,97-1,48)	0,63	1,49
Yağ	1,01±0,18	0,96 (0,77-1,16)	0,4	1,88
IP	1,23±0,14	1,3 (1,14-1,43)	0,73	1,55
CoQ10	1,07±0,16	1,08 (0,83-1,17)	0,55	1,87
IP+CoQ10	1,12±0,07	1,12 (1,08-1,18)	0,86	1,37

5. TARTIŞMA

Miyokard infarktüsü, dünya çapında en sık karşılaşılan iskemik kalp hastalığıdır (Goyal ve ark., 2015). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre her yıl yaklaşık 17,9 milyon kişi kardiyovasküler hastalıklardan hayatını kaybetmektedir (WHO, 2022).

Bir beta adrenerjik reseptör agonisti olan izoproterenol, kalpte infarktüs benzeri lezyonlara ve oksidatif strese neden olmaktadır (Upaganlawar et al., 2011). Miyokardiyal infarktüs sonrası kardiyomiyositler geri dönüşümsüz şekilde hasar görür ve bu durum kalp yetmezliğine yol açar. Sıçanlarda deneysel olarak izoproterenol tarafından indüklenen miyokard infarktüs modeli, kardiyak disfonksiyonların değerlendirilmesinde standart bir metot olarak kabul edilmiştir (Wexler, 1978). İzoproterenol sentetik bir katekolamindir ve izoproterenol benzeri diğer katekolaminlerin toksik etkileri oksidatif stres temeline dayanan mekanizmalarla ortaya çıkar (Upaganlawar et al., 2011).

Koenzim Q, bitkilerde, mikroorganizmalarda ve hayvanlarda bulunur. Koenzim Q'nun insanlarda ve çoğu memelide bulunan en yaygın formu Q10'dur (Ramasarma, 1985). İnsanda CoQ10 dokularında farklı miktarlarda olup, kalp, karaciğer ve böbrekte yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, en düşük konsantrasyonu akciğer dokusunda belirlenmiştir (Ernster and Forsmark-Andree, 1993). CoQ10 yüksek tansiyon, kalp yetmezliği, kanser, periodontal hastalıklar, fertilité gibi insan sağlığını etkileyen birçok hastalıkta çalışılmış önemli bir antioksidandır (Overvad et al., 1999). Antioksidan etkisinin yanısıra, nükleer faktör-kappa B1 (NF-κB1) bağımlı genlerin ekspresyonuna etki ederek anti-inflamatuvar bir özellik gösterdiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Schmelzer et al., 2008).

Miyokard infarktüs modeli oluşturulan bu çalışmada, deney süresince hayvanlarda canlı ağırlık değişimleri görülmüştür. Uygulamanın ilk günü, haftalık ve deney sonu yapılan canlı ağırlık tartımlarında; kontrol ve SF grubunda zamana göre, haftalık sınırlı da olsa bir miktar canlı ağırlık artışı olmuştur. Yağın laksatif etkisi nedeniyle yağ ve CoQ10 gruplarında ilk haftalarda hafif kilo kaybı görülmesine rağmen, diğer haftalarda bu durumun kompanze edildiği dikkati çekti. IP ve IP+CoQ10 gruplarında ise 2. haftada kilo kaybı belirlendi. Deney sonunda IP+CoQ10 grubundaki sıçanların ağırlık ortalamalarının kontrol grubuna kıyasla daha az ancak, IP grubundan daha fazla olduğu görüldü. Bu bulgular farklı antioksidanlarla yapılan kardiyotoksisite çalışmalarıyla uyumlu bulunmuştur (Upaganlawar et al., 2009). Elde

edilen veriler doğrultusunda hastalığın kilo kaybına yol açtığı, ancak CoQ10 uygulamasıyla bu durumun sınırlı da olsa düzelebileceği sonucuna varılmıştır.

İzoproterenol'ün toksik etkileri nedeniyle kalpte birçok histopatolojik değişiklik meydana gelmektedir. Bu histopatolojik değişiklikler arasında miyokardiyumda dejenerasyon, nekroz, yangısal hücre infiltrasyonu, intersitisyel ödem ve subendokardiyal hemoraji yer almaktadır (Lehr, 1972). Ayrıca, hasar gören dokunun yerini dolduran fibroblastlar kollajen sentezleyerek sonuçta kardiyak fibrozise neden olmaktadır (Epstein, 2020). Çalışmamızda izoproterenolün sıçan kalplerinde miyokardiyal dejenerasyon, nekroz, sınırlı nötrofil ve çoğunluğunu lenfositten oluşan yangısal hücre infiltrasyonu ile birlikte intersitisyel fibrozise yol açtığı yapılan histokimyasal tekniklerle belirlenmiştir. İzoproterenol uygulanan gruplarda bu lezyonlara en çok sol ventriküler miyokardiyumda ve interventriküler septumun apeksinde rastlanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda, CoQ10 uygulamasının IP'ün yol açtığı hasarı sınırlandırarak, kalp üzerinde koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir. Yapılan birçok çalışmada, üzüm çekirdeği ekstraktı (Nour et al., 2017), kefir (Mert et al., 2018), Fluvastatin (Zhou et al., 2008), melatonin (Patel et al., 2010), safran (Mehdizadeh et al., 2013), salvianolik asit (Wang et al., 2009) ve siringik asit (Shahzad et al., 2019) gibi antioksidan özelliği bilinen maddelerin CoQ10 ile benzer şekilde, IP uygulamasının neden olduğu toksik hasara karşı koruma sağladığı gösterilmiştir.

Oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve enerji açlığının kalp yetmezliğinde önemli patofizyolojik roller oynadığı bildirilmiştir. Kalp yetmezliği ve dilate kardiyomiyopati hastalardan alınan kan ve endomiyokardiyal doku örneklerinde miyokardiyal dokuda CoQ10' un azaldığı tespit edilmiştir (Mortensen, 1989). Kan ve miyokardiyal CoQ10 seviyesinin azalması ile semptomların ciddiyeti ve sol ventriküler disfonksiyonunun artması arasında bir ilişki bulunmaktadır (Overvad et al., 1999). Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda hasarlı kalplerde CoQ10 uygulaması ile IP'ün neden olduğu kalp hasarının şiddetini sınırlandırdığı histopatolojik olarak ortaya konulmuştur.

Miyokard infarktüsünden sonra meydana gelen fibrotik yanıt, miyokardiyal ruptura karşı kalbi koruyan kritik bir savunma mekanizmasıdır. Diğer yandan, bu mekanizma kalp yetmezliğinin ilerlemesine de katkı sağlamaktadır. Fibrozisin oluşmasında kardiyak stres, iskemi, infarktüs veya kalbin toksik maddeye maruz kalmasıyla meydana gelen yangısal yanıt ve bağışıklık sistemi aktivasyonu yer

almaktadır (Epstein, 2020). Bu nedenle yangı ve fibrozise müdahale etmek için yapılan tedavi edici yaklaşımlar, çoğu klinik araştırmaların odak noktası olmuştur (Mann et al., 2004). Kalp de dahil olmak üzere birçok organda yaşa bağlı olarak meydana gelen fibrozis, bu organlarda işlev kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle fibrozisin tedavisinde, CoQ10 desteğinin potansiyel rolünü araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Klinik alışmalar, CoQ10 takviyesinin, yaşlı bireylerin maruz kaldığı kardiyovasküler fibrozis seviyesini azaltabileceğini ve boye kardiyovasküler işlevi iyileştirdiğini ve ölüm riskini azaltabileceğini göstermiştir (Guest, 2019). CoQ10'un anti-fibrotik etkisinden sorumlu olan faktörler henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da, antioksidan ve anti inflamatuvar fonksiyonlarının katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Hargreaves and Mantle, 2019).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar, fibrozis ya da kollajen birikimi için farklı sonuçlar ortaya koymaktadır. Periostin'in kardiyotoksisitedeki etkisini araştıran bir çalışmada, IP ve IP+Periostin grupları arasında kollajen sentezinde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Sözmen et al., 2018). Yaşlı sıçanlarda yapılmış bir başka çalışmada ise, bulgularımızla uyumlu olarak CoQ10 tedavisi ile IP uygulanan sıçanlarda yangısal hücre infiltrasyonunun önlendiği ve fibrozisin azaldığı sonucuna varılmıştır (Ulla et al., 2017). Bitki kaynaklı bir fenolik bileşik olan antioksidan özelliği bulunan siringik asit'in doza bağlı olarak IP ile miyokard infarktüsü oluşturulan sıçanlarda miyokardiyumda interstisyel kollajen birikimini önlediği bildirilmiştir (Shahzad et al., 2019). Çalışmamızda fibrozisin değerlendirilmesi amacıyla yapılan trikrom boyamaları sonucunda, IP uygulanan gruplarda interventriküler septum ve sol ventrikül miyokardiyumu boyunca yoğun fibrotik alanlar olduğu görüldü. IP grubunda IP+CoQ10 grubuna göre daha fazla fibrozis alanı belirlenmesi, bu durumun CoQ10'un koruyucu etkisi ile oluştuğu, buna bağlı daha az hasar ve daha az fibrozis şekillenmesi ile ilişkilendirilmiştir.

Genel olarak, memeli kardiyomiyositlerinin doğumdan kısa süre sonra çoğalma yeteneklerini kaybettikleri bilinmektedir. Bununla birlikte, yeni veriler kalpte, normal yaşlanma sırasında ve patolojik stres durumlarında yeni kardiyomiyositlerin gelişebileceğini göstermektedir (Beltrami et al., 2003). İnsanlarda yapılan bir çalışmada, normal kalp örneklerinde yalnızca birkaç miyositin proliferasyon belirteci olan PCNA'yı eksprese ettiği, ancak hastalıklı kalplerde ise PCNA ekspresyon yüzdesinin arttığı immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Arbustini et al., 1993).

Aktif durumda olan kardiyomiyositlerin rejenerasyon yeteneğinin sınırlı olması

nedeniyle çalışmamızda da çok az sayıda kardiyomiyositin çoğaldığı, mitoz ve proliferasyon belirteçlerinden olan Histon H3 ve PCNA ile immunohistokimyasal olarak gösterildi. PCNA'nın, KM'lerde özellikle IP+CoQ10 grubunda diğer tüm gruplara göre artması yeni kardiyomiyosit gelişebileceği bilgisiyle uyumludur. Benzer olarak, miyokard infarktüsü oluşturulan ve progesteron uygulanan yetişkin farelerde de kardiyomiyositlerde Histon H3 ekspresyonunun arttığı ve bu durumun miyokard hasarının iyileşmesine katkı sağladığı bildirilmiştir (Lan et al., 2020). Miyokard infarktüsü sonrası kalpte rejenerasyon belirteçlerini değerlendiren başka bir çalışmada, fosfohiston'un (H3P) IP ve IP+Periostin gruplarında 1. günde yükseldiği, 7. ve 28. günde tekrar başlangıç seviyelerine düştüğü bildirilmiştir (Sözmen et al., 2018). Yetişkinlerde KM'lerin çok düşük bir çoğalma kapasitesi olması memeli kalplerinde rejenerasyon için temel bir engel oluşturmaktadır. Çalışmamızda kontrol gruplarında bulunan rat kalplerinde kardiyomiyositlerde Histon H3 aktivitesinin tespit edilmemesi olgun rat kalplerinde bulunan kardiyomiyositlerin post mitotik fazda oldukları bilgisini destekler niteliktedir.

Son veriler, endotelial hücrelerin kalpte infarktüs sonrası yeniden şekillenme ve rejenerasyonda kilit oyuncular olduğunu göstermektedir (Talman and Kivelä, 2018). Yapılan bir çalışmada, endotelial hücrelerle kardiyomiyosit etkileşimlerinin miyosit ölümünü önemli ölçüde azalttığı, böylece miyosit sağ kalımını desteklediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada endotelial hücre ağlarının varlığının, kardiyomiyositin hayatta kalmasını ve organizasyonunu önemli ölçüde etkilediği sonucuna varılmıştır (Narmoneva et al., 2004). Çalışmamızda, kalpte rejenere endotelial ve fibroblastik hücreleri belirlemek için, PCNA ve Histon H3 ekspresyonları ayrıntılı olarak incelenmiştir. IP+CoQ10 grubunda IP grubuna göre özellikle sol ventriküler miyokardiyumda F/E hücrelerinde Histon H3 ekspresyonunun arttığı ve bu hücrelerin çoğunlukla MI şekillendiği fibrotik alan ve çevresinde olduğu belirlenmiştir. Periostinin MI üzerine etkisini araştıran çalışmada (Sözmen et al., 2018), IP uygulanan gruplarda en fazla 1. günde F/E hücrelerde immunopozitifliğe rastlandığı, 7. günde sayının azaldığı 28. günde en düşük seviyeye düştüğü bildirilmiştir. Tedavi grubunda pozitif hücre sayısının IP grubuna kıyasla daha fazla olması, F/E hücrelerin sayısının tedaviye bağlı olarak indüklediğini ve bu durumun da çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olduğunu göstermektedir.

Özel bir interstisyel hücre türü olan telositler, Popescu ve Faussone-Pellegrini tarafından tanımlanmıştır (Popescu and Faussone-Pellegrini, 2010). Telositler,

telopodlar olarak adlandırılan oldukça uzun ve ince uzantılara sahip olup, bu hücreler kalp dahil birçok organda bildirilmiştir. Telopodların uzunluğu on ila yüzlerce mikrometre arasında olabilir ve çeşitli hücrelerle bağlantılar oluştururlar (Gherghiceanu and Popescu, 2012; Popescu and Faussone-Pellegrini, 2010). Aslında, telositler diğer hücrelerle bağlantı kurarak kalpte üç boyutlu bir ağ oluştururlar (Crețoiu et al., 2012). Kalpte sinir sonları, kapillarlar ve diğer interstisyel hücrelere ek olarak kardiyomiyosit prekürsörleriyle de yakın ilişki içindedirler (Mirancea, 2016; Popescu and Faussone-Pellegrini, 2010).

Telositlerin insanda epikardiyum (Gherghiceanu and Popescu, 2010; Hinescu et al., 2006), subepikardiyum, miyokardiyum, endokardiyum (Grigoriu et al., 2016; Rusu et al., 2012) ve kalp kapaklarında (Yang et al., 2014), sıçanda ventriküler miyokardiyum (Kostin, 2010) ve epikardiyumda (Gherghiceanu and Popescu, 2012; Hinescu et al., 2006), farede ise epikardiyum (Suciu et al., 2009), subepikardiyum (Bani et al., 2010), miyokardiyum (Gherghiceanu and Popescu, 2010) ve aorta kapağında (Zhang et al., 2015) bulunduğu bildirilmiştir. Sıçanlarda telositlerin sayısı subepikardiyumda, endokard ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksektir. Atriyumlarda da yoğunluk ventriküllere göre daha fazladır (Varga et al., 2017). Literatür verisiyle uyumlu olarak sunulan çalışmada, telositlerin ventriküllerden çok atriyumlar ve çevresinde yer aldığı görülmüştür. Atriyumda subepikardiyal olarak, aorta ve v. pulmonalis çevresinde, subepikardiyal yağ dokuda ve kalp kapaklarında telositlere rastlanmıştır. Sol ve sağ atriyum arasında sayısal olarak bir farklılığa rastlanmamıştır. Ventriküllerde ise miyokardiyum katmanında kardiyomiyositler arasında yerleştiği görülmüştür. Bu duruma benzer olarak sol anterior inen arter ligasyonu ile MI meydana getirilen sıçanlarda, kardiyak telositlerin miyokarda uzunlamasına dağıldığı bildirilmiştir. Ayrıca, MI olan kalplerde kardiyak telosit sayısının azaldığı, ligasyondan 4-5 gün sonra yapılan incelemelerde infarktüs bölgesinde kardiyak telositlere rastlanmadığı bildirilmiştir. Bu durum iskemi görülen bölgedeki kardiyak telositlerin ölümü ile açıklanmaktadır (Zhao et al., 2013). Zhao'nun verileriyle paralel olarak çalışmamızda da ventriküllerde MI sonrası meydana gelen yangısal infiltrasyon, nekroz ve fibrozis alanlarında telositlere rastlanmamıştır.

Telositler telopod adı verilen çok ince ve uzun uzantılara sahip olduğundan transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile daha ayrıntılı görüntülenmektedir (Cantarero et al., 2016; Kostin, 2010). Telositlerin, doku rejenerasyonu sırasında

miyokardiyumu onarmak için gerekli olan karmaşık yapılar oluşturduğu bazı *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Tao et al., 2016). Telositler, kardiyak kök hücreler için “hemşire hücreler” olarak adlandırılır (Bei et al., 2015; Gherghiceanu and Popescu, 2010; Popescu et al., 2009). Çünkü telositler telopodları aracılığıyla progenitör hücreler için destek sağlayıp, kardiyak yenilenme ve onarımda görev alırlar (Zhau et al., 2014). Kardiyak telositler CD34, c-Kit, vimentin ve PDGF reseptör-alfa ve reseptör-beta dahil olmak üzere birkaç farklı protein eksprese ettiğinden, elektron mikroskobu dışında immunohistokimyasal olarak da varlığı ortaya konulabilir (Bei et al., 2015; Popescu et al., 2010; Suci et al., 2012).

c-Kit reseptörünün kardiyak ve nöronal kök hücrelerde eksprese edildiği bildirilmiştir (Beltrami et al., 2003; Jin et al., 2002). c-Kit+ kardiyak kök hücrelerin, kalpte onarım ve rejenerasyonda yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (Laflamme and Murry, 2011). CD34+ hücreler ise (stromal hücreler /fibroblastlar/ fibrositler/ telositler), mezenkimal hücrelerin başlıca kaynağı olarak bilinmektedir (Diaz-Flores et al., 2014). CD34, hematopoietik progenitör hücrelerde (Civin et al., 1984), endotelial hücrelerde (Fina et al., 1990) ve çeşitli organlardaki stromal hücrelerde (van de Rijn et al., 1994) eksprese edilmektedir. CD34+ hücreler, ince, iğ şeklinde veya çok kutuplu (dendritik hücre benzeri) sitoplazmik uzantılara sahiptir. Sitoplazmik bağlantıları ile komşu CD34+ hücrelerle iletişim kurarlar (Diaz-Flores et al., 2014).

Çalışmamızda c-Kit ve CD34 pozitif reaksiyon sergileyen oldukça az sayıda hücreye rastlandığından, tüm kalp kesitinde morfolojisi telosit tanımlamasına uyan, ince sitoplazmik uzantıya sahip c-Kit ve CD34 immunopozitif hücreler telosit olarak değerlendirildi. IP ve IP+CoQ10 gruplarında diğer gruplara göre daha fazla sayıda immunopozitif hücreye rastlandı. Bu tip hücrelere çoğunlukla aorta ve pulmoner damar çevrelerinde, sol ventrikül, interventriküler septum ve sağ ventriküler miyokardiyum intersitisyumunda kardiyak kas lifleri arasında, atriyum ve büyük damarların çevresinde, subepikardiyal yağ dokuda, sol AV ve Aorta kapağında rastlanmıştır. CD34+ hücrelerine ise IP ve IP+CoQ10 gruplarında diğer gruplardaki alanlara ek olarak çok az sayıda yangısal infiltrasyon ve fibrozis bölgelerinin bulunduğu alanın çevresinde de rastlanmış ve IP+CoQ10 grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). Üzüm çekirdeği ekstraktının (ÜÇE) koruyucu etkisini değerlendiren bir çalışmada, IP grubunda kontrol grubuna göre daha az c-Kit+ ve CD34+ hücre bulunduğu, ancak IP+ÜÇE uygulanan grupta, kontrol ve IP grubuna göre hücre sayısının arttığı gösterilmiştir (Nour et al., 2017). Bahsi geçen çalışmada

IP grubunda c-Kit⁺ CD34⁺ hücreler dejenere kardiyak kas lifleri arasında yer alırken, sunulan bu çalışmada hasara uğramamış alanlarda immunopozitif hücrelere rastlanmıştır. Bu durumun hastalığa bağlı oluşan nekrotik kas lifleri, yangı hücreleri ve fibrozis ortamının telosit sayına olumsuz etkisi olduğu şeklinde yorumlanmıştır. IP grubunda kontrole göre telositlerin azalması bulgusuyla farklı olarak, çalışmamızda IP grubunda azalma görülmemiş hatta kontrol, SF ve yağ gruplarına göre sayısal olarak çok az da olsa artış görülmüştür. Bu durum hastalığın sağlıklı hayvana göre kök hücre sayısında artışa neden olabileceğini düşündürmektedir.

Zhao ve Nour'un çalışmalarıyla (Nour et al., 2017; Zhao et al., 2013) benzer bulgu olarak, ince endomisyumla ayrılan kardiyak kas lifleri arasında çok az sayıda c-Kit⁺ ve CD34⁺ hücreye rastlanmıştır. Yapılan bir çalışmada eritropoietin uygulaması ile miyokardiyal kök hücre ilişkisi araştırılmış, c-Kit ve CD34 immunopozitif hücre sayısı ve mRNA sonuçları değerlendirilmiştir. Miyokard infarktüsü oluşturulan sıçanlarda, eritropoietin enjeksiyonundan 24 ve 48 saat sonrasında c-Kit mRNA düzeyi ve immunohistokimyasal boyama sonuçları kontrol grubuna göre artış göstermiştir. İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, enjeksiyondan 48 saat sonra c-Kit⁺ hücrelerde %80'lik bir artış tespit edilmiş. Benzer şekilde, MI-eritropoietin grubu sıçanların CD34 mRNA sevipleri, kontrole ile karşılaştırıldığında 24. saatte artmıştır. Çalışma sonuçları, eritropoietin'in MI sonrası akut fazda kök hücre sayısını artırabileceğini ortaya koymuştur (Klopsch et al., 2009). Çalışmamızda da MI oluşturulan sıçanlarda CoQ10 uygulamasıyla birlikte c-Kit⁺ ve CD34⁺ kök hücre sayıları immun boyama sonuçlarına göre artmıştır. CD34⁺ kök hücre sayısının IP+CoQ10 grubunda kontrol ve yağ gruplarına göre sayısal artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05). Ancak PCR verilerine göre MI ve CoQ10 uygulanan grupta sayısal bir artış görülse de istatistiksel bir artış belirlenmemiştir (P>0,05). Bu durum, MI sonrası akut fazda kök sayısında artış görülebileceği, ilerleyen dönemlerde bu sayının giderek azalabileceğini düşündürmektedir.

Sıçanlarda akut miyokard infarktüsü sonrası yüksek yoğunluklu antrenmanın kök hücre faktörlerine etkisini araştıran bir çalışmada, MI sonrası c-Kit protein ekspresyonunun, kontrol ve MI+antreman gruplarına göre arttığı bulunmuştur (Ghanimati et al., 2020). Periostinin miyokardiyal hasara olan etkisini inceleyen çalışmada ise, IP grubunda c-Kit ekspresyonunun arttığı, periostin tedavi grubunda ise 7. ve 28. günlerde sentezin daha da arttığı bildirilmiştir (Sözmen et al., 2018). Çalışmamızda ise c-Kit ve CD34 ekspresyonları IP+CoQ10 grubunda diğer gruplara

göre sayısal olarak artış göstermekle birlikte istatistiksel olarak fark görülmemiştir. Ancak, CD34 protein ekspresyonunun IP+CoQ10 grubunda kontrol grubuna göre sayısal artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). Sıçanlarda avemar ve ekinezya ekstraktının da akut miyokard infarktüsü sonrası CD34+ stem hücrelerin mobilizasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Abdelmonem et al., 2015). Elde edilen veriler çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

c-Kit ve CD34, telosit olmayan diğer hücre tiplerinde de eksprese edilmektedir. Örneğin mast hücreleri c-Kit'i de eksprese eder, bu nedenle, telositleri diğer interstisyel hücrelerden ayırt etmek için tipik olarak ikili immunohistokimyasal boyamalar kullanılmaktadır. Telositler CD34+/vimentin+, CD34+/PDGFR- β + veya CD34+/CD117+ hücreler olarak tanımlanır. Böylece telosit, sadece vimentin ve PDGFR- β eksprese eden fibroblastlardan ayırt edilir (Bei et al., 2015; Chang et al., 2015). Bu çalışmada da CD34+/vimentin+ ve CD34+/CD117+ telositler immunfloresan boyama ile tespit edilmiş, IP ve IP+CoQ10 gruplarında diğer gruplara göre daha fazla telosite rastlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, kardiyak telositlerin intramiyokardiyal transplantasyonu sonucu miyokard infarktüsünü ve miyokardiyal fibrozisi azalttığı böylece sıçanlarda infarktüs sonrası kalp fonksiyonunu iyileştirdiği bildirilmiştir (Zhao et al., 2014). Bu çalışmanın bulguları göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda IP+CoQ10 grubunda telosit artışı ile fibrozisin şiddetinin azalması arasında bir bağlantının olabileceği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmada insanlarda önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan miyokard infarktüsü, Sprague Dawley sıçanlarda izoproterenol kardiyotoksisite modeli ile oluşturulup, CoQ10'un hastalık üzerine etkileri incelenmiştir. İzoproterenol'ün neden olduğu miyokard hasarının temelinde hücre ATP'nin tükenmesine bağlı ROS üretimi ve oksidatif stresin artışı yer aldığından, güçlü bir antioksidan özelliği bulunan CoQ10, çalışmamızda koruyucu amaçlı uygulanmıştır. Çalışmamızda elde edilen histopatolojik bulgular sonucunda, izoproterenolün oluşturduğu kardiyomiyositlerde dejenerasyon, nekroz, yangısal infiltrasyon, fibrozis bulgularının CoQ10 uygulamasıyla birlikte azaldığı sonucuna varılmıştır. Kalp hasarının onarım sürecinde görülen olumlu etkilerin şekillenmesinde, kalpte post-mitotik olduğu bilenen kardiyomiyositlerde PCNA ve Histon H3 gibi hücre siklusu aktivatörlerinin uyarılmasının da rol oynadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda, kök hücrelerin erişkin kalbinde oldukça sınırlı sayıda bulunmasına rağmen, CoQ10'un etkisiyle c-Kit+ ve CD34+ kök hücrelerinin arttığı ortaya konulmuştur. Özellikle kalpte rejenerasyonda önemli etkileri olan telositlerin varlığı CD34/c-Kit, CD34/Vimentin ikili immunohistokimyasal boyamalarla tespit edilerek kalpte buldukları bölgeler belirlenmiştir. Bütün bu veriler, CoQ10'un miyokard infarktüsü sonucu şekillenen kalp hasarının iyileşme oranını artırma potansiyeli bulunduğunu göstermesi bakımından önem taşımaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda kalp hasarında CoQ10'un daha uzun süreli ve artan farklı dozlarının kalpteki hücrelere olumlu etkilerinin olup olmadığı incelenmelidir.

KAYNAKÇA

- Abcam. (2022). Dot Blot Protocol. Retrieved 13.04.2022, from <https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Dot%20blot%20protocol.pdf>
- Abdelmonem, M., Kassem, S.H., Gabr, H., Shaheen, A.A., Aboushousha, T. (2015). Avemar and Echinacea extracts enhance mobilization and homing of CD34+ stem cells in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cell Research & Therapy*. 6 (1). 1-17.
- Ahuja, P., Sdek, P., MacLellan, W.R. (2007). Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiological Reviews*. 87 (2). 521-544.
- Alleva, R., Tomasetti, M., Battino, M., Curatola, G., Littarru, G., Folkers, K. (1995). The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92 (20). 9388-9391.
- Arbustini, E., Diegqli, M., Grasso, M., Fasani, R., D'Armini, A., Martinelli, L., Goggi, C., Campana, C., Gavazzi, A., Mario M.V. (1993). Expression of proliferating cell markers in normal and diseased human hearts. *The American Journal of Cardiology*. 72 (7), 608-614.
- Bani, D., Formigli, L., Gherghiceanu, M., Fausson-Pellegrini, M.S. (2010). Telocytes as supporting cells for myocardial tissue organization in developing and adult heart. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14 (10). 2531-2538.
- Bei, Y., Zhou, Q., Fu, S., Lv, D., Chen, P., Chen, Y., Wang, F., Xiao, J. (2015). Cardiac telocytes and fibroblasts in primary culture: different morphologies and immunophenotypes. *PloS One*. 10 (2). 1-11.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 114 (6). 763-776.
- Bertinchant, J., Robert, E., Polge, A., Marty-Double, C., Fabbro-Peray, P., Poirey, S., Aya, G., Juan, J., Ledermann, B., De la Coussaye, J. (2000). Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats. *Clinica Chimica Acta*. 298 (1-2). 13-28.
- Bindoli, A., Rigobello, M.P., Deeble, D.J. (1992). Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biology and Medicine*. 13 (4). 391-405.
- Boluyt, M., Long, X., Eschenhagen, T., Mende, U., Schmitz, W., Crow, M., Lakatta, E. (1995). Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 269 (2). 638-647.
- Buetow, B. and Laflamme, M. (2018). "Cardiovascular". Treuting, P.- Dintzis, S.- KS, M. (Eds.). in: *Comparative anatomy and histology* (s. 163-189). London: Elsevier.
- Busk, P.K., Hinrichsen, R., Bartkova, J., Hansen, A.H., Christoffersen, T.E., Bartek, J., Haunsø, S. (2005). Cyclin D2 induces proliferation of cardiac myocytes and represses hypertrophy. *Experimental Cell Research*. 304 (1). 149-161.
- Cai, C.-L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P.-H., Pfaff, S.L., Chen, J., Evans, S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental Cell*. 5 (6). 877-889.
- Cantarero, I., Jose Luesma, M., Miguel Alvarez-Dotu, J., Muñoz, E., Junquera, C. (2016). Transmission electron microscopy as key technique for the characterization of telocytes. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 11 (5). 410-414.

- Celis, J.E. and Celis, A. (1985). Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82 (10). 3262-3266.
- Chang, Y., Li, C., Lu, Z., Li, H., Guo, Z. (2015). Multiple immunophenotypes of cardiac telocytes. *Experimental Cell Research*. 338 (2). 239-244.
- Civin, C.I., Strauss, L., Brovall, C., Fackler, M., Schwartz, J., Shaper, J. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *The Journal of Immunology*. 133 (1). 157-165.
- Crețoiu, S. and Popescu, L. (2014). Telocytes revisited. *Biomolecular Concepts*. 5. 353–369.
- Crețoiu, S.M., Crețoiu, D., Popescu, L.M. (2012). Human myometrium—the ultrastructural 3D network of telocytes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 16 (11). 2844-2849.
- Crossmon, G. (1937). A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *The Anatomical Record*. 69 (1). 33-38.
- Çalışlar, T. (1978). *Laboratuvar Hayvanları Anatomisi*. Ankara: B. Ankara Üniversitesi Basımevi.
- Dawn, B., Stein, A.B., Urbanek, K., Rota, M., Whang, B., Rastaldo, R., Torella, D., Tang, X.-L., Rezazadeh, A., Kajstura, J. (2005). Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102 (10). 3766-3771.
- Dhalla, N.S., Temsah, R.M., Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension*. 18 (6). 655-673.
- Díaz-Flores, L., Gutierrez, R., Garcia, M., Sáez, F., Valladares, F., Madrid, J. (2014). CD34+ Stromal Cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as A Tissue Reserve and A Principal Source of Mesenchymal Cells. Location, Morphology, Function and Role in Pathology. *Histology and Histopathology*. 29 (7). 840-870.
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Sáez, F.J., Díaz-Flores Jr, L., Madrid, J.F. (2013). Telocytes in neuromuscular spindles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 17 (4). 457-465.
- Dursun, N. (2008). *Veteriner Anatomi (II)*. Ankara: 12. B. Medisan Yayınevi.
- Epstein, J.A. (2020). CARTing Away Cardiac Fibrosis. *Journal of the American College of Cardiology (JACC)*. 2 (1). 110-113.
- Ernster, L. and Forsmark-Andree, P. (1993). Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *The Clinical Investigator*. 71 (8). 60-65.
- Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A., Greaves, M.F. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 75 (12). 2417-2426.
- Forsmark-Andrée, P., Lee, C.-P., Dallner, G., Ernster, L. (1997). Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. *Free Radical Biology and Medicine*. 22 (3). 391-400.
- Garrido-Maraver, J., Cordero, M.D., Oropesa-Ávila, M., Vega, A.F., De La Mata, M., Pavón, A.D., De Miguel, M., Calero, C.P., Paz, M.V., Cotán, D. (2014). Coenzyme q10 therapy. *Molecular Syndromology*. 5 (3-4). 187-197.
- Ghanimati, R., Rajabi, H., Ramezani, F., Ramez, M., Bapiran, M., Nasirinezhad, F. (2020). The effect of preconditioning with high-intensity training on tissue levels of G-CSF, its receptor and C-kit after an acute myocardial infarction in male rats. *BMC Cardiovascular Disorders*. 20 (1). 1-9.

- Gherghiceanu, M. and Popescu, L. (2010). Cardiomyocyte precursors and telocytes in epicardial stem cell niche: electron microscope images. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14 (4). 871-877.
- Gherghiceanu, M. and Popescu, L.M. (2012). Cardiac telocytes—their junctions and functional implications. *Cell and Tissue Research*. 348 (2). 265-279.
- Goyal, S.N., Sharma, C., Mahajan, U.B., Patil, C.R., Agrawal, Y.O., Kumari, S., Arya, D.S., Ojha, S. (2015). Protective effects of cardamom in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (11). 27457-27469.
- Grigoriu, F., Hostiuc, S., Vrapciu, A.D., Rusu, M.C. (2016). Subsets of telocytes: the progenitor cells in the human endocardial niche. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 57 (2 Suppl). 767-774.
- Guest, P.C. (2019). *Reviews on Biomarker Studies in Aging and Anti-Aging Research*. Switzerland: 1st. B. Springer Cham.
- Hans, F. and Dimitrov, S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*. 20 (24). 3021-3027.
- Hargreaves, I.P. and Mantle, D. (2019). “Coenzyme Q10 supplementation in fibrosis and aging”. Guest, P.C. (Ed.), in: *Reviews on Biomarker Studies in Aging and Anti-Aging Research* (s. 103-112). Switzerland: Springer.
- Hebel, R., and M.W. Stromberg (eds.). (1986). *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. Michigan: BioMed Verlag.
- Hendrickx, A. and Bossuyt, X. (2001). Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 46 (6). 336-339.
- Henzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., Allis, C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 106 (6), 348-360.
- Hierlihy, A.M., Seale, P., Lobe, C.G., Rudnicki, M.A., Megeney, L.A. (2002). The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Letters*. 530 (1-3). 239-243.
- Hinescu, M., Gherghiceanu, M., Mandache, E., Ciontea, S.M., Popescu, L. (2006). Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 10 (1). 243-257.
- Hsieh, P.C., Segers, V.F., Davis, M.E., MacGillivray, C., Gannon, J., Molkentin, J.D., Robbins, J., Lee, R.T. (2007). Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nature Medicine*. 13 (8). 970-974.
- Cao, H., Dronadula, N., Rizvi, F., Li, Q., Srivastava, K., Gerthoffer, W.T., & Rao, G.N. (2006). Novel role for STAT-5B in the regulation of Hsp27–FGF-2 axis facilitating thrombin-induced vascular smooth muscle cell growth and motility. *Circulation Research*, 98 (7), 913-922.
- Jayaraj, J.C., Davatyan, K., Subramanian, S., Priya, J. (2018). “Epidemiology of myocardial infarction”. Pamukçu, B. (Ed.), in: *Myocardial Infarction* (s. 9-19). IntechOpen.
- Jeong, Y.-M., Cheng, X.W., Kim, W. (2020). Substance P administered after myocardial infarction Upregulates Microphthalmia-associated transcription factor, GATA4, and the expansion of c-kit⁺ cells. *Stem Cells International*. 2020. 1-9.

- Jin, K., Mao, X.O., Sun, Y., Xie, L., Greenberg, D.A. (2002). Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 110 (3). 311-319.
- Kaikkonen, J., Nyssönen, K., Porkkala-Sarataho, E., Poulsen, H.E., Metsä-Ketelä, T., Hayn, M., Salonen, R., Salonen, J.T. (1997). Effect of oral coenzyme Q10 supplementation on the oxidation resistance of human VLDL+ LDL fraction: absorption and antioxidative properties of oil and granule-based preparations. *Free Radical Biology and Medicine*. 22 (7). 1195-1202.
- Kloner, R.A. (2015). New observations regarding post-ischemia/reperfusion myocardial swelling. *Journal of the American College of Cardiology*. 65 (4). 324-326.
- Klopsch, C., Furlani, D., Gäbel, R., Li, W., Pittermann, E., Ugurlucan, M., Kundt, G., Zingler, C., Titze, U., Wang, W. (2009). Intracardiac injection of erythropoietin induces stem cell recruitment and improves cardiac functions in a rat myocardial infarction model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 13 (4). 664-679.
- Kostin, S. (2010). Myocardial telocytes: a specific new cellular entity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14 (7). 1917-1921.
- Kostin, S. (2016). Cardiac telocytes in normal and diseased hearts. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 55. 22-30.
- Koundrioukoff, S., Jónsson, Z.a.O., Hasan, S., de Jong, R.N., van der Vliet, P.C., Hottiger, M.O., Hübscher, U. (2000). A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 275 (30). 22882-22887.
- Kurki, P., Vanderlaan, M., Dolbeare, F., Gray, J., Tan, E. (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Experimental Cell Research*. 166 (1). 209-219.
- Laflamme, M.A. and Murry, C.E. (2011). Heart regeneration. *Nature*. 473 (7347). 326-335.
- Lan, C., Cao, N., Chen, C., Qu, S., Fan, C., Luo, H., Zeng, A., Yu, C., Xue, Y., Ren, H. (2020). Progesterone, via yes-associated protein, promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Cell Proliferation*. 53 (11). 1-15.
- Laugwitz, K.-L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L.-Z., Cai, C.-L., Lu, M.M., Reth, M. (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*. 433 (7026). 647-653.
- Le, T. and Chong, J. (2016). Cardiac progenitor cells for heart repair. *Cell death discovery*. 2. 1-4.
- Lehr, D. (1972). Healing of myocardial necrosis caused by sympathomimetic amines. *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*. 1. 526-550.
- Liang, J., Wu, Y.-L., Chen, B.-J., Zhang, W., Tanaka, Y., Sugiyama, H. (2013). The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *International Journal of Biological Sciences*. 9 (5). 435-443.
- Liang, S., Ping, Z., Ge, J. (2017). Coenzyme Q10 regulates antioxidative stress and autophagy in acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. 1-12.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*. 25 (4). 402-408.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A.L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193 (1). 265-275.

- Luna, L.G. (1968a). "Methods for connective tissue". Luna, L.G. (Ed.), in: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (s. 85-86). Michigan: Blakiston Division.
- Luna, L.G. (1968b). "Routine staining procedures". Luna, L.G. (Ed.), in: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (s. 32-34). Michigan: Blakiston Division.
- Majumder, S., Brown, K., Qiu, F., Besmer, P. (1988). c-kit protein, a transmembrane kinase: Identification in tissues and characterization. *Molecular and Cellular Biology*. 8 (11). 4896-4903.
- Mann, D.L., McMurray, J.J., Packer, M., Swedberg, K., Borer, J.S., Colucci, W.S., Djian, J., Drexler, H., Feldman, A., Kober, L. (2004). Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation*. 109 (13). 1594-1602.
- Martin, C.M., Meeson, A.P., Robertson, S.M., Hawke, T.J., Richardson, J.A., Bates, S., Goetsch, S.C., Gallardo, T.D., Garry, D.J. (2004). Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Developmental Biology*. 265 (1). 262-275.
- Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T. (2004). Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (12). 11384-11391.
- Mehdizadeh, R., Parizadeh, M.R., Khooei, A.-R., Mehri, S., Hosseinzadeh, H. (2013). Cardioprotective effect of saffron extract and safranal in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 16 (1). 56-63.
- Mert, H., Yilmaz, H., Irak, K., Yildirim, S., Mert, N. (2018). Investigation of the protective effect of kefir against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 38 (2). 259-272.
- Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M.V., Coletta, M. (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation Research*. 95 (9). 911-921.
- Miller, L.M. and Gal, A. (2017). *Cardiovascular System and Lymphatic Vessels*. St. Louis: B. Elsevier.
- Mirancea, N. (2016). Telocyte-a particular cell phenotype. Infrastructure, relationships and putative functions. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 57 (1). 7-21.
- Miyamoto, S., Kawaguchi, N., Ellison, G.M., Matsuoka, R., Shin'oka, T., Kurosawa, H. (2010). Characterization of long-term cultured c-kit⁺ cardiac stem cells derived from adult rat hearts. *Stem Cells and Development*. 19 (1). 105-116.
- Mokni, M., Hamlaoui-Guesmi, S., Amri, M., Marzouki, L., Limam, F., Aouani, E. (2012). Grape seed and skin extract protects against acute chemotherapy toxicity induced by doxorubicin in rat heart. *Cardiovascular Toxicology*. 12 (2). 158-165.
- Mortensen, S.A. (1989). Endomyocardial biopsy. Technical aspects and indications. *Danish Medical Bulletin*. 36 (6). 507-532.
- Mou, Y., Wang, Y., Li, J., Lü, S., Duan, C., Du, Z., Yang, G., Chen, W., Zhao, S., Zhou, J. (2013). Immunohistochemical characterization and functional identification of mammary gland telocytes in the self-assembly of reconstituted breast cancer tissue in vitro. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 17 (1). 65-75.

- Narmoneva, D.A., Vukmirovic, R., Davis, M.E., Kamm, R.D., Lee, R.T. (2004). Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: implications for cardiac regeneration. *Circulation*. 110 (8). 962-968.
- Nielsen, J.S. and McNagny, K.M. (2008). Novel functions of the CD34 family. *Journal of Cell Science*. 121 (22). 3683-3692.
- Nour, M.S., Sarhan, N.R., Mazroa, S.A., Gawish, S.A. (2017). Histological and immunohistochemical study of cardiac telocytes in a rat model of isoproterenol-induced myocardial infarction with a reference to the effect of grape seed extract. *Acta Histochemica*. 119 (7). 747-758.
- Olson, R.E. and Rudney, H. (1983). "Biosynthesis of ubiquinone". Aurbach, G.D. and McCormick, D.B. (Eds.). in: *Vitamins and Hormones* (s. 1-43). Elsevier.
- Overvad, K., Diamant, B., Holm, L., Hølmer, G., Mortensen, S., Stender, S. (1999). Coenzyme Q 10 in health and disease. *European Journal of Clinical Nutrition*. 53 (10). 764-770.
- Oyama, T., Nagai, T., Wada, H., Naito, A.T., Matsuura, K., Iwanaga, K., Takahashi, T., Goto, M., Mikami, Y., Yasuda, N. (2007). Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *The Journal of Cell Biology*. 176 (3). 329-341.
- Pasumarthi, K.B. and Field, L.J. (2002). Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circulation Research*. 90 (10). 1044-1054.
- Patel, V., Upaganlawar, A., Zalawadia, R., Balaraman, R. (2010). Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: a biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. *European Journal of Pharmacology*. 644 (1-3). 160-168.
- Pfister, O., Mouquet, F., Jain, M., Summer, R., Helmes, M., Fine, A., Colucci, W.S., Liao, R. (2005). CD31⁻ but not CD31⁺ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circulation Research*. 97 (1). 52-61.
- Popescu, L.M., Gherghiceanu, M., Manole, C.G., Faussone-Pellegrini, M.S. (2009). Cardiac renewing: interstitial Cajal-like cells nurse cardiomyocyte progenitors in epicardial stem cell niches. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 13 (5), 866-886.
- Popescu, L. and Faussone-Pellegrini, M.S. (2010). TELOCYTES—a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14 (4). 729-740.
- Popescu, L., Gherghiceanu, M., Hinescu, M., Cretoiu, D., Ceafalan, L., Regalia, T., Popescu, A., Ardeleanu, C., Mandache, E. (2006). Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 10 (2). 429-458.
- Popescu, L., Manole, C., Gherghiceanu, M., Ardelean, A., Nicolescu, M., Hinescu, M., Kostin, S. (2010). Telocytes in human epicardium. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14 (8). 2085-2093.
- Popescu, L.M., Curici, A., Wang, E., Zhang, H., Hu, S., Gherghiceanu, M. (2015). Telocytes and putative stem cells in ageing human heart. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 19 (1). 31-45.
- Prigent, C. and Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science*. 116 (18). 3677-3685.
- Ramasarma, T. (1985). "Natural occurrence and distribution of coenzyme Q". Lenaz, G. (Ed.), in: *Coenzyme Q: Biochemistry; Biogenetics and Clinical Applications of Ubiquinone* (s. 67-81). New York, NY, USA, : John Wiley and Sons.

- Robinson-Bennett, B. and Han, A. (2006). "Role of Immunohistochemistry in Elucidating Lung Cancer Metastatic to the Ovary from Primary Ovarian Carcinoma". Hayat, M.A. (Ed.), in: *Handbook of Immunohistochemistry and in Situ Hybridization of Human Carcinomas* (s. 537-545). Elsevier.
- Rusu, M.C., Pop, F., Hostiuc, S., Curca, G., Jianu, A., Paduraru, D. (2012). Telocytes form networks in normal cardiac tissues. *Histology and Histopathology*. 27 (6). 807–816.
- Sandstedt, J., Jonsson, M., Lindahl, A., Jeppsson, A., Asp, J. (2010). C-kit+ CD45– cells found in the adult human heart represent a population of endothelial progenitor cells. *Basic Research in Cardiology*. 105 (4). 545-556.
- Schmelzer, C., Lindner, I., Rimbach, G., Niklowitz, P., Menke, T., Döring, F. (2008). Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression. *Biofactors*. 32 (1-4). 179-183.
- Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.-D., Guerquin-Kern, J.-L., Lechene, C.P., Lee, R.T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 493 (7432). 433-436.
- Shahzad, S., Mateen, S., Naeem, S.S., Akhtar, K., Rizvi, W., Moin, S. (2019). Syringic acid protects from isoproterenol induced cardiotoxicity in rats. *European Journal of Pharmacology*. 849. 135-145.
- Siddiqui, M., Ahmad, U., Khan, A., Ahmad, M., Badruddeen, K.M., Akhtar, J. (2016). Isoprenaline: a tool for inducing myocardial infarction in experimental animals. *International Journal of Pharmaceutics*. 6 (2). 138-144.
- Smith, R.R., Barile, L., Cho, H.C., Leppo, M.K., Hare, J., Messina, E., Giacomello, A., Abraham, M.R., Marbán, E. (2007). Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 115 (7). 896-908.
- Sözmen, M., Devrim, A.K., Kabak, Y.B., Devrim, T., Sudagidan, M. (2018). The effects of periostin in a rat model of isoproterenol: mediated cardiotoxicity. *Cardiovascular Toxicology*. 18 (2). 142-160.
- Suciu, L., Popescu, L., Regalia, T., Ardelean, A., Manole, C. (2009). Epicardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC) highlighted by immunofluorescence. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 13 (4). 771-777.
- Suciu, L.C., Popescu, B.O., Kostin, S., Popescu, L.M. (2012). Platelet-derived growth factor receptor- β -positive telocytes in skeletal muscle interstitium. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 16 (4). 701-707.
- Sushamakumari, S., Jayadeep, A., Kumar, J., Menon, V. (1989). Effect of carnitine on malondialdehyde, taurine and glutathione levels in heart of rats subjected to myocardial stress by isoproterenol. *Indian Journal of Experimental Biology*. 27 (2). 134-137.
- Takeo, S., Taam, G., Beamish, R., Dhalla, N. (1980). Effects of adrenochrome on calcium accumulating and adenosine triphosphatase activities of the rat heart microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 214 (3). 688-693.
- Talman, V. and Kivelä, R. (2018). Cardiomyocyte—endothelial cell interactions in cardiac remodeling and regeneration. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 5 (101). 1-8.
- Tao, L., Wang, H., Wang, X., Kong, X., Li, X. (2016). Cardiac telocytes. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 11 (5). 404-409.
- Thomas, S.R., Neužil, J.i., Stocker, R. (1996). Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of α -tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 16 (5). 687-696.

- Tomanek, R.J. (2005). Formation of the coronary vasculature during development. *Angiogenesis*. 8 (3). 273-284.
- Tseng, A.-S., Engel, F.B., Keating, M.T. (2006). The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes. *Chemistry and Biology*. 13 (9). 957-963.
- Tyson, J.J., Novak, B., Odell, G.M., Chen, K., Thron, C.D. (1996). Chemical kinetic theory: understanding cell-cycle regulation. *Trends in Biochemical Sciences*. 21 (3), 89-96.
- Ulla, A., Mohamed, M.K., Sikder, B., Rahman, A.T., Sumi, F.A., Hossain, M., Reza, H.M., Rahman, G.S., Alam, M.A. (2017). Coenzyme Q10 prevents oxidative stress and fibrosis in isoprenaline induced cardiac remodeling in aged rats. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 18 (1). 1-10.
- Upaganlawar, A., Gandhi, C., Balaraman, R. (2009). Effect of green tea and vitamin E combination in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*. 64 (1). 75-80.
- Upaganlawar, A., Gandhi, H., Balaraman, R. (2011). Isoproterenol induced myocardial infarction: Protective role of natural products. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 6 (1). 1-17.
- van Amerongen, M.J. and Engel, F.B. (2008). Features of cardiomyocyte proliferation and its potential for cardiac regeneration. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 12 (6a). 2233-2244.
- van de Rijn, M., Lombard, C.M., Rouse, R.V. (1994). Expression of CD34 by solitary fibrous tumors of the pleura, mediastinum, and lung. *The American Journal of Surgical Pathology*. 18 (8). 814-820.
- Van Holde, K.E. (1988). Chromatin. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Varga, I., Kyselovič, J., Galfiova, P., Danisovic, L. (2017). “The non-cardiomyocyte cells of the heart. Their possible roles in exercise-induced cardiac regeneration and remodeling”. Xiao, J. (Ed.), in: *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment* (s. 117-136). Singapore: Springer.
- Wang, S.-b., Tian, S., Yang, F., Yang, H.-g., Yang, X.-y., Du, G.-h. (2009). Cardioprotective effect of salvianolic acid A on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *European Journal of Pharmacology*. 615 (1-3). 125-132.
- Wang, X., Hu, Q., Nakamura, Y., Lee, J., Zhang, G., From, A.H., Zhang, J. (2006). The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells*. 24 (7). 1779-1788.
- Weinhaus, A.J. and Roberts, K.P. (2005). “Anatomy of the human heart”. Paul, A. (Ed.), in: *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices* (s. 51-79). Totowa: Humana Press.
- Wexler, B.C. (1978). Myocardial infarction in young vs old male rats: pathophysiologic changes. *American Heart Journal*. 96 (1). 70-80.
- WHO. (2022). Cardiovascular disease. Retrieved 13.04.2022, from <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases>
- Yamahara, K., Fukushima, S., Coppen, S.R., Felkin, L.E., Varela-Carver, A., Barton, P.J., Yacoub, M.H., Suzuki, K. (2008). Heterogeneous nature of adult cardiac side population cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 371 (4). 615-620.
- Yang, Y., Sun, W., Wu, S.M., Xiao, J., Kong, X. (2014). Telocytes in human heart valves. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 18 (5). 759-765.

- Yutoku, M., Grossberg, A.L., Pressman, D. (1974). A cell surface antigenic determinant present on mouse plasmacytes and only about half of mouse thymocytes. *The Journal of Immunology*. 112 (5). 1774-1781.
- Zhang, H.-Q., Lu, S.-S., Xu, T., Feng, Y.-L., Li, H., Ge, J.-B. (2015). Morphological evidence of telocytes in mice aorta. *Chinese Medical Journal*. 128 (3). 348-352.
- Zhao, B., Chen, S., Liu, J., Yuan, Z., Qi, X., Qin, J., Zheng, X., Shen, X., Yu, Y., Qin, T.J. (2013). Cardiac telocytes were decreased during myocardial infarction and their therapeutic effects for ischaemic heart in rat. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 17 (1). 123-133.
- Zhao, B., Liao, Z., Chen, S., Yuan, Z., Yilin, C., Lee, K.K., Qi, X., Shen, X., Zheng, X., Quinn, T. (2014). Intramyocardial transplantation of cardiac telocytes decreases myocardial infarction and improves post-infarcted cardiac function in rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 18 (5). 780-789.
- Zhou, R., Xu, Q., Zheng, P., Yan, L., Zheng, J., Dai, G. (2008). Cardioprotective effect of fluvastatin on isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. *European Journal of Pharmacology*. 586 (1-3). 244-250.

EKLER

ETİK KURUL KARARI



T. C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



KURUL KARARI

KARAR NO: 2018/50	Proje KABUL NO: 2018-50	KARAR TARİHİ: 21.12.2018
PROJE Ratlarda deneysel olarak isoproterenol ile oluşturulan kardiyotoksistede koenzim Q10'in etkilerinin araştırılması		
YÜRÜTÜCÜ Doç.Dr.Yonca Betil KABAK	TC: _____	
E-POSTA _____	MOBİL TEL _____	
KURUM OMÜ Veteriner Fakültesi	İÇ HAT TEL NO _____	
<ul style="list-style-type: none">Yukarıda tanımlanan Laboratuvar Hayvanları ile yapılan çalışmayı; belirtilen araştırmacılar ile gerçekleştireceğini, ekip dışında başka kişileri HADYEK ten izin almadan iştirak ettirmeyeceğini, çalışmanın başından sonuna kadar başkaları ile paylaşmayacağını ve yayın haline dönüştüğünde belirtilen katkı sırasına göre yayınlayacağını,Üniversitemiz WEB sayfasında güncel hali yayınlanan, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun olarak çalışacağını,Onay alınmış Projede belirtilen Deneysel Hayvanları Kullanımına müsaade edilen kişilerin haricinde başkalarına hayvanlarda herhangi bir Deneysel işlem yaptırmayacağını ve Proje sürecinde işlemlerde ve çalışma ekibinde yapılacak her türlü değişiklikler için HADYEK'e izin başvurusunda bulunacağını ve onay gelinceye kadar çalışmalarını durduracağını,Proje onay tarihinden itibaren her 6(altı) ay sonrasında HADYEK'e gelişim raporu vereceğini ve Proje bitim tarihini müteakiben 3 ay içerisinde çalışma sonucunu HADYEK'e bildireceğini, Bu Proje süresince, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesinde yer alan etik ilkelerle uyumlayan veya beklenmeyen ters bir etki veya olay olduğunda derhal Yerel Etik Kurul'a bildireceğini Kabul ve taahhüt eden kimlik ve iletişim bilgileri yukarıda yazılı yürütücünün Araştırma Projesi, Etik Kurul Üyeleri tarafından OMU HADYEK yönergesi kapsamında Hayvan Hakları ve Deneysel Etik İlkelerine UYGUN bulunmuştur.		
İMZA Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY Üye	KATILMADI Prof. Dr. Ahmet UZUN Üye	KATILMADI Prof. Dr. M. Ender ARITÜRK Üye
İMZA Prof. Dr. Ahmet GÜLER Üye	İMZA Prof. Dr. H. Tahsin KEÇELİGİL Üye	İMZA Prof. Dr. N. Umur SAKALLIOĞLU Üye
KATILMADI Prof. Dr. Özcan YILMAZ Üye	İMZA	İMZA Dr. Öğretim Üyesi Buğra GENÇ Üye
İMZA Prof. Dr. Yüksel TERZİ Üye	İMZA Doç. Dr. Savaş YILMAZ Üye	KATILMADI Doç. Dr. Berfin M GÖLCÜ Üye
KATILMADI İnş. Müh. Ahmet CENGİZ Üye	İMZA Vet. Hek. Mustafa ERMIŞ Üye	KATILMADI Ecz. Onur Ferhat KARACAN Üye
İMZA Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ Başkan		

5070 Elektronik İmza Kanunu'na uygun olarak Güvenli Elektronik İmza ile üretilmiş yazı ekidir.
Evrak teyidi <https://ebysorgu.omu.edu.tr> adresinden ilgi yazıda belirtilen kod ile yapılabilir.

ÖZ GEÇMİŞ

Ankara Mehmetçik Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2013 yılında üçüncülük derecesiyle mezun oldu. 2016 yılından itibaren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.

İletişim Bilgileri

ORCID ID: 0000-0002-2552-5159

Yayınlar:

1. Gülbahar M.Y., Karaca E., Çiftci A., **İnal S.**, Ahmed I., Balakrishnan N., Breitschwerdt E.B. (2019). Pyogranulomatous myocarditis and diaphragmatic myositis associated with Bartonella henselae in a cat. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 66 (1). 103-107.
2. Kuruca N., Gülbahar M.Y., Sözmen M., Yarım M., Kabak Y.B., Karaca E., **İnal S.**, Güvenç T. (2019). Samsun'da 2004-2019 Yılları Arasında İncelenen Köpek Meme Tümörleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 30 (2). 132-136.
3. Bölükbaş C.S., Demirtaş S., Gürler A.T., **İnal S.**, Açıcı M., Umur Ş. (2020). Molecular characterization of Calodium hepaticum in grey dwarf hamster (*Cricetulus migratorius*). *Parasitology International*. 78. 1-4.
4. Kabak Y.B., Kabak M., Özak A., Sözmen M., **İnal S.**, Güvenç T., Gülbahar M.Y. Asymmetric conjoined twins: Gnathopagus parasiticus. (2020). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 67 (4). 431-435.
5. Sözmen M., Devrim T., Kuruca N., **İnal S.**, Karaca E., Gülbahar M.Y. (2020). Primary Unilateral Small Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Kidney in a Dog. *Journal of Comparative Pathology*. 176. 71-75.
6. Kabak Y.B., Sözmen M., Devrim A.K., Sudagıdan M., Yıldırım F., Güvenç T., Yarım M., Gülbahar M.Y., Ahmed I., Karaca E., **İnal S.** Expression levels of angiogenic growth factors in feline squamous cell carcinoma. (2020). *Acta Veterinaria Hungarica*. 68 (1). 37-48.
7. Güvenç D., **İnal S.**, Kuruca N., Gökmen S., Güvenç T. Synthetic pyrethroids common metabolite 3-phenoxybenzoic acid induces caspase-3 and Bcl-2 mediated apoptosis in human hepatocyte cells. (2021). *Drug And Chemical*

Toxicology. 45 (5). 1971-1975

8. Ozan E., Müftüoğlu B., Şahindokuyucu İ, Kuruçay H.N., **İnal S.**, Kuruca N., Elhag A.E., Karaca E., Tamer C., Gümüşova S., Albayrak H, Barry G., Gülbahar M.Y., Yazıcı Z. (2021). Marek's disease virus in vaccinated poultry flocks in Turkey: its first isolation with molecular characterization, *Archives of Virology*. 166 (2). 559-569.
9. **İnal S.**, Bağatır E., Kuruca N., Sezener M.G., İnal K.S., Fındık A., Güvenç T. (2021) Septicemia and multiple abscesses associated with pantoea agglomerans in a dog. *Kafkas Veteriner Fakültesi Dergisi*. 27 (3). 403-407.
10. Gültiken N., Yarım M., Aslan S., Gürler H., Yarım G.F., Tuncay M., **İnal S.**, Schäfer S.S. (2022) Expression of Anti-Müllerian Hormone and Its Type 2 Receptor in the Ovary of Pregnant and Cyclic Domestic Cats. *Animals*. 12 (7). 1-15.

Bildiriler:

1. **Beyazkılınç S.**, Yarım M., Özak A., İnal K.S., Ahmed I, Gülbahar M.Y. (2016, Eylül) "Beş aylık bir köpekte oro nazal yassı hücreli karsinom". *VIII: Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi*, Samsun.
2. Kabak Y.B., Kabak M., Özak A., **İnal S.**, Güvenç T., Gülbahar M.Y. (2016, Eylül) "Asimetrik yapışık ikizlik Gnathopagus paraziti". *VIII: Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi*, Samsun.
3. Aygün H., Kabak Y.B., Ayyıldız M., Khaleel A.Z.K., Lubna A.K., **İnal S.**, Him A., Ağar E. (2017) "The role of AM-251 in the anticonvulsant effects of hemopressin on absence-like seizures of WAG/Rij rat". *Acta Physiologica*.
3. Aygün H., Kabak Y.B., Ayyıldız M., Khaleel A.Z.K., Lubna A.K., **İnal S.**, Him A., Ağar E. (2017) "The effect of hemopressin on ECoG activity of absence epilepsy model in WAG/Rij rats". *Acta Physiologica*.
4. Aygün H., Kabak Y.B., Ayyıldız M., Khaleel A.Z.K., Lubna A.K., **İnal S.**, Him A., Ağar E. (2017, Mayıs) "WAG/Rij sıçanlarda görülen absans benzeri nöbetler üzerine CB1 kanabinoid reseptörlerinin rolü". *15. Ulusal Sinirbilim Kongresi*.
5. Güvenç D., **İnal S.**, Güvenç T. (2017, Eylül) "Detection Of Apoptosis On Hepg2 Cell Line Induced By Pyrethroid Metabolite (3-phenoxybenzoic Acid) Using Flow Cytometry". *The 16th International Symposium Prospects for the 3rd Millennium Agriculture*, Romanya.
6. Binli F., Ay S.S., Karaca E., **İnal S.**, Fındık M. (2017, Haziran) "A case of multiple

mammary tumour in a dog”. *XX Congress of the European Veterinary Society For Small Animal Reproduction*.

7. Kabak Y.B., Sözmen M., Devrim A.K., Sudağıdan M., Yıldırım F., Güvenç T., Yarım M., Gülbahar M.Y., Ahmed I., Karaca E., **İnal S.** (2017, Eylül) “The Role of VEGF-C in the Development of Feline Squamous Cell Carcinomas”. *29th Annual Congress of the European Society and College of Veterinary Dermatology (ESVD-ECVD)*, Lausanne, İsviçre.
8. Karaca E., Kuruca N., **İnal S.**, Özcan Ü., Binli F., Güvenç T., Gülbahar M.Y. (2018, Eylül) “Synchronous Metastatic Myxoid Liposarcoma and Malignant Mixed Mammary Tumor In A Dog”. *The 17th International Symposium “Prospects for the 3rd Millennium Agriculture”*, Cluj-Napoca, Romanya.
9. **İnal S.**, Kuruca N., Karaca E., Pekmezci D., Sayılkan B.U., Kabak Y.B., Gülbahar M.Y. (2018, Ekim) “Bir Kedinin İdrar Kesesinde Papiller-İnfiltratif Tipte Ürotelyal Karsinom Olgusu”. *9. Uluslararası Katılımlı Veteriner Patoloji Kongresi*, Antalya.
10. Kuruca N., **İnal S.**, Karaca E., Güvenç T., Önyay T., Gülbahar M.Y., Sözmen M. (2018, Ekim) “A Case of Hemangiopericytoma in a Female Dog”. *9. Uluslararası Katılımlı Veteriner Patoloji Kongresi*, Antalya.
11. Gençay Topçu E.B., **İnal S.**, Barılı Ö., Kuruca N., Umur Ş. (2019, Mart) “Samsun’da Nekropsi Yapılan iki At ve Bir Katırda Saptanan Parazit Türleri” *I. International Equine Medicine & Training Congress*, Samsun.
12. Kaya M.T., Sözmen M., Karaca E., **İnal S.**, Nilüfer Kuruca, Öztürk M, Kabak Y.B., Gülbahar M.Y. (2020, Kasım) “Bir Koyunda pulmoner Adenomatosis, Paratuberkülozis ve Sistemik Parazitosis ile Birlikte Seyreden Frontal Osteom Olgusu”, *10. Ulusal ve 1. Uluslararası Veteriner Patoloji Kongresi*, Burdur.
13. Gültiken N., Yarım M., Aslan S., Gürler H., Yarım G.F., Tuncay M., **İnal S.**, Schäfer S.S. Expressions of anti- Müllerian hormone and its type 2 receptor in the ovary of pregnant and cycling domestic cats. (2022, October) Congress Proceedings of the 23rd European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR) Congress.
14. **İnal S.**, Kabak Y.B. (2022) “The Histological Effect of CoQ10 on Spermatogenesis in Rats”, *ICBH*.

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. En iyi poster ödülü, Güvenç D., **İnal S**, Güvenç T. (2017, Eylül) “Detection Of Apoptosis On Hepg2 Cell Line Induced By Pyrethroid Metabolite (3-phenoxybenzoic Acid) Using Flow Cytometry”. *The 16th International Symposium Prospects for the 3rd Millennium Agriculture*, Romanya.
2. En iyi poster ödülü, Kaya M.T., Sözmen M., Karaca E., **İnal S.**, Nilüfer Kuruca, Öztürk M, Kabak. Y.B., Gülbahar M.Y. (2020, Kasım) “Bir Koyunda pulmoner Adenomatosis, Paratuberkülozis ve Sistemik Parazitozis ile Birlikte Seyreden Frontal Osteom Olgusu”, *10. Ulusal ve 1. Uluslararası Veteriner Patoloji Kongresi*, Burdur.

