

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MYOKARDİYAL İSKEMİK ARDKOŞULLANMANIN
NEKROZ ÜZERİNDEKİ KORUYUCULUĞUNDA
MELATONİNİN FİZYOLOJİK VE FARMAKOLOJİK
ETKİLERİ VE MİTOKONDİRİYAL UNCOUPLING
PROTEİNLERİ 2 VE 3'ÜN ROLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gölnur ASLAN

2016

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Fırat Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

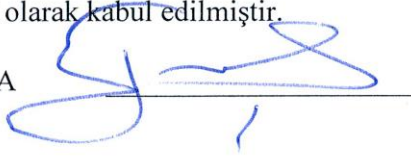
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Engin ŞAHNA



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Engin ŞAHNA



Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU



Doç. Dr. Selçuk İLHAN



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikiminden faydalandığım, tüm bu süre zarfında desteğini esirgemeyen ve göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Engin ŞAHNA'ya, eğitimim boyunca yardımlarıyla destek olan Sayın Doç. Dr. Selçuk İLHAN' a teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın biyokimyasal analizini yapan Tıbbi Biyoloji A.D Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a ve asistanı Ahmet TEKTEMUR'a teşekkür ederim.

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde çalışan Lütfü, Veysel ve Suat Abilerime deney hayvanları çalışma süresince yardımlarını esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan değerli eşim Ecz. Bahadır ASLAN' a ve her zaman yanımda olan ve haklarını asla ödeyemeceğim sevgili aileme teşekkür ederim.

Ecz. Gülnur ASLAN

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	I
ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. İskemik kalp hastalığı ve Miyokard infarktüsü	5
3.1.1. İskemi - Reperfüzyon hasarı	5
3.1.2. I/R hasarı tedavisi	7
3.1.2.1. Farmakolojik Tedavi	7
3.1.2.2. Mekanik Tedavi	8
3.2. Myokardiyal İskemik Koşullanma	9
3.2.1. İskemik önkoşullanma	10
3.2.2. Farmakolojik koşullanma	12
3.2.3. İskemik ardkoşullanma	13
3.2.3.1. PostC'nin olası mekanizması	15
3.2.3.1.1. Reaktif Oksijen Türleri	18
3.2.3.1.2. Adenozin	19
3.2.3.1.3. Protein kinaz B ve C	20
3.2.3.1.4. RISK yolu	20
3.2.3.1.5. NO ve Asimetrik Dimetiltarjinin (ADMA)	21
3.2.3.1.6. Mitokondri	22
3.2.3.1.6.1. MPTP	22
3.2.3.1.6.2. Mitokondriyal Potasyum ATP Kanalı	22
3.2.3.1.6.3 Uncoupling protein'ler	23
3.2.3.1.7. İrisin	25
3.2.3.2. PostC uygulanmasındaki önemli hususlar	26

3.2.5.3. PostC'nin koruyuculuğunun ortadan kalktığı durumlar	27
3.3. Melatonin	28
3.3.1. Melatonin etki mekanizması	29
3.3.2. Melatonin ve mitokondri	30
3.3.3. Melatonin ve MPTP	31
3.3.4. ADMA ve melatonin	32
3.3.5. I/R hasarı ve melatonin	33
3.4. Ardkoşullanma ve melatonin	34
4. GEREÇ VE YÖNTEM	36
4.1. Deney hayvanları:	36
4.2. Deney planı	36
4.3. Cerrahi uygulamalar	37
4.3.1. Pinealektomi	37
4.3.2. I/R uygulama	38
4.4. İlaç uygulanması	41
4.5. Nekroz alanının ölçülmesi	41
4.6. Biyokimyasal parametreler.	42
4.7. İstatistik	42
5. BULGULAR	43
5.1. I/R, PostC, melatonin ve Px'in nekroz alanına etkisi	43
5.2. I/R, PostC, melatonin ve Px'in irisin düzeyleri üzerine etkisi	46
5.3. I/R, PostC, melatonin ve Px'in UCP2 düzeyi üzerine etkisi	47
5.4. I/R, PostC, melatonin ve Px'in UCP3 aktivitesi üzerine etkisi	48
6. TARTIŞMA	49
7. KAYNAKLAR	58
8. ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. I/R hasarı	7
Şekil 2. PreC etki mekanizması	11
Şekil 3. PostC' nin kalp koruyucu etkisi	14
Şekil 4. PostC nın olası mekanizması	17
Şekil 5. PostC da canlı türüne göre I/R siklus süreleri	27
Şekil 6. Pineal bez	38
Şekil 7. Sıçanda sol koroner arterin ligasyon bölgesi	39
Şekil 8. Reperfüzyon sırasında EKG (üstte) ve kan basıncı (altta)	40
Şekil 9. İskemi başlangıcında EKG	40
Şekil 10. İskemi başlangıcında kan basıncı	40
Şekil 11. İskemik ardkoşullanma – EKG görüntüsü	40
Şekil 12. I/R, PostC, melatonin ve Px in nekroz alanı/tüm kalp değerleri	44
Şekil 13. I/R, PostC, melatonin ve Px in nekroz alanı/risk alanı değerleri	45
Şekil 14. Postc ve melatonin uygulamalarının nekroz alanında sağladığı azalma	45
Şekil 15. I/R, PostC, melatonin ve Px in irisin düzeyleri üzerine etkisi	46
Şekil 16. I/R, PostC, melatonin ve Px in UCP2 düzeyleri üzerine etkisi	47
Şekil 17. I/R, PostC, mel ve Px in UCP3 düzeyleri üzerine etkisi	48

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. PostC ‘nin koruyuculuğunda rol oynayan faktörler	18
Tablo 2. Ardkoşullanmanın koruyuculuğunun ortadan kalktığı durumlar	28
Tablo 3. I/R, PostC, melatonin ve Px uygulamalarının nekroz alanına etkileri	44
Tablo 4. I/R, PostC, melatonin ve Px in irisin düzeyleri üzerine etkisi	46
Tablo 5. I/R, PostC, melatonin ve Px’ in UCP2 düzeyi üzerine etkisi	47
Tablo 6. I/R, PostC, melatonin ve Px in UCP3 düzeyleri üzerine etkisi	48

KISALTMALAR LİSTESİ

ADMA	: Asimetrik Dimetilarjinin
CL	: Kardiyolipin
Enos	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ERK	: Hücre Dışı Sinyal Ayarlı kinaz $\frac{1}{2}$
ETZ	: Elektron taşıma zinciri
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
I/R	: İskemi reperfüzyon
İKH	: İskemik kalp hastalığı
MDA	: Malondialdehit
MI	: Miyokard infarktüsü
MitoKATP	: Mitokondriyal ATP bağımlı K^+ kanalları
MPTP	: Mitokondriyal Permeabilite Transizyon Poru
NO	: Nitrik oksit
O₂⁻	: Süper oksit anyon
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PKB	: Protein kinaz B
PostC	: İskemik ardkoşullanma
PreC	: İskemik önkoşullanma
Px	: Pinealektomi
RISK	: Reperfüzyon İndüklü Salvaz Kinaz
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
UCPs	: Uncoupling proteinler

1. ÖZET

İskemik ardkoşullanma (Postconditioning-PostC); reperfüzyon başlangıcında iskemi-reperfüzyon (I/R)'un kısa bölümlerine maruz kaldığında, miyokardın daha dirençli hale gelmesini hedefleyen güçlü bir kardiyoprotektif olgudur. İlerleyen yaş ve kronik kalp hastalığıyla PostC'nin koruyucu etkisinin azaldığı/ortadan kalktığı bildirilmiştir. Benzer şekilde aynı risk gruplarında düşük serum melatonin düzeyi rapor edilmektedir.

Bu çalışmada, PostC'nin koruyuculuğunda melatoninin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarının rolünün belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, I/R'ye bağlı nekroz alanı, enerji metabolizmasında görevli bir hormon olan irisin ve oksidatif strese karşı mitokondriyi koruyan uncoupling protein (UCP) 2 ve 3'ün düzeyleri incelendi.

I/R uygulamalarından 2 ay önce ratlar kontrol (Non-Px) ve pinealektomili (Px) olarak 2 gruba ayrıldı. 30 dk iskemiye takiben, 3 siklus 10'ar sn PostC ve 120 dk reperfüzyon uygulandı. Risk alanı evans blue, infarkt alanı trifeniltetrazolyumklorid ile tespit edilerek, İmageJ programı ile hesaplandı. İrisin, UCP 2 ve 3 düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile ölçüldü.

Non-Px gruplarda, PostC ve melatonin uygulamaları ile nekroz alanı azaldı (%18,83, %17,53). Px sıçanlarda (%33,58) nekroz alanı kontrol ile (%25,46) karşılaştırıldığında anlamlı yüksekti.

UCP3 düzeyi I/R ve Px ile azaldı, PostC ve melatonin uygulamaları ile arttı. Px sonrası PostC, nekroz alanı ve UCP 2, 3 üzerinde anlamlı etki oluşturmazken, PostC öncesi melatonin uygulaması ile koruyuculuk sağlandı. İrisin düzeyi, I/R ve Px ile artarken, PostC ve melatonin uygulamaları ile azaldı.

Bu bulgular; UCP 2, 3 ve irisin düzeylerinin PostC'nin koruyuculuğunda rolünün olabileceğini, fizyolojik melatoninin azaldığı durumlarda PostC'nin koruyuculuğunun (nekroz oranı, UCP2, 3) ortadan kalktığını, dışarıdan melatonin replasmanı ile koruyucu etkinin geri çevrilebildiğini göstermiştir.

Melatoninin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonları PostC'nin koruyuculuğunda önemli olabilir. Melatoninin, PostC ile benzer oranda ve benzer parametreler ile koruyuculuk gösterebildiği için farmakolojik koşullanma yapabilen bir ajan olarak düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Ardkoşullanma, melatonin, I/R, irisin, UCP 2/3

2. ABSTRACT

Physiological and Pharmacological Effects of Melatonin on Myocardial

Ischemic Postconditioning Protection on Infarct size and Role of

Mitochondrial Uncoupling Protein 2 and 3

Myocardial ischemic postconditioning (PostC) is a strong endogenous cardioprotective phenomenon, which targets the increased tolerance of the myocardium against continuous ischemia when the myocardium is subjected to short intervals of ischemia-reperfusion I/R at the beginning of reperfusion following ischemia. Physiologic and pharmacologic concentrations of melatonin released from the pineal gland has been shown protective effect against I/R injury. It has been reported that protective effects of PostC decreases/disappears with age and chronic heart disease. Similarly in low serum melatonin levels have been reported in the same risk groups.

In this study, it was aimed to investigate the physiological and pharmacological role of melatonin in PostC protection. For this purpose, I/R injury induced enfarct size, irisin (is a hormone in charge of energy metabolism) and protect the mitochondria from oxidative stress levels of UCP2 and 3 proteins were examined.

Initially rats were divided into 2 groups (control (Non-Px)) or pinealectomized (Px)) 2 months before the I/R studies. 30 min ischemia, 3 cycles of 10 sec of I / R ve120 min of reperfusion applied. Risk areas with evans blue, infarct size with triphenyltetrazoliumchloride were determined and calculated with the ImageJ program. Levels of irisin, UCP 2 and 3 were analyzed by qRT-PCR.

In Non-Px groups, infarct size decreased by PostC and melatonin applications (18.83%, 17.53%). Infarct size in Px rats (33.58%) was significantly higher compared with the control (25.46%). UCP3 level decreased with I/R and Px, increased by PostC and melatonin application. After Px, PostC does not create significant effect on the infarct size and UCP2,3 but protection was provided with melatonin before PostC. Irisin level increased with I/R and Px, decreased by PostC and melatonin applications.

These findings showed that UCP 2, 3 and irisin levels could play a role in retention of PostC, protective effect (infarct size, UCP2, 3) disappears with the reduction of physiological melatonin and comes back with melatonin replacement.

These results suggest that physiological and pharmacological concentrations of melatonin are important in protection of PostC. Melatonin and PostC are protective with a similar rate and similar parameters, so melatonin may be an agent capable of pharmacological PostC.

Keywords: Postconditioning, melatonin, I/R, irisin, UCP 2/3

3. GİRİŞ

3.1. İskemik kalp hastalığı ve Miyokard infarktüsü

İskemik kalp hastalığı (İKH); genellikle koroner arterlerin ateromatöz plaklar ile tıkanmasıyla oluşan, miyokardın metabolik gereksinimlerini karşılamaya yetecek kan akımının sağlanamaması ile karakterize bir durumdur (1). En önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olarak güncelliğini korumaktadır (2). WHO, İKH' yı 2020 yıllarında dünya çapında başlıca ölüm nedenleri arasında öngörmektedir (3). Türkiye'de ulusal düzeyde tüm yaş gruplarında kadınlarda % 18 ve erkeklerde % 20,5 ile birinci ölüm nedeni İKH'dır (4).

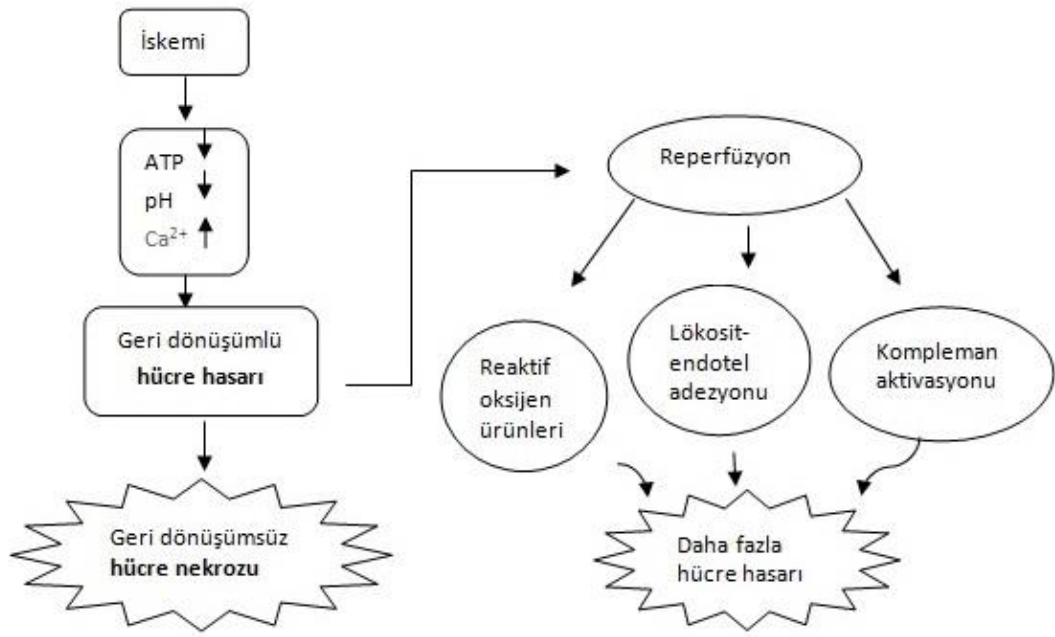
Miyokard infarktüsü (MI); koroner kan dolaşımının yetersiz kalması sonucu miyokardın iskemik nekrozu olarak tanımlanabilir (5). Oluşan infarkt alanı, oklüzyonun uzun veya kısa sürmesiyle ilişkilidir. Bu nedenle tıkanan damarın erken açılması, mortalite ve komplikasyonlarda azalma, yaşam süresinde anlamlı uzama sağlar (5, 6). Hızlı ve etkili tedavilere rağmen akut MI sonrası mortalite oranı % 5' tir (7). Her ne kadar hızlı girişimlerle kan akımı restore edilse de etki beklenen düzeyde değildir (3).

3.1.1. İskemi - Reperfüzyon hasarı

İskemi reperfüzyon (I/R) hasarı, oksijensiz dokunun yeniden sirkülasyonu ile oluşan patofizyolojik değişiklikler serisidir (8).

Dokuya giden kan akımının azalması ile başlayan iskemik hasar, reperfüzyon sağlandığında dokuların yeniden oksijenasyonu ile artarak devam eder. Hücrelerdeki mitokondriyal ATP üretiminin azalması hücre içi metabolizmanın anaerobik yöne kaymasına ve hücre içi asidoza sebep olur. ATP

bağımlı Na-K iyon pompalarının yavaşlaması, hücre içi hidrojen artışına yol açar. Artmış hidrojen yükünü dengelemek için ATP bağımlı olmayan Na-Ca pompası intraselüler Ca miktarını artırır. Artmış Ca yükü ise birçok sitozolik proteazı aktive eder. Hücre içi proteaz aktivasyonu ve reperfüzyonla dokuların yeniden oksijenasyonu hidroksil ($\text{OH}^\cdot$), süperoksit ($\text{O}_2^\cdot$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ile peroksinitrit (ONOO^-) gibi reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimine yol açan kritik biyokimyasal yolları hızlandırır. Ayrıca artmış serbest radikallerin neden olduğu enflamasyon, bölgeye inflamatuvar hücrelerin toplanmasını tetikler. Endotelial hücrelerle başta polimorf çekirdekli lökositler olmak üzere inflamatuvar hücreler arasındaki etkileşimler, birçok sitokin salınmasına ve iskeminin yol açtığı hasarın reperfüzyonla genişlemesine yol açar. Ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS) ve mitokondrilerde bulunan elektron taşıma zinciri ROS ve RNS üretiminden sorumlu başlıca mekanizmalardır. Sonuçta oluşan serbest radikaller hücre membranlarındaki lipid yapılara, hücre içi yapısal ve fonksiyonel proteinlere ve genetik materyal gibi önemli makromoleküllere zarar vererek hücre hasarı veya ölümüne yol açar (9, 10). 'Öldürücü reperfüzyon hasarı' ile iskemi sonunda yaşayan kardiyomiyositlerin ölümü gerçekleşir ve MI boyutuna katkıda bulunur (11). Akut MI hayvan çalışmalarında ölümcül reperfüzyon hasarının, final infarkt alanının %50' sine kadar sorumlu olabileceği gösterilmiştir (12). I/R hasarı sırasında gelişen yapısal ve metabolik değişimler Şekil 1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1. I/R hasarı

I/R hasarı; MI, inme, serebral iskemi, hemorajik şok, kalp cerrahisi, koroner anjioplasti gibi girişimsel ve trombolitik tedaviye bağlı oluşan patofizyolojinin temelidir (13).

3.1.2. I/R hasarı tedavisi

3.1.2.1. Farmakolojik Tedavi

İKH tedavisinde kullanılan farmakolojik ajanlar genel olarak; asetil salisilik asit, beta blokerler, klopidoğrel, statinler, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, anjiyotensin reseptör blokerleri, kalsiyum kanal blokerleri, nitratlar, nikorandil ve ivabradindir (14). Kardiyoprotektif tedavilerde kullanılan bu ajanlar klinikte I/R hasarını azaltmada istenen etkiyi gösterememiştir. I/R hasarının patofizyolojik mekanizmalarının saptanması ile farklı farmakolojik tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Atrial natriüretik peptid, siklosporin A ve eksenatid bu bağlamda üzerinde çalışılan ajanlardır (15).

Natriüretik peptidler (atrial natriüretik peptit, beyin natriüretik peptit ve dendroapsis natriüretik peptit) kan basıncını, elektrolit dengesini ve sıvı volümünü regüle eder. Direkt vazodilatör etki ile kalbin önyük ve ardyükünü azaltarak, kalp yetmezliğinde aktive olmuş diğer nörohümorale vazokonstrüktör sistemlerin etkisini dengelemeye çalışır (16).

İmmünosupresan olan siklosporin A, yapılan çalışmalara göre I/R hasarında nötrofiller üzerine direkt etkileri ile inflamasyonu azaltır (17).

Eksenatid; endojen inkretin olan glukagon benzeri peptid 1'i taklit eden bir ajandır. Timmers ve ark. inkretinmimetik olan eksenatidin MI'yı belirgin azalttığını ve reperfüzyonda verildiğinde sol ventrikül kasılma ve gevşemesini sağladığını saptamışlardır (18).

Ek olarak antioksidanların da I/R hasarına karşı koruyucu özellikte olabileceği rapor edilmiştir (15).

3.1.2.2. Mekanik Tedavi

İKH'nın iyileştirilmesinde tedavisinde girişimsel tedavi önemli yer tutar. Farmakolojik tedavide olduğu gibi, girişimsel tedavide de amaç sağ kalımı sağlamak, belirtileri azaltmak ya da ortadan kaldırmaktır. Miyokard revaskülarizasyonunda koroner arter bypass cerrahisi ve perkutan koroner girişim olmak üzere iki geleneksel yaklaşım mevcuttur. Günümüzde, minimum invaziv yaklaşım ile pompasız cerrahi ve ilaç salınımlı stentler hızla gelişmektedir (14). Reperfüzyon hasarınının minimizasyonu için ise patofizyolojik mekanizmalara bağlı olarak tedavi teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar; iskemik koşullanma ve terapötik hipotermidir (15).

Hipotermi genel olarak hücre metabolizmasını yavaşlatarak oksijen gereksinimini azaltma düşüncesiyle topikal miyokardiyal soğutmayı içeren bir yöntemdir (19).

3.2. Myokardiyal İskemik Koşullanma

Yaklaşık 40 yıldır iskemi sırasında ve reperfüzyon sonrasında miyokardiyal hücre ölümünü azaltmaya yönelik girişimler yapılmaktadır. Hayvan modellerinde birçok tedavi umut vadetmesine rağmen görece az sayıda klinik çalışma başarılı olmuştur (20). En etkili klinik tedavi yöntemlerinden bazıları, kalbin kendini koruyabilmesi için adaptif kapasiteyi ortaya çıkarmayı hedefleyen teknikleri içerebilir.

Koroner arter oklüzyonu ve koroner kan akımının restorasyonu I/R hasarının nedenidir. Öte yandan oklüzyon ve reperfüzyonun kısa döngüleri I/R hasarından koruma için uyarıcıdır (21). Miyokardiyal iskemik koşullanma I/R'nin kısa bölümlerine maruz kaldığında, miyokardın iskemiye karşı tolerans artışını hedefleyen güçlü bir endojen kardiyoprotektif olgudur (8). Miyokard iskemik koşullanma dört farklı şekilde yapılır:

- İskemik önkoşullanma (PreC)
- İskemik ardkoşullanma (PostC)
- Uzaktan koşullanma
- Farmakolojik koşullanma

3.2.1. İskemik önkoşullanma

1986'da Murry ve ark., köpeklerde sirkumfleks koroner arterde yaptıkları çalışmada önceki kısa süreli tekrarlayan I/R sikluslarının miyokardı, daha sonraki asıl I/R hasarına karşı daha dirençli hale getirdiğini ve koruyucu etkisi olduğunu göstermiş ve indüklenebilen güçlü endojen mekanizmaya “iskemik önkoşullanma” adını vermişlerdir. PreC'nin MI boyutunu % 75 oranında azalttığını farketmişlerdir (8). Bu güçlü kardiyak koruyucu yöntem, insanlar dahil olmak üzere birçok türe uygulanmıştır (8, 22, 23).

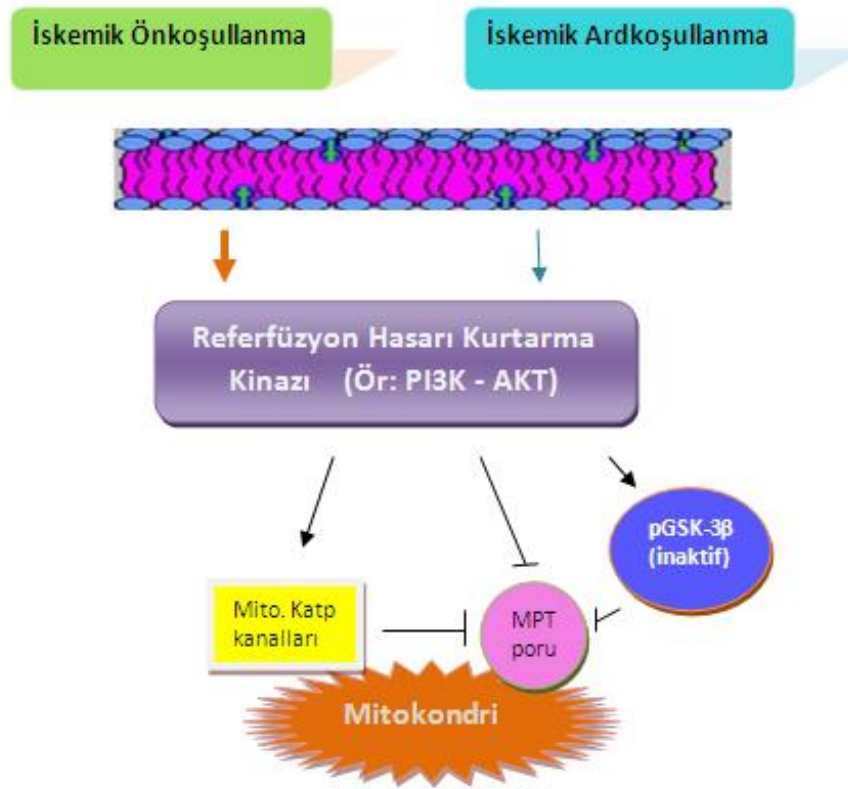
PreC sırasında koruma, iki aşamadan oluşur (8): Korumanın erken evresi, hemen PreC uyarısının ardından başlar ve 2-4 saat sürer. Miyokardiyal nekroza karşı güçlü bir koruyucu etkiye sahiptir ancak myokardiyal sersemlemeye karşı koruma sağlamaz. Korumanın gecikmiş evresi 12-24 saat sonra başlar, 2-3 gün sürer ve ikinci koruma penceresi olarak da bilinir. Miyokardiyal sersemlemeye karşı korur ancak nekroza karşı daha az etkilidir (24).

PreC'nin koruma mekanizması genellikle üç gruba ayrılan çeşitli faktörleri içerir: tetikleyiciler, medyatörler ve efektörler. Sinyal yolları karmaşıktır ve henüz tam olarak anlaşılamamıştır (25).

İskeminin kısa bölümleri adenosin, bradikinin ve endorfin gibi başlatıcı faktörlerinin salınımını sağlar. Erken fazda bu başlatıcılar, mesaj iletiminde oluşan G proteinlerine birleşmiş kendi özel reseptörlerine bağlanır. İki sinyal yolu tespit edilmiştir: Reperfüzyon İndüklü Salvaz Kinaz (RISK) ve hücre dışı sinyal ayarlı kinaz $\frac{1}{2}$ (ERK $\frac{1}{2}$) yolları. Bu kinazlar, inhibisyonuna yol açan glikojen sentetaz kinaz 3b yi etkinleştirir. Mitokondriyal permeabilite transizyon poru (MPTP) PreC 'in önemli efektörüdür ve açılması ATP üretiminin durmasına,

mitokondriyal şişme ve hücre membran rüptürüne neden olur. Protein kinaz C ve diğer kinazlar aktive edilir ve PreC'in olası efektörlerinden olan mitokondriyal ATP bağımlı K⁺ kanallarının (mitoKATP) aktivasyonundan sorumludurlar.

Korumanın ikinci penceresinde G proteinleri ve çeşitli sinyal yolları (protein kinaz C, protein kinaz G, mitoKATP) bağlanmış reseptör ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gerçekleşir. Bu, endotelial nitrik oksit sentazı (eNOS), siklooksijenaz 2 ve antiapoptotik proteinler gibi miyokardiyal koruma sağlayan çeşitli proteinlerin ekspresyonunu indükler (8). PreC'in etki mekanizması Şekil 2'de şematize edilmiştir.



Şekil 2. PreC etki mekanizması

Uzak iskemik önkoşullanma

1993 yılında Przyklenk ve ark. köpeklerde miyokardiyal iskemik koşullanmanın yeni bir formunu keşfetmiştir. Böbrek veya mezenter gibi kalbe uzak organlarda I/R siklusları uygulanarak kardiyak koruma sağlanabileceği gösterilmiştir. Miyokard iskemik koşullanmanın invaziv olmayan bu yeni formuna uzak iskemik önkoşullanma denilmiştir (8).

Uzak iskemik önkoşullanma tarafından uyarılan kalp korumasının altında yatan mekanizmalar, klasik iskemik önkoşullanma için yapılan tanımlamalara benzer. Ancak kalbi, PreC uygulanan uzak organlara bağlayan yol belirsizdir. Bununla ilgili üç teori geliştirilmiştir; ilki humoral faktörleri, ikincisi nöral bir yolu ve üçüncüsü sistemik bir cevabı içerir. Önceden PreC yapılan tavşandan alınan kan PreC'ye tabi olmayan bir tavşana transfer edildiğinde MI büyüklüğünü azaltabilir, humoral teori bu çalışma ile desteklenmektedir. Başka bir deneysel çalışma denerve halde nakledilen kalp ile domuzlara uygulanan uzak iskemik önkoşullanmanın nekroz alanını azaltabileceğini göstermiştir. Nöral teori ganglion blokörü olan heksametonyumun mesenterik artere uygulanan I/R kalbi koruyucu etkisini iptal edebileceği ileri sürülmüştür. Son olarak, sistemik tepki teorisi uzak iskemik önkoşullanmanın antienflamatuar genin transkripsiyonunu desteklediği yönünde çalışma ile savunulmaktadır (8).

3.2.2. Farmakolojik koşullanma

Miyokardiyal iskemik koşullanmanın kalp üzerindeki koruyucu etkisinin ve fizyolojik mekanizmalarının anlaşılmasıyla, bu korumayı sağlayan farmakolojik ajanlar geliştirmek için çok sayıda çalışma yapılmıştır (8). Bu çalışmalar PostC sırasında biriken adenosin, opioid, bradikinin gibi

mediyatörlerin ve onların reseptör agonistlerinin uygulanması prensibine dayanmaktadır. İnsan kalbinde kalp kapağı cerrahisi sırasında klempin aortadan ayrılmasıyla birlikte 1 dakika içinde 1,5 mg/kg adenoazin uygulanmış ve bu farmakolojik ardkoşullanma ile ilk 12 ve 24. saatlerde belirgin olarak troponin I düzeylerinde düşme olduğu tespit edilmiştir (24).

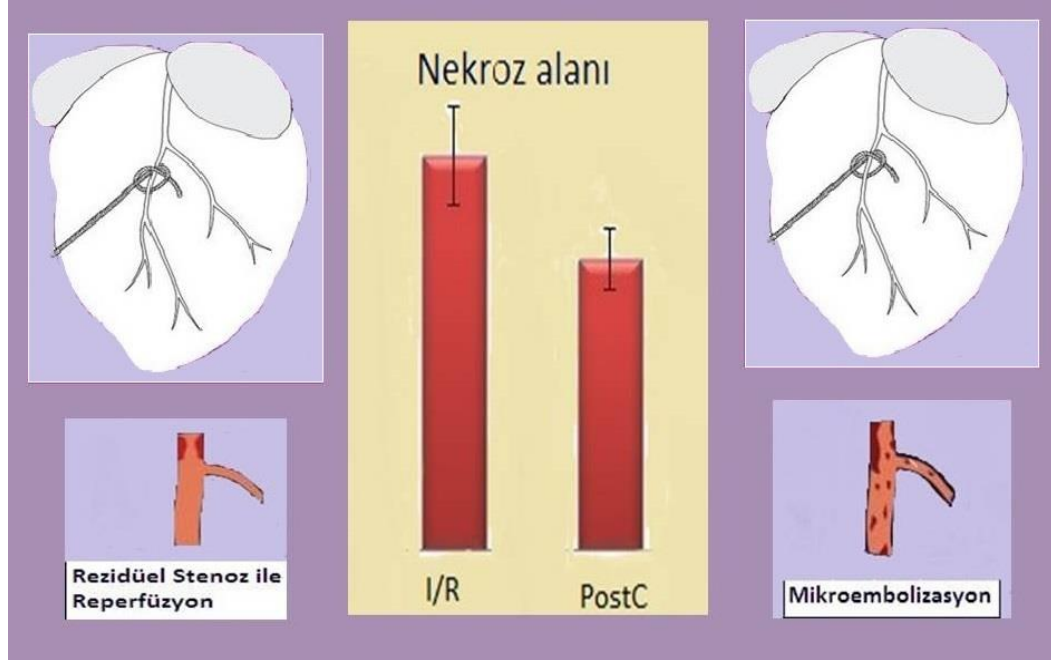
Ayrıca, kalp cerrahisinde uçucu anesteziğin miyokard üzerinde bir koşullanma etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. Uçucu anesteziğin kullanımı, postoperatif MI ve hastane ölüm insidansında önemli bir azalma sağlamıştır. Uçucu anesteziğin troponin seviyeleri, postoperatif inotropik gereksinimleri, yoğun bakımda kalış ve mekanik ventilasyon süresi anlamlı derecede azalmıştır (8).

3.2.3. İskemik ardkoşullanma

PreC'nin, akut koroner sendrom oluşumu öngörülemediğinden uygulanması sınırlıdır. Son translasyonel tedavi stratejilerine göre PostC'nin, I/R hasarına karşı yeni bir müdahale yöntemi olarak kalp koruma potansiyeli mevcuttur (26, 27).

PostC ilk olarak Zhao ve ark. tarafından tanıtılmıştır (28). Köpeklerde 60 dakika koroner arter tıkanıklığı sonrası üç kür 30 sn iskemi /30 sn reperfüzyon uygulandığında, PreC kadar koruyucu olduğu ve nekroz alanının % 44 azaldığı bulunmuş (28) ve bu olgu iskemik PostC olarak tanımlanmıştır. Sonrasında PostC'nin bu etkisi fare, sıçan, tavşan, domuz ve insanlarda uygulanmış, bütün türlerde etkili biçimde MI boyutunu azalttığı görülmüştür.

PostC'nin yararlı etkisi bir yılda gelişmiş fonksiyonel iyileşme ve azaltılmış infarkt boyutu ile kalıcı olduğu gösterilmiştir (8, 26, 28, 29). PostC'nin kalpteki koruyucu etkisi Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3: PostC'nin kalp koruyucu etkisi (21)

Girişimsel kardiyojide akut koroner sendromların, ani yüklenmesi öncesinde PreC uygulaması için zaman yoktur. Bu yüzden PostC cerrahide daha çok ilgi çekmiştir.

Konjenital malformasyon tedavisi için cerrahi geçiren çocuklara PostC uygulanmış, troponin I ve kreatin kinaz MB izoenzimi ve postoperatif inotropik gereksinim düzeyleri kontrol grubuna göre PostC grubunda anlamlı düşük bulunmuştur. Ardkoşullanmanın kalbi koruyucu etkisi kapak replasmanı yapılan yetişkinler üzerinde bir klinik deneme ile doğrulanmıştır. Ancak çıkan aort klemp-deklempleme işlemi sırasında özellikle aort duvarında aterosklerotik lezyonları olan erişkinlerde embolik kaza riski yüksek bulunmuştur. Bu durum, kısmen kalp cerrahisinde klinik çalışmaların yetersizliğini açıklamaktadır (30).

Uzak iskemik ardkoşullanma

2005 yılında Kerendi ve ark., PostC'nin kalpten uzak organlar üzerinde uygulanarak koruyucu olabileceğini göstermiştir. Sıçanlarda koroner arterin sürekli oklüzyonundan sonra reperfüzyon zamanında, renal artere 5 dakika I/R uygulandığında MI boyutunu yaklaşık % 50 oranında azalttığı görülmüş, bu fenomen uzak iskemik ardkoşullanma olarak adlandırılmıştır (8).

İskemik Perkoşullanma

İskemik perkoşullanma ilk olarak 2007'de uygulanmış; reperfüzyon aşamasında sistolik - diyastolik fonksiyonu geliştirdiği, nekroz alanını ve aritmiyi azalttığı görülmüştür (31). Deneysel çalışmalarda perkoşullanma genel olarak iskeminin başlamasından 5 dakika sonra 5'er dakikalık dört I/R döngüsü şeklinde femoral arterlere uygulanır (32). Klinikte perkoşullanma ile miyokard hasarı ve akut akciğer hasarı insidansında azalma görülmüştür (33). Uzaktan PostC'nin hüморal mekanizmalar aracılığıyla, uzaktan perkoşullanmanın, nöral mekanizmalar aracılığıyla etki gösterdiği rapor edilmiştir (34). Koroner akım tamamen bloke edildiğinde, perkoşullanma için iskemik miyokardı korumada nöral mekanizmaların hüморal mekanizmalara göre etkili olduğu belirtilmektedir (31).

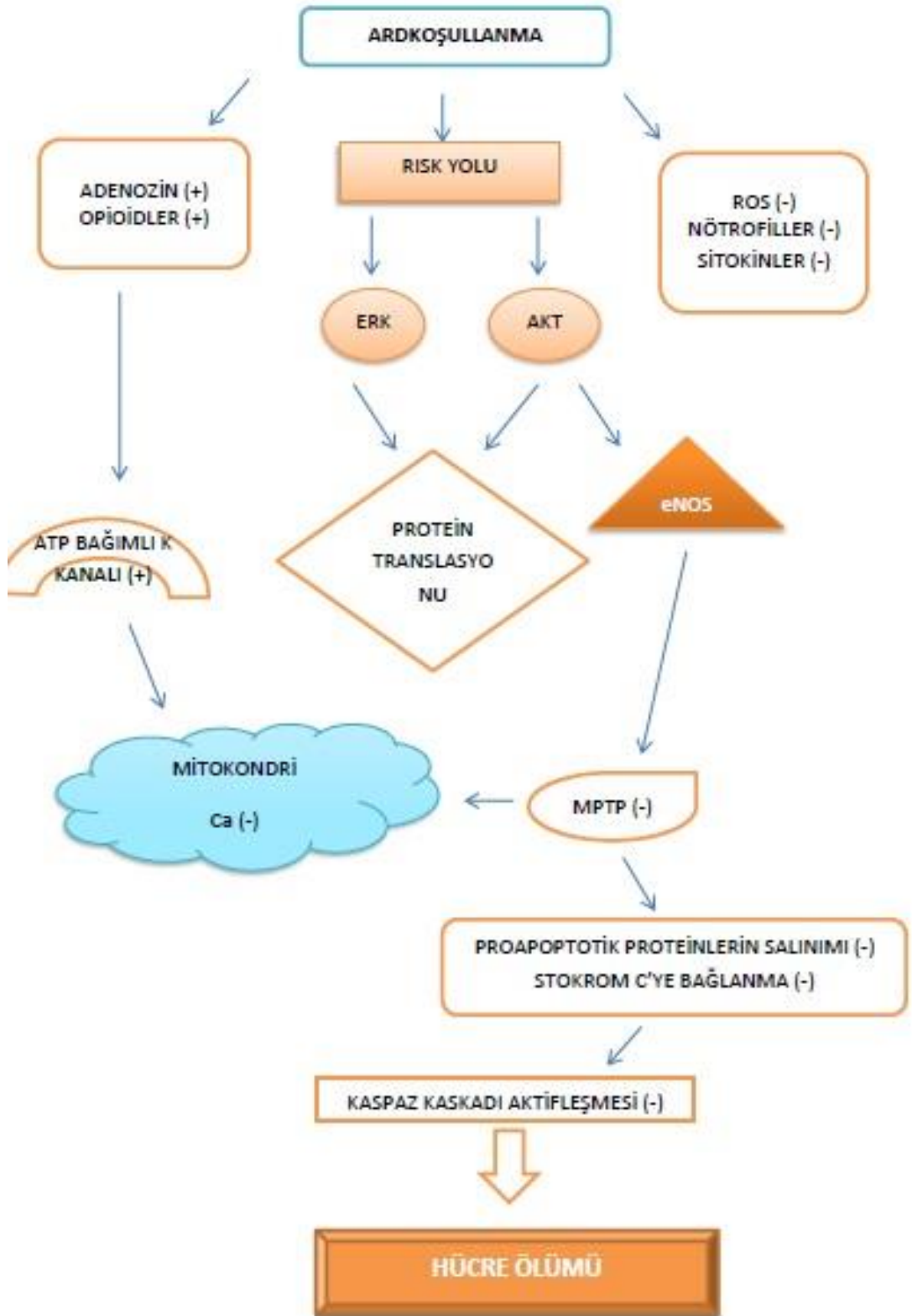
3.2.3.1. PostC'nin olası mekanizması

ROS, sitokinler, nötrofiller ve doku faktörü gibi proinflamatuvar uyaranların inhibisyonu, inflamatuvar ve oksidan yanıtları azaltabilir. Adenozin, NO ve opioid gibi endojen faktörlerin PostC ile korunması, alt mekanizmaları

tetikleyebilir. RISK aktivasyonu sonucunda eNOS aracılığı ile KATP kanalları açılır ve MPTP kapanır. MPTP açılımının engellenmesi ile mitokondri dışına Ca çıkışı olarak mitokondriyal Ca azalır ve osmotik şişmenin yanısıra dış mitokondriyal membrandaki kollaps ve rüptürün, dolayısıyla hücre nekrozunun önüne geçilmiş olur. MPTP'nin kapanışı ile ayrıca proapoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınımı engellenir. Bu sayede sitokrom C'nin, apoptotik Proteaz-Aktive Edici Faktör-1'e bağlanması inhibe edilerek, caspase kaskadının aktifleşmesinin de önüne geçilmiş olur. Bu da apoptoz, nekroz ve inflamasyonu azalttığından, hücre ölümü inhibe edilmiş olur (26, 35).

UCP 2 ve 3'ün mitokondri koruyucu, irisinin enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle PostC korumasına katılabileceği düşünülmektedir.

PostC 'nin mekanizması Şekil 4'te şematize edilmiştir.



Şekil 4. PostC'nin olası mekanizması (35)

I/R sıçanlarda PostC; malondialdehit (MDA) düzeyini azaltabilir ve miyokard Na-K-ATPaz, Ca+Mg+ATPaz, SOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerini artırabilir. PostC uygulanan, I/R sıçanlarda myokarddaki oksidatif hasara karşı, güçlü bir koruyucu etkiye sahip olduğu sonucuna varılabilir (26).

PostC 'nin koruyuculuğunda rolü olduğu düşünülen faktörler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: PostC 'nin koruyuculuğunda rol oynayan faktörler.

PostC 'nin koruyuculuğunda rol oynayan faktörler
ROS
Adenozin
Protein kinaz B/C
eNOS, ADMA
RISK yolu
Mitokondri
mPTP
mitoKATP

3.2.3.1. 1. Reaktif Oksijen Türleri

Hücre tarafından alınan oksijenin yaklaşık % 0.2-2 'sinin, mitokondri tarafından ROS a dönüştürüldüğü tahmin edilmektedir (36). I/R hasarında ROS üretimi iki aşamalı olarak meydana gelir: ilk aşama reperfüzyondan hemen sonra başlayıp birkaç saat süren tipik bir oksidatif stres durumudur. İskemi sırasında elektron taşıma ve nonenzimatik reaksiyonlar için oksijen bulunmaz. Reperfüzyonla, mitokondriler yeniden aktiflenir ve ROS üretimi artar. Bu aşamada mitokondriyal disfonksiyonla oksidatif fosforilasyonda bozulma görülür.

İkinci aşama devam eden oksidatif strese bağlı saatler ve günlerce süren bir dönemdir. Bu aşamada nötrofil infiltrasyonu ve makrofaj göçüyle birlikte inflamasyon ve ireversibl doku hasarı oluşmaktadır. Nötrofiller, oksidatif ve nitrozatif sistemle etkileşerek ROS oluşumunda önemli rol oynarlar. ROS, hücre ve mitokondriyal membranlarda lipid peroksidasyonuna ve DNA parçalanması ile hücre hasara yol açabilir (6, 24). Bu potansiyel hasara karşı koymak için, organizmalar nonenzimatik (tokoferoller, karotenler, ubikinol, glutatyon, askorbik asit) ve enzimatik (glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT)) antioksidan savunmaya sahiptir (37). ROS'un aşırı üretimi ya da antioksidan seviyesinde azalma olduğunda oksidatif stres oluşur. Yapılan çalışmaya göre, PostC lipid peroksidasyon markerlarının seviyesini azaltır ve miyokarddaki SOD, CAT, GSH-Px ve GR faaliyetlerini artırır. Bu durum, PostC' nin oksidatif hasarı hafifletebileceğini göstermektedir (27).

3.2.3.1.2. Adenozin

Adenozin, hipoperfüzyonda koroner arter vazodilatasyonu ile oksijenlenmeyi artırarak ve negatif inotropik etki ile miyokardın oksijen ihtiyacını azaltarak koruyucu etki gösterir. Adenozinle oluşturulan korumanın mekanizmasında; birçok hayvan türünde ve insanda, PKC ve KATP kanal aktivasyonu rol oynamaktadır (9).

Yapılan bir çalışmada PostC' nin mitoKATP kanalları, ERK $\frac{1}{2}$ aktivasyonu ve nitrik oksit (NO) üretimine bağlı ve adenozin reseptörlerini aktive ederek koruyuculuk sağladığı öne sürülmüş ve iki adenozin agonistinin, PostC modelinde reperfüzyon sırasında uygulandığında infarkt alanını azalttığı gösterilmiştir (22).

3.2.3.1.3. Protein kinaz B ve C

İlk olarak kalsiyum tarafından aktive edilen, fosfolipid-bağımlı serin/treonin protein kinaz şeklinde tanımlanmıştır. Protein Kinaz C (PKC)'nin, oksidatif stres altında apoptoz içinde çok önemli bir rolü vardır. Korumanın erken döneminde PKC, K⁺ ATP kanallarını doğrudan aktive ederek etki gösterir. Geç dönemde ise K⁺ ATP kanallarını aktive eder (38).

Akt sinyal yolağı ilk kez 1991 yılında tanımlanmıştır. Hem protein kinaz C, hem protein kinaz A'ya olan benzerliğinden dolayı; protein kinaz B (PKB) olarak adlandırılmıştır (38).

Büyüme faktörleri, sitokinler ve antijen reseptörlerini içeren ekstrasellüler uyarılar PKB/Akt aktivasyonunu tetikler. PKB/Akt hedefleri çoğunlukla bu uyarılar ile hücre sağkalımı ve proliferasyonunu destekler. Her ne kadar PKB/Akt aktivasyonuna yol açan hücre proliferasyonunun mekanizması tam olarak anlaşılmassa da, bazı hücrelerin sağkalımını sağladığı bilinmektedir. (38).

3.2.3.1.4. RISK yolu

I/R hasar modellerinde kalp hasarını sınırlandırmak ve kanser modellerinde hücre ölümünü teşvik etmek için; RISK yolu aktive ve deaktive etmeye çalışılmıştır (39).

PostC; MEK ½-ERK ½ ve PI3K-PKB/Akt yollarını içeren RISK yolağı üzerinde inhibisyon yapılarak MPTP açılımını engellerler. PostC ile hücre pH'sı normale döner ve survival kinazlar MPTP'lerin kapalı tutulması için aktiflenir (26).

İn-situ tavşan kalbi, ERK1/2 verildiğinde ve yine izole rat kalbi, fosfatidilinositol 3-kinaz (PKB-PI3K) yolu inhibe edildiğinde, PostC tarafından korunamayabilmektedir (25).

3.2.3.1.5. NO ve Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA)

NO, NOS tarafından sentezlenen bir aminoasittir. Endotelial hücrelerden salınır ve arteriyel kan basıncı ile kan akımının düzenlenmesinde önemli rol oynar (40). Hem iskemi hem de reperfüzyonu takiben zarar gören endotelyumda NO sentezi belirgin derecede azalır. İnhibitör etkisi çok kuvvetli olan NO eksikliği nötrofil aktivasyonunun kolaylaşmasına ve doku hasarının artmasına neden olur. Reperfüzyondan önce NO ve NO donörlerinin uygulanması ile infarkt alanı ve endotelial fonksiyon kaybı gibi I/R' un neden olduğu miyokardiyal hasar azaltılabilir. Reperfüzyonun geç fazında üretilen NO ve ONOO' in reperfüzyonun erken fazına oranla çok daha fazladır. Yüksek konsantrasyondaki NO' in kardiyak miyosit fonksiyonunu deprese eder, I/R' yi takiben inflamatuvar süreçleri uyarır, mitokondriyal solunumu bozarak, nekroza ve apoptozise neden olur. Böylece bu gecikmiş artış, doku hasarını daha da artırır. Ancak düşük konsantrasyonlardaki NO kardiyak miyositlerin fonksiyonunu artırır. I/R' u takiben platelet agregasyonunu ve nötrofil-endotelial etkileşimlerini azaltabilir.

ADMA, NOS inhibitörüdür. Oksidatif stres ADMA yapımında ve yıkımında rol alan enzimlerin aktivitelerini değiştirerek ADMA seviyesinde değişime neden olur. Kardiyovasküler risk faktörleri bulunanlarda, vazospastik anjinalı hastaların koroner damarlarında ADMA düzeyleri yüksek, NO düzeyleri düşük bulunmuştur. ADMA ayrıca ventriküler kontraksiyonu ve kalp hızını azaltmaktadır ve düzeyleri kalp yetmezliğinde artar (41).

3.2.3.1. 6. Mitokondri

3.2.3.1.6.1. MPTP

Mitokondri, hem ROS' un hücre içi ana kaynağı, hem de serbest radikallerin ana hedefi olarak kabul edilir. Mitokondrial membran bileşenlerindeki değişiklik, mitokondriyal enerji fonksiyonunun azalmasına yol açabilir. Bu durum I/R, yaşlanma, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojik koşulların etyolojisine katkıda bulunabilir (42-44).

Mitokondri; reperfüzyonu takiben görülen hücre ölümü süreciyle yakından ilişkilidir. Mitokondride geçirgenlik, mPTP'nin açılmasından kaynaklanır. MPTP açılması; mitokondrial depolarizasyon, eksternal mitokondriyal membran şişmesi, kırılması ve apoptoz ya da nekroza yol açabilen sitokrom C ve diğer proapoptotik faktörlerin sızmasıyla sonuçlanır. PostC MPTP' yi direkt olarak inhibe eder ve bu durum I/R hasarında tedavi yöntemleri göz önünde bulundurulduğunda PostC uygulamasını belirgin bir seçenek haline getirir (45).

3.2.3.1.6.2. Mitokondriyal Potasyum ATP Kanalı

Mitokondri iç membranında bulunan mitoKATP kanallarının iskemi sırasında açılmasının mitokondrinin ROS üretimini artırabileceği gösterilmiştir (46). PostC' nın kalp koruyucu etkisini kappa-opioid reseptörleri ve mitoKATP kanalları aracılığıyla gerçekleştirebileceği ileri sürülmüştür (47). Yapılan çalışmalar mitoKATP kanallarının mitokondriyal Ca^{2+} ve K^+ iyonlarının homeostazı (48), ROS üretimi, aksiyon potansiyeli oluşumu, intraselüller olaylara rehberlik eden birçok kimyasal ya da mekanik uyarıya aracılık etme (49),

vazodilatasyon ve nöron eksitabilitesinde rolü olduğunu göstermiştir. MitoKATP kanallarının açılması mitokondriyal hacmi değiştirmeye yeterli olan, fakat membran potansiyelinde önemli bir depolarizasyona neden olamayan, K⁺ akımı artışına sebep olur. Hacimdeki bu değişimin hücre enerji “coupling”i üzerinde önemli etkileri olduğu düşünülmektedir (50, 51).

3.2.3.1.6.3 Uncoupling protein’ler

Uncoupling proteinler (UCP’ler)’in 1990’ların sonlarında keşfedilmesinden bu yana, termojenez, obezite, diyabet, yaşlanma, nörolojik, immünolojik ve dolaşımla ilgili hastalıkları da içeren fizyolojik ve patolojik reaksiyonlarda rollerinin oldukça fazla olduğu görülmüştür (21).

UCP’ler iç mitokondrial membranda bulunan mitokondriyal taşıma proteinleri ailesidir. Anyon taşıyıcı proteinler, protonları (H⁺) mitokondrial matrikse taşır, sırasıyla proton itici gücünü ısı olarak dağıtır ve ATP üretiminden substrat oksidasyonunu ayırır. Mitokondriyal ROS oluşumunu azaltmada yetenekleri yaygın olarak kabul edilmektedir. Mitokondrinin yüksek membran potansiyeli ROS üretimini indükleyecek ve dolayısıyla oksidatif hasara neden olacaktır. ROS UCP’leri etkinleştirerek negatif feedback ile daha fazla süperoksit üretimi engellenecek ve oksidatif hasar azalacaktır (52). Bu proteinler, memelilerde benzer yapılara sahiptir, ancak doku dağılımları farklıdır. Memelilerde beş çeşit UCP bulunur (23).

UCP1 esas olarak yenidoğanlarda termojenezden sorumludur, kahverengi adipoz dokuda eksprese edilir (23).

UCP2 yaygın olarak bağışıklık sistemi, merkezi sinir sistemi ve böbrekte bulunur. UCP2 mitokondriyal biyogenezi, substrat kullanımını, kalsiyum homeostazının korunması ve ROS eliminasyonunu düzenlediği; böylece, hücre koruyucu ve muhtemelen bir yaşlanma karşıtı etki sağladığı düşünülmektedir (23, 53).

UCP3 esas olarak, iskelet kasında eksprese edilir, aynı zamanda kahverengi yağ dokusu ve kalp dokusunda bulunur. UCP3 1997 yılında ilk keşfedilen UCP olmasına karşın (54), aktivasyon mekanizmaları ve fizyolojik rolü halen tartışma konusudur. UCP3 özellikle yağ asidi metabolizmasında ve enerji harcamasına aracılık etmede rol oynayan bir proteindir (23). ROS kaynaklı oksidatif hasarın önlenmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (55-57).

UCP3 knock out farelerde I/R sırasında daha fazla ROS oluştuğu ve ATP içeriğinin azaldığı böylece miyokard I/R hasarına karşı artmış güvenlik açığı ve iki kat daha büyük enfarktüsle karşılaşmıştır (45).

Sıçan kalplerinde PreC'in, kalp dokusunda UCP2 ve UCP3 ekspresyonunu artırdığı ve UCP'lerin PreC'in kardiyoprotektif etkisinde rolleri olduğu saptanmıştır (58). Ancak kardiyak regülasyonu nasıl etkilediği belirsizdir (59)

Kardiyodinamik reperfüzyon bozuklukları ve miyokardın kontraktıl aktivitesi yaşlı kaplerde daha şiddetli olduğundan, yaşlı kalplerde UCP2 mRNA düzeylerinin daha yüksek ve UCP3 mRNA seviyelerinin ise artış eğiliminde olduğu gözlenmiştir (55).

UCP4 ve UCP5 esas olarak beyinde eksprese edilir. Fonksiyonları hala belirsizdir. Oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyona karşı korunma sağlayabileceği üzerinde durulmaktadır (23).

3.2.3.1.7. İrisin

112 aminoasitten oluşan ve 12 kDa molekül ağırlığına sahip bir protein olan irisin, ilk olarak Bostrom ve ark. tarafından 2012 yılında kas dokusundan izole edilmiştir (60).

Irisin beyaz adipoz dokuyu kahverengi adipoz dokuya dönüştürerek enerji harcanmasını sağlayan termojenik bir proteindir (61). Memelilerde beyaz adipoz dokuları, temel olarak trigliseridleri ve yağ asitlerini depolar ve çok az sayıda mitokondri içerir. Kahverengi adipoz doku ise beyaz yağ dokusunun aksine, enerji harcaması konusunda uzmanlaşmıştır ve çok sayıda mitokondri içerir (62, 63).

Irisinin ilk önce esas sentez alanının iskelet kas dokusu olduğu düşünülmüş (64), daha sonra daha çok kalp kasında sentezlendiği gösterilmiştir (65). İrisin ayrıca tükürük bezlerinde tespit edilmiştir. Böbrekler, ovaryum, testis, rektum, kalp, intrakranial arterler, dil, optik sinir, mide, sinir hücreleri, cildin yağ bezleri, ter bezlerinde de irisin immünoreaktivitesi bulunmuştur (62, 65, 66). Düşük irisin düzeyinin obez kişilerde endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür (67).

İrisinin etki mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmaya göre, irisin belli konsatrasyon aralığında mitokondriyal termojenezi ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırır, PI3K-AKT ve miyokardda ERK ve STAT3 sinyal yollarını aktive eder. Kardiyomiyoblast hücre proliferasyonunu inhibe edip, metabolik işlev/farklılaşma ile ilgili genleri aktive eder. H9C2 hücreleri kardiyak dokuların elektrofizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir. İrisin H9C2 hücre çoğalmasını inhibe eder, büyümesini artırır ve hücrel mitokondriyal metabolizmasını upregüle eder (68).

Akut MI hastalarında tükürük ve serum irisin seviyelerinin 48 saate kadar kademeli düştüğü, 72 saatte artmaya başladığı görülmüştür. Yaşa bağlı irisin seviyesi ile troponin I, CK-MB ve CK arasında korelasyon bulunmuştur (69).

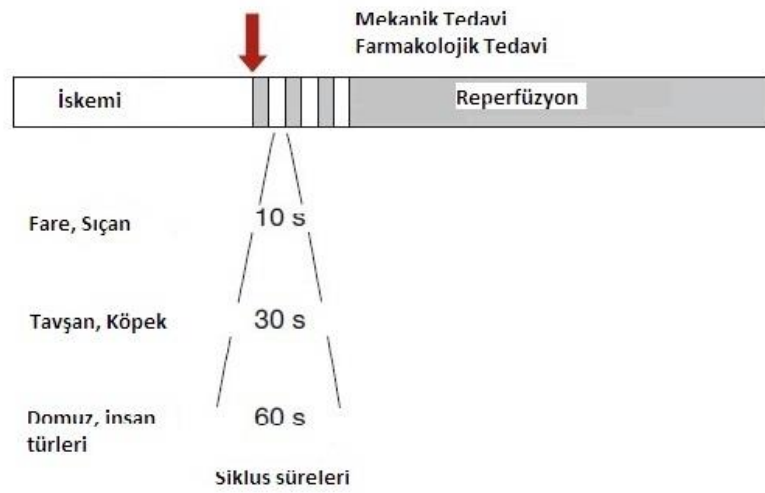
Koroner girişimlerin ardından ortaya çıkan koroner arter hastalığında artan irisin seviyesi ile istenmeyen kardiyovasküler olayların ilişkili olduğu gözlenmiştir (70). Ayrıca akut MI geçiren genç hastalara kıyasla sağlıklı yaşlılarda serum irisin seviyesinin daha yüksek olduğu görülmüştür (71).

3.2.3.2.PostC uygulanmasındaki önemli hususlar

PostC'nin deney hayvan modellerinde etkin şekilde uygulanabilmesi için dikkat edilmesi gereken hususlar şunlardır:

- I/R siklus süresi: PostC çalışmalarında kritik ihtiyaçlara bağlı olarak daha az siklus ve uzun iskemik süre uygulandığında koruyuculuğun azaldığı saptanmıştır (26).
- Sıcaklık: Vuuren ve ark.nın sıçanlarda yaptıkları çalışmalarında PostC'nin 37 C° de koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir (72).
- Test edilecek hayvan türü: Vinten-Johansen ve ark.nın çalışmalarında hayvanların; reperfüzyon sırasında metabolizmaları, endojen oksidatif savunmaları ve antienflamatuvar etkideki farklılıkları nedeni ile PostC ye tepkileri farklı olmaktadır (73).
- Cinsiyet: Criostoma ve ark.nın 6x10 saniyelik I/R döngüleri ile erkek sıçanlarda 20 ve 25 dakikalık iskemi sonrası koruyucu etki görülürken dişi sıçanlarda sadece 20 dakikalık iskemi sonrası koruyuculuk görüldüğünü bildirmişlerdir (23).

- İskeminin bitirilmesi ile PostC uygulamasının başlatılması arasında geçen zaman: Bazı araştırmacıların PostC ‘yi reperfüzyonun başlamasından bir süre sonra başarı ile uyguladıklarını bildirmelerine rağmen genel kabul edilen görüş iskemiden hemen sonra uygulanması gerektiğidir (26).
- I/R‘ nin kısa sikluslarının süresi uygulanan canlının türüne göre değişebildiği Şekil 5’de gösterilmiştir.



Şekil 5. PostC da canlı türüne göre I/R siklus süreleri (26)

3.2.5.3. PostC nın koruyuculuğunun ortadan kalktığı durumlar

Ardkoşullanmanın koruyuculuğunun ortadan kalktığı durumlar Tablo 2 de de gösterilmiştir (74).

Tablo 2: Ardkoşullanmanın koruyuculuğunun ortadan kalktığı durumlar

Ardkoşullanmanın koruyuculuğunun ortadan kalktığı durumlar
Yaş
Hiperkolesterolemi
Akut myokard infartüsü
Diyabet
Obezite
Hipertansiyon
Sol ventrikül hipertrofisi

3.3. Melatonin

Melatonin başta pineal bez olmak üzere lens, over ve kemik iliği hücreleri, safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan ve gece gündüz ritmini düzenlemekle görevli olan bir hormon olup, 1993 yılında antioksidan etkinliği gösterilmiştir (75, 76). Dolaşımdaki melatoninin yoğunluğu pineal bezdeki melatonin üretimini yansıtır. Yüksek lipofilitesi ve küçük boyutundan dolayı (77), tüm biyolojik doku ve sıvılara dağılır ve yüksek konsantrasyonda birikme özelliğine sahiptir. Melatonin sentezi triptofandan başlar. Plazmada yaklaşık %70 oranında albumine bağlanarak taşınır. Büyük oranda karaciğerde, az miktarda böbrekte metabolize edilir. Karaciğerde 6-hidroksimelatoninine dönüşür; böbrekte sülfat ve glukuronik aside bağlanarak itrah edilir. Melatonin seviyesi karanlık başladığında yükselmeye başlar. Gece yarısından sonra (02.00-04.00) maksimum seviyesine ulaşır ve sonra giderek düşer. Serum melatonin yoğunluğu, yaşa göre de anlamlı olarak değişir. Yaşlanma ile birlikte melatonin düzeyinin de giderek azaldığı bilinmektedir (78).

3.3.1. Melatonin etki mekanizması

Melatoninin insanda farmakolojik olarak tanımlanmış iki reseptörü bulunmaktadır. ML1 pikomolar konsantrasyonlarda, yüksek affiniteli bağlanma yeri olup, a ve b alt tipleri mevcuttur. ML2 ise nanomolar konsantrasyonlarda, düşük affiniteli bağlanma yerleri olarak gösterilmiştir. ML1 reseptörlerinin aktivasyonu, G proteini üzerinedir. Adenilat siklazı inhibe ederek, hedef hücrelerde siklik AMP (sAMP) seviyesini azaltır. Bu reseptörler, muhtemel olarak, retinal fonksiyonların, sirkadiyen ritimlerin ve üremenin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. ML2 reseptörlerinin etkinleşmesi ve dağılımı hakkında henüz kesin bilgi mevcut değildir. Melatonin membran Ca^{+2} pompası aktivesini artırır ve kalmodulini regüle eder. Aşırı Ca^{+2} yükünü engelleyerek hücre içi Ca^{+2} düzeyini dengeleyebilir (77).

Melatonin direkt radikal süpürerek, indirekt spesifik melatonin reseptörleri aracılığı ile antioksidan enzimleri aktive ederek ya da prooksidatif enzimleri inhibe ederek dokuda koruyuculuk gösterir (79). Bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutatyon ve vitamin E gibi) daha güçlü bir ajandır. Lipid peroksidasyonunu önleyerek, membranların akışkanlığını ve fonksiyonunu koruyarak etki gösterir (80). Oldukça toksik olan OH⁻ radikali basta olmak üzere diğer serbest oksijen radikallerinin sebep olduğu oksidatif hasardan makromolekülleri özellikle DNA'yı koruyabilir. Ayrıca reaktif nitrojen türlerinin güçlü bir temizleyicisidir (81). Melatonin, lipid bozunmasının güçlü başlatıcısı olan ONOO⁻ yu nötralize ederek, membran lipidlerini koruyabilir (82).

3.3.2. Melatonin ve mitokondri

Mitokondrinin birincil işlevi ATP sentezidir. Elektron taşıma zinciri (ETZ) yoluyla hücre içinde enerji üretim süreçlerinde merkezi bir rol oynar. İç mitokondriyal zarda bulunan ETZ, elektron taşıyıcı enzim kompleksleri içerir (83). Melatonin bu komplekslerin aktivitesini arttırırken, ATP sentezinin verimliliğini ve solunum oranını muhafaza eder. Mitokondri, zaman ve konsantrasyona bağlı bir şekilde melatonini alabilir ve melatoninin etkinliği mitokondri içindeki varlığına bağlıdır. İn vivo eksojen uygulamadan sonra da, melatoninin mitokondriye girdiği (84) ve konsantrasyon bağımlı olarak ADP varlığında oksijen tüketimini ve membran potansiyelini azalttığı, H_2O_2 üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (85).

Yapılan çalışmalar melatoninin mitokondriyal zarı stabilize ederek hemostazın korunmasında etkin bir rol oynadığını göstermiştir (86, 87). Nörolojik (88), kalp-damar hastalıkları (89) ve yaşlanma (90) da dahil olmak üzere birçok patofizyolojik koşulda, bu molekülün koruyucu etkisi antioksidan, serbest radikal yakalayıcı ve mitokondriyal iç zarı stabilize ederek mitokondriyal membranların kararlılığı, bütünlüğü ve fonksiyonu üzerinedir. Böylece mitokondriyal disfonksiyona karşı korur (91).

Kardiyolipin (CL), iç mitokondriyal zarda yer alan bir fosfolipittir (92). CL deki anormallikler sadece iç mitokondriyal zarın akışkanlığını değiştirmez, aynı zamanda solunum zinciri komplekslerinin işlevini ve/veya supramoleküler yapıdaki organizasyonu değiştirebilir (93). Özellikle, CLnin oksidasyonu ve tükenmesi, çeşitli metabolik ve dejeneratif hastalıklarda mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkilidir (94). Melatoninin, oksidatif hasardan mitokondriyal CL

yi koruduğu bildirilmiştir. Mitokondriyal işlev bozukluğu ile ilişkili hastalıklarda, bu molekölün yararlı etkisi öne sürölmüştür (95).

Yaşlanmada melatonin ve mitokondriyal disfonksiyon

Yaşlanma çok faktörlü bir süreçtir. Genetik olarak belirlenir ve çevreden epigenetik olarak etkilenir (96). Mitokondri yaşlanma sürecine yakından katılır. Artmış duyarlılık ve/veya enerjinin yetersiz tedariği sonucu DNA, ROS üretimini ve mutasyonları uyarak mitokondriyal ve hücrel biyoenerji fonksiyonlarının hızla gerilemesini tetikler (97).

Melatonin serum düzeyleri genç hayvanlara kıyasla yaşlı hayvanlarda anlamlı azalır (98). İnsanlarda, total serum antioksidan kapasitesi melatonin düzeyi ile koreledir. Böylece yaşlanmada melatoninin azalma düzeyi yaşlılarda görölen artmış oksidatif hasar ile ilişkilidir.

Melatoninin fizyolojik dozlarda kronik uygulamasının kalp dokusunda oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyonu üzerine etkileri yaşlılığı hızlandırılmış fareler (SAM) kullanılarak araştırılmıştır (99). SAM in kalp dokusunda yaşa bağlı mitokondriyal oksidatif hasarı ETZ kompleksleri aktivitesinde ve ATP seviyelerindeki azalmaya neden olmuştur. Kronik melatonin uygulaması mitokondriyal biyoenerji parametrelerini normalize etmiş ve ATP seviyesini arttırmıştır. Ayrıca, melatonin tedavisinin SAM lerin ömrünün uzamasında yararlı etkisi görölmüştür (100).

3.3.3. Melatonin ve MPTP

MPTP açılması mitokondriyal zarın iç kısmına > 1500 Da moleküllerin geçişine izin verir ve hızla kalsiyum şelasyonu ile kapatılabilir. MPTP açık

kalması durumunda, ATP seviyeleri tamamen hücre nekrozu sırasında tükenmiş olabilir (101).

MPTP açılması, hücrede iki şekilde meydana gelebilir, Geçici MPTP ve uzun süreli MPTP açılması, hayatta kalma veya ölüm gibi farklı sonuçlara sahiptir. Uzun süreli MPTP apoptoz veya nekroz için "dönüşü olmayan nokta" olmasına karşın, geçici MPTP açılması mitokondriyi korur (102). Floresan lazer tarama görüntüleme mikroskop uygulamasında, melatoninin, MPTP açılmasını inhibe etmediği, bunun yerine mitokondriyal Ca^{2+} stresi esnasında geçici MPTP'nin aktivitesini koruduğu gösterilmiştir (104). MPTP'nin bu melatonin bağımlı modülasyonu nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili mitokondriyal Ca^{2+} 'nın tedavisinde önemli bir terapötik potansiyele sahip olduğu düşündürmektedir (102).

Yaşlanmada melatonin ve MPTP

Yaşlı sıçanlar kalp mitokondrisi Ca^{2+} kaynaklı MPTP açılmasına daha duyarlıdır ve sitokrom C salınımına yaşlanma ve yaşa bağlı kardiyovasküler bozukluklar ile ilişkili nekrotik ve apoptotik miyosit hücre ölümünde önemli etkileri olabilir. Melatonin ile farmakolojik müdahale bu, yaşa bağlı kardiyovasküler hastalıklara karşı faydalı olabilir. Melatonin ile uzun süreli tedavi bu olayları dengeler (102).

3.3.4. ADMA ve melatonin

ADMA, NOS' un kompetitif inhibitörüdür. ADMA seviyesinde artış birçok sistemik hastalık ve oksidatif stres ile ilişkilidir. Melatonin ADMA-NO yolağı üzerine etki göstererek kalbi koruyucu etki gösterir (103). Hipertansif sıçanlarda antioksidan kapasitesi ve NO düzeylerinin azalmasıyla plazma ADMA düzeyleri artmış, melatonin

uygulanması bu etkiyi geri çevirmiş, oksidatif hasarı azaltmış ve sol ventrikül fonksiyonunu geliştirmiştir (104).

Hiperkolesterolemili sıçanlarda PostC nin kalp koruyucu etkilerinin ortadan kalkmasında yüksek ADMA seviyesinin rol oynayabileceği düşünülmüştür (105).

3.3.5. I/R hasarı ve melatonin

Melatoninin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarının serbest radikal süpürücü ve anti-oksidan etkileri ile miyokardiyal hasarı (mortalite, aritmiler ve infarkt alanı) azaltabildiği bildirilmiştir. Melatonin kaynaklı kardiyoprotektif koruma reperfüzyon ve mPTP inhibisyonu sırasında protein kinaz B aktivasyonu, ERK 1/2, RISK yolu ile ilişkilidir. Ayrıca melatonin, iskemik dokudaki lökosit adezyonunu, platelet agregasyonunu ve lipid peroksidasyonunu azaltabilir. Pikomolar ve mikromolar aralığında enfarktüs boyutunu önemli ölçüde azaltır ve reperfüzyon esnasında fonksiyonel iyileşmeyi artırır. (79). Melatoninin antiadrenerjik, antiinflamatuvar ve antioksidatif özellikleri de vasküler hastalık ve ateroskleroza karşı korumaya katılmaktadırlar (106). Pankreatik insulin salgılanması üzerindeki etkileri ile bütün vücudun glikoz homeostazının düzenlenmesinde etkisi vardır ve dolaylı olarak bir sirkadiyen şekilde miyokard substrat metabolizmasını etkileyebilir (107).

Melatonin koroner tıkanıklık öncesi uygulandığında, reperfüzyon aritmilerini azaltır fakat akut koroner sendromlarda klinik olarak, tedavilerin çoğunda reperfüzyon sırasında uygulanmaktadır. Hastalar genel olarak terapötik müdahalelere cevabı azaltabilen fizyolojik değişikliklere sahiptir (108).

Yetersiz melatonin düzeyine bağlı kardiyoprotektif etkilerin eksikliği, İKH da dahil olmak üzere birçok kardiyovasküler hastalık ile ilişkili olabilir. Akut koroner sendromlu hastalarda veya MI sonrası, gece melatonin düzeyininin ve 6-sulfatoksimeatoninin idrar ile itrahının azaldığı gösterilmiştir. Bu değişiklikler düşük melatonin seviyeli akut MI li hastalarda gözlemlenen kardiyovasküler risk artışını tanımlayabilir. Bu nedenle melatoninin uygulanması İKH'nın farmakolojik tedavisinde melatonin düşük toksisite ve yüksek güvenlik hipoteziyle klinik olarak anlamlı bir rol oynayabileceği beklenmektedir (79).

Melatonin infarkt alanını anlamlı azaltır ve reperfüzyon sırasında fonksiyonel iyileşmeyi artırır. Yapılan bir çalışma Px sıçanların kalplerinde nekroz alanının anlamlı arttığını ve endojen melatonin düzeyinin I/R boyunca kalp koruyucu etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Sıçanlara eksojen verilen melatoninin Px sıçanlarda hasarı anlamlı azaltırken; Px yapılmamış sıçanlarda hasarı azaltma eğiliminde olduğu görülmüştür (109). Daha yüksek doz melatoninin I/R de nekroz alanını ve MDA düzeyini anlamlı azalttığı, GSH seviyesini artırdığı belirlenmiştir (110).

Melatoninin yüksek plazma düzeyleri, doğrudan I/R hasarı belirteçlerin düşük düzeyleri ile ilişkili olabilir (111).

3.4. Ardkoşullanma ve melatonin

Melatoninin PostC üzerindeki etkilerini ve mekanizmalarını araştıran herhangi bir çalışma bizim bilgilerimize göre henüz mevcut değildir.

PostC'nin miyokard hasarını azaltıcı etkilerine neden olan ana sinyal yolları arasında eNOS ve NO' nun artması, MPTP açılmasının inhibisyonu yer alır.

Deneyisel çalışmalarda melatoninin eNOS ve NO' yu artırdığı ve MPTP açılmasını azalttığı gösterilmiş olması nedeniyle, MI'dan korunmada rol alan endojen moleküler mekanizmaların koruyucu etkilerinde rolü olup olmadığı ve endojen melatonin seviyesinin düştüğü durumlarda (yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar vs) koruyuculuğun devam edip etmediğinin araştırılmasının klinik açıdan büyük önem taşıdığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada;

1. Fizyolojik melatoninin azaldığı durumlarda ve farmakolojik melatonin uygulanmasında PostC'nin nekroz üzerindeki muhtemel koruyucu etkisinin devam edip etmediğinin belirlenmesi,
2. İrisin düzeylerinin PostC'de rolü olup olmadığının ve fizyolojik ve farmakolojik melatoninden nasıl etkilendiğinin belirlenmesi,
3. Mitokondriyal membran proteinleri olan UCP 2 ve 3'ün PostC'de rolü olup olmadığının ve melatoninin bu moleküller üzerine etkilerinin belirlenmesi,
4. PostC ile melatonin uygulamalarının nekroz alanına etkileri ve moleküler mekanizması karşılaştırılarak melatoninin PostC'nin etkilerini taklit edip edemeyeceğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney hayvanları:

Çalışmada 8 haftalık Spraque Dawley cinsi, 200 gr ağırlığında 56 adet erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından 03/09/2014 tarih ve 172 nolu etik kurul kararınca karşılandı. Sıçanlara 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık sıklısta, havalandırılmalı, sabit ısı (21 $\pm$ 1 C°) odalarda ve özel kafeslerde standartlara uygun olarak bakıldı ve beslenmeleri 8 mm' lik standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile sağlandı.

4.2. Deney planı

Sıçanlar rastgele 8 gruba ayrıldı.

Gruplar:

Pinealektomi uygulanmayan (Non- Px) gruplar

Grup 1: Kontrol (Sham) grubu (n=7)

Grup 2: I/R uygulanan sıçanlar (n=7)

Grup 3: I/R ve PostC uygulanan sıçanlar (n=7)

Grup 4: I/R ve melatonin uygulanan sıçanlar (n=7)

Pinealektomili (Px) gruplar

Grup 5: Px uygulanan sıçanlar (n=7)

Grup 6: Px ve I/R uygulanan sıçanlar (n=7)

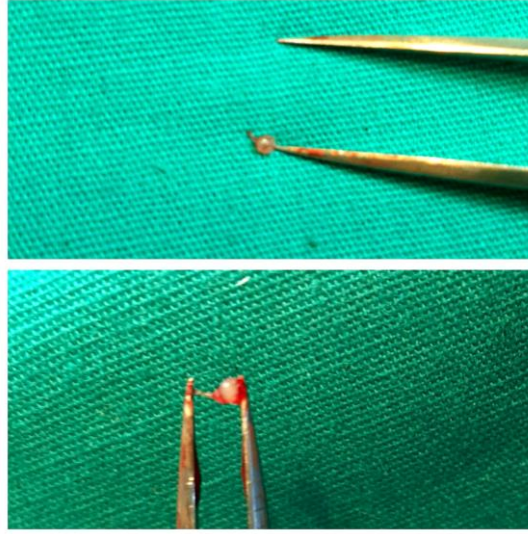
Grup 7: Px , I/R ve PostC uygulanan sıçanlar (n=7)

Grup 8: Px, melatonin, I/R ve PostC uygulanan sıçanlar (n=7)

4.3. Cerrahi uygulamalar

4.3.1 Pinealektomi

Anestezik olarak periton içi (ip) ketamin hidroklorid (Ketalar, Pfizer, İstanbul) 75 mg/kg + ksilazin (Rompun, Bayer, İstanbul) 8 mg/kg kullanıldı. Kafa derisi tıraş edildikten sonra longitudinal olarak oksipital çıkıntıya uzanacak şekilde medialde 1,75 cm'lik bir insizyon yapıldı. Sagital ve lambdoid sutureların bulunduğu kemiklerin periostları temporal kaslara ulaşınca kadar kazındı. Daha sonra dişci turu ile rostrokaudal olarak kafatası kemiği ortalama 1,25 cm rektangular ve 0,75 cm de mediolateral olacak şekilde kesildi. Superior sagital ven 6-0 atravmatik ipek iplikle 1 mm'lik aralıkla 2 defa ligature edildi. İki ligatur arasından sagital sinus kesilip ve posterior kısmı duranın diseksiyonunu izleyerek pineal bez açığa çıkıncaya kadar geriye çekildi. Anterior taraftan ince uçlu penset ile pineal bez sap kısmından tutularak alındı. Daha sonra superior sagital venin her iki ucu birbirine bağlanarak, kafatası derisi 3-0 ipek iplikle dikildi. Sıçanlar I/R çalışmaları için 2 aylık bekleme periyoduna alındı. Kontrol grubunda pinealektomideki cerrahi işlemler yapıldı, ancak pineal bez çıkarılmadı.



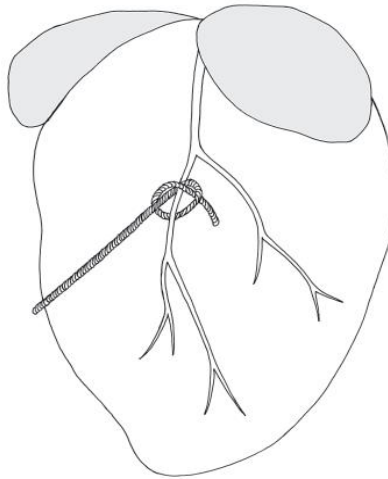
Şekil 6. Pineal bez

4.3.2. I/R uygulama

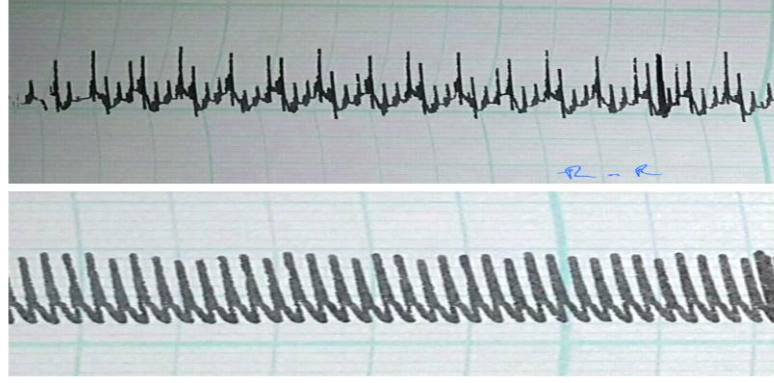
Pinealektomiden 2 ay sonra sıçanlara 1.2 g/kg üretanın ip olarak verilmesi ile anestezi uygulandı. Yapay solunum için trakea kanülasyonu yapıldı ve sıçanlar solunum pompasına bağlandı. Karotid artere yerleştirilen bir kanülden, trandüser (Harvard model, 50-8952) ve bir kaydedici (Harvard Universal ossilograf (penrecorder)) yardımıyla kan basıncı ve EKG yazdırıldı. Göğsün sol tarafına 1-1.5 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldıktan sonra cilt altı dokuları ve göğüs kasları geçildi, sternumun hemen solunda dördüncü kosta kesilerek sol torakotomi yapıldı. Toraks açıldığı anda, içerideki negatif basıncın ortadan kalkması nedeniyle, solunumun devamı ve normal pCO₂, pO₂ ve pH değerlerini korumak amacıyla ventilasyon cihazıyla (Harvard Animal Rodent Ventilator) 1.5ml/100g.'lık hacim ve 60 atım/dk'lık bir hızla oda havası verilerek pozitif basınçlı solunum uygulanmaya başlandı. Perikardiyum yavaşça sıyrılarak kalp serbestleştirildi ve göğsün sağ tarafına hafifçe basılarak kalp dışarı alındı. 6/0 ipek iplik ve 10 mm'lik yuvarlak uçlu iğneyle sol ana koroner arterin altından

miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızlıca geçildi. Daha sonra kalp yeniden göğüs içine yerleştirilerek 20 dk stabilizasyon için beklendi. Lambeth Conventions’da belirlenen değerlendirme kriterleri göz önüne alınarak bu işlemlere bağlı herhangi bir aritmi görülmesi ya da ortalama kan basıncının oklüzyon öncesi 70 mm Hg nin altına düşmesi halinde denek çalışma dışı bırakıldı.

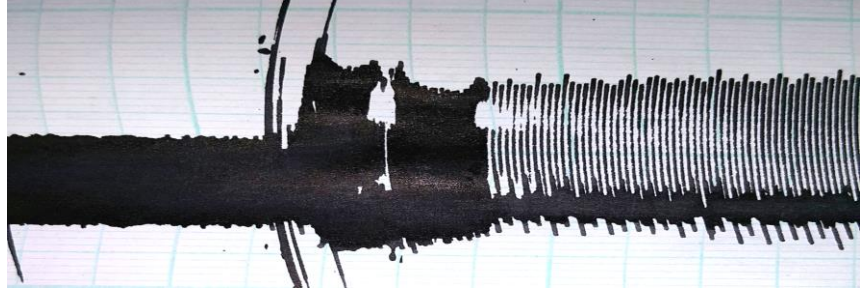
Damarın altından geçirilmiş olan ipliğin uçları 1 mm çap ve 1cm boyundaki ufak bir plastik tüp içinden geçirildi. 20 dk.lık stabilizasyon periyodu sonunda iplik plastik tüp ve bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak damarın oklüzyonu sağlandı. İskemi süresi tamamlandığında klemp açılarak tüp içinden geçen ip gevşetilip üç kür 10 sn iskemi, 10 sn reperfüzyon şeklinde PostC uygulandı. PostC sonrası kalp 120 dakika reperfüze edildi. Deneye son verilmeden önce heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç. İstanbul) uygulandı ve hayvan karotid arterden kanatılarak sakrifiye edildi.



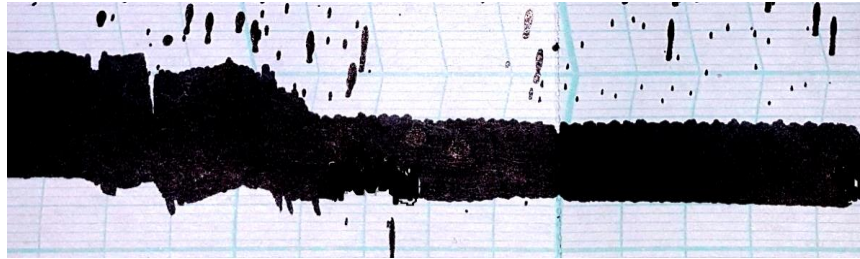
Şekil 7: Sıçanda sol koroner arterin ligasyon bölgesi



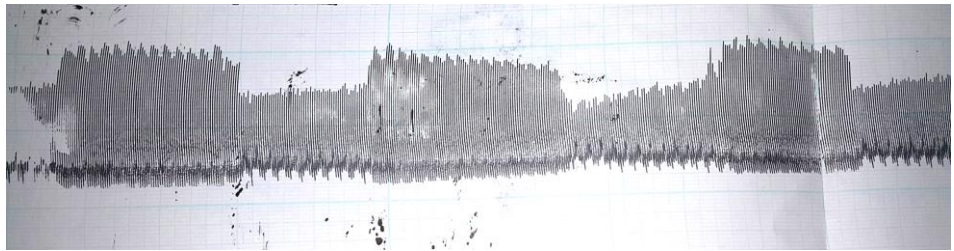
Şekil 8: Reperfüzyon sırasında EKG (üstte) ve kan basıncı (altta)



Şekil 9: İskemi başlangıcında EKG



Şekil 10: İskemi başlangıcında kan basıncı



Şekil 11: İskemik ardkoşullanma – EKG görüntüsü

4.4. İlaç uygulanması

Melatonin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.) saf etanolde çözülerek, % 0,9 NaCl ile sulandırıldı, gruplara çözücü olarak aynı hacim ve konsantrasyonda etanol verildi. Melatonin ve çözücü ip enjeksiyonu ile I/R' den önce 10 gün boyunca verildi.

4.5. Nekroz alanının ölçülmesi

Her deneyin sonunda kalpler hızlıca çıkarılıp Langendorff düzeneğine asıldı. Koroner arterin içerisinde kalan kanların yıkanması için, bir miktar serum fizyolojik ile perfüze edildi. Koroner arterin çevresinde bulunan ipek iplik yeniden sıkıştırıldı. %2 evans blue süspansiyonu (Alfa Aesar, Ward Hill) 0,5 ml verilerek boyayı tutmayan kısım risk zone (risk alanı) olarak tespit edildi. Kalpler Landendorff düzeneğinden alındı ve 12 saat dondurucuda bekletilmek üzere alüminyum folyoya sarıldı. Dondurulmuş kalpler 2 mm kalınlığında dilimlendi ve %1'lik trifenil tetrazolyum klorid (TTC) (VWR chemicals, UK) içeren tamponda (pH=7.4) 37 C° de 15-20 dk süreyle inkübe edildi. TTC, dokuda NADH, dehidrojenazlar ve diaforazlar bulunduğunda formazan pigmentlerini indirir. Canlı dokular, bu enzimler ve kofaktörleri içermeleri için koyu kırmızı renkte boyanırken, infarkt alanları bunları içermediklerinden boyanmazlar. Boyamadan sonra kalp dilimleri birbirinden 2 mm uzaklığı olan iki cam levhanın arasına konuldu. Canlı doku ve nekrotik doku ayırt edilerek şeffaf bir asetat üzerine çizildi. İmageJ programı ile ölçülen infarkt alanı kalbin yüzdesi olarak ifade edildi.

4.6. Biyokimyasal parametreler

Ratlardan alınan kalp örnekleri PCR için RNAlater'a batırıldı. RNA later'da gece boyunca doyurulduktan sonra, dokular -80 ° C'de muhafaza edildi. Örnekler mRNA q-Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (AB Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, CA)'da tespit edildi. Bu amaçla her hayvana ait kalp ve serum doku örnekleri homojenize edildikten sonra doku homojenatından uygun RNA izolasyon kiti (: İnvitrogen, Ambion by life technologies™ , PureLink™ RNA Mini Kit, Katalog No: 12183018A, ABD) kullanılarak total RNA izole edildi.

mRNA Ekspresyon Düzeyinin Tespiti

UCP2,3 ve irisin ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile gösterildi ve “house-keeping” genlerle (aktin, lamin) normalize edildi. Deney düzeneğinde yer alan farklı deney grupları için her bir mRNA'ya ait qRT-PCR analizi gerçekleştirildi. Kısaca, 1 mikrogram total RNA, qRT- PCR işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla öncelikle cDNA (complementary DNA) (AB Applied Biosystems, High- Capacity cDNA Reverse Trancription Kits, Part No:437522 REVB, Foster City, CA) sentezi gerçekleştirildi ve hedef mRNA'lara özgü primerlerin kullanıldığı “SYBR Green” tabanlı qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

4.7. İstatistik

Elde edilen tüm veriler ‘SPSS for Windows 21’ paket programı kullanılarak istatistiksel olarak yorumlanıp değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Nekroz grupları, irisin, UCP 2 ve 3 düzeyleri ANOVA testi analiz edildi.

5. BULGULAR

5.1. I/R, PostC, melatonin ve Px in nekroz alanına etkisi

I/R' ye bağlı miyokardiyal nekroz alanı PostC ve melatonin uygulamaları ile anlamlı azaldı. İki grubun nekroz alanında sağladığı azalma birbiriyle kıyaslandığında anlamlı değildi.

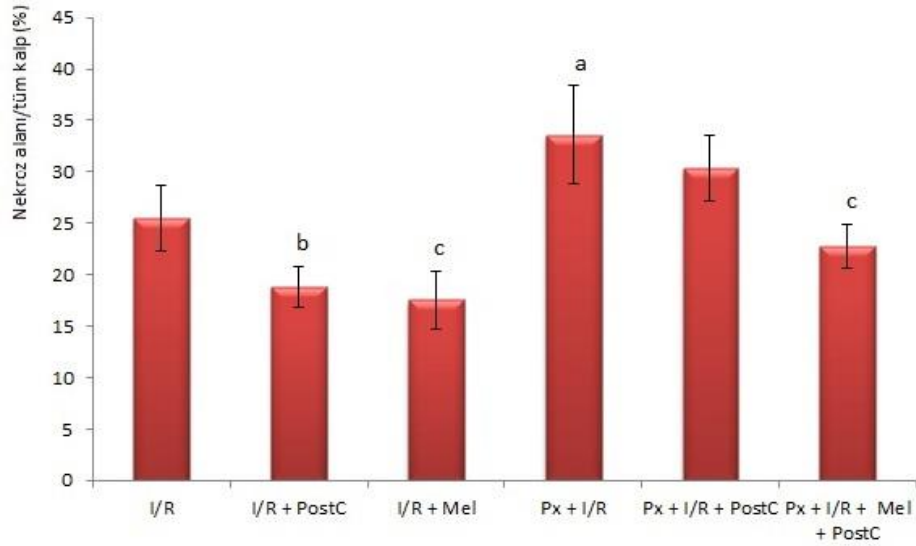
Nekroz alanı Px sıçanlarda Non-Px sıçanlara göre anlamlı arttı. Px sıçanlarda PostC, I/R grubuna göre nekroz alanını azalttı ancak bu azalma anlamlı değildi. PostC öncesi melatonin uygulamaları ile anlamlı koruyuculuk görüldü.

I/R'ye bağlı infarkt alanı/risk alanı değerleri ile infarkt alanı/tüm kalp değerleri birbirlerine paraleldi. I/R' ye bağlı nekroz alanı değerleri Tablo 3, Şekil 12,13 ve 14' te gösterilmiştir.

Tablo 3: I/R, PostC, melatonin ve Px uygulamalarının nekroz alanına etkileri.

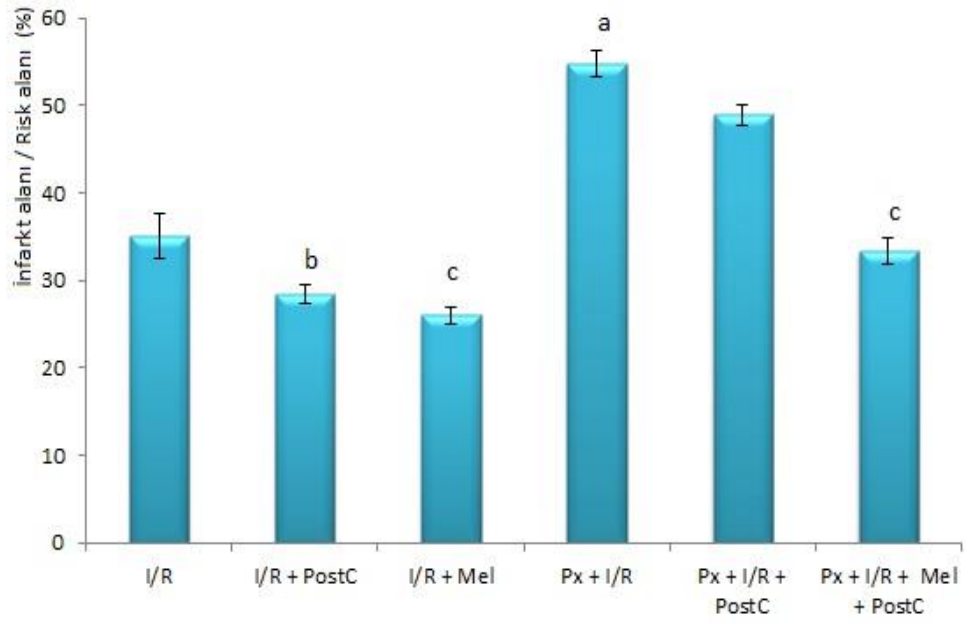
a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık ($p < 0.05$). (mel: melatonin)

Gruplar	Tüm kalp (cm^3)	Nekroz alanı (cm^3)	Nekroz alanı / Risk alanı (%)	Nekroz alanı / Tüm kalp (%)
I/R	$62,8 \pm 12,0$	$16,1 \pm 5,7$	$35,1 \pm 2,5$	$25,46 \pm 3,20$
I/R + PostC	$71,3 \pm 7,21$	$13,61 \pm 2,1$	$28,43 \pm 1,1^b$	$18,83 \pm 2,00^b$
I/R + Mel	$64,6 \pm 2,0$	$11,9 \pm 2,0$	$26,03 \pm 1,0^c$	$17,53 \pm 2,79^c$
Px + I/R	$77,6 \pm 5,5$	$25,0 \pm 3,1$	$54,68 \pm 1,5^a$	$33,58 \pm 5,98^a$
Px + I/R + PostC	$71,1 \pm 8,6$	$22,8 \pm 2,4$	$48,9 \pm 1,2$	$30,36 \pm 3,31$
Px + I/R + Mel + PostC	$61,4 \pm 3,9$	$15,3 \pm 3,0$	$33,46 \pm 1,5^c$	$22,75 \pm 2,17^c$



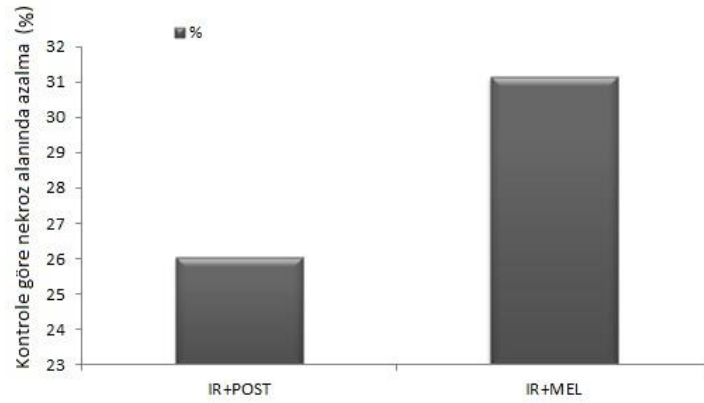
Şekil 12: I/R, PostC, melatonin ve Px in nekroz alanı/tüm kalp değerleri (%).

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık ($p < 0.05$). (mel: melatonin)



Şekil 13. I/R, PostC, melatonin ve Px in nekroz alanı/risk alanı değerleri (%).

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık ($p < 0.05$). (mel: melatonin)



Şekil 14. Non- Px gruplarda Postc ve melatonin uygulamalarının nekroz alanında sağladığı azalma (%).(mel: melatonin)

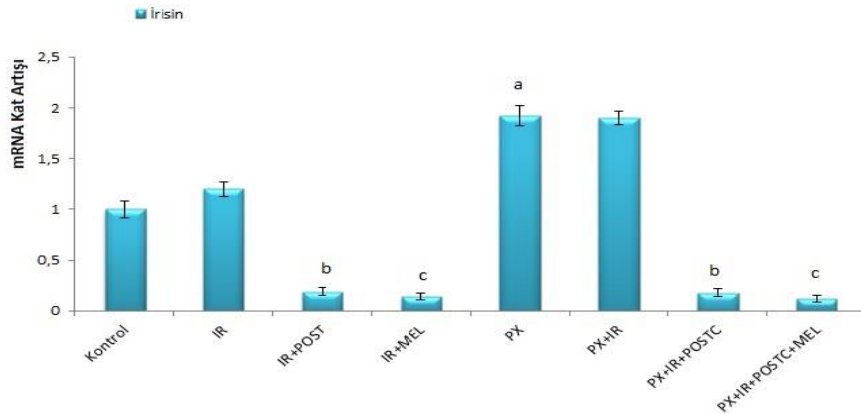
5.2. I/R, PostC, melatonin ve Px in irisin düzeyleri üzerine etkisi

Irisin düzeyi I/R ve Px uygulamaları ile arttı, hem Px hem de non-Px gruplarında PostC ve melatonin uygulamaları ile azaldı. İrisin düzeylerinin gruplara göre değişimi Tablo 4 ve Şekil 15' te gösterilmiştir.

Tablo 4. I/R, PostC, melatonin ve Px in irisin düzeyleri üzerine etkisi

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık ($p < 0.05$). (mel: melatonin)

İrisin (mRNA Kat Artışı)	
Kontrol	1
I/R	1,2
I/R+POST	0,19 ^b
I/R+MEL	0,14 ^c
PX	1,92 ^a
PX+I/R	1,9
PX+I/R+POSTC	0,18 ^b
PX+I/R+POSTC+MEL	0,12 ^c



Şekil 15. I/R, PostC, melatonin ve Px in irisin düzeyleri üzerine etkisi

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık ($p < 0.05$). (mel: melatonin)

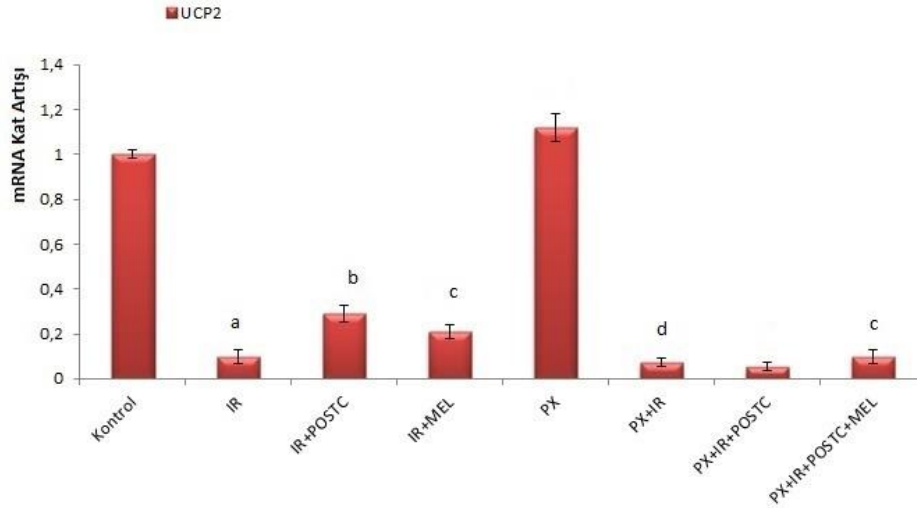
5.3. I/R, PostC, melatonin ve Px in UCP2 düzeyi üzerine etkisi

UCP2 seviyesi kontrole göre I/R ile anlamlı azaldı. Melatonin ve PostC uygulamaları ile anlamlı arttı. Px ile UCP2 düzeyinde artış görüldü ancak bu artış anlamlı değildi. Px gruplarında PostC öncesi melatonin uygulanması UCP2 düzeyini artırdı. Grupların UCP2 seviyesi Tablo 5 ve Şekil 16’da gösterilmiştir.

Tablo 5. I/R, PostC, melatonin ve Px’ in UCP2 düzeyi üzerine etkisi

	UCP2 (mRNA Kat Artışı)
Kontrol	1
I/R	0,1 ^a
I/R+POSTC	0,29 ^b
I/R+MEL	0,21 ^c
PX	1,12
PX+I/R	0,073 ^d
PX+I/R+POSTC	0,054
PX+I/R+POSTC+MEL	0,1 ^c

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık, d: Px sıçanlarda I/R ye bağlı anlamlı farklılık (p<0.05). (mel: melatonin)



Şekil 16. I/R, PostC, melatonin ve Px in UCP2 düzeyleri üzerine etkisi

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık, d: Px sıçanlarda I/R ye bağlı anlamlı farklılık (p<0.05). (mel: melatonin)

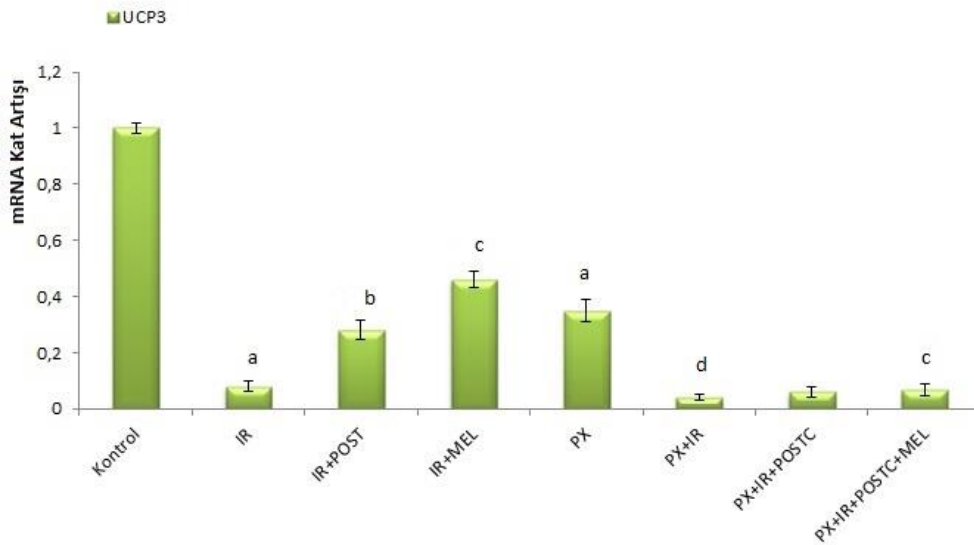
5.4. I/R, PostC, melatonin ve Px in UCP3 aktivitesi üzerine etkisi

UCP3 seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında I/R ve Px ile anlamlı azaldı, melatonin ve PostC uygulamaları ise anlamlı arttı. Px gruplarında uygulanan PostC ve melatonin uygulamaları ile UCP3 düzeyindeki artış anlamlı değildi. Grupların UCP3 seviyesi Tablo 6 ve Şekil 17’ de gösterilmiştir.

Tablo 6. I/R, PostC, melatonin ve Px in UCP3 düzeyleri üzerine etkisi

	UCP3 (mRNA Kat Artışı)
Kontrol	1
I/R	0,08 ^a
I/R+POST	0,28 ^b
I/R+MEL	0,46 ^c
PX	0,35 ^a
PX+I/R	0,04 ^d
PX+I/R+POSTC	0,06
PX+I/R+POSTC+MEL	0,07 ^c

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık, d: Px sıçanlardalarda I/R ye bağlı anlamlı (p<0.05). (mel: melatonin)



Şekil 17. I/R, PostC, mel ve Px in UCP3 düzeyleri üzerine etkisi

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık, d: Px sıçanlardalarda I/R ye bağlı anlamlı (p<0.05). (mel: melatonin)

6. TARTIŞMA

Çalışmamızda I/R' ye bağlı nekroz alanı PostC ve melatonin uygulamasıyla anlamlı azaldı. Px ile anlamlı artan nekroz alanı PostC ile azalma eğilimindeydi ancak anlamlı değildi. PostC öncesi melatonin verildiğinde ise anlamlı koruyuculuk görüldü.

Melatoninin I/R' de koruyuculuğu çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (109, 110, 112-116). Yapılan bir çalışmada melatonin iskemiden 10 dakika önce juguler venden 10 mg/kg verildiğinde nekroz alanı ve MDA değerleri anlamlı azalmış, GSH düzeyi artmıştır (117). Benzer şekilde farelerde iskemi öncesi 30 dk melatonin uygulamasının nekroz alanını anlamlı azalttığı gözlemlenmiştir (114). Melatonin 4 mg/kg dozunda uygulandığında I/R' ye bağlı nekroz alanı (109) ve aritmilerde (110) azalma anlamlı bulunmamıştır. Başka bir çalışmada iskemi öncesinde uygulanan melatoninin ventriküler taşikardiyi ve fibrilasyonu baskıladığı, I/R sırasında O_2^- üretimini ve MPO aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (113). Vazan ve ark. (115) deney boyunca melatonin uygulamış ve bu uygulamanın aritmi süresini anlamlı olarak kısalttığını ve aritmi skorunu azalttığını saptamıştır. Benzer bir çalışmada (116); melatonin sol ventrikül fonksiyonunu önemli derecede iyileştirmiştir.

Liu ve ark. (109) oluşturduğu deneysel modelde gruplara 2.5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg melatonin koroner arter ligasyonundan 10 dk önce, ip enjeksiyon ile uygulandığında, melatonin gruplarında sol ventrikül diyastolik basınç iyileşmiş, miyokard hücrelerinin ATP içeriği anlamlı yüksek bulunmuştur. Melatonin uygulanan gruplar arasında 10 mg/kg melatonin optimum koruma sağladığı görülmüştür. Başka bir çalışmada 10 mg/kg melatoninin in vivo I/R' de

nekroz alanını ve MDA düzeyini anlamlı azalttığı ve GSH seviyesini artırdığı belirlenmiştir (94). Bizim çalışmamızda I/R öncesi 10 gün 10 mg/kg melatonin ip uygulandığında nekroz alanında anlamlı koruyuculuk görüldü.

Biz PostC nin, I/R ye bağlı nekroz alanını anlamlı azalttığını gözlemledik. Yapılan çalışmalar da bizim sonuçlarımızı desteklemektedir (8, 26, 28, 29). Köpeklerde yapılan PostC çalışmasında yöntemin oldukça koruyucu olduğu ve infarkt alanını % 44 azalttığı görülmüştür (28). Zhang ve ark. (28)' nın sıçan modelinde PostC nin; myokarddaki MDA düzeyini azaltıp, SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini artırdığını ve myokarddaki oksidatif hasara karşı, koruyucu olduğunu göstermişlerdir.

PostC ile ilgili klinik çalışmalar da mevcuttur (35, 42, 118, 119). PostC konjenital malformasyon tedavisi için cerrahi geçiren çocuklara 30 saniyelik iki siklus şeklinde kardiyopulmoner bypasstan hemen önce uygulanmış, troponin I ve kreatin kinaz MB ve postoperatif inotropik gereksinim düzeyleri anlamlı azalmıştır (30). Bu, kapak replasmanı yapılan yetişkinler üzerinde gerçekleştirilen klinik bir deneme ile doğrulanmıştır. Bununla birlikte çıkan aort klemp/deklempleme işlemi özellikle aort duvarında aterosklerotik lezyonları olan erişkinlerde yüksek embolik kaza riski ile ilişkili bulunmuştur (22).

Kim ve ark. (118) ST yükselmeli MI (STEMI) nedeniyle primer perkütan koroner girişim uygulanan hastalara, 4 siklus 1 dakikalık PostC'yi balon oklüzyonu ile uygulamışlardır. Miyokard kurtarma indeksi geleneksel primer perkütan koroner girişim uygulanan hastalar ile karşılaştırıldığında PostC ile gelişme göstermemiş, STEMI hastalarında PostC'nin miyokardiyal kurtarmayı artırmadığı veya infarkt boyutunu azaltmadığı görülmüştür.

Akut MI'da, PostC 'nin kardiyoprotektif rolünü inceleyen bir çalışmada ise miyokardiyal hasar (serum kardiyak enzimler ve infarkt görüntüleme ile) ve sol ventrikül fonksiyonu ölçülmüş, PostC uygulaması ile serum kardiyak enzimlerde ve nekroz alanında azalma, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda ise iyileşme görülmüştür (119).

Px ratlarda nekroz alanının anlamlı arttığını gözlemledik. Laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmada (110) Px kalplerde nekroz alanının büyük olduğu ve endojen melatonin düzeyinin I/R süresince kardiyoprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada melatonin, doksorubisin verilmesinden önce ve sonra ikişer gün uygulandığında Px sıçanlarda MDA düzeyi anlamlı azalmış, doku hasarı anlamlı artmıştır (120).

Px ile PostC' nın koruyuculuğu ortadan kalktı. Farmakolojik melatonin verilip PostC uygulandığında ise anlamlı koruyuculuk gözlendi. Melatoninin myokardial PostC üzerine etkisi bizim bilgilerimize göre bilinmemektedir. Ancak PreC de melatoninin etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (121, 122). Genade ve ark. (121) izole perfüze rat kalbinde PreC' i 1x5 dk şeklinde uygulayıp iskemiden önce ve reperfüzyondan sonra 5' er dk melatonin verdiklerinde melatoninin PreC koruyuculuğuna yönelik katkısına rastlamamışlardır. PreC 3x5 dk şeklinde uygulanarak aynı şekilde melatonin verildiğinde ise elde edilen değerlerin önkoşullanmamış kalpte gözlenen sonuçlar olduğu görülmüştür.

Andreadou ve ark. nın (122) in vivo tavşanda yaptıkları çalışmada melatonin nekroz alanı üzerinde herhangi bir etki göstermemiş (%42.9, %47.4) ve PreC grubunda MI büyüklüğünün azalmasını hafifletmemiştir (% 13.6, %14.0). Böylece melatoninin antioksidan özelliklerine rağmen enfarktüs boyutunda

PreC'nin etkisine katkı sağlamadığı sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda ise non-Px gruplarda PostC ve melatonin uygulamalarının koruyuculukları arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Px grupta ise melatonin ve PostC uyguları ile anlamlı koruyuculuk görülmüştür.

Px ile kardiyovasküler risk faktörlerine açık hale gelmiş sıçanlarda PostC'nin kalp korumasının anlamlılığa ulaşamadığını gördük. Iliodromitis ve ark. (123) hiperkolesteroleminin PostC'nin nekroz alanındaki koruyucu etkisini önemli ölçüde engellediğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır (124). Wagner ve ark. (125) farelerde, PostC'nin nekroz alanındaki koruyuculuğunun, spontan hipertansif sıçanlarda tamamen kaybolduğunu, iskemi süresinin 20 dk kısaltılmasının bile koruyucu etkiyi geri getirmediğini gözlemlemişlerdir. Hipertansif sıçanlarda PostC'nin etkisiz olduğunu Penna ve ark. da belirtmişlerdir (126). Bir çalışma sevofluran ardkoşullanması ile nekroz alanının genç farelerde anlamlı azaldığını, ancak yaşlı farelerde koruyuculuğun anlamlı olmadığını saptamışlardır (127). Sophie ve ark. (128)'nin yaptığı klinik çalışmada ise PostC ile nekroz alanı anlamlı azalmış, yaş, cinsiyet, hipertansiyon, dislipidemi ve obezitenin nekroz alanı üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. PostC'nin kalbi koruyucu etkisi STEMI hastalarında yaygın olan geleneksel kardiyovasküler risk faktörlerinin etkisinde olmadığı sonucuna varmışlardır. Başka bir klinik çalışma cinsiyet, yaş ve direkt stent kullanımının PostC üzerinde anlamlı bir etkisi olduğunu ve PostC'nin koruyucu etkisinin, genç ve erkek hastalar arasında daha belirgin olduğunu belirtmişlerdir (129). İskemik PostC ve sevofluran postC diyabetik olmayan sıçanlarda % 50 oranında enfarktüsü azaltmıştır. Bu etki diyabetik sıçanlarda tamamen ortadan kalkmış,

insülin ile normogliseminin oluşturulması kalp koruyucu etkiyi geri getirmemiştir (130). Deneysel bir çalışmada diyabet, PostC nin kalp koruyucu etkisinde önemli bir azalmaya neden olmuş (131), klinik bir çalışmada ise diyabet ve PostC arasında anlamlı bir etkileşime rastlanmamıştır (128). Sigara da İKH da önemli risk faktörlerindendir. Deneysel bir I/R çalışmasında tütün maruziyetinin nekroz alanında artışa neden olduğu bildirilmiştir (132). İnsanlarda ise sigara içen hastalarda akut koroner sendromu takiben daha yüksek kardiyak enzim konsantrasyonlarına rastlanmıştır. PreC'in kalp koruyucu etkisini sigaranın anlamlı değiştirmediği görülmüştür (133).

Çalışmamızda non-Px grupta I/R ile irisin seviyesi arttı, ancak bu artış anlamlı değildi. Aydın ve ark. (51) doksorubisin vererek serum ve kalp dokusunda irisin seviyelerini incelemişler ve doksorubisin kaynaklı myokardiyal hasarın irisin seviyesini artırdığını saptamışlardır. Aronis ve ark. koroner girişim sonrası oluşan koroner arter hastalıklarında artan irisin seviyesi ile istenmeyen kardiyovasküler olay gelişiminin ilişkili olduğunu göstermişlerdir (53).

Yapılan başka bir araştırmada MI sıçanlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum irisin seviyeleri 1 saatten 24 saate giderek düşmüştür - 2 saatte minimuma inmiş, 6 saat sonra yeniden artmıştır. MI'dan 2 ve 4 saat sonra, irisin kalp kası hücrelerinde belirgin azalmış, kalp kas hücrelerinin bağ dokusu yakınlarında ise artmıştır. 6 saat sonra kalbin bağ dokusu çevresinde irisin artmaya, kalp kası hücrelerinde azalmaya devam etmiştir. 24 saat sonra ise kalp kası dokusunda normal düzeylerine dönmüş ve kalp kası hücrelerinin bağ dokusunda ise irisin seviyesi önemli ölçüde yüksek seviyede kalmıştır (115).

Px ile irisin seviyesinin I/R hasarına göre daha fazla arttığını gözlemledik. Benzer şekilde Emanuel ve ark. (54) genç sağlıklı (20.7 ± 6.3 ng/mL) ve akut MI geçiren genç hastalara (15.1 ± 5.4 ng/mL) kıyasla sağlıklı yaşlılarda (35.3 ± 5.5 ng/mL) serum irisin seviyesinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Koşullamalarda irisin rolünü gösteren çalışma henüz yayınlanmamıştır. Melatoninin irisin düzeyine etkisini inceleyen mevcut tek çalışmada melatonin, zayıf sıçanların kahverengi yağ ekstrelerinde UCP1 ve termojenik proteinlerin miktarlarını ve hem zayıf hem de diyabetik şişman sıçanlarda vücut sıcaklığını artırmış, diyabetik şişman sıçanlarda UCP1'i ölçülebilir miktarda indüklemiştir. Dolaşımdaki irisin düzeyleri ise melatoninden etkilenmemiştir (55). Bizim çalışmamızda PostC ve farmakolojik melatonin uygulanması hem non-Px hem de Px sıçanlarda irisin seviyesini anlamlı azalttı. Px sonrası PostC, irisin düzeyinde koruyuculuk gösterdi.

Çalışmamızda UCP2 ve 3 düzeyleri I/R ile anlamlı azaldı. Benzer şekilde doksorubisin indüklü kalp yetmezliği ile UCP2 ve 3 protein ekspresyonu anlamlı azalmıştır (134). Safari ve ark. (42)'nin sıçanlarda oluşturdukları I/R modelinde ise mitokondriyal UCP3 artışı 30 dk iskemi sonrası 30 dk (%19), 60 dk (% 23) ve 120 dk (% 31) reperfüzyon gruplarında ölçülmüş, ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır. 180 dk (% 131) ve 240 dk (% 102) reperfüzyon gruplarında ise UCP3 düzeyleri anlamlı yüksektir. UCP2 seviyeleri 30 dk reperfüzyondan itibaren kontrole göre anlamlı fazla bulunmuştur (30 dk %213, 60 dk %152, 120 dk %123 ve 180 dk %131). Köpeklerde yapılan çalışmada isoproterenol indüklü kalp yetmezliğinde UCP2 mRNA ve protein düzeylerinin önemli ölçüde arttığı ve UCP2 ekspresyonunun kreatin fosfat / ATP

oranı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (135). Başka bir çalışmada UCP2 seviyeleri ile miyokard enerji düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur (136). UCP2 mitokondriyal ROS üretiminin bir regülatörüdür ve oksidatif stres ile indüklenen endotelial işlev bozukluğunu antagonize edebilir (137).

Çalışmamızda I/R ve Px uygulaması, UCP3 düzeyini anlamlı azalttı (%92, % 65 oranında). Hoshovs'ka ve ark. (138) yetişkin (6 ay) ve yaşlı (24 ay) sıçan kalplerini langendorf düzeneğinde perfüze ederek I/R uygulamışlardır. Yaşlı kalplerde UCP2 düzeyi anlamlı yüksek, UCP3 düzeyi ise artış eğiliminde bulunmuştur. Biz UCP2 düzeyinin I/R ile anlamlı azaldığını, Px ile değişmediğini gözlemledik.

Bizim çalışmamızda melatonin ve PostC uygulamalarında UCP2 ve 3 seviyesi non-Px gruplarda anlamlı arttı. Px gruplarında ise PostC uygulaması ve PostC ile melatoninin birlikte uygulamalarının UCP3 düzeyinde sağladığı artış anlamlı değildi. Melatonin ve PostC' nin UCP2 ve 3 düzeylerine etkisini inceleyen çalışma bizim bilgilerimize göre mevcut değildir. Ancak PreC'nin UCP3 üzerine etkisini inceleyen çalışmalarda, PreC'nin kalbi koruyucu etkisinde UCP2 ve 3 'ün rol oynayabileceği görülmüştür (8,58). Hoshovs'ka ve ark. (58) izole edilmiş sıçan kalpleri üzerinde 3 siklus 5'er dk PreC'in, kalp dokusunda UCP2 ve UCP3 ekspresyonunu artırdığını ve UCP'lerin PreC 'in kardiyoprotektif etkisinde rolleri olduğunu saptamışlardır. UCP inhibitörü olan genipin ile UCP2 aktivitesi blokajı, PreC ile gelen iskemik adaptasyonunun koruyucu etkisini ortadan kaldırdığını rapor etmişlerdir.

Palmeri ve ark. (8)'nın çalışmalarında doğal tip ve UCP3 knockout fareler üzerinde yaptıkları PreC'de UCP3 ün rolünü incelemişler ve doğal tip farelerle

karşılaştırıldığında knockout farelerde iki kat daha büyük enfarktüsle rastlamışlardır. Ayrıca UCP3 knockout farelerde PreC'in koruyucu etkinliği kalkmıştır. UCP3 eksik kalplerde I/R'ye karşı miyokard dokunun savunmasız olduğu görülmüştür.

Kalp cerrahisinde uçucu anesteziğin miyokard üzerinde koşullanma etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. 22 klinik deneme derlenerek yapılan meta-analizde uçucu anesteziğin (sevofluran veya desfluran) kullanımı, postoperatif MI ve hastane ölüm insidansında önemli bir azalma ile sonuçlanmış ve uçucu anesteziğin ile troponin seviyeleri, postoperatif inotropik gereksinimleri, yoğun bakımda kalış ve mekanik ventilasyon süresi anlamlı düşük bulunmuştur (8). Wu ve ark.(139) parsiyel agonist etkili sentetik opioid analjezik olan butorfanolun farmakolojik PostC etkisini araştırdıkları çalışmada nekroz alanı ile MDA ve MPO düzeyleri anlamlı azalmıştır. Butorfanol PostC'sinin I/R' ye karşı güçlü kalp koruyucu olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda non-Px grubunda hem PostC hem de melatonin nekroz alanını anlamlı azalttı ve biyokimyasal değerleri benzer şekilde etkiledi. Melatonin daha fazla koruyuculuk göstermesine rağmen bu iki grup arasında anlamlı fark görülmedi. Bu, melatoninin uçucu anesteziğe benzer şekilde farmakolojik koşullanma sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca PostC klempleme-deklempleme işlemleri sırasında lezyon oluşumu gibi yan etki profiline sahip girişimsel bir tedavi metodudur. Melatonin PostC'den daha fazla koruyucu (nekroz oranı) ve daha düşük yan etki profiline sahip olması nedeniyle endojen melatonin düzeyinin korunması ya da uygulanması kolay farmakolojik melatonin verilmesi koroner arter hastalıklarının tedavisinde daha avantajlı olabilir.

Sonuç olarak;

Fizyolojik melatoninin azaldığı durumlarda PostC'nin koruyuculuğunun ortadan kalktığı, melatonin replasmanı ile bu etkinin geri çevrilebildiği görülmüştür. Melatoninin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonları PostC'nin koruyuculuğunda önemli olabilir. Melatonin düzeyini (endojen ritmi) korumak için yaşam modifikasyonu ile kardiyak korunma sağlanabilir ve yaşlılık ya da melatonin seviyesinin azalmasının eşlik ettiği kalp hastalıkları için predispose durumlarda toksisitesi düşük rapor edilen melatonin replasmanı önerilebilir.

Mitokondriyal UCP2 ve UCP3 düzeyleri, I/R hasarında, melatonin ve PostC nin koruyuculuğunda etkin bir rol oynayabilir.

İrisin seviyeleri, özellikle fizyolojik melatoninin azalması ile artan I/R hasarının fizyopatolojisinde önemli olabilir. PostC ve melatoninin kalbi koruyucu etkilerinde artmış irisin seviyesini etkin biçimde düşürmelerinin önemli rolü olabilir.

Melatonin, PostC ile benzer oranda ve benzer parametreler ile koruyuculuk gösterebildiği için farmakolojik koşullanma yapabilen bir ajan olarak düşünülebilir.

İrisin, UCP 2 ve 3 düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Western Blot ile sonuçların teyid edilmemiş olması çalışmamızın eksik yönü olarak düşünülebilir. I/R'ye bağlı aritmilerin Px, melatonin ve PostC'den nasıl etkilenebileceği; I/R, PostC ve melatonin uygulamalarının nekroz alanı, UCP 2,3 ve irisinin yanında oksidatif değişikliklere bağlı endotel disfonksiyonun, inflamatuvar mediyatörlerin ve muhtemel diğer yolların rolü henüz bilinmemektedir. İleriki çalışmalarımızda araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Kern MJ. Coronary blood flow and myocardial ischemia. Braunwald Heart Disease. 7 th ED. 2005; 1103-1127.
2. Health Organization (WHO). The top ten causes of death. Factsheet No 310/ 2008.
3. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. Nat Med. 1998; 4(11): 1241-3.
4. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Türkiye Kalp Ve Damar Hastalıklarını Önleme Ve Kontrol Programı Birincil, İkincil ve Üçüncül Korumaya Yönelik Stratejik Plan ve Eylem Planı. Ankara - 2010.
5. Brodie BR, Stuckey TD, Wall TC, et al. Importance of time to reperfusion for 30-day and late survival and recovery of left ventricular function after primary angioplasty for acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 1998; 32(5): 1312-9.
6. Thompson PL, Fletcher EE, Katavatis V. Enzymatic indices of myocardial necrosis: influence on short- and long-term prognosis after myocardial infarction. Circulation. 1979; 59(1): 113-9.
7. Stebbins A MR, Armstrong PW et al. A model for predicting mortality in acute ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention: results from the Assessment of Pexelizumab in Acute Myocardial Infarction Trial. Circ Cardiovasc Interv 2010; 3: 414-22.
8. Bousselmi R, Lebbi MA, Ferjani M. Myocardial ischemic conditioning: Physiological aspects and clinical applications in cardiac surgery. J Saudi Heart Assoc. 2014; 26(2): 93-100.
9. Şengül İ, Şengül D, İskemik ön koşullanma ve sonradan koşullanma mekanizmaları olarak intraselüler sinyalizasyon ve adenosin. Cumhuriyet Tıp Derg. 2010; 32: 127-131.
10. Oguzhan Ozcan, Huseyin Erdal, Zafer Yonden. İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Oksidatif Stress İlişkisine Biyokimyasal Bakış. Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg. 2015; 6(23): 27-33.
11. Sharma V, Bell RM, Yellon DM. Targeting reperfusion injury in acute myocardial infarction: a review of reperfusion injury pharmacotherapy. Expert Opin Pharmacother. 2012; 13(8): 1153-75.
12. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. N Engl J Med. 2007; 357(11): 1121-35.
13. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. Circulation. 2002; 105(20): 2332-6.

14. Julian DG, Bertrand ME, Hjalmarson A, et al. Recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology. Management of stable angina pectoris. *Eur Heart J*, 1997; 18 (3): 394 - 413.
15. Frohlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *European heart journal*. 2013; 34(23): 1714-22.
16. Semizel E, Bostan ÖM, Çil E. Konjestif Kalp Yetmezliği. *Güncel Pediatri* 2006; 3: 140-145.
17. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cevalvo D. Neutrophilic infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury: modulating effect of FK506 and cyclosporin. *Transplantation*. 1993; 55: 265-1272.
18. Webb IG, Williams R, Marber MS. Lizard spit and reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53: 511-3.
19. Bilal MS, Sarıoğlu T. İskemik Miyokard İnjurisi ve İntraoperatif Miyokard Korunmasına Genel Bir Bakış. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 1992; 1: 2, 118-126.
20. Gerczuk PZ, Kloner RA. Protecting the heart from ischemia: an update on ischemic and pharmacologic conditioning. *Hosp Pract*. 2011; 39(3): 35-43.
21. Heusch G KP, Skyschally A, Levkau B, Schulz R, Erbel R. The coronary circulation in cardioprotection: more than just one confounder. *Cardiovasc Res*. 2012; 1(94(2)): 237-45
22. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*. 2004; 95(3): 230-2.
23. Crisostomo PR, Wang M, Wairiuko GM, Terrell AM, Meldrum DR. Postconditioning in females depends on injury severity. *The Journal of surgical research*. 2006; 134(2): 342-7.
24. Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 420(2): 222-36.
25. Şengül İ, Şengül D. İskemik Ön Koşullanma ve Sonradan Koşullanma Mekanizmalarından Biri: Potasyum-ATP Kanalları (Mitokondriyal ve Sarkolemmal). *Yeni Tıp Dergisi* 2012; 29(1): 7-11.
26. Marzilli M, Morrone D, Guarini G. Postconditioning. *Heart Metab*. 2012; 54: 20-24
27. Zhang L, Ma J, Liu H. Protective effect of ischemic postconditioning against ischemia reperfusion-induced myocardium oxidative injury in IR rats. *Molecules*. 2012; 17(4): 3805-17.

28. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003; 285(2): 579-88.
29. Argaud L, Gateau-Roesch O, Augeul L, et al. Increased mitochondrial calcium coexists with decreased reperfusion injury in postconditioned (but not preconditioned) hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: 386–391.
30. Luo W, Li B, Lin G, Huang R. Postconditioning in cardiac surgery for tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007; 133(5): 1373-4.
31. Aimo A, Borrelli C, Giannoni A, et al. Cardioprotection by remote ischemic conditioning: Mechanisms and clinical evidences. *World journal of cardiology*. 2015 ; 7(10): 621-32.
32. Sachdeva J, Dai W, Gerczuk PZ, Kloner RA. Combined remote preconditioning and postconditioning failed to attenuate infarct size and contractile dysfunction in a rat model of coronary artery occlusion. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2014; 19(6): 567-73.
33. Hu Q, Luo W, Huang L, Huang R, Chen R, Gao Y. Multiorgan protection of remote ischemic preconditioning in valve replacement surgery. *The Journal of surgical research*. 2016; 200(1): 13-20.
34. Basalay M, Barsukevich V, Mastitskaya S, et al. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning - similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Experimental physiology*. 2012; 97(8): 908-17.
35. Şengül İ ŞD. İskemik Ön Koşullanma ve Sonradan Koşullanma Mekanizmalarından Biri: Potasyum–ATP Kanalları (Mitokondriyal ve Sarkolemmal). *Yeni Tıp Dergisi* 2012; 29(1): 7-11.
36. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973 : 707–716.
37. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Gözükar A. Nitrik oksit (no) ve nitrik oksit sentaz (NOS)'ın fizyolojik ve patolojik özellikleri. *Türkiye klinikleri j pediatri* 2001; 10(4): 226-35.
38. Doğan AL, Dicle G. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 34-42.
39. Wu YJ, Fang LH, Du GH. Advance in the study of myocardial ischemic preconditioning and postconditioning and the clinical applications. *Yao Xue Xue Bao*. 2013; 48(7): 965-70.
40. Shahzad T, Kasseckert SA, Iraqi W, et al. Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2013; 58: 209-16.
41. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109: 27-32.

42. Boveris A, Navarro A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life*. 2008; 60(5): 308-14.
43. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*. 2003; 348(26): 2656-68.
44. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25(10): 502-8.
45. Ozcan C, Palmeri M, Horvath TL, Russell KS, Russell RR, Role of uncoupling protein 3 in ischemia-reperfusion injury, arrhythmias, and preconditioning. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013; 304(9): 1192-200.
46. Carroll R, Gant VA, Yellon DM, Mitochondrial KATP channel opening protects a human atrial-derived cell line by a mechanism involving free radical generation. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 691-700.
47. Wang J, Gao Q, Shen J, Ye TM, Xia Q. Kappa-opioid receptor mediates the cardioprotective effect of ischemic preconditioning. *Journal of Zhejiang University Medical sciences*. 2007; 36(1): 41-7.
48. Beavis AD BR, Garlid KD. Swelling And Contraction Of The Mitochondrial Matrix. I. A Structural Interpretation Of The Relationship Between Light Scattering And Matrix Volume. *J Biol Chem* 1985; 260.25; 13424-13433.
49. Hanley PJ, Gopalan KV, Lareau RA, et al. Beta-oxidation of 5-hydroxydecanoate, a putative blocker of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *The Journal of physiology*. 2003; 547: 387-93.
50. Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, et al. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP- sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002; 283(1): H284-95.
51. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovascular research*. 2002; 55(3): 534-43.
52. Liu J, Li J, Li WJ, Wang CM. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *J Diabetes Res*. 2013; 2013: 585897.
53. Kukat A, Dogan SA, Edgar D, et al. Loss of UCP2 attenuates mitochondrial dysfunction without altering ROS production and uncoupling activity. *PLoS genetics*. 2014; 10(6): e1004385.
54. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A. et al, Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett*. ; 1997.408, 39-42.
55. Goglia F, Skulachev VP. A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J*. 2003; 17(12): 1585-91.

56. Nabben M, Hoeks J. Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism. *Physiol Behav.* 2008; 94(2): 259-69.
57. Schrauwen P, Hesselink MK. The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc Nutr Soc.* 2004 May; 63(2): 287-92.
58. Hoshovs'ka Iu V, Shymans'ka TV, Sahach VF. Genipin--uncoupling protein inhibitor--reduces the protective effect of ischemic preconditioning. *Fiziol Zh.* 2011; 57(6): 38-45.
59. Safari F, Anvari Z, Moshtaghioun S, et al. Differential expression of cardiac uncoupling proteins 2 and 3 in response to myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Life sciences.* 2014; 98(2): 68-74.
60. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012; 481(7382): 463-8.
61. Mohite, PB, Pandhare RB, Khanage S. Derivative spectrophotometric method for estimation of antiretroviral drugs in fixed dose combinations. *Adv Pharm Bull.* 2012; 2(1): 115-8.
62. Aydin S. Three new players in energy regulation: preptin, adropin and irisin. *Peptides.* 2014; 56: 94-110.
63. Zhang Y, Li R, Meng Y, Li S, et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes.* 2014; 63(2): 514-25.
64. Mailloux RJ, Harper ME. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free radical biology & medicine.* 2011; 51(6): 1106-15.
65. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, et al. Cardiac, skeletal muscle and serum irisin responses to with or without water exercise in young and old male rats: cardiac muscle produces more irisin than skeletal muscle. *Peptides.* 2014; 52: 68-73.
66. Aydin S, Aydin S, Kuloglu T, et al. Alterations of irisin concentrations in saliva and serum of obese and normal-weight subjects, before and after 45 min of a Turkish bath or running. *Peptides.* 2013; 50: 13-8.
67. Han F, Zhang S, Hou N, Wang D, Sun X. Irisin improves endothelial function in obese mice through the AMPK-eNOS pathway. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2015; 309(9): H1501-8.
68. Xie C, Zhang Y, Tran TD, et al. Irisin Controls Growth, Intracellular Ca²⁺ Signals, and Mitochondrial Thermogenesis in Cardiomyoblasts. *PloS one.* 2015; 10(8): e0136816.
69. Aydin S, Aydin S, Kobat MA, et al. Decreased saliva/serum irisin concentrations in the acute myocardial infarction promising for being a new candidate biomarker for diagnosis of this pathology. *Peptides.* 2014; 56: 141-5.

70. Aronis KN, Moreno M, Polyzos SA, et al. Circulating irisin levels and coronary heart disease: association with future acute coronary syndrome and major adverse cardiovascular events. *Int J Obes.* 2015; 39(1): 156-61.
71. Emanuele E, Minorette P, Pareja-Galeano H, et al. Serum irisin levels, precocious myocardial infarction, and healthy exceptional longevity. *Am J Med.* 2014; 127(9): 888-90.
72. Van Vuuren D, Lochner A. Ischaemic postconditioning: from bench to bedside. *Cardiovasc J Afr.* 2008; 19(6): 311-20.
73. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Jiang R, Zatta AJ, Dobson GP. Preconditioning and postconditioning: innate cardioprotection from ischemia-reperfusion injury. *Journal of applied physiology.* 2007; 103(4): 1441-8.
74. Heusch G. Reduction of infarct size by ischaemic post-conditioning in humans: fact or fiction? *European heart journal.* 2012; 33(1): 13-5.
75. Yerer MB, Aydoğan S. Sirkadiyen ritme bağlı olarak melatonin seviyesindeki değişikliklerin eritrositlerde lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. *Sağlık bilimleri dergisi (journal of health sciences)* 2006; 15(3) 153-160.
76. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84.
77. Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res.* 1993; 15: 59–69.
78. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998; 78: 687-721.
79. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Avanzas P. The role of melatonin in acute myocardial infarction. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012; 17: 2433-41.
80. Reiter RJ, Tan D, Kim SJ, et al. Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats. *Mech Ageing Dev.* 1999; 110(3): 157-73.
81. Mander P, Brown GC. Nitric oxide, hypoxia and brain inflammation. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32(Pt 6): 1068-9.
82. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, et al. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res.* 1997; 23: 106–116.
83. Lenaz G, Genova ML. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 12(8): 961-1008.

84. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Protective role of melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Arch Toxicol.* 2015; 89(6): 923-39.
85. Lopez A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lopez LC, et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res.* 2009; 46(2): 188-98.
86. Martin M, Macias M, Leon J, et al. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(4): 348-57.
87. Acuna Castroviejo D, Lopez LC, Escames G, et al. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem.* 2011; 11(2): 221-40.
88. Patki G, Lau YS. Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011; 99(4): 704-11.
89. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P. Myocardial ischemia-reperfusion injury: Possible role of melatonin. *World journal of cardiology.* 2010; 2(8): 233-6.
90. Bondy SC, Lahiri DK, Perreau VM, et al. Retardation of brain aging by chronic treatment with melatonin. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1035: 197-215.
91. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Front Physiol.* 2014; 5: 377.
92. Houtkooper RH, Vaz FM. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(16): 2493-506.
93. Musatov A, Robinson NC. Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radic Res.* 2012; 46(11): 1313-26.
94. Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(1): C33-44.
95. Petrosillo G, Matera M, Moro N, Ruggiero FM, Paradies G. Mitochondrial complex I dysfunction in rat heart with aging: critical role of reactive oxygen species and cardiolipin. *Free radical biology & medicine.* 2009; 46(1): 88-94.
96. Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell.* 2005; 120(4): 437-47.
97. Judge S, Leeuwenburgh C. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(6): C1983-92.
98. Reiter RJ, Richardson BA, Johnson LY. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science* 1980; 210: 1372–1373.

99. Rodriguez MI, Carretero M, Escames G, et al. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res.* 2007; 41(1): 15-24.
100. Rodriguez MI, Escames G, Lopez LC, et al. Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice. *Exp Gerontol.* 2008; 43(8): 749-56.
101. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *Journal of pineal research.* 2005; 38(1): 1-9.
102. Jou MJ. Melatonin preserves the transient mitochondrial permeability transition for protection during mitochondrial Ca(2+) stress in astrocyte. *Journal of pineal research.* 2011; 50(4): 427-35.
103. Tain YL, Kao YH, Hsieh CS, et al. Melatonin blocks oxidative stress-induced increased asymmetric dimethylarginine. *Free radical biology & medicine.* 2010; 49(6): 1088-98.
104. Ersahin M, Sehirli O, Toklu HZ, Suleymanoglu S, Emekli-Alturfan E, Yarat A, et al. Melatonin improves cardiovascular function and ameliorates renal, cardiac and cerebral damage in rats with renovascular hypertension. *J Pineal Res.* 2009; 47(1): 97-106.
105. Landim MB, Dourado PM, Casella-Filho A, Chagas AC, da-Luz PL. High plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine inhibit ischemic cardioprotection in hypercholesterolemic rats. *Brazilian journal of medical and biological research.* 2013; 46(5): 454-9.
106. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Clinical aspects of melatonin in the acute coronary syndrome. *Curr Vasc Pharmacol.* 2009; 7(3): 367-73.
107. Lochner A, Huisamen B, Nduhirabandi F. Cardioprotective effect of melatonin against ischaemia/reperfusion damage. *Front Biosci (Elite Ed).* 2013; 5: 305-15.
108. Diez ER, Renna NF, Prado NJ, et al. Melatonin, given at the time of reperfusion, prevents ventricular arrhythmias in isolated hearts from fructose-fed rats and spontaneously hypertensive rats. *Journal of pineal research.* 2013; 55(2): 166-73.
109. Sahna E, Acet A, Ozer MK, Olmez E. Myocardial ischemia-reperfusion in rats: reduction of infarct size by either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin. *J Pineal Res.* 2002; 33(4): 234-8.
110. Sahna E, Olmez E, Acet A. Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: can the incidence of sudden cardiac death be reduced? *J. Pineal Res.* 2002; 32(3): 194-8.

111. Sokullu O, Sanioglu S, Kurc E, et al. Does the circadian rhythm of melatonin affect ischemia-reperfusion injury after coronary artery bypass grafting? *Heart Surg Forum*. 2009; 12(2): 95-9.
112. Deniz E, Sahna E, Aksulu HE. Nitric oxide synthase inhibition in rats: melatonin reduces blood pressure and ischemia/reperfusion-induced infarct size. *SCJ*. 2006; 40(4): 248-52.
113. Ormrod DJ, Harrison GL, Miller TE. Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J Pharmacol Methods* 1987; 18(2): 137-42.
114. Chen Z, Chua CC, Gao J, Hamdy RC, Chua BH. Protective effect of melatonin on myocardial infarction. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003; 284(5): 1618-24.
115. Vazan R, Pancza D, Beder I, Styk J. Ischemia-reperfusion injury--antiarrhythmic effect of melatonin associated with reduced recovering of contractility. *General physiology and biophysics*. 2005; 24(3): 355-9.
116. Kaneko S, Okumura K, Numaguchi Y, et al. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Life sciences*. 2000; 67(2): 101-12.
117. Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, AcetA. Protective Effects of Melatonin on Myocardial IschemiaReperfusion Induced Infarct Size and Oxidative Changes. *Physiol. Res*. 2005; 54: 491-495.
118. Kim EK, Hahn JY, Song YB, et al. Effect of ischemic postconditioning on myocardial salvage in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction: cardiac magnetic resonance substudy of the POST randomized trial. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2015; 31(3): 629-37.
119. Khan AR, Binabdulhak AA, Alastal Y, et al. Cardioprotective role of ischemic postconditioning in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J*. 2014; 168(4): 512-21.
120. Sahna E, Parlakpınar H, Ozer MK, et al. Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *J Pineal Res*. 2003; 35(4): 257-61.
121. Genade S, Ytrehus K, Lochner A. Melatonin prevents cardioprotection induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc J S Afr*. 2006; 17(5): 239-44.
122. Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, et al. Melatonin does not prevent the protection of ischemic preconditioning in vivo despite its antioxidant effect against oxidative stress. *Free radical biology & medicine*. 2004; 37(4): 500-10.
123. Iliodromitis EK, Zoga A, Vrettou A, et al. The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits. *Atherosclerosis*. 2006; 188(2): 356-62.

124. Donato M, D'Annunzio V, Berg G, et al. Ischemic postconditioning reduces infarct size by activation of A1 receptors and K⁺(ATP) channels in both normal and hypercholesterolemic rabbits. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2007; 49(5): 287-92.
125. Wagner C, Ebner B, Tillack D, Strasser RH, Weinbrenner C. Cardioprotection by ischemic postconditioning is abrogated in hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2013; 61(1): 35-41.
126. Penna C, Tullio F, Moro F, et al. Effects of a protocol of ischemic postconditioning and/or captopril in hearts of normotensive and hypertensive rats. *Basic research in cardiology*. 2010; 105(2): 181-92.
127. Li H, Zhou C, Chen D, Fang N, Yao Y, Li L. Failure to protect against myocardial ischemia-reperfusion injury with sevoflurane postconditioning in old rats in vivo. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 2013; 57(8): 1024-31.
128. Pichot S, Mewton N, Bejan-Angoulvant T, et al. Influence of cardiovascular risk factors on infarct size and interaction with mechanical ischaemic postconditioning in ST-elevation myocardial infarction. *Open heart*. 2015; 2(1): e000175.
129. Zhou C, Yao Y, Zheng Z, et al. Stenting technique, gender, and age are associated with cardioprotection by ischaemic postconditioning in primary coronary intervention: a systematic review of 10 randomized trials. *European heart journal*. 2012; 33(24): 3070-7.
130. Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, et al. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nature genetics*. 2011; 43(6): 595-600.
131. Zhu SG, Xi L, Kukreja RC. Type 2 diabetic obese db/db mice are refractory to myocardial ischaemic post-conditioning in vivo: potential role for Hsp20, F1-ATPase delta and Echs1. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012; 16(4): 950-8.
132. Zhu BQ, Sun YP, Sievers RE, et al. Exposure to environmental tobacco smoke increases myocardial infarct size in rats. *Circulation* 1994; 89: 1282–90.
133. Robinson K, Conroy RM, Mulcahy R. Smoking and acute coronary heart disease: a comparative study. *Br Heart J* 1988; 60: 465–9.
134. Bugger H, Guzman C, Zechner C, Palmeri M, Russell KS, Russell RR, 3rd. Uncoupling protein downregulation in doxorubicin-induced heart failure improves mitochondrial coupling but increases reactive oxygen species generation. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2011; 67(6): 1381-8.
135. Tano S, Horiki N, Omata F, et al. Second and third-look endoscopy for the prevention of post-ESD bleeding. *Medicine*. 2015; 94(6): e491.

136. Wang GX, Zhao XY, Lin JD. The brown fat secretome: metabolic functions beyond thermogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2015; 26(5): 231-7.
137. Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Koziel A, et al. Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction. *Pharmacological reports : PR*. 2015; 67(4): 704-10.
138. Wu Y, Wan J, Zhen WZ, et al. The effect of butorphanol postconditioning on myocardial ischaemia reperfusion injury in rats. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2014; 18(3): 308-12.

8. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Samsun/ Vezirköprü' de doğdu. 2010 yılında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldu ve Vezirköprü Devlet Hastanesinde çalışmaya başladı. 2012 yılında Isparta Devlet Hastanesinde 9 ay çalıştı. 2013 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa ve Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesinde çalışmaya başladı ve aynı hastaneye çalışmaya devam etmektedir.