

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA, Na⁺/H⁺ ZİT TRANSPORT İNHİBİSYONU
VE KARNOZİN UYGULAMASININ, KALP
İSKEMİ/REPERFÜZYONUNDA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ**

**Hazırlayan
Kalender ÖZDOĞAN**

**Danışman
Prof.Dr.Nurcan DURSUN**

Doktora Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSD-11-3715 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2015
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Kalender ÖZDOĞAN

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Sıçanlarda, Na^+/H^+ Zıt Transport İnhibisyonu ve Karnozin Uygulamasının, Kalp İskemi/Reperfüzyonunda İyileştirici Etkisi” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Kalender ÖZDOĞAN

Danışman
Prof.Dr.Nurcan DURSUN

Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr. Asuman GÖLGELİ

Prof. Dr. Nurcan DURSUN danışmanlığında **Kalender ÖZDOĞAN** tarafından hazırlanan “**Sıçanlarda, Na⁺/H⁺ Zıt Transport İnhibisyonu ve Karnozin Uygulamasının, Kalp İskemi / Reperfüzyonunda İyileştirici Etkisi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji Anabilim Dalı**’nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

10 /06 / 2015

JÜRİ**İmza**

Danışman : Prof.Dr. Nurcan DURSUN
(Fizyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Cem SÜER
(Fizyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Doç. Dr. Hasan Basri ULUSOY
(Farmakoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Selim KUTLU
(Necmettin Erbakan Üni. Fizyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Leyla ŞAHİN
(Mersin Üni. Fizyoloji Anabilim Dalı)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ilgi, bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen öğrencilerini evladı gibi gören emeklerini ödeyemeyeceğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nurcan DURSUN' a,

Bilimsel konularda olsun, kişisel konularda olsun tüm sorunlarımızı dinleme ve çözme noktasında çekinmeden yanına gidebileceğimiz, ikinci danışman hocam diyebileceğim Sayın Prof. Dr. Cem SÜER ve Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU hocalarıma,

Deneylerin yapılması noktasında hiçbir emeğini esirgemeyen Fizyoloji bölümündeki değerli kardeşlerim Sinan HAMARAT, Araş. Gör. Burak TAN ve Melek BATAKCI'ya Biyokimyasal ölçümlerdeki desteklerinden ve bu konulardaki becerilerini bizlerle paylaşmaktan sakınmayan değerli arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Fazile CANTÜRK'e

Uyumlu bir çalışma ortamı sağlayarak destekte bulunan değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Sami AYDOĞAN, Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ, Prof. Dr. Nazan DOLU ve Prof. Dr. Bekir ÇOKSEVİM'e,

Hayatımın her anında sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen Canım Eşime, Anneme, Babama ve Kardeşlerime sonsuz teşekkürler...

SIÇANLARDA, Na^+/H^+ ZIT TRANSPORT İNHİBİSYONU VE KARNOZİN UYGULAMASININ, KALP İSKEMİ/REPERFÜZYONUNDA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ

Kalender ÖZDOĞAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Haziran 2015

Danışman: Prof. Dr. Nurcan DURSUN

ÖZET

Kalp dokusunda iskemi-reperfüzyonun (İ/R) neden olduğu kontraktür ve ona bağlı hücre ölümlerinin nedeni hücre içi artan H^+ iyonu ve buna bağlı Na^+-H^+ değiştiricinin (NHE1) aktive olmasıdır. Karnozin (KAR) hem antioksidan özelliği hem de hücre içi iyi bir H^+ tamponlayıcı olması nedeni ile İ/R hasarını azaltmaktadır. Çalışmanın amacı, İ/R geliştirilen sıçan kalplerinde NHE1 inhibitörünün (kariporid, KRP) kalp hücre fonksiyon ve biyokimyasına etkisini araştırmak, KAR ile birlikte NHE1 inhibitör verilmesinin, KAR'ın kardiyoprotektif etkisinde H^+ tamponlayıcı rolünün önemini ortaya koymaktır.

Çalışma, izole kalp dokusunda global İ/R geliştirilen (kontrol, KONT, n=15), reperfüzyon esnasında KRP verilen (10 $\mu\text{m/L}$, Krebs-Henseleit solusyonu içerisinde) (KRP, n=15), 2 hafta KAR verildikten sonra (200mg/kg/gün, i.p.) kalp dokularına reperfüzyon esnasında KRP verilen (KAR+KRP, n=15) ve 2 hafta KAR verildikten sonra (200mg/kg/gün, i.p.) İ/R yapılan (KAR, n=15) olmak üzere 4 grupta yapılmıştır. Her grupta 6 olmak üzere 4 grubun kalp dokularında sol ventrikül sistolik basınç (SVSB) ve sol ventrikül diyastol sonu basınçları (SVDSB) ölçülmüştür. Sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG), sol ventrikül maksimum-minimum basınç değişim hızı ($\pm\text{dP/dt}$), yukarıdaki parametrelerden hesaplanarak elde edilmiştir. Aynı kalplerde nekrotik alan ölçülmüştür. Ayrıca her grubun 9 hayvanının kalplerinde EKG parametreleri kayıtlanmış, daha sonra bu kalpler homojenize edilerek malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve mitokondriyal ATP miktarı ölçülmüştür.

KRP uygulaması KONT grubuna göre MDA'da azalmaya ($p<0.003$), SOD ve KAT aktivitesinde artışa (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.006$) neden olmuştur. Mitokondriyal ATP miktarında azalma gelişmiş olmasına rağmen nekrotik alan KRP uygulaması ile azalmıştır ($p<0.001$). İki hafta KAR verildikten sonra kalp dokularına reperfüzyon esnasında KRP verilen (KAR+KRP) grupta ise MDA'daki azalma daha da fazla olmuş, SOD ve KAT aktivitesinde azalma gelişmiştir. Yine mitokondriyal ATP üretimi daha da azalmış buna rağmen nekrotik alan sadece KRP verilen gruba göre daha fazla azalmıştır ($p<0.001$). KRP uygulamasının olumlu etkileri ventrikül basınç ve EKG bulgularına tam olarak yansımamıştır. Sadece KAR verilen grupta KONT a göre İ/R esnasında gelişen oksidan stres daha az, antioksidan savunma ise daha fazla gelişmiştir. Mitokondriyal ATP üretimi KONT'dan önemli oranda artış göstermiştir ($p<0.001$). Bu olumlu etkilere bağlı olarak İ/R esnasında nekrotik alan gelişmemiştir. Karnozinin İ/R esnasında yapmış olduğu bu olumlu etkiler ventrikül fonksiyonu ve EKG'sine de olumlu şekilde yansımıştır.

Sonuç olarak KRP, İ/R esnasında kalp hasarlanmasını azaltmış, KAR ile birlikte verilmesi ise bu etkisini artırmamıştır. KAR'ın tek başına olan yararlı etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Na^+/H^+ değiştirici 1 (NHE1), İskemi/reperfüzyon, Karnozin, Mitokondriyal ATP, Kalp, Oksidan-Antioksidan

**THE Na⁺/H⁺ COUNTER TRANSPORT INHIBITION AND CARNOSINE
TREATMENT, CARDIAC ISCHEMIA / REPERFUSION INJURY HEALING EFFECT
IN RATS**

Kalender ÖZDOĞAN

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Physiology

Doctorate Thesis, June 2015

Supervisor: Prof. Dr. Nurcan DURSUN

ABSTRACT

Increased H⁺ ion concentration and the activation of Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) are the causes of contracture and cell deaths induced by ischemic reperfusion (I/R) injury of the heart. Carnosine (CAR) decreases the I/R injury because it's a good antioxidant and can buffer H⁺ ions. The aim of this study is to investigate the effect of the NHE inhibitor (Cariporide, CRP) on the function and biochemistry of cardiac cells and to reveal the importance of the buffering of H⁺ ion in cardioprotective effect of the combination of CAR and NHE1 inhibitor in the I/R injury of the heart in rats.

The study includes four groups: first one is the control group with global I/R in isolated cardiac tissue (Control, CONT, n=15), second group was given cariporide (10µm/L, in Krebs-Henseleit solution) during reperfusion (CRP, n=15), third group was given carnosine (200 mg/kg/day, i.p.) for two weeks before I/R and was given cariporide (10µm/L) during reperfusion (CAR+CRP, n=15) and fourth group was given carnosine (200 mg/kg/day, i.p.) for two weeks before I/R (CAR, n=15). In cardiac tissues of 6 rats in each group, left ventricular systolic pressure (LVSP) and left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) were measured. Left ventricular developed pressure (LVDP) and the maximum-minimum rates of change in left ventricular pressure (±dP/dt), were obtained by using above parameters. Necrotic area was measured in the same cardiac tissues. Besides, ECG parameters heart of 9 animals in each group were recorded. Then the hearts of these animals were homogenized and malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and mitochondrial ATP levels were measured.

The application of CRP caused a decrease in MDA (p<0.003), and an increase in the activity of SOD and CAT (respectively p<0.001, p<0.006) with respect to the CONT group. Although there is a decrease in the amount of mitochondrial ATP, necrotic region decreased with CRP application (p<0.001). In the rats that were given cariporide during reperfusion after carnosine treatment for two weeks before I/R (CAR+CRP), the decrease in MDA became larger, the decrease in the activities of SOD and CAT improved (p<0.001). Even though the mitochondrial ATP generation decreased further again, necrotic region decreased compared to the only CRP given group. The positive effects of CRP application has not been completely observed on ventricle pressure and ECG results. Only in CAR given group compared to CONT, the oxidant stress which emerges during I/R developed less and antioxidant defense developed more. Mitochondrial ATP generation significantly increased compared to CONT group (p<0.001). Due to these positive effects, necrotic region has not developed during I/R. These positive effects caused by carnosine during I/R has affected the ventricle function and ECG positively. As a result, CRP has decreased the damage to the heart during I/R; but giving it together with CAR has not increased its effect further. The positive effect of CAR has been observed more on its own.

Keywords: Na⁺/H⁺ exchanger-1, Ischemia/Reperfusion, Carnosine, Mitochondrial ATP, Heart, Oxidant-Antioxidant

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. MİYOKARDİYAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI.....	5
2.1.1. İskemik Hasarın Mekanizmaları	6
2.1.2. Reperfüzyon Hasarının Mekanizması	8
2.2. Na ⁺ /H ⁺ DEĞİŞTİRİCİ PROTEİNLERİN REGÜLASYONU ALTINDA	
YATAN MEKANİZMALAR.....	10
2.2.1. İntrasellüler pH (pHi).....	10
2.2.2. Bazı Organellerdeki pH.....	11
2.3. pH REGÜLASYONUNUN MEKANİZMASI.....	12
2.3.1. Fizyokimyasal Tamponlama	12
2.3.2 pH Regülasyonunda Rol Alan İyon Transport Mekanizmaları.....	13
2.4. MİYOKARDİYUMLARDAKİ İNTRASELLÜLER pH (pHi)	14
2.4.1. Miyokardiyumdaki pHi Regülasyonu	15
2.4.2. Miyokardiyal iç pH'nın Patofizyolojisi	17
2.5. Na ⁺ /H ⁺ DEĞİŞTİRİCİLER (NHE)	17
2.5.1. Yapısal Özellikleri	18
2.5.2. NHE Farklılığı, Doku Dağılımı ve Karakteristikleri	19
2.5.3. Farmakolojik İnhibisyonu	19
2.6. Na ⁺ /H ⁺ DEĞİŞTİRİCİ İZOFORM 1 (NHE1).....	19
2.6.1. NHE1 Aktivitesinin Regülasyonu.....	20
2.6.2 NHE1 ve Kalp	21
2.6.2.1. Miyokardiyum İçindeki Regülasyonu.....	21
2.6.2.2. İskemi/Reperfüzyon (I/R) Hasarındaki Rolü	22
2.6.2.3. NHE1 ve Hipertansiyon	23
2.6.2.4. Kalp Hipertrofisi ve Konjestif Kalp Yetmezliğinde NHE1	23
2.7. KARNOZİN	24
2.7.1. Karnozinin Tanımı, Yapısı, Sentez ve Yıkım Aşamaları.....	24
2.7.1.1 Tanımı ve Kimyasal Yapısı.....	24
2.7.1.2. Karnozin Metabolizması	25

2.8. KARNOZİNİN OLASI FONKSİYONLARI	28
2.8.1. Tamponlayıcı Aktivitesi ve pH'nın Kontrolü	28
2.8.2. Metal İyon Şelatlama Özeliği	29
2.8.3. Antioksidan Aktivitesi	29
2.8.4. Membran Koruyucu Özellikleri	30
2.8.5. Diğer Biyolojik Etkileri	30
2.9. KARNOZİN METABOLİZMASINDA ROL ALAN ENZİMLER VE TRANSPORT PROTEİNLERİ.....	31
2.9.1. Karnozin Sentaz	31
2.9.2. Karnozin N-Metiltransferaz	31
2.9.3. Karnozinaz	31
2.9.4. Karnozin Transport Proteinleri	32
2.9.4.1. <i>PEPT1</i> ve <i>PEPT2</i>	32
2.9.4.2. <i>PHT1</i> ve <i>PHT2</i>	33
2.10. KARNOZİNİN KARDİYOVASKÜLER FONKSİYONU	33
2.10.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Karnozin	34
2.11. ANESTEZİ ALTINDAKİ SIÇANDA HEMODİNAMİK ÖLÇÜMLER	36
2.11.1. Langendorff Kalp Modeli	36
2.11.2. Preparatın Hazırlanması	36
2.11.3. Perfüzyon Solüsyonunun Hazırlanması	38
2.11.4. Perfüzyon Akım İlişkisi	38
2.12. TETRAZOLYUM METODU İLE İNFARKT ALAN ÖLÇÜLMESİ	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. DENEY GRUPLARI	41
3.2. LANGENDORFF SİSTEMİ İLE HEMODİNAMİK PARAMETRELERİN ÖLÇÜMÜ	42
3.3. NEKROTİK ALAN BELİRLEME.....	47
3.4. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN ÖLÇÜMÜ.....	48
3.4.1. Kalp Preparatlarının Biyokimyasal Ölçümler İçin Hazırlanması	48
3.4.2. ATP Ölçümü	48
3.4.3. Protein Miktarının Tayini.....	48
3.4.4. Enzim Aktivitelerinin Tayini	50
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. KARİPORİDİN İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINI AZALTMA ETKİSİNDE KARNOZİNİN ROLÜ	56
4.1.1. Sol Ventrikül Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi.....	56
4.1.2. EKG Parametrelerinin Değerlendirilmesi	60
4.1.3. Biyokimyasal Analizler.....	63
4.1.4. Nekrotik Alan Değerlendirilmesi.....	66

4.2. Karnozinin İskemi Reperfüzyon Hasarına Etkisi.....	67
4.2.1. Sol Ventrikül Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi.....	67
4.2.2. EKG Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	71
4.2.3. Biyokimyasal Analizler.....	73
4.2.4. Nekrotik Alan Değerlendirilmesi.....	76
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	77
6. KAYNAKLAR	84

ETİK KURUL BELGESİ

ÖZGEÇMİŞ

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. İzole sıçan kalbinde Mİ süresince gerçekleşen olaylar.	7
Tablo 2.2. Sıçan dokularındaki histidin içeren dipeptitlerin profili.	25
Tablo 3.1. Bradford standartlarının hazırlanması.....	49
Tablo 3.2. Ohkawa ve ark. geliştirdiği metoda göre MDA tayininde kullanılan kimyasallar.	51
Tablo 3.3. Sun ve ark. geliştirdiği metoda göre SOD tayininde kullanılan deney karışımı.....	52
Tablo 3.4. Aebi ve ark. geliştirdiği metoda göre KAT tayininde kullanılan deney karışımı	54
Tablo 4.1.1a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB), sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB) ve sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG) ölçümlerine ait veriler.	58
Tablo 4.1.1b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç değişim hızı (+dP/dt) ve minimum basınç değişim hızı (-dP/dt).	60
Tablo 4.1.2a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen EKG parametrelerinin değerlendirilmesi.	62
Tablo 4.1.2b. R amplitüd değerlendirmesi.....	62
Tablo 4.1.3a. MDA seviyesi, SOD ve KAT aktivitelerinin biyokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	65
Tablo 4.1.3b. ATP miktarının biyokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	66
Tablo 4.1.4. Kalp dokusunda meydana gelen nekrotik alan %'si	66
Tablo 4.2.1a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB), sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB) ve sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG) ölçümlerine ait veriler.	69
Tablo 4.2.1b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç değişim hızı (+dP/dt) ve minimum basınç değişim hızı (-dP/dt).	70
Tablo 4.2.2a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen EKG parametrelerinin değerlendirilmesi.....	72
Tablo 4.2.2b. R amplitüd değerlendirmesi.....	73
Tablo 4.2.3a. MDA seviyesi, SOD ve KAT aktivitelerinin biyokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	75
Tablo 4.2.3b. ATP miktarının biyokimyasal olarak değerlendirilmesi.....	75
Tablo 4.4. Kalp dokusunda meydana gelen nekrotik alan %'si	76

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Langendorff kalp modelinde iskemi/reperfüzyon olayının şematize edilmesi ve sırasıyla iskemi/reperfüzyon hasarının mekanizmaları	6
Şekil 2.2. Reperfüzyon başlangıcında kardiyomiyositlerde değişmiş Ca^{+2} kullanımının mekanizmaları ve sonuçları.....	8
Şekil 2.3. Kardiyak miyosit hücresi içerisindeki pH regülasyonuna ait şematik diyagram.....	15
Şekil 2.4. Memelilere ait Na^{+}/H^{+} değiştirici ailesine ait taşıyıcıların genetik farklılığı ve membran dağılımının filogenetik ağaçta gösterimi.	18
Şekil 2.5. NHE1 proteininin şematik gösterimi.	21
Şekil 2.6. β -alanin-L-histidin yapısındaki histidin türevi dipeptitlerin kimyasal yapısı.	24
Şekil 2.7. KAR'ın sentez ve yıkımı	26
Şekil 2.8. Karnozin ve analoglarının metabolizması	27
Şekil 2.9. Histidin İçeren dipeptitlerin bağırsaklardan emilimindeki olası yolak.....	32
Şekil 2.10. Langendorff düzeneği kuruluş şeması	37
Şekil 3.1. Deney protokolünün şematik gösterim.....	42
Şekil 3.2. BSA standartlarından elde edilen grafik.....	50
Şekil 3.3. MDA standartlarından elde edilen grafik	52
Şekil 4.1.1.a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB).	57
Şekil 4.1.1.b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB).	57
Şekil 4.1.1.c. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG).	58
Şekil 4.1.1.d. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç değişim hızı ($+dP/dt$).	59
Şekil 4.1.1.e. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül minimum basınç değişim hızı ($-dP/dt$).	59
Şekil 4.1.2a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen QRS kompleksi.	60
Şekil 4.1.2b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen QTc (düzeltilmiş QT) intervali.	61
Şekil 4.1.2c. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen ST intervali	61
Şekil 4.1.2d. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen R amplitüdü.....	62
Şekil 4.1.3a. Gruplar arası MDA seviyesi	63
Şekil 4.1.3b. Gruplar arası SOD aktivitesi	64
Şekil 4.1.3c. Gruplar arası KAT aktivitesi.....	64
Şekil 4.1.3d. Gruplar arası mitokondriyal ATP miktarı	65
Şekil 4.1.4. İskemi/ eperfüzyon sonrası alınan kalp dokularındaki nekrotik alan %'si..	66
Şekil 4.2.1a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB).	67
Şekil 4.2.1b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB).....	68

Şekil 4.2.1c. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG).	68
Şekil 4.2.1d. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç değişim hızı (+dP/dt).	69
Şekil 4.2.1e. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül minimum basınç değişim hızı (-dP/dt).	70
Şekil 4.2.2a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen QRS kompleksi.	71
Şekil 4.2.2b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen QTc (düzeltilmiş QT) intervali.	71
Şekil 4.2.2c. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen ST intervali.	72
Şekil 4.2.2d. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen R amplitüdü.	73
Şekil 4.2.3a. Gruplar arası MDA seviyesi	74
Şekil 4.2.3b. Gruplar arası SOD aktivitesi	74
Şekil 4.2.3c. Gruplar arası KAT aktivitesi.	74
Şekil 4.2.3d. Gruplar arası mitokondriyal ATP miktarı;	75
Şekil 4.2.4. İskemi / reperfüzyon sonrası alınan kalp dokularındaki nekrotik alan %'si.	76

RESİM LİSTESİ

Resim 2.1. Tetrazolyum ile boyanmış kalplerde infarkt alan gösterimi.	40
Resim 3.1. Langendorff sistemine sabitlenmiş izole kalp preparatı.	43
Resim 3.2. Laboratuvarımızdaki Langendorff perfüzyon sisteminin genel görünümü.	44
Resim 3.3. Sol ventrikül içi basınç ölçümünde kullanılan balon ve sabitleme aparatı ..	44
Resim 3.4. BSL MP 30 sistemi ve bu sisteme ait voltaj stimülatörü	45
Resim 3.5. MP30 sistemi ile alınan sol ventrikül parametrelerini gösteren kayıt.	45
Resim 3.6. EKG kaydı için elektrot yerleştirilmiş izole kalp preparatı.	46
Resim 3.7. MP30 sistemi ile sıçanlardan alınan bipolar EKG kaydı.	46
Resim 3.8. TTC ile boyama yapılmadan önce ve sonraki kalp kesitlerinin görünümü.	47

KISALTMALAR

AE	:Cl-/HCO ₃ -2 değiştirici (anyon değiştirici)
CA	:Karbonik anhidraz
CHE	:Cl-/OH- değiştirici
EKG	:Elektrokardiyografi
H⁺	:Hidrojen iyonu
HCO⁻³	:Bikarbonat iyonu
I/R	:İskemi-reperfüzyon
KRP	:Kariporid
KAR	:Karnozin
KAT	:Katalaz
KMT	:Karnozin N-Metiltransferaz
KN	:Karnozinaz
KS	:Karnozin sentaz
MCT	:Monokarboksilik asit taşıyıcı
MDA	:Malondialdehit
Mİ	:Miyokardiyal iskemi
mtPTP	:“mitokondriyal permeability transition pore”
NBC	:Na ⁺ -HCO ⁻³ birlikte taşıyıcı
NCX	:Na ⁺ /Ca ⁺² değiştirici
NHE1	:Na ⁺ -H ⁺ değiştirici
OH⁻	:Hidroksil iyonu
PEPT	:Oligopeptit taşıyıcı
pHi	:İntrasellüler pH
PHT	:Peptit/histidin taşıyıcılar
ROT	:Reaktif oksijen türleri
SERCA	:Sarkoplazmik retikulum Ca ⁺² ATP az
SOD	:Süperoksit dismutaz
SR	:Sarkoplazmik retikulum
SVBG	:Sol ventrikül basınç gelişimi
SVDSB	:Sol ventrikül diyastol sonu basınç
SVSB	:Sol ventrikül sistolik basınç
TTC	:Trifenil tetrazolyum klorid
+dP/dt	:Sol ventrikül maksimum basınç değişim hızı
-dP/dt	:Sol ventrikül minimum basınç değişim hızı
SS	:Standart sapma

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İntrasellüler pH (pHi) homeostazı hücrenin hayatta kalması için son derece önemlidir (1). pH değişiklikleri, kas kasılması, hücre-hücre etkileşimi, membran potansiyeli ve iletkenliğinin yanı sıra, hücre metabolizma, hücre büyüme-çoğalması ve hücre hacim regülasyonundaki değişiklikler gibi hemen hemen tüm hücresel süreçlerden sorumludur (2-6). Özellikle pH değişikliklerinden çok kolay etkilenen proteinlerin güçlü bir şekilde iyonlaşması onların tersiyer-kuarterner yapılarını etkiler ve herhangi bir değişiklik, proteinin fonksiyonunu kolay bir şekilde bozabilir (7). pHi, hem aktin filamentlerinin çapraz bağlanmaları hem de tübülün polimerizasyonunu etkilediği için hücre bütünlüğünü düzenlemede de ana regülatördür (8). İntrasellüler H^+ iyon miktarı yükseldiği zaman mitokondriyal Ca^{+2}/H^+ değiştirici pompa aktive olur. Bunun sonucu olarak sitoplazma içindeki Ca^{+2} seviyesi yükselir (9). Ayrıca pH değişiklikleri elektrolit dengesini etkilediğinde (özellikle Na^+ , Cl^- ve K^+ iyonları) fizyolojik bozulma gözlenebilir (6). İyon kanalları, iyon iletkenliği ve kanal açılıp kapanması için en uygun intrasellüler ve ekstrasellüler pH'ya ihtiyaç duyar. pH'daki sapmalar membran potansiyelini değiştirebilir ve sinir-kas hücrelerinin uyarılabilirliklerini etkiler (6, 10-12). Pek çok hücre içi mesajcı ve sinyal yolları da yine pHi'deki değişikliklerden etkilenir (13). Hücre çoğalmasına ön ayak olmada pHi'nin rolü aktif bir araştırma alanı olmuştur (6). Ayrıca sitozolik pH'daki artış birçok farklı doku hücrelerinin farklılaşması ile bağlantılı olup, kanserin farklı bir etkeni olabilmektedir (14). Normalin 0.3-0.4 altında olan asidik pH'nın apoptozu tetiklediği gösterilmiştir.

Hücre içi pH'sını korumak zorunda olan, farklı pH içeriğine sahip birçok organel mevcuttur. pHi'deki bu farklılıklar organellerin düzgün çalışması, hücrenin hayatta kalması, fonksiyonu ve çoğalması için hayati bir öneme sahiptir (10, 15). Mitokondriyal matriks oldukça alkalidir. Bunun sebebi mitokondri iç membranındaki elektron taşıma zincirinde rol alan proteinlerin dışarı H^+ atmasıdır (15-17). pHi'nin tam olarak rolü ve

belli başlı mekanizmalar açık olmamasına rağmen mitokondrinin pH'sındaki değişiklikler, mitokondri bağımlı apoptoz gelişiminin başlangıcındaki olaylarla bağlantılıdır.

Fizyolojik tamponlar ve asit-baz taşıyıcılar, bir dizi sinyal dönüşüm yolakları ve pH regülasyonunda rol alan taşıyıcıları modüle eden yardımcı proteinler pH'nın düzenlenmesinde rol oynamaktadır (18). Vücudumuzda  önemli hücre tampon sistemi mevcuttur. Bunlar fosfat, bikarbonat ve protein tampon sistemleridir. *Fosfat tampon sistemi*, önemli bir intrasellüler tampon sistemdir. *Bikarbonat tampon sistemi*, pHi regülasyonunda önemli bir role sahiptir. Ekstrasellüler ortamda CO₂'nin sınırsız bir kaynağı olarak rol alır, ayrıca bu sistemin bileşenlerini (CO₂ ve HCO₃⁻) regüle eder. (19). Son olarak *protein tampon sistemleri* ise tüm intrasellüler fizyokimyasal tampon kapasitesinin % 75 kadarından sorumludur. Ayrıca proteinler, pek çok iyonlaşabilir gruplar içerir, özellikle de histidin türevi (karnozin gibi) proteinlerdeki imidazol grupları bu şekildedir (20, 21).

pH'daki akut değişiklikler, çeşitli tampon sistemlerce minimize edilmesine rağmen, kronik veya büyük değişikliklerden pH homeostazının korunmasında asit baz konsantrasyonlarını kontrol etmek için kompleks mekanizmalar geliştirilmiştir. Protonların (H⁺) veya bazların (HCO₃⁻) hücre membranından alınması veya atılması birçok taşıyıcı sistemin karşılıklı etkileşimi ile gerçekleştirilir (19).

Kalpde, pHi'yi nötral aralığa yakın değerlerde korumak için asit ve bazların metabolik dalgalanmalarıyla hızlı bir şekilde başa çıkmak için karmaşık bir sistem geliştirilmiştir (22-24). İntrasellüler pH'daki dalgalanmalara karşı ilk savunma hattı intrasellüler tamponlamadır. Bu, başlıca proteinler üzerindeki histidin kalıntıları (rezidüleri) (insinrik tamponlama) ve CO₂/HCO₃⁻ tampon sistemi aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Sarkolemmada bulunan beş iyon taşıyıcı protein, membrandan H⁺'li iyonları (H⁺, OH⁻ ve HCO₃⁻) taşıyarak pH'nın düzelmesine aracılık ederler. Bu taşıyıcılardan, asit çıkışını sağlamak için Na⁺-H⁺ değiştirici (NHE) ve Na⁺-HCO₃⁻ birlikte taşıyıcı (NBC) proteinleri işlev yaparken, asit yüklemeden ise *anyon değiştirici* (AE) ve Cl/OH değiştirici (CHE) proteinler sorumludur. Beşinci değiştirici protein ise *monokarboksilik asit taşıyıcı* (MCT) olup, her iki yönde de çalışabilir (22, 25-27).

Fizyolojik olarak pHi hareketliliğine hem mobil hem de sabit tamponlar aracılık etmektedir. Proteinler, H⁺ difüzyonunu kısıtlayan moleküler ağırlıklarından dolayı çok

düşük intrasellüler hareketliliğe sahiptir (27). Hücre içindeki bu H^+ 'leri hücre içinden dışarı, dışarıdan içeri mekik dokuma şeklinde taşınması için mobil tamponlar olarak görev yapan düşük moleküler ağırlıklı sitoplazmik H^+ taşıyıcılar mevcuttur. Kalbin kendine özgü mobil tamponlarının çoğu, histidin dipeptitler veya histidin içeren dipeptitlerdir. Bu küçük moleküller (asetilkarnozin, anserin ve homokarnozin) fizyolojik aralığa yakın bir pKa değerine sahiptir. Sitoplazma ve sarkolemma arasında H^+ iyonlarını mekik gibi taşırlar (28, 29).

Intrasellüler pH'nın dalgalanmaları kalpte sürekli gözlenmesine rağmen, önemli düzeydeki asidoz durumu, pHi'nin yaklaşık 6.5'e düştüğü miyokardiyal iskemi (Mİ) gibi patofizyolojik durumlar süresince gözlenebilir (30, 31).

İskemi periyodu süresince gelişen hafif düzeydeki bir asidoz hücre içerisine Ca^{+2} girişinde azalma meydana getireceği ve mitokondride aşırı kalsiyum birikimini önleyeceği için avantaj sağladığı bildirilmiştir. Reperfüzyon veya yeniden oksijenlenme esnasında NHE aracılığıyla Na^+ 'nın hücre içerisine, bunu takiben Na^+/Ca^{+2} değiştirici (NCX) ters çalışarak hücre içine Ca^{+2} 'yı, hücre dışına Na^+ taşınması gerçekleşir. Böylece intrasellüler Ca^{+2} çok artar. Aşırı kalsiyum yüklenmesi sarkoplazmik retikulumdan (SR) spontan Ca^{+2} salınımına neden olur ve bu da ektopik atımlar ve kardiyak aritmilere yol açar. pHi'nin indüklediği Ca^{+2} aşırı yükü, ayrıca mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına neden olur (32).

NHE'ler, aşırı asit birikimine karşı hücreleri koruyan, membranda bulunan taşıma proteinlerinin büyük bir grubunu oluşturur (33). Bu değiştirici proteinler pHi regülasyonunun yanı sıra çeşitli hücresel fonksiyonlara katkı sağlamaktadır (34-36). Bunlar arasında hücre hacim regülasyonu, hücre çoğalması ve organellerin iyon - hacim homeostazı sayılabilir (37-39). NHE izoformları, genellikle farmakolojik ajanlara olan duyarlılıkları ile karakterize edilir (özellikle amilorid ve türevlerine). NHE1, amilorid türevi ajanlara en duyarlı olanıdır, NHE2 ise daha az duyarlıdır, NHE3-4-5 ise en az duyarlı olan gruptur (1, 3). NHE'lerin diğer farmakolojik inhibitörleri HOE694 ve HOE642'yi (KRP) içeren açılguanin bileşikleridir (40, 41). NHE1, bikarbonat taşıyıcılar ile birlikte pHi'nin normal değerinde tutulmasını sağlar, bunun yanında anyon değiştirici proteinler ve hücre içi sıvının osmozu aracılığıyla hücre içine giren Cl^- girişi ve onu takip eden Na^+ girişi ile hücre içerisindeki hacim artışlarını engeller. Bazı hücre tiplerinde NHE1 farklı bölgelerde bulunur ki bu bölgelerin hücre fonksiyonlarında

özelleşmiş rolleri olabilir. Örneğin kalp miyositlerindeki değiştirici, interkale disklere ve T tübüllere yoğun bir şekilde lokalize olmuştur (42). NHE1'in bir diğer fonksiyonu ise hücre çoğalması ve farklılaşması ile ilişkilidir. Kimyasal mutajenlerce NHE1'i eksik olan hücrelerin yanı sıra NHE1'den yoksun fare fibroblastlarında hem hücrelerin çoğalması (3, 4) hem de farklılaşmasındaki (43) yolların bozulduğu gösterilmiştir. Hücre çoğalmasından ayrı olarak NHE1'in diğer önemli bir fizyolojik rolü ise, apoptoz ve nekroz ile hücre ölümünü modüle etmesidir (34). Hücre ölümünü, osmotik stres ya da hücre içi pH'yı değiştirmek sureti ile indirek olarak ya da direk hücre ölüm yollarını aktive ederek yapmaktadır (44).

KAR'ın intrasellüler hidrojen iyon konsantrasyonunu düzenlemesi yönünde bir veya birden çok rolü olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. KAR etkin bir fizyolojik tampondur (45).

Çalışmanın amacı, İ/R geliştirilen sıçan kalplerinde NHE1 inhibitörünün (KRP, HOE642) kalp hücre fonksiyon ve biyokimyasına etkisini araştırmak, KAR ile birlikte NHE inhibitör verilmesinin, KAR'ın kardiyoprotektif etkisinde H^+ tamponlayıcı rolünün önemini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MİYOKARDİYAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

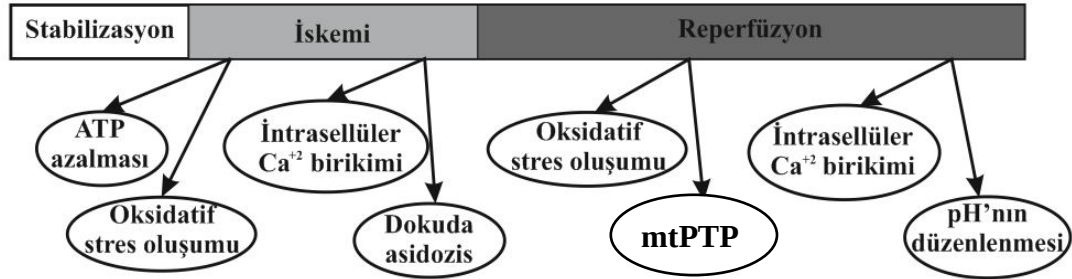
Miyokardiyal iskemi (Mİ), bir veya birden fazla koroner damarda meydana gelebilecek kısmi veya tam bir tıkanmaya bağlı olarak oluşur. Mİ, koroner kan akımının azalmasını takiben kalbin O₂ ve besin ihtiyacının karşılanamaması olayıdır. Bu olay sonunda, kalpte besin ve O₂ yetersizliğine bağlı olarak zararlı metabolizma maddelerinin ortamdaki yeterli oranda uzaklaştırılamaması ve organda kalıcı hasarların oluşması söz konusu olmaktadır. Mİ'nin nedeni olan tıkanma genellikle aterosklerotik plak oluşumunun tipik bir sonucudur (46).

İskemi ve/veya reperfüzyon süresi uzadıkça zaman, geri dönüşsüz hücre ölümlerinin meydana geldiği nekrotik alanlar oluşur (47). Nekrotik doku, kasılma aktivitesini gerçekleştiremez, nekrotik olmayan bölgeler bu durumu telafi etmeye çalışır. İnfarkt olmayan dokulara olan talebin artışı, kalp yetmezliği ve zararlı fonksiyonel değişikliklere sebep olabilir (48). Bu yüzden infarkt alanının oluşmasının önlenmesi veya sınırlandırılması çok önemlidir. Mİ'nin ilk tedavisi, iskemi sonrasında canlılığını sürdürebilecek dokuların kurtarılması için blokajın ortadan kaldırılması ile olur. Bu durum iskemik miyokardiyuma yeniden oksijenlenmiş kan girişinin gerçekleşmesiyle yani reperfüzyon ile olur.

Reperfüzyon, klinik olarak anjioplasti, trombolitik terapi ve *bypass* cerrahisi ile sağlanmaktadır (47). Geri dönüşsüz hücre ölümüne neden olan iskemi, reperfüzyon sayesinde geri dönüşümlü hasarlara sebep olabilir (48). Reperfüzyon iskemi tedavisi için temel unsurdur fakat reperfüzyon, iskemik hasardan farklı mekanizmalar ile dokuda hasar oluşumuna veya miyokardiyum ölümüne sebep olan bir ortam oluşturur (49). İskemiden dolayı meydana gelen hasar sonucu oluşan bileşikler, reperfüzyonda beklenmedik metabolik ve kimyasal değişikliklere sebep olacağı için hem iskemi hem de reperfüzyon miyokardiyal hasar ve infarkt alan oluşumundan sorumludur (49).

En önemlisi, iskemi ve reperfüzyon hasarı homojen değildir ve çok sayıda faktörün bir

araya gelmesiyle hasar ve infarkt alan oluşumu söz konusudur (50). Her iki olayda da hasar, kalsiyumun aşırı birikimi ve oksidatif streten kaynaklanmaktadır. Bunlar çok sayıda biyolojik moleküllerle etkileşim halindedir ve iskemi reperfüzyon hasarının ana yolaklarıdır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Langendorff kalp modelinde iskemi/reperfüzyon olayının şematize edilmesi ve sırasıyla iskemi/reperfüzyon hasarının mekanizmalarının gösterimi. ATP: Adenozin trifosfat, : Mitokondriyal permabilite transition por, pH: Hidrojenin gücü

2.1.1. İskemik Hasarın Mekanizmaları

Miyokardiyal iskemi, kardiyomiyositlerin normal performansı ve hayatta kalması için gerekli olan oksijen ve besinlerin azalması sonucu ortaya çıkmaktadır. Hücrel homeostaz, ATP miktarının regülasyonuna dayanmaktadır. Bu yüzden ATP'nin aerobik mekanizmalarca üretimi iskemik koşullar altında ciddi oranda azalmakta ve hücre anaerobik ATP üretiminden ihtiyacını gidermeye çalışmaktadır ancak aerobik üretime kıyasla ATP üretimi yetersizdir(51). Glikolizin yetersizliğini, inorganik fosfat, laktat ve H^+ 'nın aşırı miktarda artışı takip etmektedir (47). Uzun iskemi periyodu sürecinde anaerobik glikolizden yeterli enerji karşılanamaz ve meydana gelen asidik koşullarla bu durum bir araya geldiğinde kardiyomiyositlerin hasarlanması ve ölümüne sebep olabilir (47).

İskemi süresince bozulan ATP sentez hızı büyük oranda ATP bağımlı pompaların fonksiyonunda bozulmaya, bu durum da hücrel membrandaki iyonik durumlarda dengesizliklere sebep olur. Bu dengesizliğin ana etmeni sodyumun intrasellüler birikimi ve potasyumun ekstrasellüler ortama çıkışıdır. Bu durum hücrenin ozmotik olarak şişmesine ve sarkolemmada hasara sebep olur (47). Hücrel iyon dengesindeki bu bozukluk Na^+/K^+ ATP bağımlı pompanın ve intrasellüler asidoz ile aktifleşen Na^+/H^+ değiştirici proteininin bir etkisidir. Tüm iyon dengesizlikleri voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyonu ile kalsiyumun hücre içine girişine sebep olur. Bunun yanı sıra Na^+/Ca^{+2} değiştirici tersine çalışır. Yüksek enerjili fosfatların eksikliği SR'ye Ca^{+2}

alınmasında bozulmaya sebep olur ve sitozolik kalsiyumun daha da fazla birikmesine izin vermiş olur (47). Sitozolik Ca^{+2} 'daki artış, fosfolipazlar, proteazlar ve kalpainlerin aktivasyonuna neden olur, bunlarda iskemik kontraktürün yanı sıra membranda şişmeye bağlı olarak yırtılmalara ve hücrel hasarlara neden olmaktadır (47, 52). İskemik kontraktür, hücre içindeki ATP'nin eksikliği ve Ca^{+2} 'nın varlığı sonucunda olmaktadır, bu durum aktin miyozin çapraz köprü döngüsünde bozulma ve sol ventrikül diyastol sonu basıncında (SVDSB) belirgin bir artışa neden olmaktadır. Kontraktür, kardiyomiyositlerin hücre iskeletinin daha kırılgan ve mekanik hasarlardan kolay etkilenebilmesine sebep olabilir (Tablo 2.1.) (50).

Tablo 2.1. İzole sıçan kalbinde Mİ süresince gerçekleşen olaylar.

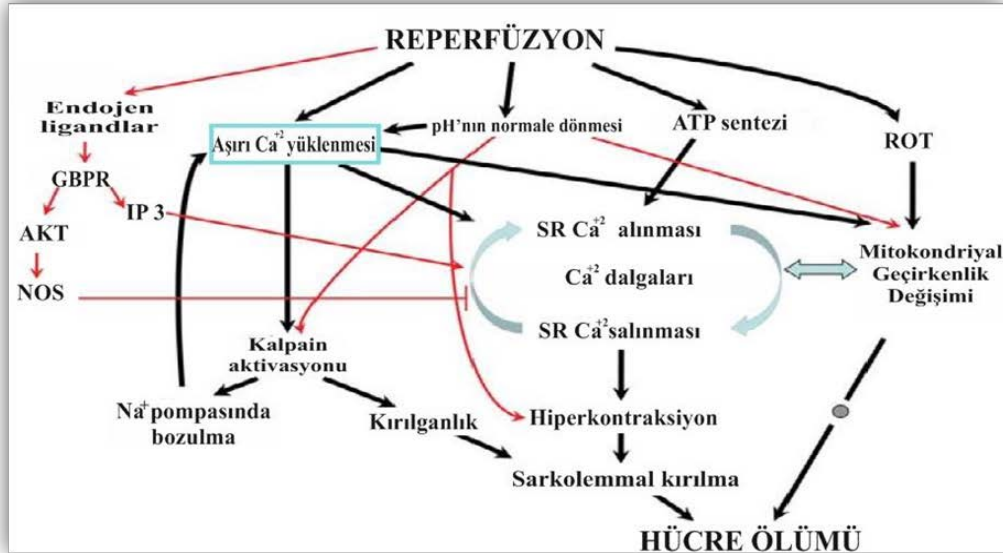
ZAMAN	SONUÇ
➤ 1-2. Dakika	➤ ATP seviyesi düşer; kasılma durur.
➤ 10. Dakika	➤ ATP % 50 tükenir; Hücrel ödem, membran potansiyelinde düşüş, hücre uyarılabilirliğinde artış ve aritmilere hassasiyet gelişir.
➤ 20-24. Dakika	➤ Geri dönüşümsüz hücre hasarı meydana gelir.

Hücrel sistemlerdeki iyon dengesinde bozukluklara ilaveten iskemi süresince meydana gelen reaktif oksijen türlerindeki (ROT) artışı da hücreye ağır hasarlar vermektedir. Oksidatif stres; lipidler, proteinler ve DNA içeren bir hücrenin tüm bileşenlerinde hasara sebep olabilir. Bunun sonucu olarak da miyokardiyumda fonksiyon bozukluklarında artış ve hem kalıcı hem de onarılabilir hasarlar ortaya çıkabilir. İskemi süresince meydana gelen ROT'un başlıca kaynakları, mitokondriyal elektron taşıma zinciri, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz sistemleridir (47). ROT, doğrudan iyon taşınımını, lipid peroksidasyonunda rol alan membran enzimlerini, pompaları ve protein kanallarını etkiler bu durumlarda membran geçirgenliğinde değişikliğe sebep olabilir (53). Ayrıca ROT, Ca^{+2} taşınmasında bozukluklara neden olabilir böylece iyon taşınması üzerine ATP'deki azalmanın olumsuz etkileri ortaya çıkar(54). ROT'lar Ca^{+2} ile uyarılan SR ve sarkolemmal Ca^{+2} ATPaz aktivitesini bozabilir, dolayısıyla SR içine veya hücre dışına Ca^{+2} taşınmasında azalma ve iskemik hücrede aşırı kalsiyum birikimi söz konusu olur (48, 55).

Hipertansif sıçanlarla (HS) yapılan çalışmalarda iskemiye yatkınlığın, Ca^{+2} taşınmasının düzenlenmesi, iyon homeostazı ve enerji metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (56). Sol ventrikül hipertrofisi bulunan HS'de iskemik kontraktürün başlangıçta daha hızlı ve daha geniş bir bölgede olduğu gösterilmiştir (57, 58). Enerji metabolizması, iskemi süresince daha az ATP ve kreatin fosfat içeriğine sahip olan HS'lerde normal sıçanlar ile karşılaştırıldığında farklılık göstermiştir (59, 60). İskemi süresince azalan antioksidan potansiyel ve hücre içindeki artmış Na^+ miktarı, iskemiye yatkınlığın artmasına katkı sağlamış olabilir (61).

2.1.2. Reperfüzyon Hasarının Mekanizması

İskemik bölgenin reperfüzyonu canlı dokunun geri kalan kısımlarının kurtarılması ve yeniden oksijenlendirilmesi için gereklidir. Reperfüzyon sürecinde iskemik miyokardiyumda öncelikli olarak kan akımının düzenlenmesi, mitokondrilerde yeniden enerji üretimi, pH'nın hızlı bir şekilde düzenlenmesi, oksidatif strese artış, inflamatuvar sinyal oluşumu, "mitokondriyal permeability transition pore" (mtPTP)'lerin açılması ve hiperkontraktüre sebep olan hücre içi kalsiyumun aşırı artışı gibi bir dizi olay meydana gelir (49) (Şekil 2.2.). Reperfüzyon hasarının patogenezi sürekli olarak araştırılmasına rağmen, sinyal yolları karmaşık ve tam olarak anlaşılamamıştır.



Şekil 2.2. Reperfüzyon başlangıcında kardiyomiyositlerde değişmiş Ca^{+2} kullanımının mekanizmaları ve sonuçları. Siyah oklar ana olayları göstermekte, kırmızı oklar ise önemli modüle edici faktörleri göstermektedir. **GBPR**; G-bağımlı protein reseptörler, **IP3**; İnoзитol trifosfat, **NOS**; Nitrik oksit sentaz, **ROT**; Reaktif oksijen türleri **AKT**; Protein Kinaz B

Reperfüzyon süresince mitokondri, iskemi süresince tükenmiş olan enerji depolarının yeniden dolması ve oksijen taşınımının yeniden eski haline dönmesiyle işlevsel hale dönmeye başlar. Böylece mitokondri yüksek oranda ROT üretir ve elektron taşıma zincirinden ROT'lar sızar (52, 62). Ayrıca asidik miyokardiyumdaki oksijenin hızlı artışı bir hidroksil radikal reaksiyonunu tetikler ve bu stres durumunda nitrik oksit salınımının azalması ile sonuçlanır. Yüksek miktardaki ROT; lipitler, proteinler ve DNA'ya zarar vererek hücrel hasara yol açar. Ayrıca ROT'lar apoptoza, SR'nin hasarlanmasına ve Ca^{+2} sızıntısına sebep olabilir. Bunların haricinde ROT'lar, reperfüzyon sonrasındaki kardiyomiyosit ölümüne aracılık eden nötrofilleri ve diğer inflamatuvar medyatörleri çeker (49).

Kalsiyum, reperfüzyon hasarının patogeneğinde önemli bir role sahiptir. Reperfüzyon esnasında iskemiden kaynaklanan yüksek sitozolik Ca^{+2} seviyesinin nedeni;

- ❖ Yeniden enerjilenmiş membran taşıyıcı proteinleri üzerinden ani Ca^{+2} girişi (49),
- ❖ Kontrol edilemeyen miyofibriler aktivasyonun neden olduğu hasarlanmış SR'de meydana gelen Ca^{+2} salınımlarıdır (63).

Ayrıca SR'de reperfüzyonda aşırı Ca^{+2} tutulumu başlar ve SR, Ca^{+2} ile doldurulduğu zaman, iyon homeostazisi olmaksızın aşırı ATP tüketimi gerektiren bir Ca^{+2} alımı ve salınımı döngüsü ile sonuçlanabilir(51).

Çalışmalarda, reperfüzyon süresince hipertansif sıçanlarda normotensif sıçanlardan daha hızlı bir Ca^{+2} yüklenmesi olduğu gözlenmiştir(64). Sitozolik Ca^{+2} seviyesinin sürekli yüksek olması hiperkontraktüre sebep olabilir; bu durum, iskemi sürecinden daha büyük bir SVDSB olmasına ve kardiyomiyosit ölümüne (kontraktür) neden olabilir (63). Ayrıca bu kontraktür miyokardiyum içindeki mikro damarların sıkışmasına sebep olabilir bu da azalmış perfüzyonla sonuçlanır (50).

Mitokondriler, reperfüzyon hasarından kolay etkilenirler ve apoptoz veya nekroz yolu ile hücreye ölüm sinyali gönderirler (52). Apoptoz, enerji bağımlı bir olaydır ve uzun süren iskemi enerjinin tükenmesine sebep olur (47). Hücre ölümü esas olarak reperfüzyonun erken aşamalarında apoptoz ve nekroz şeklinde iken, reperfüzyonu takiben hücrenin enerji depoları dolar dolmaz büyük oranda apoptoza dönüşür. mtPTP, mitokondiyal membranlar arasına yerleştirilmiş spesifik olmayan bir pordur. Mitokondriyal matrikste Ca^{+2} 'nin aşırı birikimi ve apoptotik sinyal vericilerin salınımına izin verildiğinde mtPTP'nin açılması gerçekleşir (49, 52). mtPTP'nin açılmasıyla elektrolitler ve su mitokondrilerin içerisine girerek şişmesine sebep olur.

Bunu takibinde mitokondriyal membran potansiyeli kaybolur (52). Reperfüzyon süresince gözlenen fazla H^+ 'nin ortamdan uzaklaştırılmasıyla pH'nın düzenlenmesi ve ROT'ların artmasını içeren diğer metabolik değişkenler mtPTP'nin açılmasını sağlarlar(49). mtPTP'nin açılmasından kaynaklanan hücre ölümü ya kaspaz aktivasyonu için yeterli enerjinin sağlandığı apoptozun veya nekrozun bir sonucudur (65).

2.2. Na^+/H^+ DEĞİŞTİRİCİ PROTEİNLERİN REGÜLASYONU ALTINDA YATAN MEKANİZMALAR

2.2.1. İntrasellüler pH (pHi)

Protonların (H^+), hücre içi ve dışı arasındaki pH dengesinin sürdürülmesinde, hücre içi membran potansiyelinin -60 mV olması ve membranlar arasında H^+ iyonlarının pasif olarak taşınmasının rol aldığı farzedilir (19). Bu durum Donnan dengesinde hücre içi pH (pHi)'nin yaklaşık 6.3-6.4 olmasını sağlar. Bu değer, hücre metabolizma (glikoliz) sırasında üretilen H^+ 'dan dolayı asidik stresi akla getirmez. Bunun yanı sıra diğer süreçler hücre asidifikasyonuna katkı sağlamaktadır. Bunlar plazma membranının iki tarafı arasındaki asit dengeleyicilerin (içeride H^+ ve dışarıda OH^-/HCO_3^-) pasif taşınması ile olur ki bu da asidik iç organellerden H^+ 'lerin sızması ve iç ortamın alkali olması gereken organellerden H^+ 'lerin pompalanması ile gerçekleşir (H^+ 'lerin direk sitozole girmesi ile veya sitozolik bazların hücre dışına çıkması ile). Bu faktörlerin tümü hem hücre metabolizmasının hem de diğer hücre fonksiyonların bozulmasına neden olan sürekli ve fazla miktardaki asit yükünü hücreye bırakır (18, 66, 67). Aslında, hücrede pH 6.85'in altında ve 7.65'in üzerinde olduğu durumlarda hastalık semptomlarına sebep olurken, 6.8 altı veya 8.0 üzerinde ölüme sebep olmaktadır (68). Ancak hücreler, pH'larını 6.8 ila 7.2 arasında korumak ve kontrol etmek için pHi'yi kuvvetli bir şekilde düzenleyecek bir yetenektedir. pHi'nin homeostazı hücrenin hayatta kalması için son derece önemlidir. pHi'nin homeostazı hücre içi sitozolik koşulların modülasyonunda pH'daki hafif değişikliklere duyarlı olan pek çok biyomolekülün modülasyonunun yanı sıra, stabil protein aktivitesi ve etkileşimleri içinde hayattır (1). Dolaylı olarak, hücre pH değişiklikleri hemen hemen tüm hücre süreçlerde, kasılması, hücre-hücre etkileşimi, membran potansiyeli ve iletkenliğinin yanı sıra (69), hücre metabolizma, hücre büyüme – çoğalması ve hücre hacim regülasyonundaki değişikliklerden sorumludur (2-4).

Proteinler özellikle pH'daki değişikliklerden çok kolay etkilenir, çünkü proteinlerin güçlü bir şekilde iyonlaşması onların tersiyer-kvarterner yapılarını etkiler ve herhangi bir değişiklik proteinin fonksiyonunu kolay bir şekilde bozabilir (7). pH'nın optimal aralığın dışına çıkması, reaksiyonlarda ciddi bir düşüşe sebep olur ve protein yapısına bağlı olan metabolik reaksiyonlar bozulur (70). Ayrıca pHi hücre iskeletini kuvvetli bir şekilde etkiler. Hem aktin filamentlerinin çapraz bağlanmaları hem de tübülün polimerizasyonu pHi'den etkilendiği için pHi bu olayda ana modülatör olarak görev alır. Ayrıca aktin bağlayıcı proteinler pH'dan etkilenir ve alkalizasyon tübülün depolimerizasyonu ve mikrotübüllerin bozulmasına sebep olur (10, 69, 71, 72). Fakat pH'daki değişiklikler genellikle intrasellüler kalsiyumdaki değişikliklerle beraber olduğu için bu durumun pH'daki değişimi dolaylı olarak etkileyip etkilemediği açık değildir. Örneğin, intrasellüler H^+ iyon miktarı yükseldiği zaman mitokondriyal Ca^{+2}/H^+ değiştirici pompa aktive olur. Bunun sonucu olarak da sitoplazma içindeki Ca^{+2} seviyesi yükselir (9). Ayrıca pH değişiklikleri elektrolit dengesini etkilediğinde (özellikle Na^+ , Cl^- ve K^+ iyonları) fizyolojik bozulma gözlenebilir (69).

İyon kanalları, iyon iletkenliği ve kanal açılıp kapanması için en uygun intrasellüler ve ekstrasellüler pH'ya ihtiyaç duyar. pH'daki sapmalar membran potansiyelini değiştirebilir ve sinir-kas hücrelerinin uyarılabilirliklerini etkiler (10-12, 69). Pek çok hücre içi mesajcı ve sinyal yolları da yine pHi'deki değişikliklerden etkilenir. Örnek olarak cAMP'den sentezlenen adenilat siklaz ve pH'ya duyarlı enzimler verilebilir (13). Kalsiyum bağlayan düzenleyici bir protein olan kalmodilin de pHi'ye bağımlı bir şekilde hem doğrudan hem de dolaylı olarak pH değişikliklerinden etkilenir (36). Hücre çoğalmasına ön ayak olmada pHi'nin rolü aktif bir araştırma alanı olmuştur. Tek başına pH hücre büyümesini sağlamaz. Hücre büyümesi için gerekli olan pH sinyali, hücre tipine ve stimulusa bağlı olabilir (69). Ayrıca sitozolik pH'daki artış birçok farklı doku hücrelerinin farklılaşması ile bağlantılı olup, kanserin farklı bir etkeni olabilmektedir. Normalin 0.3-0.4 altında olan asidik pH'nın apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (14).

2.2.2. Bazı Organellerdeki pH

Hücre iç pH'sını korumak zorunda olan, farklı pH içeriğine sahip birçok organel mevcuttur. pH'daki bu farklılıklar organellerin düzgün çalışması, hücrenin hayatta kalması, fonksiyonu ve çoğalması için hayati bir öneme sahiptir (10). Örneğin, endozomların asidifikasyonu (~pH 6.0-6.2), ligand-reseptör ayrılması ve yeniden

kullanımı, makromoleküllerin toplanması ve salgı granüllerinden sekresyon için çok önemlidir (15). Lizozomlar 4.7 gibi düşük bir pH'da biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştirir. Lizozom içerisinde bulunan hidrolitik enzimler için en uygun pH 5.0 olduğundan nötral pH'da inaktiftir. Aksine, mitokondriyal matriks oldukça alkalidir. Bunun sebebi mitokondri iç membranındaki elektron taşıma zincirinde rol alan proteinlerin dışarı H^+ atmasıdır. pH'nın tam olarak rolü ve belli başlı mekanizmalar açık olmamasına rağmen mitokondrinin pH'sındaki değişiklikler, mitokondri bağımlı apoptoz gelişiminin başlangıcındaki olaylarla bağlantılıdır (15-17).

2.3. pH REGÜLASYONUNUN MEKANİZMASI

pHi'nin regülasyonu oldukça karmaşıktır. Sadece fizyolojik tamponlar ve asit-baz taşıyıcılar değil aynı zamanda bir dizi sinyal dönüşüm yolları ve pH regülasyonunda rol alan taşıyıcıları modüle eden yardımcı proteinler de bu olayda rol oynamaktadır (19).

2.3.1. Fizyokimyasal Tamponlama

Tamponlama, H^+ 'nin proteinler gibi makromoleküllere bağlanması veya bağlanmaması ilkesine dayanır. Bu sayede zayıf asitler, bir solüsyon veya sitoplazma içerisinde bulunan serbest H^+ konsantrasyonundaki değişiklikleri minimize etmeye yardımcı olan tersinir (iki yönlü) dengeyi sürdürecektir. Konsantrasyon değişiklikleri olduğunda sürekli olarak H^+ iyonları alınır veya salınır, bu tamponlar saniyeler içerisinde pH'daki değişikliklere cevap verir (6). Bir hücrenin tamponlama gücü genellikle, asidik veya alkali yüklerden kaynaklanan pHi'deki değişikliklere hücrenin direnç gösterme yeteneği olarak belirlenebilir. Daha spesifik bir tanım ise, pH değerini 1 birim artırmak için 1 litre solüsyona ilave edilmesi gereken güçlü asit (ör: HCl) veya güçlü baz (ör: NaOH) miktarıdır (19).

Vücudumuzda üç önemli tampon sistem mevcuttur. Bunlar; fosfat, bikarbonat ve protein tampon sistemleridir (20). Fosfat tampon sistemi, önemli bir intrasellüler tampon sistemdir. Çünkü intrasellüler fosfat oranı, ekstrasellüler sıvıdakine göre yaklaşık 20 kat daha yüksektir. Reaksiyon, dihidrojen fosfat ($H_2PO_4^-$) ve hidrojen fosfat (HPO_4^{2-}) iyonları arasında dengededir.

Bikarbonat tampon sistemi, pHi regülasyonunda önemli bir rolü vardır. İlk olarak, ekstrasellüler ortamda CO_2 'nin sınırsız bir kaynağı olarak rol alır, ayrıca bu sistemin bileşenlerini (CO_2 ve HCO_3^-) regüle eder (19).

Son olarak protein tampon sistemleri ki bunlar tüm intrasellüler fizyokimyasal tampon kapasitesinin % 75 kadarından sorumludur. Ayrıca proteinler, pek çok iyonlaşabilir gruplar içerir, özellikle histidin türevi proteinlerdeki imidazol grupları bu şekildedir (20, 21).

2.3.2 pH Regülasyonunda Rol Alan İyon Transport Mekanizmaları

pH'daki akut değişiklikler, çeşitli tampon sistemlerce minimize edilmesine rağmen, kronik veya büyük değişikliklerden pH homeostazının korunmasında asit baz konsantrasyonlarını kontrol etmek için kompleks mekanizmalar geliştirilmiştir. Protonların (H^+) veya bazların (HCO_3^-) hücre membranından alınması veya atılması birçok taşıyıcı sistemin karşılıklı etkileşimi ile gerçekleştirilir (19).

Asit çıkarıcı ve yükleyici taşıyıcılar 5 grupta sınıflandırılabilir;

- 1) Katyon/Proton değiştiriciler (bir veya iki değerlikli katyonlara karşılık H^+ 'nin değişiminde) Hücre içi asidifikasyonun azaltılmasında çok büyük öneme sahip olan Na^+/H^+ değiştiriciler (NHE) bu gruptadır (73).
- 2) Bikarbonat bağımlı taşıyıcılar (Na^+ ve/veya Cl^- çiftinden birinin hareketine karşı HCO_3^- 'ün membranın diğer yanına geçişi) Üç büyük tipi vardır; Cl^-/HCO_3^- taşıyıcı, ayrıca anyon taşıyıcı olarak adlandırılır (AE), $(Na^+/HCO_3^-)-Cl^-$ taşıyıcı, ayrıca Na^+ -bağımlı- veya Na^+ -ile sürülen- Cl^-/HCO_3^- taşıyıcı (NDCBE), ve son olarak, Na^+/HCO_3^- -birlikte taşıyıcısı-kotransporter (NBC) (74-76).
- 3) Sodyum- organik iyon birlikte taşıyıcıları (sodyum ile birlikte zayıf bazların taşınması). Monokarboksilat birlikte taşıyıcılar (MCT) bu sınıfta yer alır. Laktat- H^+ birlikte taşıyıcılar buna bir örnektir (77).
- 4) Klorür- organik iyon değiştiriciler (klorür ve zayıf bazların zıt olarak taşınması) (CHE) (34, 78, 79).
- 5) H^+ -ATPaz familyasındaki H^+ pompaları ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanarak aktif olarak H^+ taşırlar. H^+ -ATPazlar veya H^+ pompaları ATP bağımlı proton pompaların bir ailesidir. Bu pompaların üç farklı tipi vardır; mitokondriyal F₀F₁-tip H^+ - ATP sentaz (F ATPaz), H^+/K^+ -ATPazı içine alan E1-E2 veya P-tip ATP hidrolaz (P-ATPaz), ve son olarak vakuolar veya V₀ V₁-tip H^+ -ATP hidrolazlar (V-ATPaz) (6).

2.4. MİYOKARDİYUMLARDAKİ İNTRASELLÜLER pH (pHi)

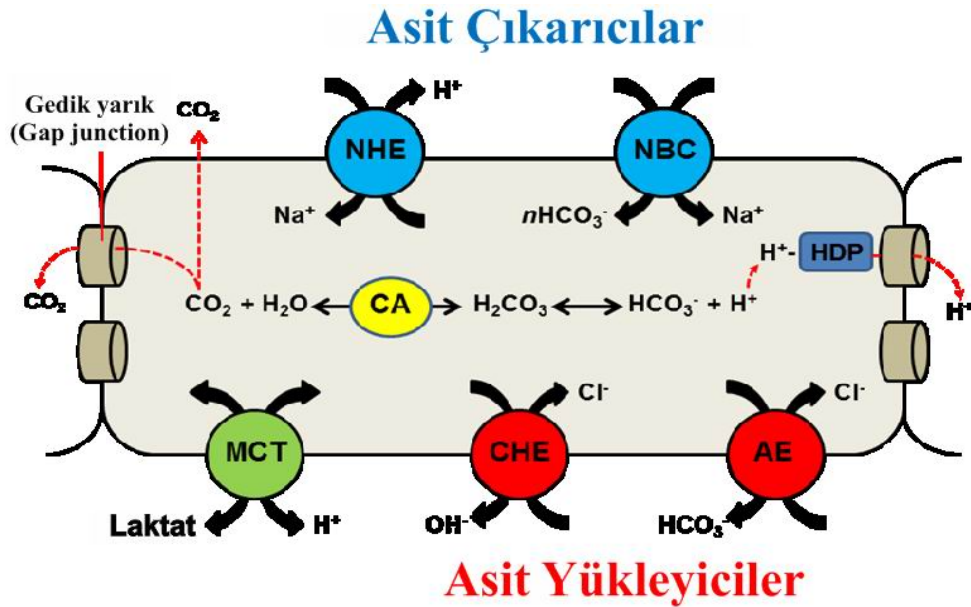
Kalp, metabolik olarak son derece aktif bir organdır. Kardiyomiyosit aktivitesi, doku hasarını etkili bir şekilde önlemek için, kontrollü bir asit üretimine sebep olur. Aerobik metabolizmada H^+ 'nın salınmasına neden olan CO_2 üretilirken, anaerobik metabolizmada laktik asit şeklinde H^+ üretilir (22). Aşırı asidifikasyon ciddi derecede Na^+ ve Ca^{+2} homeostazını bozar, bunun yanı sıra geçit bölgesi veya haberleşme bölgelerinin bağlantılarını (gap junction), buna bağlı olarakta eninde sonunda kasılma fonksiyonlarını bozabilir (22, 28, 30, 80). Kalp kasılması, intrasellüler veya ekstrasellüler pH'daki küçük fizyolojik değişikliklere son derece duyarlıdır (sırasıyla, pHi veya pHo). pHi özellikle uyarım ve kasılma üzerine modülatör etkisinden dolayı önemlidir, eğer kontrol altında tutulamazsa pHi kardiyak aritminin güçlü bir tetikleyicisi olabilir. Fizyolojik pH seviyesi 7.2 olan pHi'de önemli oranda bir düşüş, intrasellüler Ca^{+2} sinyalizasyonunda bozulma ve kasılmanın baskılanmasına sebep olur. Kalsiyum dağılımında rol oynayan pek çok anahtar protein, asidoz ile değişik oranlarda inhibe edilir. Na^+/Ca^{+2} değiştirici (NCX) (81), L tipi Ca^{+2} kanalları (82), sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salan kanal (ryanodin reseptörü), (83, 84) ve sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} ATP az (SERCA) bu gruptaki proteinlerdir.

İntrasellüler kalsiyumun artışından sorumlu tutulan mekanizmada, NHE, NBC ve NCX proteinler arasındaki fonksiyonel ilişki gösterilmektedir. pHi'deki bir düşüş Na^+ 'nın içeri girişini artırmak için NHE ve NBC'yi stimüle eder (85-87). İntrasellüler Na^+ artışı, sarkolemmal NCX'in zıt yönde çalışmasını sağlar, hücre içi Ca^{+2} artışına neden olur, bu durumda Ca^{+2} -SERCA pompaları Ca^{+2} fazlasını SR içerisine pompalar. Bu durum ise sırasıyla SR depolarından Ca^{+2} salınımının artışına bu da intrasellüler Ca^{+2} 'nin daha fazla artışına neden olur (86, 88).

Asit çıkarıcı taşıyıcıların önemini ortaya koymada iki yol önerilmiştir. Birincisi NHE veya NBC'nin inhibisyonu iken diğer ise farmakolojik inhibisyon veya NBC'yi inaktif etmek için karbonik anhidraz inhibisyonudur (41, 89, 90). Geçit bölgelerinin geçirgenliği, H^+ 'lar aracılığıyla inhibisyona son derece duyarlıdır (91, 92). Araştırmalarda hücre içi pH azalmasının yani H^+ iyon miktarındaki artışın geçit bölgelerinin birbirinden ayrılmasına sebep olduğu ve bu durumun sonucu olarakta hücreler arası iletişimin engellendiği ifade edilmiştir.

2.4.1. Miyokardiyumdaki pH Regülasyonu

Kalpde pH'i nötral aralığa yakın değerlerde korumak için asit ve bazların metabolik dalgalanmalarıyla hızlı bir şekilde başa çıkmak için karmaşık bir sistem geliştirilmiştir (22-24). İntrasellüler pH'daki dalgalanmalara karşı ilk savunma hattı intrasellüler tamponlamadır. Bu başlıca proteinler üzerindeki histidin rezidüleri (insintrik tamponlama) ve $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ tampon sistemi aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Sarkolemmada bulunan beş iyon taşıyıcı protein, membrandan H^+ 'lı iyonları (H^+ , OH^- ve HCO_3^-) taşıyarak pH'nın düzelmesine aracılık ederler. Bu taşıyıcılardan, asit çıkışı sağlamak için NHE ve NBC proteinleri işlev yaparken, asit yüklemeden ise AE ve CHE proteinler sorumludur. Beşinci değiştirici protein ise MCT olup, her iki yönde de çalışabilir. Ancak normoksik ve egzersiz yapılmayan koşullarda laktat seviyesi düşük olduğundan dolayı genelde bu pompa aktif değildir fakat hipoksi gibi durumlarda laktat seviyesindeki artışa bağlı olarak bu pompa aktive olur (Şekil 2.3.) (22, 25, 26, 93).



Şekil 2.3. Kardiyak miyosit hücresi içerisindeki pH regülasyonuna ait şematik diyagram. Hücrede asit çıkaran proteinler (mavi) Na^+/H^+ değiştirici (NHE) ve $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ birlikte taşıyıcı (NBC). NHE 1:1 oranında iyon değişimi yaparken NBC 1:1 veya 1:2 oranında bir değişim gerçekleştirmektedir. Asit yükleyiciler (kırmızı), Cl^-/OH^- değiştirici (CHE) ve $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anyon değiştirici (AE) den oluşmaktadır. Monokarboksilik asit taşıyıcı (MCT) protein kuvvetli bir hücre içi pH düzenleyici olmamasına rağmen, membran üzerinde iki yönlü çalışabilen bir proteindir. Ayrıca intrasellüler asidite histidin dipeptitleri gibi mobil tamponlarca düzenlenebilmektedir veya CA tarafından CO_2 ve H_2O , HCO_3^- ve H^+ ya dönüştürülür (25, 94).

Fizyolojik olarak pH_i hareketliliğine hem mobil hem de sabit tamponlar aracılık etmektedir. Proteinler H^+ difüzyonunu kısıtlayan moleküler ağırlıklarından dolayı çok düşük intrasellüler hareketliliğe sahiptir (27). Hücre içindeki bu hareketlilik suyun içindekinden iki kat daha yavaştır (29, 95) bu da hücrenin diğer tarafında pH farklılığına neden olur özellikle, lokal asit baz üretimi arttığı zaman H^+ hareketliliği, sarkolemmadaki pH düzenleyici taşıyıcılar ile sitoplazmik pH'nın etkin bir şekilde eşleşmesini sağlamak için pH regülasyonunun önemli bir bileşenidir (96). Hücre içindeki bu H^+ 'leri hücre içinden dışarı, dışarıdan içeri mekik dokuma şeklinde taşınması için mobil tamponlar olarak görev yapan düşük moleküler ağırlıklı sitoplazmik H^+ taşıyıcılar mevcuttur. Kalbin kendine özgü mobil tamponlarının çoğu histidin dipeptitler veya histidin içeren dipeptitlerdir. Bu küçük moleküller (asetilkarnozin, anserin ve homokarnozin) fizyolojik aralığa yakın bir pK_a (Hidrojen iyonlarını kabul etme yeteneğinin bir ölçüsü olan asidik iyonlaşma sabitesinin negatif logaritması olarak tanımlanan ve bir asit veya bazın nispi gücünü gösteren değerdir) değerine sahiptir. Sitoplazma ve sarkolemma arasında H^+ iyonlarını mekik gibi taşırlar (28, 29).

Bunun yanı sıra sarkolemmal mebranın diğer tarafına H^+ taşınmasında miyokardiyum içerisinde pH regülasyonunun başka bir yolu vardır. H^+ 'lar, geçit bölgelerinde bulunan konneksin kanalları arasından da difüze olabilir (28, 97). Memeli ventrikül miyositlerindeki baskın konneksin kanalı, konneksin-43 tür (Cx43) (96). Hücreler arasında ki bu tip asit geçişi, Na^+/H^+ değiştirici proteinle yapılan H^+ değişimi gibi geniş bir yer tutmaktadır(97). Hücreler arasındaki bu iletişim kardiyak hücreler arasındaki lokal pH farklılıklarının dengelenmesine izin verir ve miyokardiyum içerisindeki H^+ sürekliliğine yardım etmektedir (22). H^+ 'nın hücreler arası akışı, geçit bölgeleri iletkenliğini inhibe eden farmakolojik ajanlarca (gliseretik asit) inhibe edilir (97). Ancak intrasellüler asit yükündeki hafif bir artış pH dengesini kurmada bu geçit bölgelerinin H^+ geçirgenliğini artırırken, aşırı miktarda asit yüklenmesi ($pH_i < 6.2$) H^+ geçirgenliğini geniş ölçüde inhibe edecektir. Muhtemelen bu durum, lokal bozukluklar ve komşu dokular üzerine olabilecek potansiyel zararlı etkileri engelleyecek koruyucu bir önlem sağlamaktadır (22). Mobil H^+ tamponlarınca pH hücre içinde heterojen bir şekilde dağıtıldığı için, bu tamponlar ayrıca geçit bölgelerindeki kanalların diğer tarafına H^+ akışı için de gereklidir (25).

Karbonik anhidraz (CA) hem H^+ hem de metabolik CO_2 nin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. CA'lar bikarbonat taşıyıcılara fonksiyonel olarak yardım etmek suretiyle pH'ı düzenledikleri ileri sürülmektedir. İntra ve ekstrasellüler CA'lar bikarbonat taşıyıcılarına direk bağlanması ile bikarbonat taşıyıcılarına önemli miktarda HCO_3^- sağlamak suretiyle transportu artırdığı ifade edilmektedir (98). Bu bikarbonat taşıyıcılar ve CA'ların oluşturduğu kompleks iki yönlü çalışmaktadır. İlk olarak ekstrasellüler ortamdaki CA4 veya CA14, CO_2 nin hidrasyonunu ($CO_2 + H_2O$) katalizler ve ekstrasellüler ortamda HCO_3^- oluşumu meydana gelir. Bikarbonat taşıyıcılar tarafından hücre içine alınan HCO_3^- hücre içinde CA2 enzimleri aracılığı ile H^+ iyonlarını tamponlar. Hücre içinde H_2CO_3 oluşur ve bu daha sonra CA'larca parçalanıp CO_2 ve tekrar H_2O ya dönüşür. Ortamdaki CO_2 membrandan ekstrasellüler ortama difüze olur. Farmakolojik antagonistler tarafından CA'nın inhibisyonunun, derin hücre tabakalarında intrasellüler asidoza sebep olduğu gösterilmiştir. CA aktivitesi, in vitro sıçan kalplerinde global iskemi sonrasında pH'nın düzelmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (22).

2.4.2. Miyokardiyal iç pH'nın Patofizyolojisi

Intrasellüler pH'nın dalgalanmaları kalpte sürekli gözlenmesine rağmen, önemli düzeydeki asidoz durumu, pH_i 'nin yaklaşık 6.5'e düştüğü Mİ gibi patofizyolojik durumlar süresince gözlenebilir (22). Koroner arter tıkanması, Mİ periyodu süresince pH_i 'de önemli bir düşüşe sebep olur (30).

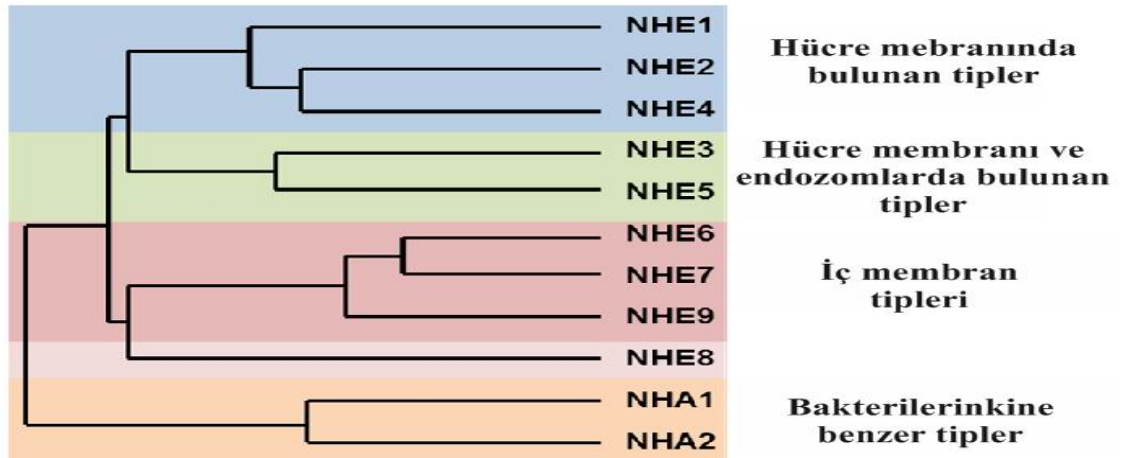
İlginçtir ki, iskemi periyodu süresince gelişen hafif düzeydeki bir asidoz hücre içerisine Ca^{+2} girişinde azalma meydana getireceği ve mitokondride aşırı kalsiyum birikimini önleyeceği için avantaj sağladığı bildirilmiştir. Reperfüzyon veya yeniden oksijenlenme esnasında NHE aracılığıyla Na^+ 'nın hücre içerisine, bunu takiben NCX ters çalışarak hücre içine Ca^{+2} 'yı, hücre dışına Na^+ taşınması gerçekleşir böylece intrasellüler Ca^{+2} çok artar. Aşırı kalsiyum yüklenmesi SR den spontan Ca^{+2} salınımına neden olur ve bu da ektopik atımlar ve kardiyak aritmilere sebep olur (32, 99). pH_i 'nin indüklediği Ca^{+2} aşırı yükü, ayrıca mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına neden olur (100).

2.5. Na^+/H^+ DEĞİŞTİRİCİLER (NHE)

İlk kez 1989 yılında Sardet ve arkadaşları insan Na^+/H^+ değiştirici protein cDNA'sı klonlamıştır (101). NHE'ler işlevsel olarak farklı bir ailedir, ikincil aktif membran

taşıyıcıları olarak ifade edilir, sodyum iyonuna karşılık membranın diğer tarafına H^+ taşınmasından sorumludur. Bu proteinler fizyolojik koşullar altında intrasellüler H^+ 'leri çıkarmak için gerekli olan enerjiyi $Na^+-K^+-ATPaz$ tarafından oluşturulan Na^+ gradientinden sağlarlar(1). Bu değiştirici proteinler 1:1 veya 2:2 oranında iyon değişimi gerçekleştirir (102).

NHE'ler, aşırı asit birikimine karşı hücreleri koruyan, membranda bulunan taşıma proteinlerinin büyük bir grubunu oluşturur. NHE ailesinin 11 izoformu bulunmaktadır bunlardan beş tanesi NHE1-NHE5 plazma membran tip izoformları, NHE6-NHE9 intrasellüler organellerde bulunan izoformları ve 2 tanesinde bakteriyal katyon proton değiştirici proteine benzediği için NHA1 ve NHA2 olarak isimlendirilmiş izoformdur (33) (Şekil 2.4.). Bu değiştirici proteinler pHi regülasyonunun yanı sıra çeşitli hücre fonksiyonlara katkı sağlamaktadır. Bunlar arasında hücre hacim regülasyonu, hücre çoğalması ve organellerin iyon - hacim homeostazı sayılabilir (1, 34-39).



Şekil 2.4. Memelilere ait Na^+/H^+ değiştirici ailesine ait taşıyıcıların genetik farklılığı ve membran dağılımının filogenetik ağaçta gösterimi. Bu alkali katyon/ proton değiştiriciler arasındaki genetik ilişki sekans dizeleri tarafından belirlenmiştir (15, 33).

2.5.1. Yapısal Özellikleri

Tüm NHE'ler benzer yapıya sahiptir. N terminali ve C- terminali olmak üzere 2 ana yapıdan oluşur. N-terminali hidrofobiktir ve 500 aminoasitten oluşur. İzofomlar % 45-65 oranında amino asit benzerliğine sahiptir. C-terminali ise hidrofilik olup, % 25-35 oranında benzerdir. C-terminali sitoplazmada N-terminali ise membranda bulunur. Membrana bağlı 12 geçiş alanı bulunmaktadır ve bunlardan biri iyon transferinde rol oynamaktadır (1, 39).

2.5.2. NHE Farklılığı, Doku Dağılımı ve Karakteristikleri

NHE'ler tüm memeli hücrelerinde bulunur, her bir üyesinin dokulardaki dağılımı ve fonksiyonu farklıdır NHE1, hemen hemen tüm hücrelerde pHi ve hücre hacim homeostazından sorumludur (35, 36). NHE2 izoformu % 50 oranında NHE1'e benzerdir, özellikle gastrointestinal yolakta bulunur bunun yanı sıra böbrek, beyin, uterus ve akciğerlerde bulunur (103, 104). NHE3 özellikle gastrointestinal yolak ve böbreklerin epitelyal hücrelerinde bulunur, apikal membrana lokalize olmuştur (35, 36). NHE4 en fazla mide epitelyumunda ve böbreğin iç medullar toplayıcı kanalında bulunur. Ayrıca düşük oranda iskelet kası, beyin ve uterus - pankreas hücrelerinin bazolateral membranlarında da bulunmaktadır (104, 105). Homoloji olarak NHE3'e benzeyen NHE5 özellikle beyindeki nöron hücre gövdelerinde bulunmaktadır(106). NHE6 endozomların geri dönüşümünde birincil olarak rol alır (107). NHE7 trans golgi ağında ve komşu veziküllerde bulunur (39, 108). NHE8 yine trans golgi ağı mebranı ve orta golgi ağı mebranında bulunmaktadır (109). NHE9 iç membran yüzeylerinde bulunmaktadır (33).

2.5.3. Farmakolojik İnhibisyonu

NHE izoformları, genellikle farmakolojik ajanlara olan duyarlılıkları ile karakterize edilir (özellikle amilorid ve türevlerine). NHE1, amilorid türevi ajanlara en duyarlı olanıdır, NHE2 ise daha az duyarlıdır, NHE3-4-5 ise en az duyarlı olan gruptur(1). NHE'lerin diğer farmakolojik inhibitörleri HOE694 ve HOE642'yi (KRP) içeren açılguanin bileşikleridir. Bu bileşiklerin oldukça yüksek seçicilik ile NHE1'e bağlandığı gösterilmiş ve kalpteki iskemi reperfüzyon hasarını bloklamada tedavi edici etkili bir ajan olarak görev yaptığı bildirilmiştir (40, 41). Farmakolojik önemlerinden dolayı diğer pekçok inhibitörlerde ayrıca kullanılmaktadır (110).

2.6. Na⁺/H⁺ DEĞİŞTİRİCİ İZOFORM 1 (NHE1)

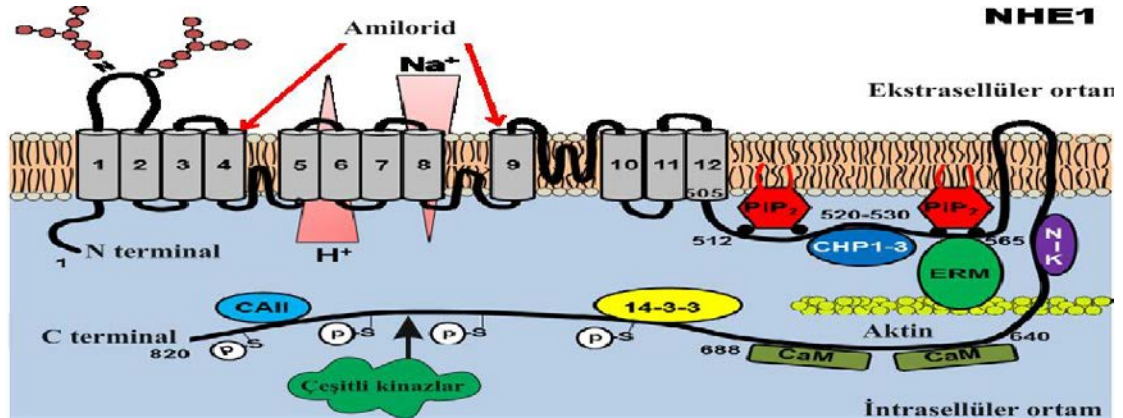
Bu proteinin membran domainleri iyon taşınması için hem gerekli hem de yeterlidir, sitozolik domainleri ise iyon değişim aktivitesinin regülasyonundan sorumludur. Şekil 2.5.'de gösterildiği gibi NHE1, 12 transmembran sarmalından oluşmuştur, sitozolde yerleşmiş N ve C terminal uçları vardır (111). NHE1 en yaygın şekilde çalışılan NHE izoformudur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda hemen hemen tüm hücre tipleri ve dokuların hücre membranında bulunduğu ifade edilmiştir. NHE1, bikarbonat taşıyıcılar ile birlikte pHi'nin normal değerinde tutulmasını sağlar, bunun yanında anyon değiştirici

proteinler ve hücre içi sıvının ozmozunu aracılığıyla hücre içine giren Cl^- girişi ve onu takip eden Na^+ girişi ile hücre içerisindeki hacim artışlarını engeller (112). NHE1 ilk kez Sardet ve arkadaşlarınca 1989 da moleküler olarak belirlenmiştir. Hücre sinyal yollarında yapı malzemesi ve katyon translokasyonundaki rolünden bağımsız olarak hücrenin şekillenmesinde de rol almaktadır. Bazı hücre tiplerinde NHE1 farklı domainlerde bulunur, ki bu domainler hücrelerin fonsiyonlarındaki özelleşmiş rolleri olabilir (113). Örneğin kalp miyositlerindeki değiştirici, interkale disklere ve T tübüllere yoğun bir şekilde lokalize olmuştur (42). NHE1'in bir diğer fonksiyonu ise hücre çoğalması ve farklılaşması ile ilişkilidir. Kimyasal mutajenlerce NHE1'i eksik olan hücrelerin yanı sıra NHE1'den yoksun fare fibroblastlarında hem hücrelerin çoğalması hem de farklılaşmasındaki yolların bozulduğu gösterilmiştir (3, 4, 43). Hücre çoğalmasından ayrı olarak NHE1'in diğer önemli bir fizyolojik rolü ise, apoptoz ve nekroz ile hücre ölümünü modüle etmesidir. Hücre ölümünü, osmotik stres ya da hücre içi pH'yı değiştirmek sureti ile indirekt olarak ya da direk hücre ölüm yollarını aktive ederek yapmaktadır (44). Hücre ölümündeki direkt modülasyonu, hücre çoğalması ve ölümünde önemli rolü olan birçok protein gibi mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK), Akt/ protein kinaz B (PKB) aracılığı ile oluşturur (44, 114).

2.6.1. NHE1 Aktivitesinin Regülasyonu

Na^+/H^+ değiştiricilerinden NHE1'in aktivitesi çok iyi bir şekilde regüle edilmiştir. Bu proteinin başlıca regülatör uyararı hücre içi asidozdur, bu normal fizyolojik koşullar altında ihmal edilebilecek düzeydeki bir asidozdur (115). Ancak pH_i azalırsa, NHE hızlı bir şekilde aktive edilir. NHE1, intrasellüler H^+ lara ilave olarak hormonlar ve büyüme faktörleri gibi dış faktörlercede aktive edilebilir. Bu faktörler daha alkali bir aralıkta NHE1'in pH 'sını kaydırarak aktive eder ve bu da alkali pH 'da normal aktivitesinden daha iyi çalışmasını sağlar (116). pH 'daki kaymanın çoğu NHE1'in C terminalindeki regülatör bölgenin fosforilasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Fosforilasyon yoluyla NHE1'in regülasyonu karmaşıktır ve hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. Farklı kinazlarca NHE1 aktivitesinin regüle edildiği düşünülmektedir (117). Mitojen aktive edici protein kinaz, Rho kinaz, Nck etkileşimli kinaz ve p90rsk tarafından fosforilasyonun NHE'yi aktive ettiği bilinmektedir (43, 117-119). Aksine, protein kinaz p38 bazı hücre tiplerinde NHE'yi inhibe ederken bazı hücre tiplerinde stimule etmektedir (120). Protein kinaz C ve D yi içeren diğer kinazlar proteini regüle etmekte fakat direk olarak fosforilleyip fosforillemeyi açık değildir. NHE değiştirici proteinin

fosforilasyonuna artan iyon değişim aktivitesinin nasıl aracılık ettiği henüz bilinmemektedir. NHE proteini ayrıca birçok regülatör proteinle etkileşim halinde regüle edilmektedir (111).



Şekil 2.5. NHE1 proteininin şematik gösterimi. 12 kez membranı geçen α-heliks N terminal ve C terminal yapısından oluşan bu proteinin özellikle C terminali oldukça büyüktür ve birçok protein ve biyomolekülle etkileşim halindedir. Fosfatidilinozitol-4-5-bifosfat (PIP₂), kalsinörin B homologu protein izoformları 1 den 3 e kadar (CHP1-3), Aktin bağlayan protein ailesi (ERM), Ca²⁺ / kalmodulin kompleksi (CaM) ve karbonik anhidraz II (CAII) gibi (1).

2.6.2 NHE1 ve Kalp

Miyokardiyum içerisindeki NHE1, interkale diskler ve T tübüllerde belirgin bir lokalizasyona sahiptir fakat periferik sarkolemmal membranlarda yoktur (42). Bu lokalizasyon miyokardiyum hücrelerinin mikro çevresindeki pH'nın kontrolünde potansiyel bir role sahip olabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla geçit bölgesi proteini olan, konneksin 43 (121) veya ryanodin duyarlı kalsiyum salınım kanal proteini (122) gibi pH duyarlı proteinlerin aktivitesini kontrol etmektedir. Bu durum, uyarı iletkenliği ve uyarılma-kasılma gelişimine etki etmek için NHE1'e olanak sağlayacaktır (1). Bu hipotez, NHE1'in farmakolojik antagonisti amilorid tarafından NHE1 inhibisyonunun ve kültür ortamındaki çoğalmış kardiyomiyositlerin geçit bölgelerindeki iletkenliğin azalmasının gözlenmesiyle desteklenmiştir (123).

2.6.2.1. Miyokardiyum İçindeki Regülasyonu

Miyokardiyal NHE1 proteini genellikle G proteini ile eşleştirilmiş reseptörleri (GPCRs) içeren çeşitli reseptörlerin aracı olduğu yanıtlarla regüle edilmektedir. Örneğin, katekolaminlerce indüklenen NHE1 aktivasyonu α1-adrenerjik reseptörünün uyarılmasıyla meydana gelir (124). Bu yolla sabit aralıkta tutulmaya çalışılan pH'nın

sağlanması ve böylece NHE1 aracılı olarak akut asit yükünün düzeltilmesi söz konusudur (125). NHE1 uyarıcı diğer bir faktör olan Endotelin-1 (ET-1) hem pH'nin artırılması (117) hem de izole edilmiş miyositlerde asiditenin eski haline getirilmesini hızlandırır (126). Kardiyomiyosit büyümesini stimüle eden peptit yapılı anjiyotensin II (AngII) hormonunda AT1 reseptörleri aracılığıyla NHE1'i aktive etmektedir (127). NHE1'in kalpteki ekspresyonunun aldosteron tedavileri aracılığı ile de artırıldığı çalışmalarda gösterilmiştir (128).

2.6.2.2. İskemi/Reperfüzyon (I/R) Hasarındaki Rolü

Son 20 yılda yapılan çalışmalar ile miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarında NHE1'in aşırı oranda aktive olduğu gösterilmiştir (40, 115, 129). Bu durumun ise NHE'nin inaktivasyonu sağlandığı takdirde iskemi reperfüzyon hasarının azaltılabileceğine dair konu üzerinde durulmaktadır (130). NHE1 aktivasyonu sadece kalpte (24) değil aynı zamanda merkezi sinir sistemi, karaciğer ve akciğerde iskemi takiben reperfüzyonla indüklenen hücresel hasarda çok önemli bir olaydır (131-135). Bu süreç kompleks ve tam olarak anlaşılamamasına rağmen, alta yatan mekanizmada iskemi süresince enerji yoksunluğundan dolayı hücrenin fizyolojik iyon gradiyentini sürdürmeye gücünün yetmemesi ve bunu takiben reperfüzyon sırasında inflamatuvar cevabın artışına bağlı olarak hücre hasarında artış olacaktır (136). NHE1'in anormal hiperaktivasyonu, mekanizmaların kombinasyonu ile meydana geldiği düşündürmüştür. İskemik olaylar süresince ATP'nin azalması, hem Na^+/K^+ -ATPaz hem de NHE1'i inaktive eder. Kan akımı reperfüzyonla düzenlendiğinde (eski haline geldiğinde), ekstrasellüler Na^+ normalleştirilir. İntrasellüler pH'yı düzeltmeye çalışan NHE1'in hiperaktivasyonu ise hücre içinde Na^+ artışına sebep olur. İntrasellüler Na^+ 'daki bu çarpıcı artışı, NCX tersine işlev görmesine neden olur ve Ca^{+2} 'un hücre içine geçişine yol açar (137, 138). Hücre içine giren bu Ca^{+2} miktarındaki fazlalık kardiyak aritmiler ve serbest radikal toksisitesiyle doku hasarına, apoptoz ve nekroz yanısıra ödeme neden olarak sinaptik iletiyi bozar (125, 136). Pekçok çalışmada NHE1'in farmakolojik inhibisyonunun, çeşitli kardiyak fonksiyon bozukluklarından kalbi koruduğu, infarkt alanın sınırlandırılmasına katkı sağladığı, $\text{Ca}^{+2}/\text{Na}^+$ homeostaz bozukluğunun hafiflemesini, bununla birlikte aritmiler ve apoptozisin azalmasına katkı sağladığı gösterilmiştir. Bunlara ilave olarak reperfüzyon sonrasında fonksiyonel bir düzelme ve metabolik enerjinin korunduğuda ifade edilmiştir (40, 115, 125). NHE1 inhibisyonu ile indüklenen korumanın bu rolü NHE proteini eksik transgenik farelerde gösterilmiştir. Bu farelerin

kardiyak iskemi reperfüzyon hasarına karşı dirençleri, NHE'si bulunan normal farelerde KRP ile yapılan inhibisyona benzerdir (139).

2.6.2.3. NHE1 ve Hipertansiyon

Hipertansiyon, hem deneysel hayvan modellerinde hem de hipertansiyonlu hastalarda NHE1 aktivitesindeki artışla ilişkilendirilmiştir (140). NHE1'deki bir eksiklik primer bir sebep olmamasına rağmen, bu protein kronik olarak yüksek tansiyon süresince aktif ve Ca^{+2} dengesinin değiştirilmesi ile ilişkilidir (136, 141). Fakat, bu kusur veya eksiklik altında yatan mekanizma hala tam olarak anlaşılmamıştır (141).

Farklı çalışmacılar, çeşitli protein kinaz yolları ile sinyalizasyondaki değişikliklerin geliştiğini bildirmiştir. Örneğin bunlardan biri MAPK aktivitesinin artırılması, buna bağlı NHE1'in fosforilasyonu ve aktivasyonu gelişmektedir (142, 143). Diğer çalışmalarda ayrıca damar düz kaslarındaki NHE1'in aşırı aktivasyonunun intrasellüler Na^{+} birikiminde net bir artışa sebep olduğu önerilmiştir. Hücre içi Na^{+} arttıkça NCX değiştirici proteinin çalışmasında bir düşüş veya tersine çalışması söz konusu olmaktadır, bu durumu takiben intrasellüler Ca^{+2} seviyesinde artış ve sürekli olarak damar düz kaslarında kasılma olmaktadır (136). Bu hipotez NCX in farmakolojik antagonisti SEA400 ile inhibisyon sonucu kan basıncında düşüşün gösterilmesi ile desteklenmiştir (144). Ayrıca NHE1 aktivitesinin sürekli olarak artmasının damar düz kas hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasını artırabileceği yapılan başka bir çalışma ile öne sürülmüştür (136).

2.6.2.4. Kalp Hipertrofisi ve Konjestif Kalp Yetmezliğinde NHE1

Kalp yetmezliği, birçok intrasellüler ve moleküler eksikliklerin birbiriyle olan ilişkisinden ileri gelen karmaşık bir klinik hastalık belirtisidir. Kalp dokusundaki hipertrofi kalpte miyokardiyal hasara bu da kalp yetmezliğine neden olur (125). Yenidoğan kardiyomiyosit kültürleri ile yapılan çalışmalar kardiyak hipertrofide NHE1'in rolünü göstermiştir. Ayrıca NHE1'in miyokard enfarktüsünü takiben oluşan hipertrofik cevapda anahtar bir rolü olduğunu ve bu proteinin aktivasyonunun kalp yetmezliğinde önemli bir hücresel hedef olabileceği öne sürülmüştür. Son yapılan çalışmalar, kalpde yüksek aktiviteli NHE1' in aşırı ifade edildiği farelerde bu proteinin aktivasyonu kardiyak hipertrofiyi ve kalp yetmezliğini başlatmak için yeterli olduğu gösterilmiştir (145). İskemi reperfüzyon hasarı gibi durumlarda NHE1' in farmakolojik olarak inhibisyonu, kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliği ile ilişkili olan biyokimyasal

strese yanıtı azaltmada yararlı olduğu görülmüştür (1, 115). Hipertrofide çeşitli kinazların aktivasyonunda NHE1' in olası rolü öne sürülmüştür. Aşırı sodyum birikimi protein kinaz C (PKC) aktivasyonuna (128) bu durumda transkripsiyonel değişiklikler ile hipertrofi gelişmesine neden olur. NHE1' in inhibisyonu hücre içine Na^+ girişini azaltır. Buna bağlı olarak Na^+ 'nın indüklediği PKC izoormlarının (PKC δ ve PKC ϵ) aktivasyonu engellenir (146, 147). PKC nin inhibisyonunun hipertrofik cevaplarda düşüğe sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca NHE1 inhibitörü KRP kardiyak hipertrofi ile indüklenen gerim ile ilişkili raf-1 ve MAP kinaz aktivasyonunu bloke etmiştir (148).

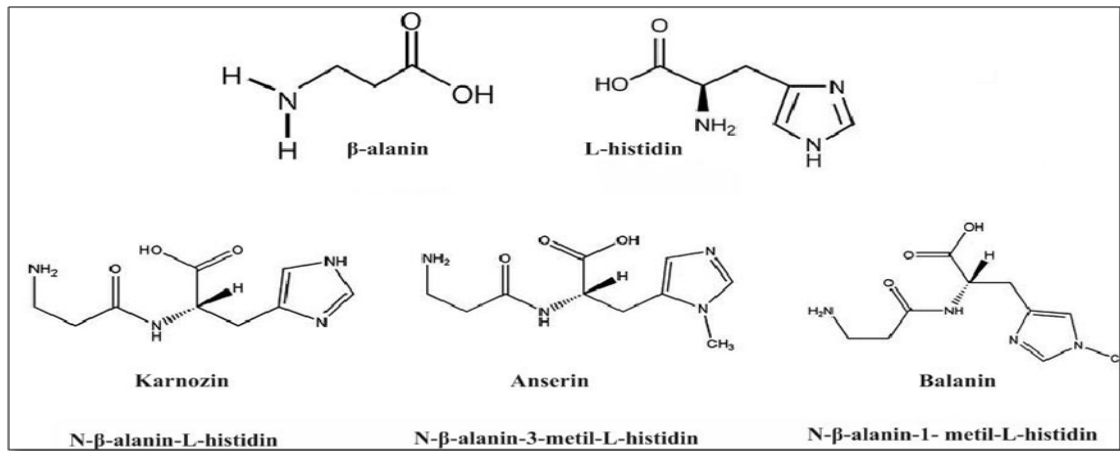
2.7. KARNOZİN

1900 yılında et ekstraktlarından izole edilen KAR, Rusya'nın önde gelen biyokimyacılarından V.S. Gulewich tarafından bulunmuş histidin türevi bir dipeptiddir (149). Biyolojik rolü tam olarak bilinmemesine rağmen, yapılan çalışmalarda KAR'ın; intrasellüler tampon, immün modülatör, nörotransmitter, metal iyon şelatörü, antioksidan ve serbest radikal süpürücü olarak işlev gördüğü gösterilmiştir.

2.7.1. Karnozinin Tanımı, Yapısı, Sentez ve Yıkım Aşamaları

2.7.1.1 Tanımı ve Kimyasal Yapısı

KAR, β -alanin-L-histidin yapısında, suda çözünebilen histidin türevi fizyolojik bir dipeptiddir ve homokarnozin (γ -amino-bütiril-histidin, GABA-histidin), anserin (β -alanin-L-metilhistidin) gibi aminoasit histidin dipeptidlerin en basit üyesidir (**Şekil 2.6.**).



Şekil 2.6. β -alanin-L-histidin yapısındaki histidin türevi dipeptitlerin kimyasal yapısı.

KAR, omurgalı canlıların dokularında yaygın bir şekilde yer alır. Özellikle iskelet kası, kalp kası ve merkezi sinir sistemi gibi uyarılabilir, bölünemeyen ve uzun ömürlü

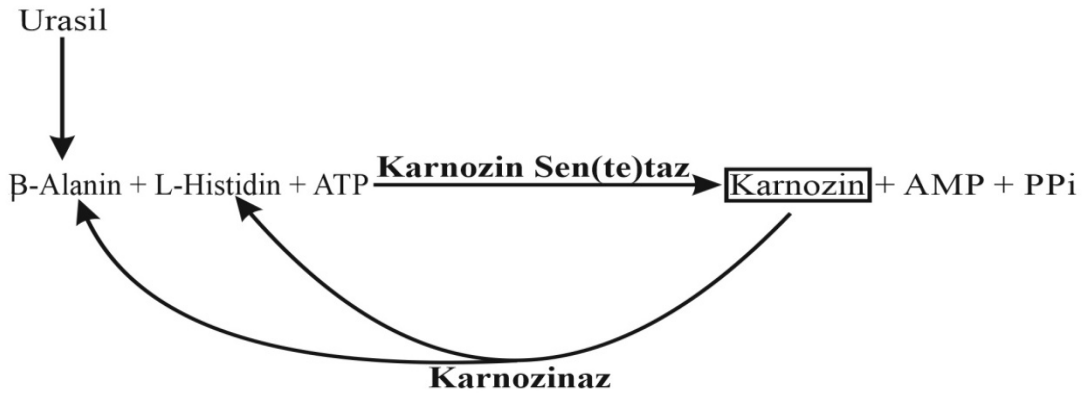
dokularda yüksek konsantrasyonda (Tablo 2.2.), (150) mide ve böbrekte düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır (151, 152).

Tablo 2.2. Sıçan dokularındaki histidin içeren dipeptitlerin profili. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiş olup yaş doku ağırlığı başına nmol/g olarak elde verilmiştir.

HİSTİDİN İÇEREN DİPEPTİTLER			
DOKU (nmol/g)	KARNOZİN	ANSERİN	HOMOKARNOZİN
Beyin	27.35 $\pm$ 7.56	—	51.14 $\pm$ 6.10
Serebellum	48.41 $\pm$ 4.66	57.48 $\pm$ 10.92	77.64 $\pm$ 11.04
Böbrek	—	—	—
Karaciğer	—	—	—
Akciğer	—	—	—
Miyokardiyum	67.03 $\pm$ 3.45	64.50 $\pm$ 9.86	—
Plazma	—	—	—
Gastrokinemius İskelet Kası	5279.95 $\pm$ 1006.21	7861.13 $\pm$ 2599.12	—
Tibialis İskelet Kası	4200.86 $\pm$ 1093.41	7419.34 $\pm$ 701.17	—
Soleus İskelet Kası	2606.23 $\pm$ 487.08	5414.51 $\pm$ 1367.06	—

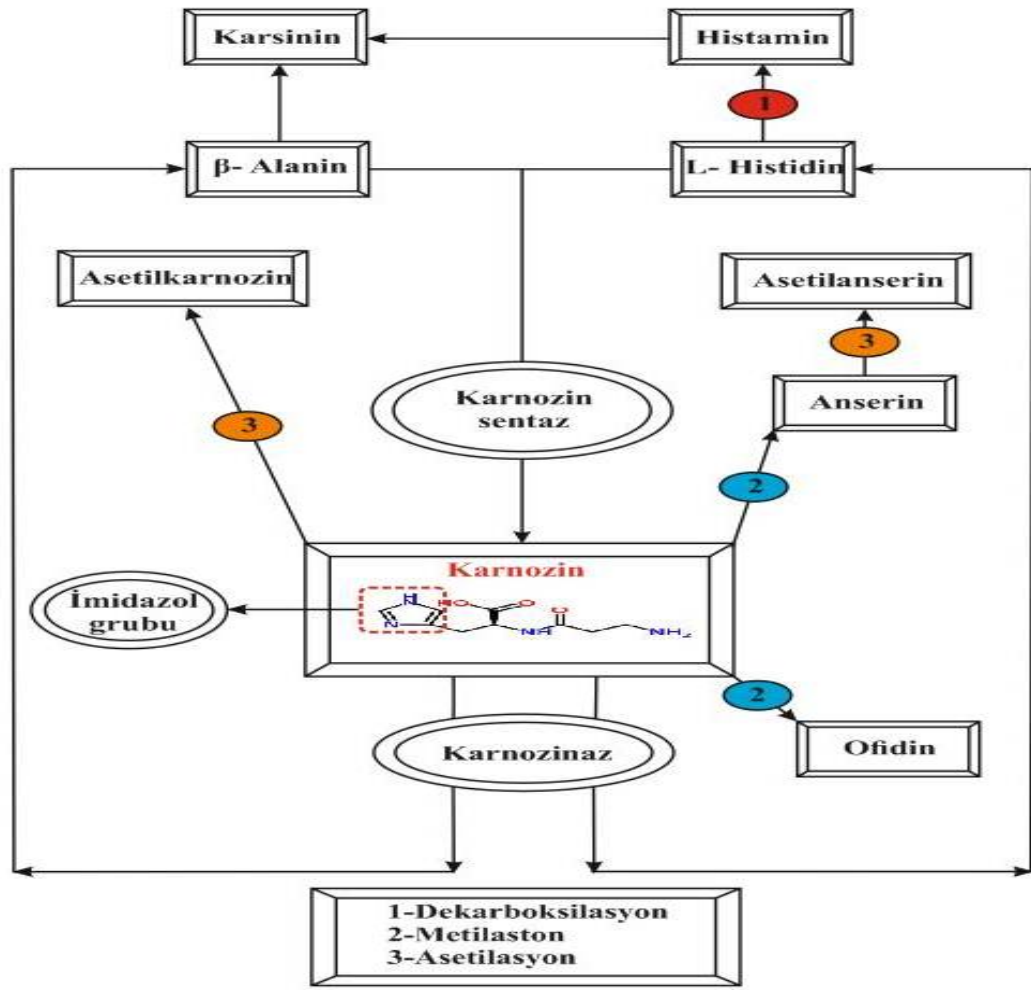
2.7.1.2. Karnozin Metabolizması

KAR, karnozin sentetaz (KS) enzimi tarafından β -alanin ve L-histidinden sentezlenen, ATP gerektiren bir reaksiyonla oluşur (Şekil 4). Primer hücre kültürü kullanılarak yapılan çalışmalarda bu dipeptidin kas hücreleri, glial hücreler ve oligodentrositler tarafından sentezlendiği gösterilmiştir (153). Protein yapısına girmeyen β -alanin, urasilin karaciğerde yıkımı ile oluşur. KAR'ı sadece β -alanini hücre içine taşıyan taşıyıcı sistemine sahip hücreler sentezleyebilir. Bu sistemin iskelet kası hücreleri ve oligodentrositlerde bulunduğu, hücre farklılaşması arttıkça da hücrelerin β -alanin alımının arttığı gösterilmiştir (154). Geniş bir substrat spesifitesine sahip KAR sentetazın, sitozolde bulunduğu ve farklı dokularda tüm aminoasit histidin dipeptidlerini sentezleyebildiği bildirilmektedir (155).



Şekil 2.7. KAR'ın sentez ve yıkımı

Doku KAR düzeyleri; asetilasyon, metilasyon ve hidroliz reaksiyonları ile kontrol edilmektedir. KAR'ın asetilasyonu veya metilasyonu sırasıyla, N-asetil karnozin veya anserin oluşturmaktadır (156). α -peptidleri hidroliz eden peptidazlara karşı dirençli olan KAR'ın hidrolizi (157), doku veya serum karnozinazları tarafından gerçekleştirilir. Farklı gen ürünleri olan bu enzimlerin sadece dağılımı değil aktiviteleri de farklılık gösterir (158). Uygun şartlarda bu iki izoform da KAR'ı hidroliz ederken, homokarnozine karşı sadece serum karnozinazı hidrolitik aktivite gösterir (Şekil 2.8.) (149).



Şekil 2.8. Karnozin ve analoglarının metabolizması

Karnozinaz, alt üniteleri birbirine bir veya daha fazla disülfid bağıyla bağlanmış bir dimerdir. Fizyolojik şartlarda karnozinazın; beyinde homoKAR'ın , dolaşımda da KAR ve anserinin yıkılmasından sorumlu olduğu öne sürülmüştür (158). Serum karnozinaz aktivitesinin yaşla birlikte yükseldiği; 10 aydan küçük çocuklarda az veya tesbit edilmeyecek düzeyde olduğu; 15 yaşına kadar aktivitesinin giderek arttığı ve yetişkin düzeyine ulaştığı belirtilmiştir (156). Doku KAR düzeylerinin diyetten etkilendiği, histidinden fakir diyetle beslenen sıçanlarda iskelet kası KAR seviyelerinin düştüğü, diyetle histidin eklenmesiyle de düşen KAR seviyelerinin arttığı bildirilmiştir. Ancak kalp, karaciğer ve iskelet kası gibi dokularda KAR seviyelerini ise etkilemediği gösterilmiştir. KAR ile E vitaminin birlikte kullanımı, sadece E vitamini kullanımına göre kalpte E vitaminin, karaciğerde hem KAR hem de E vitamini seviyelerinde yükselmeye yol açmıştır. Kas dokusu KAR seviyeleri; açlık, enfeksiyon, travma ve şoktan sonra düşmektedir (151).

2.8. KARNOZİNİN OLASI FONKSİYONLARI

KAR yüzyılı aşkın bir süre önce keşfedilmiş olmasına rağmen, işlevleri ile ilgili bilgiler tam olarak ortaya çıkmamıştır. KAR ve homokarnozin unutulmuş ve gizemli dipeptitler olarak tanımlanmıştır (153). Farklı hastalıkların sebep olduğu birçok hasara karşı KAR'ın koruyucu etkisine dair çok sayıda örnek vardır (Serbest oksijen radikalleri, reaktif nitrojen türleri, glikasyon ajanları, zararlı aldehytler, toksik metal iyonları). Ayrıca yaşlanmayı geciktirici yönde de etkileri vardır (159).

KAR'ın, iskemi- reperfüzyon hasarına karşı sıçan karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokularına ait hücreleri koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca diyabet, osteoporoz, nörodejenerasyon, yaralanma, görme kaybı, işitme kaybı ve immün fonksiyon ile ilgili bozukluklar üzerine de koruyucu aktivitesi gösterilmiştir (159).

2.8.1. Tamponlayıcı Aktivitesi ve pH'nın Kontrolü

İlk kez 1953 te Severin ve ark. tarafından KAR'ın kasta bir pH tamponlayıcı olarak işlev gördüğü açık bir şekilde tanımlanmıştır. Kurbağa sartorius kası kullanılarak yapılan bu çalışmada, KAR varlığında elektriksel olarak uyarılan kas kasılmaları sonucu yüksek oranda laktat birikiminin kasın çalışmasında bir bozulmaya sebep olmadığını, fakat KAR yokluğunda laktatın kas dokusunda önemli oranda asidifikasyonuna neden olduğunu ortaya çıkarmışlardır (160).

KAR'ın intrasellüler hidrojen iyon konsantrasyonunu düzenlemesi yönünde bir veya birden çok rolü olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (96). KAR etkin bir fizyolojik tampondur. Bu özelliği nispeten az mitokondriye sahip ve böylece laktik asit üreten beyaz, glikolitik kaslar ile olan ilişkisini açıklar niteliktedir. Nitekim bu durum Tablo 2.2.'de KAR'ın sıçan doku dağılımına bakıldığında gastrokinemius ve tibialis iskelet kaslarında bariz bir şekilde görülmektedir. Aksine oksidatif özellikteki soleus iskelet kasında ise bu oran düşüktür. Sadece KAR değil aynı zamanda asetillenmiş formlarıda hidrojen iyon konsantrasyonunun artışı direk baskılamaya yardım etmektedir, KAR'ın karbonik anhidraz enzimini aktive etme yeteneği, bikarbonat tampon kapasitesini artırabilmektedir (161). Bu özellikler intrasellüler asidoz ile ilişkili bir durum olan iskemide KAR'ın koruyucu rolünü açıklamada yardımcı olabilir (45). Hücreler pHi'deki değişikliklere karşı kendilerini korumak için H^+ tamponlayıcı sistemler geliştirmiştir.

Kas hücrelerinde bikarbonat içermeyen tampon sistem olarak;

1. Proteinlerin histidin rezidüleri içinde,
2. Serbest histidin içinde,
3. KAR ve anserin gibi histidin içeren dipeptitlerin içinde bulunan imidazol halkaları bu işlevi yerine getiren yapılardır (21).

İmidazol halkaları bu rezidüler içerisinde bulunan güçlü H^+ tamponlama bileşenleridir. Bu gruplar pH_i 'ye yakın bir pK değerine sahiptir. İmidazol halkasında bulunan 2 azottan biri fizyolojik aralıktaki pH 'da protonlanabilir. Bu düzenleyici oluşum imidazol gruplarının pK değerini pH_i 'ye yakın olarak tutan düzenleyici bir süreçtir (162). KAR'ın imidazol halkasının pK_a değeri 6.83 tür. Laktik asitin glikolitik yolla üretimi arttığında, bu yapı dokular için ideal bir fizyolojik tampon olur (imidazol halkasındaki serbest histidinin pK_a 'sı yaklaşık 6 dır, bu yüzden histidinin KAR'a dönüşmesi onu daha etkili bir tampon yapmaktadır.) (163).

β -alanin ile yapılan pek çok çalışmada araştırmacılar iskelet kasları ve atletik performansa odaklanmışlardır. Bu çalışmalarda, hem kastaki KAR içeriği hem de laktik asit üretiminin fazla olduğu aşırı yoğun (anaerobik) antrenmanlarda, β -alaninin performansı destekleyici etkileri gösterilmiştir (163). Bu etkileride muhtemelen pH_i 'deki zarar verici etkileri önleyerek gerçekleştirmiştir.

2.8.2. Metal İyon Şelatlama Özelliği

Farklı çalışmalarda KAR'ın bakır, çinko, nikel, kadmiyum ve kobalt gibi geçiş metalleri ile kompleks oluşturabilme yeteneği rapor edilmiştir. Geçiş metallerinin oluşturduğu zararlı etkilerin yok edilmesinde etkin bir maddedir. Özellikle bakır ve çinko en çok araştırılan iyonlardır (164).

2.8.3. Antioksidan Aktivitesi

KAR'ın antioksidan aktivitesi ilk olarak Boldyrev ve ark. tarafından 1980'lerde çalışılmıştır. Daha sonra farklı çalışmalarda KAR'ın doğrudan ve dolaylı olarak antioksidan aktivitesi in-vitro çalışmalar ile gösterilmiştir. KAR'ın antioksidan aktivitesine; metal iyon şelatasyonu ve ROT'lar-peroksil radikalleri temizlenmesini içeren farklı mekanizmaların aracılık ettiği ifade edilmektedir (165-167). KAR hayvansal dokularda bulunan suda çözünebilir doğal bir metabolittir. Antioksidan özelliklerinden dolayı aktif oksijen türlerinin temizlenmesi KAR'ın biyolojik bir

fonksiyonudur. KAR, bir hidroksil ve ROT süpürücüsü ve tekli moleküler oksijenin güçlü bir yok edicisidir (168-171). KAR'ın antioksidan aktivitesi, SR, iskelet kas mikrozomları ve linoleik asit emülsiyonlarını da kapsayan oksidasyon model sistemlerinde dahi gösterilmiştir (167, 168). KAR suda çözünürlüğünden dolayı, hücre içerisinde yüksek konsantrasyonda bulunan oksidasyon araçları (geçiş metalleri ve oksijen radikalleri gibi) ile hücreler için iyi bir antioksidan sistem olarak çalışmaktadır (151). KAR, metal şelatasyonu ve serbest radikal süpürücü bir kombinasyonla lipit oksidasyonunu önleyebilmektedir (172). Çalışmalar gösteriyor ki, KAR ve ilgili peptitlerin doku ve organeldeki seviyesi, model membran sistemlerinin peroksidasyonunu önlemiştir (173).

2.8.4. Membran Koruyucu Özellikleri

Sarkoplazmik membran parçalarıyla yapılan çalışmalarda, KAR veya anserin ilavesiyle, lipit peroksidasyonunun neden olduğu SR- Ca^{+2} pompasına Ca^{+2} bağlanma ve Ca^{+2} -ATPaz inhibisyonunun ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (174). Bileşiklerin ikisi birlikte reaksiyona ilave edildiğinde malondialdehit konsantrasyonunun doza bağımlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. Farklı modellerde lipit peroksidasyonunda da benzer sonuçlar gösterilmiştir. Kısmen hidrofilik yapıya sahip olan KAR molekülü, membranın çift katmanlı lipit yapısındaki hasarlara bağlanabilir ve hasarın yanında oluşan peroksidasyon ürünlerinin giderilmesinde etkilidir (151).

2.8.5. Diğer Biyolojik Etkileri

KAR; nörotransmitter, antioksidan sistem (173, 175) ve antiglikasyon (176) gibi pek çok biyolojik olayla ilişkilidir.

- ❖ İnsan fibroblast kültürlerinin maksimum bölünme sayısını (hayflick limiti) artırabilir (157),
- ❖ Kas kasılmasını ve oksidatif fosforilasyonu regüle edebilir (157),
- ❖ İnsan nötrofillerinin interlekin-1 β üretimini artırır ve apoptoz önler (151),
- ❖ Trasforme hücreleri öldürerek antikanser aktivite gösterir (157),
- ❖ Mitokondriyal apoptoz yollarının inhibitörüdür (177),
- ❖ Lenste katarakt oluşumu engeller (178),
- ❖ İrritan faktörlere karşı gastrik mukoza koruyucusudur (179),
- ❖ Nöroprotektif ajan (180) olması diğer etkiler arasında sayılabilir.

2.9. KARNOZİN METABOLİZMASINDA ROL ALAN ENZİMLER VE TRANSPORT PROTEİNLERİ

2.9.1. Karnozin Sentaz

KAR'ın keşfinden sonra sıra bu dipeptidi oluşturan β -alanin ve L-histidin amino asitlerinin sentezi için gerekli olan enzimleri, faktörleri belirlemeye gelmiştir (164). Bauman ve Ingvaldsen β -alanin ve L-histidin aminoasitlerinin birbiri ile ilişkili olduğunu ancak histidin-L- β alaninin birbiri ile bağlantılı olmadığını göstermişlerdir (181). 1950'li yıllarda KAR sentez reaksiyonunun biyokimyasal özellikleri, tavuk kasından in-vitro olarak saflaştırılmış enzimle kısmen yapılmış ve bu enzim KAR sentaz (KS) olarak adlandırılmıştır (164).

KAR'ın sentezi için gerekli olan bileşenler; amino asitler (β -alanin-L-histidin), Mg^{+2} ve ATP'dir. KS geniş bir substrat yelpazesine sahiptir ve β -alanin veya L-histidin yerine farklı aminoasitler koyarak çeşitli diğer dipeptitleri oluşturabilir (182, 183). Sonraki 50 yıl boyunca bu enzim daha da saflaştırılmaya çalışılsa da başarısız olmuştur (164). 2010 yılında Drozak ve ark. KAR sentazın moleküler kimliğini belirlemiştir. Başlangıçtaki deneysel çalışmalarda karaciğer dokusunda KAR'ın sentezlenebileceği önerilmesine rağmen sonraki çalışmalarda KS'nin başlıca iskelet kası, kalp kası ve belirli beyin bölgelerinde bulunduğu açıkça gösterilmiştir (184).

2.9.2. Karnozin N-Metiltransferaz

KAR metilasyonu ile ilgili ilk kanıt Winnick T. and Winnick RE. tarafından ortaya konulmuştur (391). Anserin, ofidin/balenin ve metillenmiş KAR analoglarının sentezlenmesi için iki olası yolak vardır. Birinci enzimatik yolak, KAR üzerinde bulunan S-adenozilmetionin (SAM) e bir metil grubu transferini gerçekleştiren KAR N-metiltransferaz (KMT) vasıtasıyla. İkinci yolak ise KS aracılığıyla β -alanin ile N-pimetilhistinin enzimatik olarak reaksiyona sokulmasıyla. İlk bahsedilen yolak yani KMT, fizyolojik olarak daha önemlidir (164).

2.9.3. Karnozinaz

KAR ve ilişkili bileşikler olağan (di)peptidazlar tarafından parçalanamaz fakat onların metabolizmaları karnozinaz (KN) adı verilen kendi hidrolitik enzimlerince karakterize edilir. İlk olarak 1949 yılında Hanson ve Smith tarafından domuz böbreği kullanılarak kısmen saflaştırılmış ve tanımlanmıştır (185). Moleküler olarak tanımlanmış iki formu mevcuttur. Bunlar KN1 (serum karnozinaz) ve KN2 (doku karnozinaz) dir.

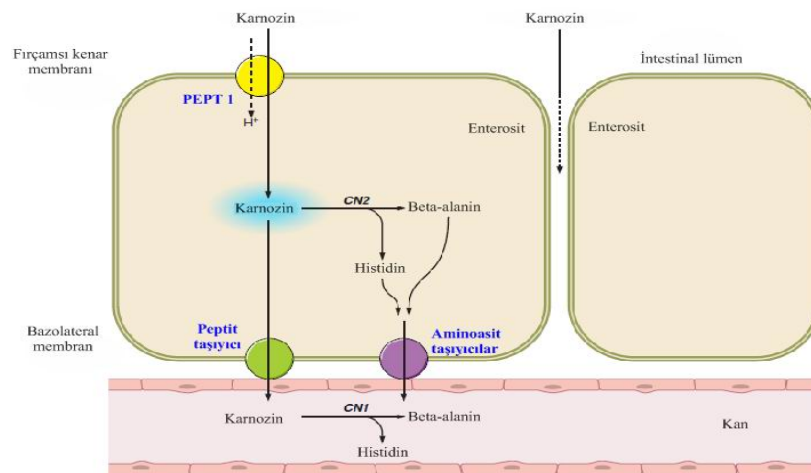
Metalloproteaz ailesinin üyeleridir. İnsanda bu enzimler % 53 sekans benzerliği gösterir ve her ikisinde homodimer olarak bulunur (164).

2.9.4. Karnozin Transport Proteinleri

KAR, H^+ 'la eşleştirilmiş oligopeptid taşıyıcıyı (POT ailesi veya SLC15 ailesi) ailenin birkaç üyesince membranlardan taşınabilmektedir. Bu ailenin memelilerdeki üyeleri oligopeptid taşıyıcılar 1 ve 2 (PEPT1- PEPT2) ve peptit/histidin taşıyıcılar 1 ve 2 (PHT1-PHT2) taşıyıcılardır. POT ailesine ait üyeler, geniş bir seçiciliğe sahiptir. KAR ve metilenmiş analoglarını taşıyabilirler (186). PEPT1-2, 400 farklı dipeptit ve 8000 farklı tripeptit taşıyabilmekte, ancak çok uzun peptitleri ve tek aminoasitleri taşıyamamaktadır. PHT1-2'lerde seçiciliğe sahiptir ancak bu taşıyıcılar hakkında çok açık bilgiler yoktur. PEPT'lerden başlıca farklılıkları di/tripeptitlere ilaveten L-histidin taşıyabilmeleridir (164).

2.9.4.1. PEPT1 ve PEPT2

PEPT1, peptitlerin intestinal absorpsiyonunda çok önemli bir role sahiptir. KAR, ince bağırsaktan emilebilir ve çok az da oral yolla mideden hidrolize edilmeden tüm olarak kana girebilmektedir (Şekil 2.9.) (187, 188). KAR mikrovilluslu membranlardan PEPT1 aracılığı ile hücreye alınır. Hücreler içine giren KAR ya KARaz 2 tarafından hidrolize edilir veya bazolateral membranın diğer tarafına taşınır. PEPT1, bir peptit/proton birlikte taşıyıcıdır ve aktivitesi düşük lümenal/apikal pH ile artırılmış olur. PEPT2, renal tübüldeki peptitlerin filtrelenmesinde reabsorpsiyona katkı sağlamaktadır. Bu taşıyıcı özellikle epitelyal hücrelerin apikal membranına lokalize olmuştur (164).



Şekil 2.9. Histidin İçeren dipeptitlerin bağırsaklardan emilimindeki olası yolak.

2.9.4.2. PHT1 ve PHT2

PEPT'ler ile ilgili biyokimyasal ve fizyolojik bilgiler yeterince vardır ancak yakın zaman da keşfedilen PHT'ler ile ilgili bilgiler çok fazla değildir. PHT1 ilk olarak sıçan beyninden Yamashita ve ark. tarafından klonlanmıştır (186). Kurbağa oosit hücrelerinde PHT1 in KAR taşıyıcı aktivitesi gösterilmiştir. Klonlanmış insan PHT1 inin, pH bağımlı KAR taşınımında rol aldığı bulunmuştur. Bhardwaj ve ark. insan PHT1 (hPHT1) klonlamıştır (189). İkinci peptid/L-histidin taşıyıcı (PHT2) Botka ve ark. (72) ve Sakata ve ark. tarafından tanımlanmıştır (189).

hPHT1 özellikle iskelet kasında ve dalakta bulunurken hPHT2 ise kalp, dalak, plasenta, akciğer ve lökositlerde olduğu moleküler çalışmalarla gösterilmiştir (190). İnsan vücudundaki KAR'ın büyük çoğunluğu iskelet kasında bulunduğu için KAR taşıyıcılarında fonksiyonel olarak iskelet kas hücrelerinde olması beklenilmektedir. Everaert ve ark. yapmış oldukları çalışmada PHT lerin mRNA transkriptlerinin fare ve insan iskelet kaslarında göstermişlerdir (191) ancak PEPT'leri gösterememişlerdir. Kastaki fizyolojik fonksiyonları ve hücre içine mi dışına mı taşıma yaptıkları da tam olarak açık değildir.

2.10. KARNOZİNİN KARDİYOVASKÜLER FONKSİYONU

KAR'ın tanımlanmış ilk fizyolojik etkilerinden birisi, köpeklere intravenöz olarak verilen KAR'ın sistemik kan basıncında geçici bir düşüşe sebep olması yönündeydi (164). Hipotansif ve antihipertansif etkisi diğer birçok memeli türünde yapılan çalışmalarla çoğunlukla desteklenmiştir (164, 192). Kan basıncı üzerine KAR'ın düşürücü etkisi büyük olasılıkla sistemik arterlerin vazodilatasyonu ile gerçekleştirilmektedir. KAR'ın damar gevşetici etkisi izole edilmiş sıçan aort halkalarında gösterilmiştir (193). Damar tonusunun regülasyonunda KAR göz önüne alındığında, sadece egzogen KAR değil aynı zamanda endojen kaynaklı KAR da normal hemodinamik regülasyonda rol almaktadır. İn-vivo olarak Zn-KAR kompleksinin oluşumu ve histamin H1 reseptörlerinin bağlanması, damar düz kaslarının kasılma ve gevşemesi ile ilgili olduğu belirlenmiştir (194, 195). Ancak KAR'ın damar çapında etkili olan mekanizmalarına alternatif olarak, karnozin-histidin- histamin yolağı, NO/cGMP mekanizması ve otonom sinir sisteminin modülasyonu da sayılabilir (193, 196, 197).

KAR izole sıçan kalpleriyle yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi kardiyak kasılabilirliği belirgin bir şekilde artırabilmektedir (198). İskelet kasındaki kasılmayı düzenlemenin altında yatan mekanizmalara paralel olarak KAR'ın ayrıca, kalp kasında hücre içi Ca^{+2} seviyesi artışı ile aktin-miyozin etkileşimini ve pH tamponlayıcı kapasiteyi artırdığı bildirilmektedir. İzole kardiyomiyosit hücrelerinde, KAR hem SR'den kalsiyum salınımını sağlar hem de kalsiyuma cevaben kasılabilir proteinlerin gerimini düzenler (199). İntrasellüler kalsiyumun modüle edilemesinin yanında, KAR ve diğer histidin içeren dipeptitler pH'nın regülasyonu ve kardiyak hücrelerde mobil tamponlayıcı sisteme katkı sağlamada rol alırlar (96). Bu bağlamda ilginç ve yeni bir hipotez Swietach ve ark. tarafından önerilmiştir. Bu hipoteze göre kardiyomiyositler lokal pH değişikliklerine cevaben fonksiyonel Ca^{+2} gradiyenti oluşturan Ca^{+2}/H^{+} değişim proteini gibi lokal pH değişikliğinde fonksiyonel Ca^{+2} artışına neden olmaktadır (200). Yukarda bahsedilen çalışmaya rağmen, kardiyovasküler sistemde bulunan histidin içeren dipeptitler hakkında çok fazla bilimsel bilgi yoktur.

2.10.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Karnozin

1990'lardan beri birçok in-vivo ve in-vitro çalışmalarda farklı hayvan modellerinde kalp beyin, karaciğer, böbrek ve testisleride içine alan organlarda iskemi/reperfüzyon hasarını azaltmak için KAR'ın kullanıldığı rapor edilmiştir. Başlangıçta İ/R nin indüklediği oksidatif stresin hücrel hasara neden olması ile, İ/R'li hayvan modellerinde koruyucu bir ajan olarak KAR'ın kullanılması antioksidan aktivitesinden dolayı düşünülmüştür. Rapor edilen birkaç çalışmada ise KAR'ın doku oksidatif hasarının düzelttiği görülmüştür. Ayrıca enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar üzerine koruyucu etkisine paralel olarak İ/R doku hasarına karşı KAR koruyuculuğu gösterilmiştir (164).

Lee ve ark. izole sıçan kalbinde ROT'ların temizlenmesi adına KAR veya histidinin bu işlevini belirlemek için çalışmalar yapmıştır. Kalbin izolasyonunu takiben, içlerinde KAR veya histidin bulunan tampon çözelti ile kalp stabil olana kadar perfüze edilmiş ve bu işlemi takiben 40 dk global iskemi sonrasında da 30 dk reperfüzyon işlemi gerçekleştirilmiştir. KAR'la perfüze edilen kalpler histidine oranla sol ventrikül diyastolik basınç (SVDB) ve dP/dt 'yi düzeltme ile fonksiyonel olarak daha başarılı olmuştur. KAR, hasarı izleyen dönemde kalp hızı ve koroner akımı düzeltmemiştir. Bu bilgiler göstermektedir ki KAR iskemik hasardan miyokardiyal hücreleri korumaktadır

(201). Yani reperfüzyon hasarını azaltmak için reperfüzyon hızını azaltmıştır. Prokop'eva ve ark.'ları tarafından yapılan çalışmada hipoksi ve reoksijenizasyondan sonra izole edilmiş sıçan kalplerinde (15mM) KAR'ın etkisi değerlendirilmiştir. KAR koroner kan akımını artırmakta, laktat dehidrojenazın salınımını ve kontraktür süresini azaltmaktadır (198). Ölümcül kan kaybı sonrasında kalp reperfüzyonu esnasında, kan yerine kullanılan maddeler içerisinde KAR verilmesinin kardiyomiyositlerin membranını hasardan koruduğu ve bu membranlar içerisine lokalize olmuş enzimlerin fonksiyonlarını normalleştirdiği gösterilmiştir (202). Gercken ve arkadaşlarınca yapılan çalışmada ise kardiyoplejik solüsyonların (miyokard kontraksiyonlarının ortadan kalkmasını sağlayan solüsyon) içerisinde verildiğinde KAR'ın yararlı kardiyak etkileri olduğunu rapor etmişlerdir. Ne yazık ki kontrollü klinik denemelerde KAR içeren ve içermeyen kardiyoplejik solüsyonlar arasında bir fark bulunmamıştır (203). Dolgikh ve arkadaşları sıçanlarda resüsitasyon sonrası gerçekleşen aritmiler üzerine KAR'ın (25 mg/kg) etkisini değerlendirmiştir. Resüsitasyon başlangıcında KAR'ın verilmesi, kardiyak kasılmaların ve solunumun daha erken düzelmesine, kardiyak ritim bozukluklarının azalmasına neden olmuştur. KAR ayrıca ATP ve fosfokreatin seviyelerini artırma yoluyla kalp biyoenerjisini düzeltmiştir. (204). Rusakov and Dolgikh'in çalışmalarında ise kan kaybı ile indüklenen Mİ'yi takiben sıçanların miyokardiyal bütünlüğü üzerine KAR'ın etkisini çalışmışlar. Bu çalışmacılar yaklaşık 4-6 dk boyunca sıçanlarda kan kaybına sebep olarak kalp krizi oluşturmuşlardır. Bu olayı takiben KAR içermeyen kan vermişler, kapalı kalp masajı ve suni tenefüs yapmışlar. Yaşama dönen sıçanlar KAR ile tedavi edilmiş ve bu sıçanlarda iki kardiyak enzim (aspartat aminotransferaz ve malat dehidrojenaz) azalmıştır. KAR'la tedavi edilen hayvanlarda ayrıca lipit peroksidasyon ürünlerinin seviyeside azalmıştır (202). Aynı zamanda kardiyomiyositlerden miyogloblin ve nükleozidlerin (ör: adenozin) salınımının azaltılmış olması ile membran koruyucu aktivitesini gösterdiği ifade edilmiştir. Asetillenmiş KAR, iskemik kasılmaları baskılamakta daha etkindir ve kalp kasılması üzerine etkisi daha belirgindir (205). Ayrıca, asetilkarnozin iskemi sırasındaki miyokardiyal kasılabilirliği düzenlemekte, bu yüzden KAR kalpte ve bununla birlikte beyinde anti-iskemik aktiviteye sahiptir (206).

P. R. Roberts ve G. P. Zaloga çalışmalarında KAR alan kalpler ile kontrol tamponu veya beta adrenerjik agonisti alan kalpleri karşılaştırdıklarında kalpte meydana gelen aritmilerin tetiklediği iskeminin oranında azalma olduğunu gözlemişlerdir (198).

KAR'ın, kalp yetmezliği ve miyokart infarktüsünü düzenlemedeki rolü ile membran depolarizasyonu ve kardiyak $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$ ın aktivasyonunu indüklediği çalışmalarda gösterilmiştir (207). KAR'ın miyofibriler ATPaz'ı aktive ettiğinde rapor edilmiştir (172, 208). Ayrıca Simonya ve ark. eritrosit membranları üzerinde bulunan $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$ aktivitesi üzerine etkilerini değerlendirmişler. Eritrosit membranları üzerindeki $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$ aktivitesi invitro çalışmada KAR tarafından artırılmıştır. İlginç bir şekilde eritrosit $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$ aktivitesi, konjestif kalp yetmezliği ve akut miyokart infarktüsülü hastalarda azalmıştır (209). P. R. Roberts ve G. P. Zaloga çalışmalarında hem intrasellüler hem de ekstrasellüler peptid olarak rol alan KAR'ın inotropik etkisini belirleyememişler. İzole hücrelerle yapılan çalışmalarda ise intrasellüler olarak iki etkiyi belirlemişlerdir. Birincisi SR'den KAR tarafından indüklenen kalsiyum salınımıdır diğeri ise kalsiyuma kasılabilir proteinlerin gerim üretme cevabındaki değişikliklerdir (198). Ayrıca KAR, kalsiyum bağımlı mekanizmalar yoluyla kasılabilirliği düzenlemekte ve kalp son yükünü (afterload) azaltarak da vaskular tonusu azaltmaktadır.

Sonuç olarak iskemik hasar süresince KAR'la yapılan çalışmalarda KAR'ın antioksidan etkilerinin iskemik hasar oluşan kalplerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde koruyucu rolü olduğu bildirilmiştir (198).

2.11. ANESTEZİ ALTINDAKİ SIÇANDA HEMODİNAMİK ÖLÇÜMLER

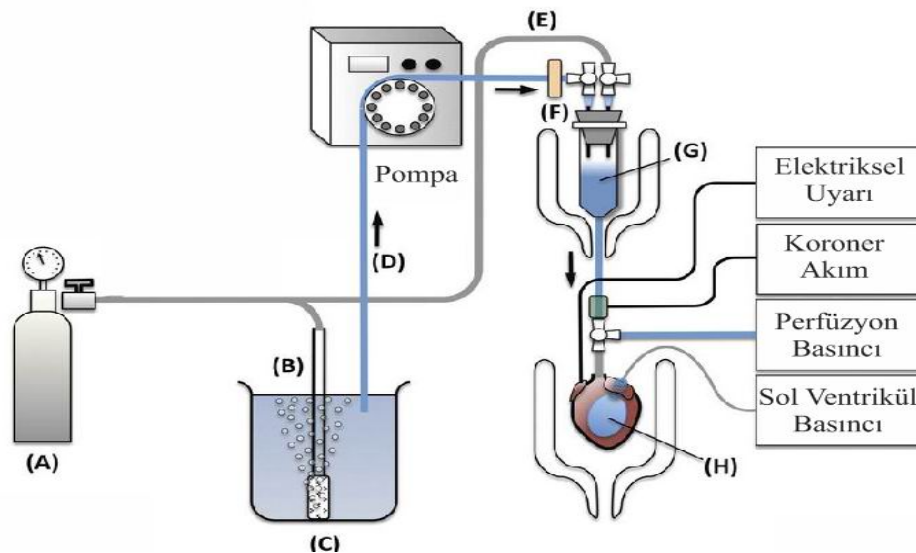
2.11.1. Langendorff Kalp Modeli

Langendorff, izole kalpte akut deneyler yapılmasını ve pek çok parametrenin aynı anda ölçülmesine olanak sağlayan kullanışlı bir yöntemdir. İzole perfüze kalp preparatı ilk kez Oscar Langendorff isimli bir Alman doktor tarafından tanımlanmıştır. Çalışmadan istenen şartlara göre modifiye edilebilir. Bugüne kadar pek çok modifikasyona uğramış olan preparat fizyolojik, farmakolojik ve biyokimyasal araştırmalarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Preparat en çok akut ilaç etkilerini araştırmak için kullanılsa da önceden belli bir uygulamaya tabi tutulmuş hayvanların kalplerindeki değişiklikler ve bu kalplere ilaçların akut etkileri de incelenebilmektedir

2.11.2. Preparatın Hazırlanması

Genel anestezi altındaki deney hayvanının kalbinde herhangi bir mekanik hasar oluşturmada öncelikle assendan (çıkan) aortu izole edilir. Hayvandan alınan kalp,

soğuk perfüzyon solüsyonuna (Ör: Krebs-Henseleit veya Tyrod solüsyonu) konulmalıdır. Bu sayede kalbin atması soğuk solüsyon içinde durur ve perfüzyon için hazır bekletilen kanüle kolayca takılarak 4/0 ipek iplikle sabitlenir. Buradan belli bir basınçla verilen perfüzyon sıvısı aort kapaklarını kapatır ve sıvı sol ventrikül içine gidemez ancak koroner arterleri perfüze eder. Perfüzat daha sonra koroner sinüsten sağ atriüme boşalır ve daha sonra pulmoner arterlerden atılır. Perfüzyon sıvısı bir ısı sarmalı aracılığıyla ısıtılmış ve % 95 O₂ + % 5 CO₂ ile oksijenlendirilmiştir. Perfüzyon başladığı anda kanül içinde hava kabarcığı olmamasına dikkat edilmelidir; varsa kalp hafifçe sıkılarak hava uzaklaştırılmalıdır. Preparat kayıtlar için gerekli prosedür yerine getirildikten sonra cidarları ısıtılan bir kalp odacığı içine alınmalıdır. Bu şekilde preparatın termoregülasyonu daha hassas bir şekilde yapılmış ve kalbin dış cidarları kurumaya karşı korunmuş olur (Şekil 2.10.). Bu yöntemle sayesinde, sistolik basıncı (SB), sol ventrikül diastol sonu basıncı (SVDSB), sol ventrikül basıncı gelişimi hızı (SVBG), basıncı gelişim hızı (+dP/dtmax), basıncı gevşeme hızı (-dP/dtmin), eğim (slope), indeks (+dp/dtmax/-dP/dtmax), kontraksiyon-zaman eğrisi altında kalan alan, kalp hızı, basıncı hız çarpanı, sol ventrikül volümü, koroner rezistans, oksijen kullanımı, refrakter periyod gibi parametreler ölçülebilir.



Şekil 2.10. Langendorff düzeneği kuruluş şeması A) 95% O₂-5% CO₂ tankı, B) Gaz dağıtım tüpü C) Krebs-Henseleit tampon deposu, D) Perfuzat hattı, E) Basıncı hattı, F) Süzgeç, G) Kompiyans çemberi, H) Balon

2.11.3. Perfüzyon Solüsyonunun Hazırlanması

Preparat genellikle modifiye Krebs veya Tyrode solüsyonları ile perfüze edilir. Preparatın iyi çalışması perfüzyon solüsyonunun kalitesine de bağlıdır. Solüsyon kesinlikle hiçbir partikül içermemelidir. Bunun için kaplar çok temiz olmalı, mümkünse deiyonize edilmiş distile su kullanılmalı ve solüsyon için en yüksek saflıkta tuzlar tercih edilmelidir. Çözelti hazırlanması bittikten sonra mutlaka uygun filtrelerle (örn. 5 µm) süzülmalıdır.

2.11.4. Perfüzyon Akım İlişkisi

a. Perfüzyon ve Akımla İlişkili Parametreler I: Perfüzyon iki ayrı şekilde yapılabilir;

-Sabit Basınç veya Sabit Akım: Sabit basınçla perfüzyonda koroner akımı, sabit akımla perfüzyonda da koroner perfüzyon basıncını kaydetmek mümkündür. Eğer yeterli basınç veya akımda perfüzyon yapılırsa preparatın yaşayabilirliği (viabilitesi) açısından iki metodun birbirine üstünlüğü yoktur. Elde edilen parametreler (basınç veya akım) birbirleriyle ters orantılı oldukları için herhangi birinin ölçülmesi diğeri hakkında da fikir verir.

b. Perfüzyon ve Akımla İlişkili Parametreler II

Bazı Langendorff sistemlerinde kullanılan perfüzyat yeniden sirküle edilir. Kullanılmış perfüzyat sıvısı da pek çok biyokimyasal parametrenin ölçülebilmesi için bize fayda sağlar. Bunlardan en sık kullanılanları arasında LDH, CK, troponin T ölçümleri, pH, pO₂, pCO₂ gibi parametrelerin *online-realttime* ölçümü için modüller üretilmiştir.

-Kasılma Gücü ile İlişkili Parametreler: Sol ventrikül içine sol atrium yoluyla bir balon yerleştirilir. Balona belli bir basınç uygulanarak preload (ön yükleme) oluşturulur. Balon içinde oluşan basınç intraventriküler basıncı simüle eder. Yeni cihazlarda ultrasonik sensörlerle ventrikül boyutlarını, segment uzunluklarını ve duvar kalınlıklarını da ölçmek mümkündür.

-Elektriksel Parametreler: Yerleştirilen iki elektrodla bipolar elektrogram kaydedilebilir. Elektrogram için metal veya suction elektrodlar kullanılır. Kalpten monofazik aksiyon potansiyelinin kaydı için özel cihazlar da üretilmiştir. Langendorff preparatında ritim ve hız değişikliklerinin deneyimizi etkilemesini istemiyorsak kalbi sağ atriума yerleştirilen iki elektrotla yarabiliriz. Uygun izolasyon yöntemleri izlenirse, uyarı yapılması elektrogram kayıtlarının alınmasına engel değildir (108).

2.12. TETRAZOLYUM METODU İLE İNFARKT ALAN ÖLÇÜLMESİ

Miyokard enfarktüsü Mİ'den kaynaklanmaktadır. Mİ'de, kasılabilir kitledeki kayıptan dolayı kalbin kan pompalama yeteneği tehlikeye girdiği için miyokardiyal enfarktüs, iskemili hastalar için ciddi bir problemdir. Son 30 yılda, kardiyoloji tarafından, kalbin enfarktüse karşı daha dayanıklı olmasına yönelik araştırmalar olmuştur. Bu tür araştırmalarda anahtar nokta kalbin tamamında ki miyokart enfarktüsünün erken belirlenmesine izin veren bir metodun bulunmasıdır. Tetrazolium boyama en popüler metot olarak öne çıkmaktadır. Bu teknik, canlı dokularda dehidrogenaz enzimi ve kofaktörlerinin tetrazolyum adı verilen boya ile formazan adı verilen pigment oluşumuna dayanmaktadır. Dokuda bu enzim ve kofaktörlerden herhangi birinin eksikliği canlılığın olmadığı bir göstergesi olduğu beyan edilmektedir. Diğer yandan pozitif olarak boyanan dokunun sağlıklı olması şart değildir ve saatler veya günler sonra bile ölebilir. Bu yüzden bir iskemik hasardan sonra ki reperfüzyon süreci ne kadar uzun olursa, ölü ve canlı dokular arasındaki ayrımın bu metod ile ayrımı daha güvenilir olur. Üç saatten daha az süreli reperfüzyonlarda (langendorff ile perfüze edilen kalplerde 2 saat) bu metod güvenilir değildir çünkü arınma süresi yetersizdir. Üç günlük sürenin optimal olduğu düşünülmektedir. Ancak, maalesef bu üç günlük periyot karmaşıklığı artırmaktadır. Bu yüzden, çoğu araştırmacı açık göğüs çalışmalarında reperfüzyonun 3-6 saat olması üzerinde uzlaşmaya varmıştır. İskemik miyokardiyum sıcaklığa oldukça duyarlıdır. Her bir derecelik soğutmanın risk zonunu % 7 oranında koruduğu rapor edilmiştir. 35° C ye düşürülmüş tavşan kalbinde yapılan 30 dakikalık koroner dal oklüzyonu infarkt alanının ortalama % 35 ten % 21 e düşmesini sağlayacaktır. Yetersiz sıcaklık kontrolü infarkt alan çalışmalarındaki parazitlerin ana kaynağıdır (210-212).

-Fosfat tamponu ile karıştırma: Tetrazolyum tozu fosfat tamponu içinde dilüe edilir. Araştırmacılar genelde düşük [NaH_2PO_4 (0.1 M)] ve yüksek [Na_2HPO_4 (0.1M)] pH sisteminden oluşan iki tamponun birleşiminden elde edilen bir tampon kullanmışlardır. Na_2HPO_4 nin moleküler ağırlığı 142 g/mol dir ve 0.1 M için 14.2 g alınıp 1 litre içerisine ilave edilir. NaH_2PO_4 ün moleküler ağırlığı 120 g/mol dir ve 0.1 M için 12 g bir litre distile su içerisine ilave edilir. Aşağıdaki tabloda bu iki tamponun belirli oranlarda karışımı ile farklı pH'da fosfat tamponu elde edilebilmektedir. Kanın pH'sı ortalama 7.4 tür. Bu açıdan tampon seçiminde pH'nın 7.4 olmasına dikkat edilmelidir.

1 gram tetrazolyum tuzu pH'sı 7.4 olan 100 ml tampon içerisinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilir. Bu oran kullanıma göre orantı ile ayarlanabilir.

-Kalp dilimleri: Araştırmacılar genelde tetrazolyum ile kalbi perfüze etmekten çok kalp dilimlerini boyamayı tercih etmişlerdir. Taze dokunun tetrazolyum ile muamele edilmesi ise önerilmemektedir. Taze dokuda kontraktür ve inkübasyon sürecinde dokuda katlanmalar olacağı için hasarlı ve hasarsız alanların planimetre ile ölçümü sağlıklı ve zor olacaktır. Bunun için alınan kalp dokuları öncelikle -20 °C'lık bir dondurucuda yaklaşık 1-2 saat bekletilmelidir. Doku katılaştıktan sonra dilimlenebilir. Kalp dilimleri yaklaşık olarak 2 mm kalınlıkta olacak şekilde ayarlanmalıdır.

-Dilimlerin inkübasyon: Dilimler 37 °C lik bir su banyosu veya termometreli bir inkübasyon ortamında tetrazolyum boyası içeren fosfat tamponu ile inkübe edilir. Dilimler tampon ortamına konulduktan sonra en az 1 dk boyunca 1 kez çalkalanmalıdır. Genellikle 15-20 dk'lık inkübasyon yetmektedir. Yaşayan dokular tetrazolyumdan dolayı koyu kırmızı bir hal alırken infarkt alanlar açık renkte kalacaktır. Bu dokular % 10'luk formaldehit içerisinde 20 dk bekletilerek boya fikse edilir.

-İnfarkt alan ölçümü: Planimetre (alan ölçümü) yöntemi ile formaldehitden çıkarılan dokular iki cam plaka veya lam arasına yerleştirilerek dilimlerin toplam alanının hasarlı alana olan oranı image J veya benzeri bir alan ölçüm programı ile hesaplanarak % hasar oranı belirlenir (Resim 2.1.)

$$\text{infarkt alan \% si} = \frac{\text{infarkt alan} * 100}{\text{tüm alan}}$$



Resim 2.1. Tetrazolyum ile boyanmış kalplerde infarkt alan gösterimi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Proje, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığının TSD-11-3715 nolu kararı ile onaylanmıştır. Çalışmamızda vücut ağırlığı 300 ± 50 g olan 4 aylık, 60 adet, Sprague Dawley cinsi, erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, oda sıcaklığı 24 ± 1 °C, nemi % 60–70 olan ve gece-gündüz döngüsü otomatik olarak 12 saat gece, 12 saat gündüz olacak şekilde ayarlanan ortamlarda, polipropilen yapıdaki kafeslerde barındırıldı. Çalışma süresince, hayvanların istedikleri kadar pelet şeklinde sıçan yemi ve çeşme suyu almalarına izin verildi.

3.1. DENEY GRUPLARI

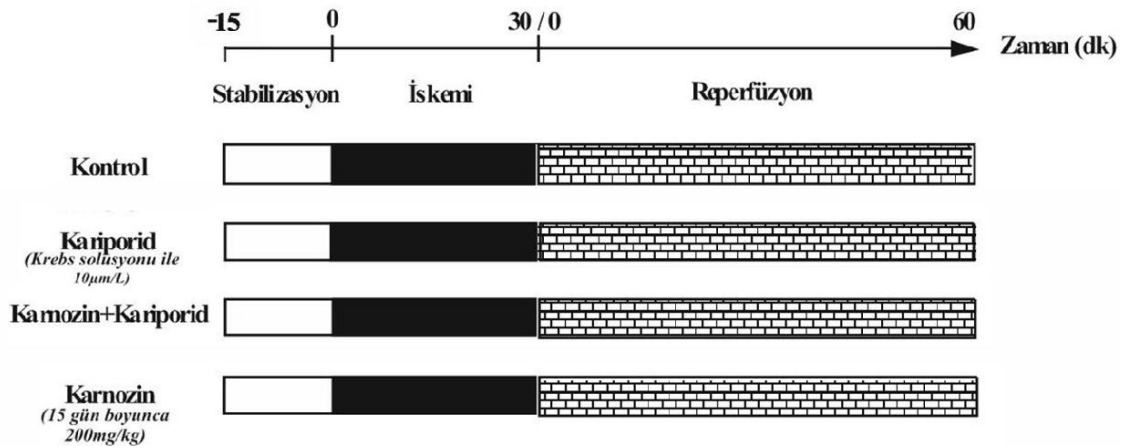
Ağırlıkları ölçülen hayvanlar rastgele 4 gruba ayrıldı (Şekil 3.1.).

Kontrol grubu (KONT); Genel anestezi altındaki hayvanların kalpleri alınarak Langendorff perfüzyon sistemine sabitlendi. İskemi öncesinde 15 dk süreyle sisteme uyum için Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edildi. Daha sonra 30 dk global iskemi ve 60 dk Krebs-Henseleit solüsyonu ile reperfüzyon yapıldı. Bu süre boyunca ventrikül basınç kaydı ve EKG kaydı alındı.

Kariporid (Na^+/H^+ pompa inhibitörü) uygulanan grup, (KRP); Genel anestezi altındaki hayvanlardan kalpler alınarak Langendorff perfüzyon sistemine sabitlendi. İskemi öncesinde 15 dk sisteme uyum için Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edildi. Daha sonra 30 dk global iskemi ve bu işlemi takiben içerisinde KRP (Sanofi-Aventis, Frankfurt/Almanya, hediye olarak alınmıştır) bulunan Krebs-Henseleit solüsyonu ($10 \mu\text{m/L}$) (213) ile 60 dk reperfüzyon yapıldı. Bu süre boyunca ventrikül basınç kaydı ve EKG kaydı alındı.

Karnozin + Kariporid grubu (KAR+KRP) : İskemi öncesi, iki hafta boyunca hergün intraperitoneal (i.p.) olarak KAR (200 mg/kg [Sigma Aldrich, St. Louis, MO]) verildi. 15. günde genel anestezi altındaki hayvanların kalpleri alınarak Langendorff perfüzyon sistemine sabitlendi. İskemi öncesinde 15 dk sisteme uyum için Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edildi. Daha sonra 30 dk global iskemi ve bu işlemi takiben içerisinde KRP bulunan Krebs-Henseleit solüsyonu (10µm/L) ile 60 dk reperfüzyon yapıldı. Bu süre boyunca ventrikül basınç kaydı ve EKG kaydı alındı.

Karnozin grubu (KAR); İskemi öncesi, iki hafta boyunca i.p olarak hergün KAR (200 mg/kg) verildi (214). KAR'ın verildiği 15. günün sonunda, genel anestezi altındaki hayvanların kalpleri alınarak Langendorff perfüzyon sistemine sabitlendi. İskemi öncesinde kalplerin sisteme uyumunu sağlamak için 15 dk Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edildi. Daha sonra 30 dk global iskemi ve 60 dk Krebs-Henseleit solüsyonu ile reperfüzyon yapıldı. Bu süre boyunca ventrikül basınç kaydı ve EKG kaydı alındı.



Şekil 3.1. Deney protokolünün şematik gösterim

3.2. LANGENDORFF SİSTEMİ İLE HEMODİNAMİK PARAMETRELERİN ÖLÇÜMÜ

Hayvanlara anestezik madde verilmeden yaklaşık 15-20 dk önce heparinli serum fizyolojik (500U/ml/i.p. hayvan başına) verildi. Her çalışma öncesinde sistem distile su ile yıkandı. Sistem 37°C sabit ısı altında pH' sı 7.3-7.4 olarak ayarlanan Krebs-Henseleit solüsyonu ile (mmol/L: NaCl 118; KCl 4.7; CaCl₂ 2.0; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1.2; Glikoz 11.1) perfüzyona hazır hale getirildi. Sistem içerisinde hava kalmamasına dikkat edildi. Her gruba ait 6 sıçan alındı. Sıçanlar, ketamin 39.35 kg/mg

ve xylazin 4.96 kg/mg karışımı ile i.p. olarak anestezi edildi. Toraksı açılan sıçanların kalbine herhangi bir mekanik hasar verilmeden aortu izole edildi. Vücuttan ayrılan kalp dokusu, içerisinde soğuk Krebs-Henseleit solüsyonu bulunan petri kabına alındı ve çok hızlı bir şekilde aortundan Langendorff perfüzyon sistemindeki solüsyonunun geldiği kanüle sabitlendi (Resim 3.1.).



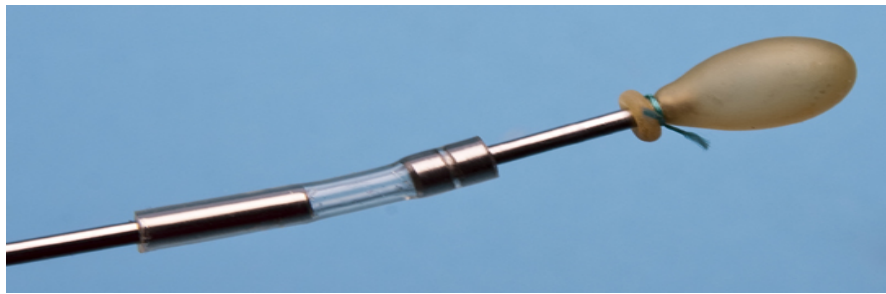
Resim 3.1. Langendorff sistemine sabitlenmiş izole kalp preparatı

Perfüzyon cihazı yardımı ile kalbe 8-10 ml/dk (kalbin büyüklüğüne göre hesaplanan değer) sabit akımla Krebs-Henseleit solüsyonu verildi. Bu perfüzyat sıvısı aort kapaklarını kapatıp, perfüzyat sıvısının sol ventriküle geçişini engelledi ve koroner perfüzyon sağlandı. Kalp dokusunu besleyen perfüzyat daha sonra koroner sinüsten sağ atriya boşaldı oradanda atık haznesine gönderildi (Resim 3.2.).



Resim 3.2. Laboratuvarımızdaki Langendorff perfüzyon sisteminin genel görünümü

Sol ventrikül basınç kayıtları alınacak ancak EKG kaydı alınmayacak kalplerin atriyumları uzaklaştırıldı. Bu işlem sonrasında içi su dolu elastik balon (Harvard marka, izovolümetrik kasılma gücünün ölçümü için 300-400 gr'lık sıçanlara özel 4 numara elastik balon ile) kalbin sol ventrikülüne yerleştirilip, balona belirli bir basınç uygulanarak önyük (preload, yaklaşık 3-7 mmHg) oluşturuldu (Resim 3.3.).



Resim 3.3. Sol ventrikül içi basınç ölçümünde kullanılan balon ve sabitleme aparatı

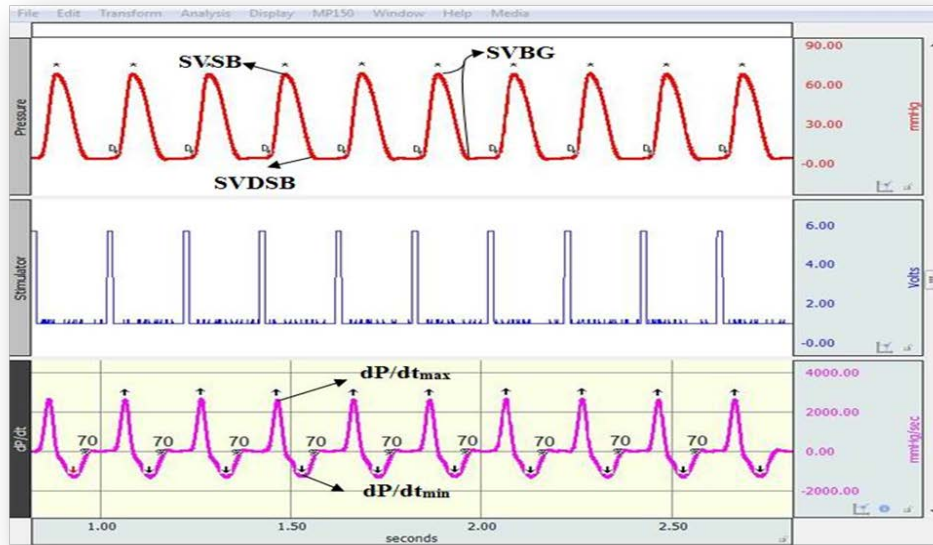
Kalpler bir analog-dijital sistem olan Biopac MP30 sistemi ve 5 Volt / 5 Hertz uyarı veren stimülatör vasıtasıyla kalbin apeksi ve bazaline yerleştirilen voltaj elektrotlarıyla uyarıldı. Voltaj (5 Volt) stimülatör aracılığı ile ayarlanırken, uyarı frekansının sıklığı (5 Hertz) Biopac MP30 sistemine ait program vasıtasıyla ayarlandı (Resim 3.4.).



Resim 3.4. BSL MP 30 sistemi ve bu sisteme ait voltaj stimülatörü

İzole organ banyosu, kalbi içine alacak şekilde sabitlendi. 15 dk iskemi öncesi (kalbin sisteme adaptasyonu ve kontrol amaçlı), 30 dk iskemi süresince ve 60 dk reperfüzyon boyunca ventrikül basınç kayıtları alındı. Oluşan yanıtlar; sol ventrikül sistolik basınç (SVSB), sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB), sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG), basınç gelişim hızı (kasılma, $+dP/dt_{max}$) ve basınç düşme hızı (gevşeme, $-dP/dt_{min}$) MP30 sistemi ve bir basınç çevirici ile bilgisayara kayıt edildi (Resim 3.5.).

Kayıtların analizi ise Acqknowledge 4.2. programı ile yapılmıştır. İskemi öncesi alınan 15 dk'lık kayıtlar ve reperfüzyon süresince alınan 60 dk'lık kayıtların ortalamaları alınarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kayıt işlemi sonrası kalpler nekrotik alan boyaması yapmak için -20°C de 30 dk bekletilerek kesitler alındı ve boyama yapıldı.



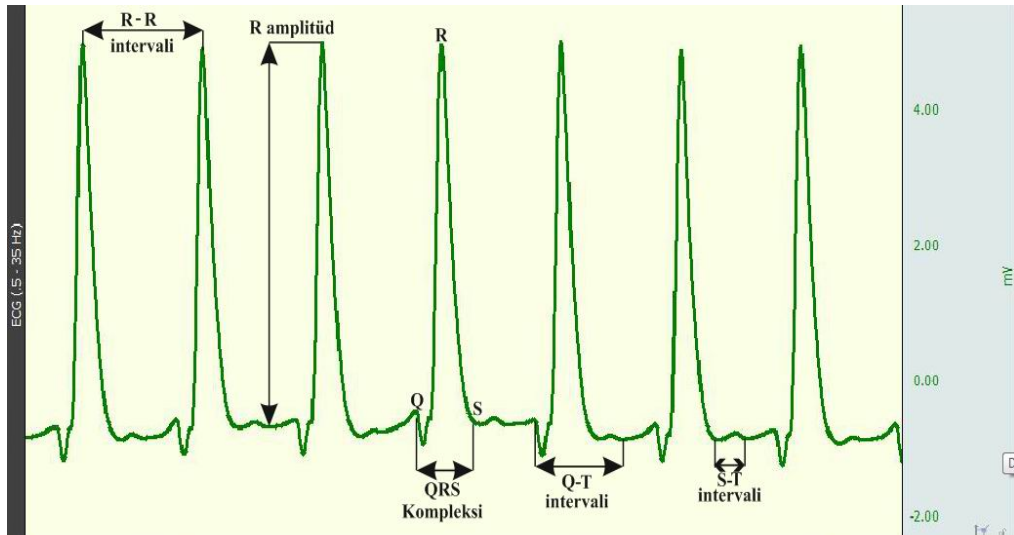
Resim 3.5. MP30 sistemi ile alınan sol ventrikül parametrelerini gösteren kayıt.

EKG değerlendirmeleri ve enzim çalışmalarının yapılması için her gruptan 9 hayvan kullanıldı. Langendorff sistemine sabitlenmiş izole kalbe yerleştirilecek bipolar iğne

elektrodların bir tanesi sağ atriyumuna yakın bir yere diğeri kalbin apeksine yerleştirilerek (Resim 3.6.) iskemi öncesi, iskemi süresince ve reperfüzyon süresince elektrokardiyografi kaydı alındı (Resim 3.7.). Bu kalplerde; atriumlar alınmadı (kalbin kendi spontan aktivitesi ile çalışması için), sitimülatörle uyarı verilmedi ve sadece EKG değerlendirilmesi ve enzim çalışması yapılacağı için ventrikül içerisine balon yerleştirilmedi. EKG kayıtlarının bitiminde kalpler biyokimyasal ölçümlerin yapılacağı zamana kadar -80 °C de saklandı.



Resim 3.6. EKG kaydı için elektrot yerleştirilmiş izole kalp preparatı



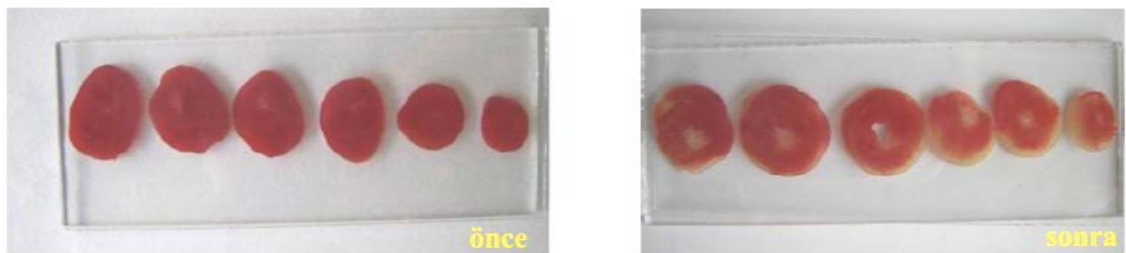
Resim 3.7. MP30 sistemi ile sıçanlardan alınan bipolar EKG kaydı.

3.3. NEKROTİK ALAN BELİRLEME

Kalpte Meydana Gelen Hasarın Trifenil Tetrazolium Klorid (TTC) ile Belirlenmesi

Reperfüzyon sonunda alınan kalpler 30 dk -20°C belli bir sertliğe ulaşması için bekletildi. pH'sı 7.4 olan 100 ml fosfat tampon solüsyonu [Dulbecco'nun fosfat tamponu; 0.8 g NaCl (137 mM), 0.02 g KCl (2.7 mM), 0.216 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8.1 mM), 0.02 g KH_2PO_4 (1.1 mM) 100 ml distile suda çözünerek oda sıcaklığında muhafaza edilir] içerisine 1gr TTC boyasından konuldu, %1'lik TTC'li fosfat tamponu hazırlandı. Bu solüsyon serolojik kuvvetler etkisinde 15 dk manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Ardından 37°C de inkübatörde 15-20 dk inkübe edildi. -20°C 'de saklanan soğuk kalp dokularından, her birinin kalınlığı 2 mm olacak şekilde, apeksden tabana doğru 5-6 kesit yapıldı.

TTC'li fosfat tamponu 37°C 'lik ortamdan çıkarıldı ve kesitler bu solüsyon içine konularak yaklaşık 15-20 dk 37°C ' de tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda alınan kalp dilimleri %10' luk formaldehitde 15- 20 dk bekletildi. Formaldehit içinden alınan her bir kesitin ağırlığı tartılarak kaydedildi. Bu kesitler iki lam arasına dizilerek asetat kalemi ile genel kesit alanı ve hasarlı kesit alanı çizildi. Hesaplamalarda Image J 1.48v programı kullanıldı. Toplam kesit alanının, hasarlı alana olan % oranı ile hesaplamaları yapıldı (Resim 3.8.) (210).



Resim 3.8. TTC ile boyama yapılmadan önceki ve sonraki kalp kesitlerinin görünümü

3.4. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN ÖLÇÜMÜ

3.4.1. Kalp Preparatlarının Biyokimyasal Ölçümler İçin Hazırlanması

Kalp doku homojenatlarının hazırlanması sırasında yapılan tüm işlemler, buz içerisinde ve 4 °C’de gerçekleştirildi. Mitokondri izolasyon protokolü olarak; sol ventriküller 250 mM sukroz, 5mM Tris HCl ve 2 mM EGTA içeren 4 ml’lik medium ortamında (cam homejenizasyon tüpü içine konularak) WiseTis HG-15D homojenizatörde 18G’lik bıçakla buz üzerinde 8000 rpm de homojenize edildi. Elde edilen homojenat 2000 g’ de 8 dk santrifüj (Nüve NF 1200R) edildi. Santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatandan 1 ml alınarak 12000 g’ de 10 dakika santrifüj edildi. İkinci santrifüjden sonra hücre sitozolünden oluşan süpernatant uzaklaştırıldı, geriye kalan “pelletdeki” mitokondriler, 140 mM KCl ve 20 mM Tris HCl içeren 250 µL’lik resüpsansiyon solüsyonuyla sulandırıldı, daha sonra ATP ölçümlerinde kullanılmak üzere -80 °C de saklandı.

Enzim ölçümü için -80 °C’de dondurularak saklanan dokular tartıldıktan sonra ağırlıkları kaydedildi. Dokular soğuk 50 mM KH₂PO₄ tampon solüsyonu (pH 7.0) içerisinde (cam homejenizasyon tüpü içine konularak) buz üzerinde gerçekleştirildi. Homejenat 4 °C’de 12000g’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısımları alınarak SOD, KAT enzim aktiviteleri ve MDA düzeyinin ölçülmesinde kullanıldı (215).

3.4.2. ATP Ölçümü

ATP ölçümü sıçan ATP eliza kiti (MyBiosource, Katolog No: MBS723034, San Diego, CA) kullanılarak yapıldı. Önceden hazırlanmış -80 °C saklanan numuneler ölçümden yarım saat önce derin dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığında çözülde. Ölçüm öncesi numuneler vortekslendi. Kit prosedürüne uygun olarak belirtilen standartlar ve numuneler plate kuyucuklarına yüklendi, Tecan Marka plate yıkayıcı ve eliza okuyucu ile değerler belirlendi.

3.4.3. Protein Miktarının Tayini

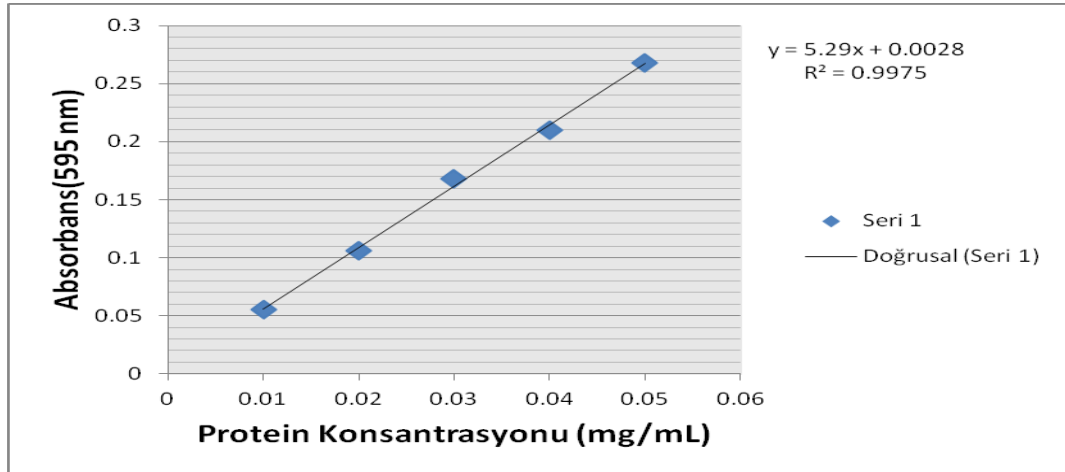
Örneklerdeki protein konsantrasyonu Bradford yöntemine göre belirlendi (216). Bradford ayırıcı hazırlanışı ise kısaca; 500 mg Comassie Brilliant Blue G 250 (Amresco), 250 mL % 96 etanol içinde iyice çözülde, daha sonra 500 mL % 85 orto-fosforik asit ilave edildi ve son hacim 1 litre olacak şekilde dH₂O eklenerek hazırlandı (Tablo 3.1). Protein miktarının belirlenmesinden önce 5X Bradford ayırıcı 1:5 oranında distile su (dH₂O) ile seyreltilde ve Whatman # 1 numaralı filtre kağıdı ile filtre edildi. Protein konsantrasyonunun tespiti için sığır serum albümini (BSA Fraksiyon-V, Sigma)

ile standart serisi oluşturuldu. 1 mg/mL BSA stoğundan 5, 10, 15, 20, 25 μ L alındı ve hazırlanan cam tüplere aktarıldı ve son hacimleri 500 μ L olacak şekilde dH₂O ile tamamlandı. Tüplerin üzerine tekrar son hacim 5 mL olacak şekilde 1X Bradford ayırıcı eklendi. Örneklerin protein konsantrasyonlarının tespiti için 4°C’ de buzlu suda tutulan her kalp örneğinden 40 μ L protein ekstraktı alınıp cam tüplere aktarıldı ve yine son hacim 1000 μ L’ ye dH₂O tamamlanarak seyreltildi (seyreltme katsayısı 1000). Bu aşamalardan sonra 1:5 oranında dilüe edilmiş 1X Bradford ayırıcısından 5 mL karışıma ilave edildi. Oda sıcaklığında yaklaşık 5-10 dakika bekletildikten sonra 595 nm’deki absorbans değerleri spektrofotometre ile belirlendi (Shimadzu UV-1800). Absorbans okumalarında plastik spektrofotometre küveti kullanıldı (0.5-2 ml, ebatı 10x4x45 mm).

Tablo 3.1. Bradford standartlarının hazırlanması

Standartlar	dH ₂ O (μ L)	1 mg/mL stok BSA (μ L)	1X Bradford Ayırıcı (mL)
Kör	500	0	5
0.01 mg/mL	495	5	5
0.02 mg/mL	490	10	5
0.03 mg/mL	485	15	5
0.04 mg/mL	480	20	5
0.05 mg/mL	475	25	5

Standartlara ait absorbans değerleri ile bir grafik elde edildi (Şekil 3.2.). Grafikten elde edilen denklem yardımı ile de protein konsantrasyonu, bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları formülden tespit edildi. Denklemde x eğim, y ise örneklerin Bradford sonucu ölçülen absorbans değerlerini temsil etmektedir. Hesaplamaya dilüsyon faktörü olarak 1000 katsayısı da dahil edildi.



Şekil 3.2. BSA standartlarından elde edilen grafik.

İskemi / reperfüzyon (I/R) grubu (KONT grubu), I/R+ Karnozin (KAR) + Kariporid (KRP) grubu= (KAR+KRP grubu), I/R + Karnozin grubu = (KAR grubu) ve I/R+Kariporid grubu = (KRP grubu) örneklerinde protein konsantrasyonları tespit edildikten sonra tüm örneklerin ortak bir konsantrasyon değerinde olması için dH₂O ile gereken seyreltme yapıldı. Ayarlamaları yapılan gruplardan, yeterli sayıda olacak kadar ependorf tüplere gruplara ait örnekler alındı ve enzim çalışmalarında kullanıldı, daha sonra yapılabilecek çalışmalar için -80°C’ de saklandı.

3.4.4. Enzim Aktivitelerinin Tayini

Bütün enzim ekstraktları enzim çalışmaları süresince 0–4°C’ de buzlu suda tutuldu. Ayrıca ışığın olumsuz etkisi olabileceği ihtimali de göz önünde tutularak örnekler mümkün olduğunca ışıktan korunmaya çalışıldı.

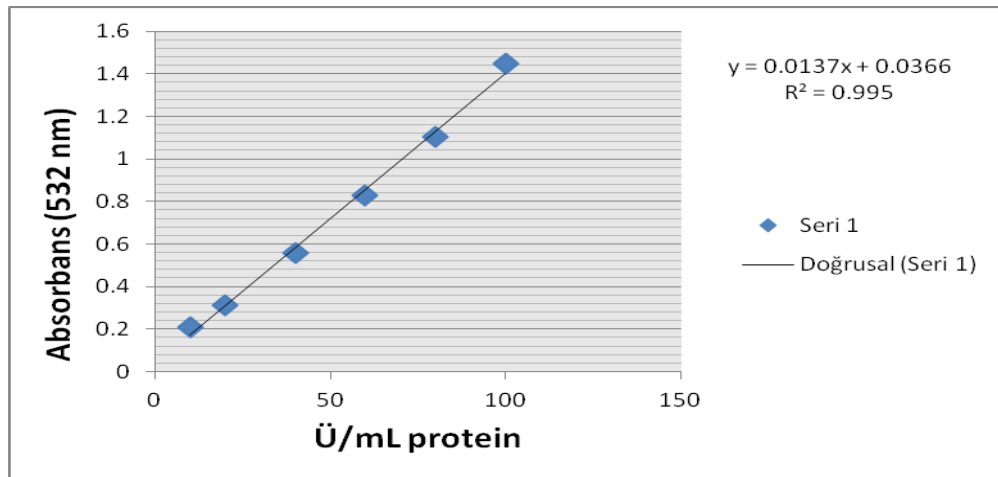
Malondialdehit (MDA) Tayini

Lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA’nın ölçümünde kullanılan spektrofotometrik metodların büyük bir kısmı, MDA’nın, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek, 532 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren pembe renkli bir kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır (217). Akciğer, karaciğer, kalp ve böbrek dokusu MDA tayininde, Ohkawa ve ark.’nın geliştirdiği metot kullanıldı (218). MDA ölçümü yapılacak her numune için kullanılacak olan kimyasallar ve işlem sırası Tablo 3.2.de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.2. Ohkawa ve ark. geliştirdiği metoda göre MDA tayininde kullanılan kimyasallar.

Süpernatant	0.1 mL
% 8.1 Sodyum dodesil sülfat	0.1 mL
% 20 Asetik asit (pH 3.5)	0.75 mL
% 0.8 Tiyobarbitürik asit	0.75 mL
dH₂O	0.3 mL
95⁰C sıcak su banyosunda 60 dk kaynatıldı	
dH₂O	0.5 mL
n-butanol/piridin (15:1)	2.5 mL
4⁰C’de 4000 rpm’de 15 dk santrifüje edildi	

Spernatantlardan 0.1 mL alınıp kapaklı cam tüplere konuldu. Üzerlerine sırasıyla 0.1 mL sodyum dodesil sülfat (% 8.1), 0.75 mL asetik asit (% 20: pH 3.5), 0.75 mL tiyobarbitürik asit (% 0.8) ve 0.3 mL dH₂O eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra ağızları sıkıca kapatılan tüpler, 95⁰C sıcak su banyosunda 60 dk kaynatıldı. Kapakları açılarak soğutulan tüplere, 0.5 mL dH₂O ve 2.5 mL n-butanol/piridin (15:1) karışımı eklendi, vorteksle iyice karıştırıldı. Tüplerin 4⁰C’de 4000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmesi ile elde edilen pembe organik fazın absorbanısı, 532 nm’de, distile su ile aynı şekilde çalışılan kre karşı ölçüldü. Değerlendirme standart eğri (şekil 3.3.) zerinde yapıldı. Standart eğriden elde edilen doku MDA seviyeleri (nmol/mL), aynı süpernatantlarda Bradford yöntemi ile ölçülen miligram protein başına verildi (nmol MDA/ mg protein).



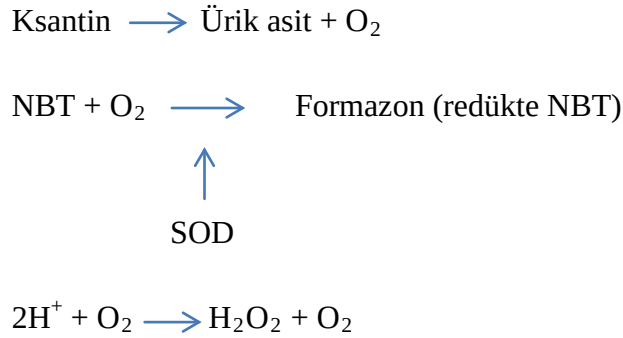
Şekil 3.3. MDA standartlarından elde edilen grafik

Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Çalışmaya alınan sıçanların kalp dokularındaki SOD aktivitesi tayininde Sun ve ark. tarafından geliştirilen metod kullanıldı (219).

Metodun prensibi: Ksantin oksidaz (XO) ile ksantin oksidasyonu sırasında açığa çıkan $O_2^{\bullet}$, nitroblue tetrazolium (NBT) gibi boyar maddeleri redükleyerek formazonları oluşturmaktadır. Süperoksit anyonunun, H_2O_2 'e dismutasyonunu sağlayan SOD varlığında, XO reaksiyonları ile üretilen $O_2^{\bullet}$, sürekli tüketileceğinden, NBT ile reaksiyona giren $O_2^{\bullet}$ miktarı azalacak ve bu yolla formazon oluşumu önlenecektir.

SOD aktivitesi, XO'ın katalizlediği tepkimede, NBT redüksiyonunun inhibisyon derecesine bağlı olarak ölçülebilir. SOD aktivitesi yükseldikçe, NBT redüksiyonu ile formazon oluşumu azalacaktır.



SOD aktivitesi tayin edilecek her numune için, toplam hacim 2.45 mL olacak şekilde, Tablo 3.3. verilen konsantrasyonlarda bir deney karışımı hazırlandı:

Tablo 3.3. Sun ve ark. geliştirdiği metoda göre SOD tayininde kullanılan deney karışımı.

0.3 mM Ksantin	1.0 mL
150 µM NBT	0.5 mL
0.4 M Sodyum karbonat	0.3 mL
0.6 mM EDTA	0.5 mL
1 gr/L BSA	0.15 mL
Deney karışımı	2.45 mL

Deney karışımı pipetlenen numune tüplerinin üzerine kalp doku homojenatlarından elde edilen, 0.5 mL süpernatant ve deney karışımı içeren kontrol tüpüne, 0.5 mL 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.0) ilave edildi. Deney tüpleri 25°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra, her birinin üzerine, eşit zaman aralıkları ile 0.05 mL 167 Ü/L XO eklenerek reaksiyon başlatıldı. Tüpler, 25°C’de 20 dakika süreyle tekrar inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, yine eşit zaman aralıkları ile tüplere 1 mL 0.8 mM CuCl₂ ilavesi ile reaksiyon durduruldu. Numune ve kontrol tüplerinde, formazon oluşumundan kaynaklanan renk şiddeti, 560 nm dalga boyunda, distile su körüne karşı, spektrometrede okundu. SOD içermeyen kontrol tüpünde, maksimum formazon oluşumu (Optik Dansite (OD): 0.250) gözlemlendi.

Standart serinin hazırlanması: SOD (3300 Ü/mg solid/mg protein), 0.6 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde, dH₂O ile çözüldü. Bu stok standart 0.01 M fosfat tamponu ile dilüe edilerek, deney ortamında sırasıyla 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 ng konsantrasyonlarında olacak şekilde, SOD çalışma standartları hazırlandı ve numune gibi çalışıldı.

Hesaplama: Standart seri ve numune tüplerinde % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Kontrol OD} - \text{Numune OD})}{\text{Kontrol OD}} \times 10$$

Standart seri için hesaplanan % inhibisyon değerlerine karşılık gelen SOD konsantrasyonları kullanılarak; SOD tarafından NBT redüksiyon hızının inhibisyon grafiği elde edildi. Grafik yardımı ile numunelere ait % inhibisyon değerlerinde ünite SOD değerleri hesaplandı. Bu değerler metodun uygulanması sırasında kullanılan dilüsyon faktörleri ile çarpılarak numunelerin gerçek SOD ünitelerine ulaşıldı. Bradford yöntemine göre protein miktarları da tayin edilen kalp doku homojenatlarında SOD aktivitesi, spesifik aktivite cinsinden, Ü/mg protein olarak verildi.

Katalaz Aktivitesi Tayini

Kalp dokusunda katalaz aktivitesi tayininde Aebi tarafından geliştirilen metod kullanıldı (220). Metodun H₂O₂’in katalaz tarafından O₂ ve H₂O’ya parçalanması esnasında reaksiyon karışımındaki absorban değişiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.



KAT aktivitesi tayininde her numune için kullanılacak olan kimyasallar Tablo 3.4.'de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.4. Aebi ve ark. geliştirdiği metoda göre KAT tayininde kullanılan deney karışımı

Fosfat tamponu (50 mM; pH 7.0)	a) 6.81 g. KH_2PO_4 1000 mL dH_2O tamamlandı.
	b) 8.90g. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1000mL dH_2O tamamlandı.
	a ve b çözeltileri 1:1.55 oranında karıştırıldı.
Hidrojen peroksit (% 30)	1 μL
Homejenat	20 μL

Deney tüpüne 979 μL 0.05 M, pH 7.0 Fosfat tamponu, 1 μL % 30 H_2O_2 pipetlendi. Ortama daha sonra 20 μL homejenat pipetlenerek, 25°C'de 240 nm dalga boyunda dH_2O körüne karşı spektrofotometrik olarak 5 dakika absorbans değişimi izlendi. Katalaz aktivitesinde, kalp dokularında 120 saniyeden sonra bir değişim gözlenmediğinden, çalışmada katalaz aktivitesinin kalp dokusu için 120 saniye boyunca izlenmesi uygun bulundu.

Standart serinin hazırlanması: Standart olarak saf katalaz (Bovine Liver Catalase, Sigma) kullanıldı. 2.5- 5.0- 7.5 ve 10.0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda katalaz standart solüsyonu hazırlandı. Deney tüpüne 2 mL fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.0) ve 1 μL % 30 H_2O_2 pipetlendikten sonra ortama en son 100 μL standart eklendi. 25°C'de 240 nm dalga boyunda 180 saniye süreyle spektrofotometrik olarak absorbans değişimi izlendi. $\Delta\text{OD}/\text{dk}$ hesaplanarak bu değerlerle standart eğri çizildi. $\Delta\text{OD}/\text{dk}$ hesaplanarak, katalaz miktarları standart eğriden elde edildi. Kalp dokusunda Bradford yöntemi (154) ile protein tayini yapılarak sonuçlar $\mu\text{g/g}$ protein cinsinden verildi.

Hesaplar:

$$x = A \mu\text{g Katalaz/mL (Numunedeki katalaz miktarı)}$$

Numune μg protein		A μg Katalaz
1000 μg protein		y μg Katalaz

$$y = B \text{ } \mu\text{g katalaz / mg protein} \times 2.8 \text{ (faktör)} = \ddot{U} \text{ / mg protein}$$

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel hesaplamalar, Microsoft Office Excell Office 2007 ve SPSS 21.0 paket programları kullanılarak yapıldı. İskemi öncesi ve sonrası grup içi değerlendirmeler için ise bağımlı örneklem t-testi kullanıldı. İkiden çok grup arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde; normal dağılıma uygunluk saptanan koşullarda, gruplar arası değerlendirme için tek yönlü ANOVA uygulandı ve ardından post hoc test olarak Tukey testi kullanıldı. Değerler ort. $\pm$ SS olarak gösterildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

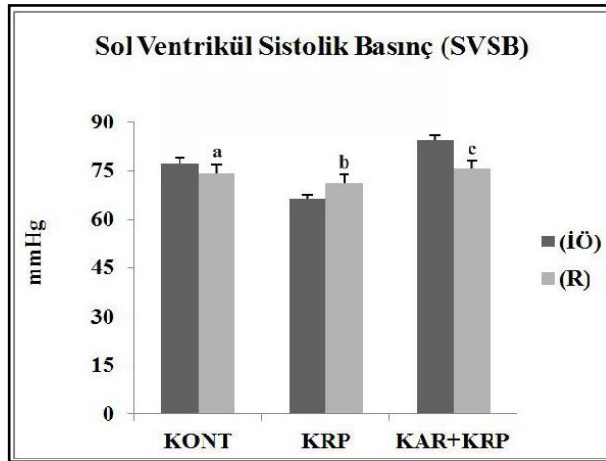
4.BULGULAR

4.1.Kariporidin İskemi/Reperfüzyon Hasarını Azaltma Etkisinde Karnozinin Rolü

4.1.1. Sol Ventrikül Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

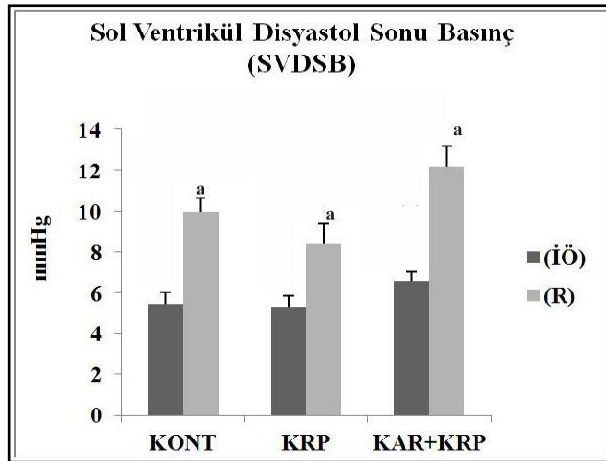
Etik kurulun hayvan kullanım sayısında yaptığı kısıtlamalar nedeniyle elektrofizyolojik parametrelerin ölçümü için dokuzar hayvan ayrılmış fakat bunların altışar adedinde başarılı kayıt alınmıştır. Amacımıza yönelik öncelikli olarak üç deney grubu tasarlanmıştır. Tüm gruplarda Langendorff sistemi kullanılarak izole kalpte global İ/R işlemi yapılmıştır. Gruplar sadece İ/R yapılan KONT grubu, iskemi yapıp reperfüzyon esnasında içerisinde kariporid bulunan (10µm/L) perfüzyon solüsyonunun verildiği KRP grubu ve kalp izole edilmeden iki hafta önce karnozin verilmeye başlanarak (200 mg/kg/gün) iki hafta sonunda izole edilen kalp dokusuna reperfüzyon esnasında kariporid verilen KAR+KRP grubu şeklinde tasarlanmıştır. İskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası *gruplar arası* istatistiksel farklılıklar bulgular ve tartışma kısmında ele alınmamıştır. Sebebi, KRP sadece reperfüzyon esnasında KAR ise 2 hafta süreyle verildiği için grupların iskemi öncesi ve reperfüzyon süresince alınan gruplar arası kayıt değerlendirmelerinde farklılık olması muhtemel olduğu için göz ardı edilmiştir.

KRP'nin kalp fonksiyonları iskemi öncesi – reperfüzyon sırasındaki grup içi istatistiksel karşılaştırmasında, KRP SVSB'yi anlamlı düzeyde artırmıştır. ($p<0.002$). KONT ve KAR+KRP grubunda bu değer anlamlı düzeyde azalmıştır (sırasıyla $p<0.04$, $p<0.001$ - Şekil 4.1.1a.).



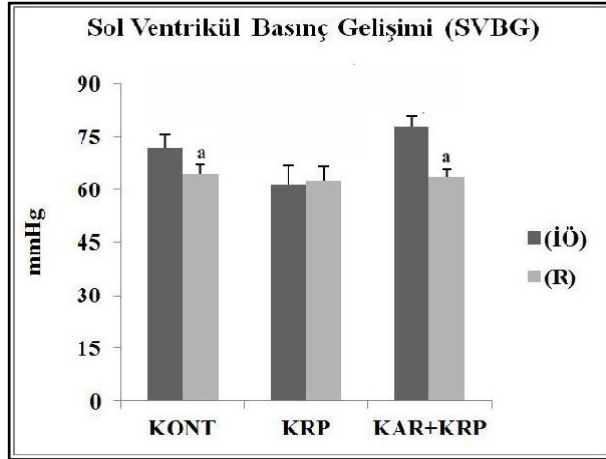
Şekil 4.1.1.a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB). **Grup içi değerlendirme; a:** $p<0.04$, **b:** $p<0.001$, **c:** $p<0.002$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

SVDSB değerleri, her grubun iskemi öncesi – reperfüzyon sırasındaki grup içi istatistiksel karşılaştırmalarında KONT, KRP ve KAR+KRP gruplarında anlamlı artış (tüm gruplar için $p<0.001$ -Şekil 4.1.1b) bulunmuştur. KRP verilen gruptaki artış diğer iki gruptan daha az olmuştur.



Şekil 4.1.1.b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB). **Grup içi değerlendirme; a:** $p<0.001$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

SVBG grup içi istatistiksel değerlendirmesinde KRP dışındaki gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterirken KRP grubundaki değişim anlamlı düzeyde farklı bulunmamıştır. (Şekil 4.1.1c., Tablo 4.1.1a.).



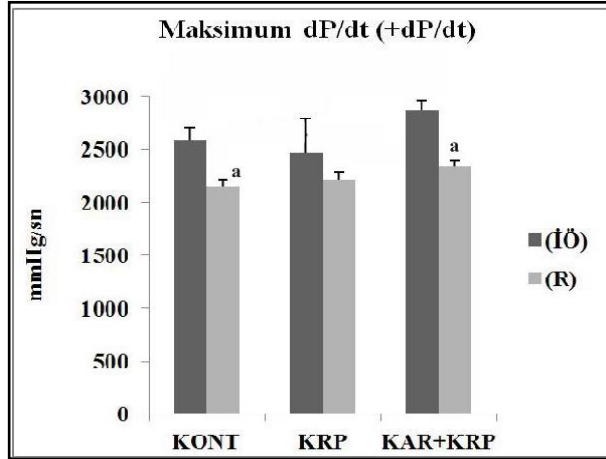
Şekil 4.1.1c. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG). **Grup içi değerlendirme; a:** $p < 0.001$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Tablo 4.1.1a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB), sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB) ve sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG) ölçümlerine ait veriler.

Parametreler (mmHg)	KONT (n=6)	KRP (n=6)	KAR+KRP (n=6)
SVSB(İÖ)	77.17 $\pm$ 1.58	66.27 $\pm$ 1.50	84.24 $\pm$ 1.37
SVSB (R)	74.26 $\pm$ 2.62 ^a	71.01 $\pm$ 3.00 ^b	75.66 $\pm$ 2.19 ^c
SVDSB (İÖ)	5.41 $\pm$ 0.60	5.29 $\pm$ 0.55	6.53 $\pm$ 0.48
SVDSB (R)	10.01 $\pm$ 0.63 ^a	8.40 $\pm$ 0.99 ^a	12.22 $\pm$ 1.00 ^a
SVBG (İÖ)	71.75 $\pm$ 4.07	61.47 $\pm$ 5.04	77.71 $\pm$ 3.19
SVBG (R)	64.36 $\pm$ 2.63 ^a	62.62 $\pm$ 3.78	63.47 $\pm$ 2.16 ^a

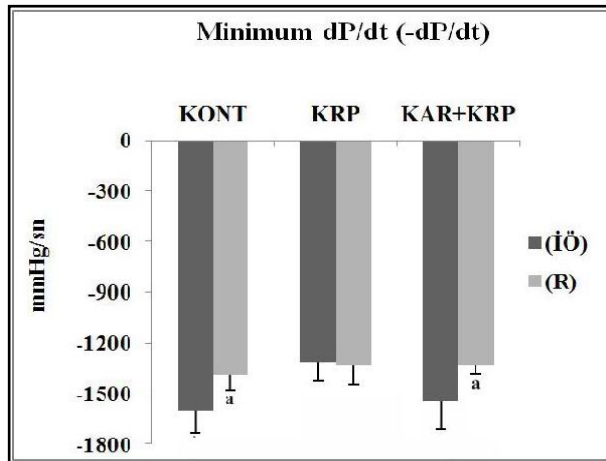
SVSB grup içi değerlendirme; a: $p < 0.003$, **b:** $p < 0.004$, **c:** $p < 0.001$ iskemi öncesine göre. **SVDSB grup içi değerlendirme; a:** $p < 0.001$ iskemi öncesine göre. **SVBG için grup içi değerlendirme; a:** $p < 0.001$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Her grubun iskemi öncesi ile reperfüzyon esnasındaki $+dP/dt$ değerleri grup içi istatistiksel karşılaştırmada, KONT ve KAR+KRP gruplarında anlamlı azalma gösterirken (her iki grup için $p<0.001$), KRP grubunda anlamlı bir değişim bulunmamıştır (Şekil 4.1.1d.).



Şekil 4.1.1d. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç değişim hızı ($+dP/dt$). **Grup içi değerlendirme; a:** $p<0.001$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

İskemi öncesi ile reperfüzyon esnasındaki $-dP/dt$ değerleri, grup içi istatistiksel karşılaştırmada KONT ve KAR+KRP gruplarında anlamlı azalma bulunmuştur (her iki grup için $p<0.001$). KRP grubunda ise anlamlı düzeyde bir değişim bulunmamıştır (Şekil 4.1.1e., Tablo 4.1.1b.).



Şekil 4.1.1e. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül minimum basınç değişim hızı ($-dP/dt$). **Grup içi değerlendirme; a:** $p<0.001$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Tablo 4.1.1b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç değişim hızı (+dp/dt) ve minimum basınç değişim hızı (-dp/dt)

Parametreler (mmHg/sn)	KONT (n=6)	KRP (n=6)	KAR+KRP (n=6)
+ dp/dt (İÖ)	2596.3±111.4	2466.9±335.8	2873.4±88.2
+ dp/dt (R)	2159.3±59.7 ^a	2214.0±74.2	2332.5±72.5 ^a
- dp/dt (İÖ)	1602.1±132.0	1315.2±112.3	1548.8±165.0
- dp/dt (R)	1393.8±87.4 ^a	1330.3±116.7	1332.8±54.8 ^a

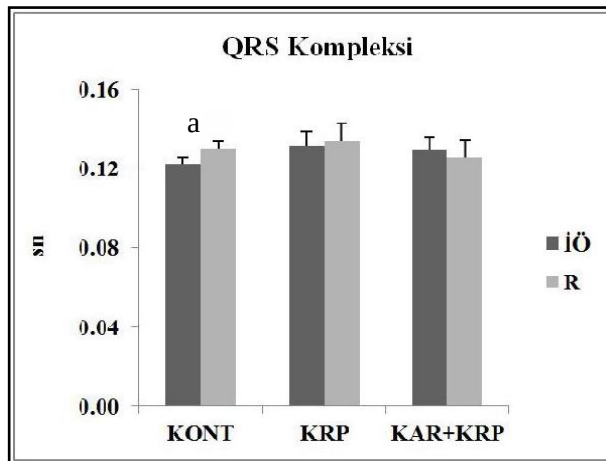
+dp/dt grup içi değerlendirme; a: p<0.001 iskemi öncesine göre. -dp/dt grup içi değerlendirme; a: p<0.001 iskemi öncesine göre. Değerler ortalama ±SS olarak verildi.

Ventrikül basınç parametrelerinin tamamı göz önünde bulundurulduğunda KRP'nin reperfüzyon sırasında az da olsa fonksiyonları düzelttiği, KAR tedavisi almış grupta ise beklenen düzeltici etkinin gözlenmediği bulunmuştur.

4.1.2. EKG Parametrelerinin Değerlendirilmesi

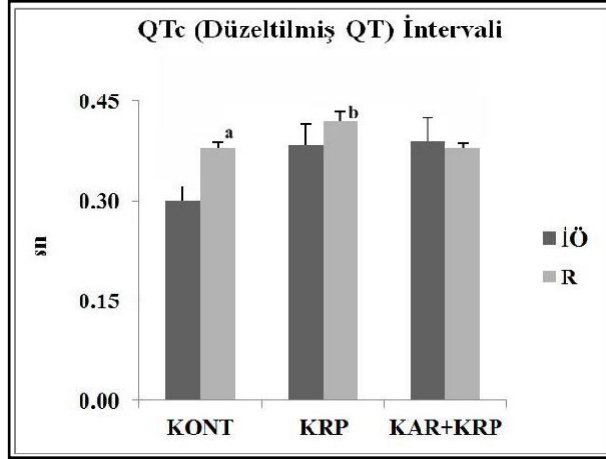
Kalplerde Langendorff sistemi ile oluşturulan İ/R geliştirme işlemi esnasında KRP muamelesi sadece reperfüzyon süresince yapılmıştır. EKG parametrelerinde ventrikülde görülen olumlu etkiler tam olarak görülmemiştir.

QRS kompleksi KONT grubu hariç diğer iki grupta iskemi öncesine göre reperfüzyon aşamasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişmemiştir (Şekil 4.1.2a.).



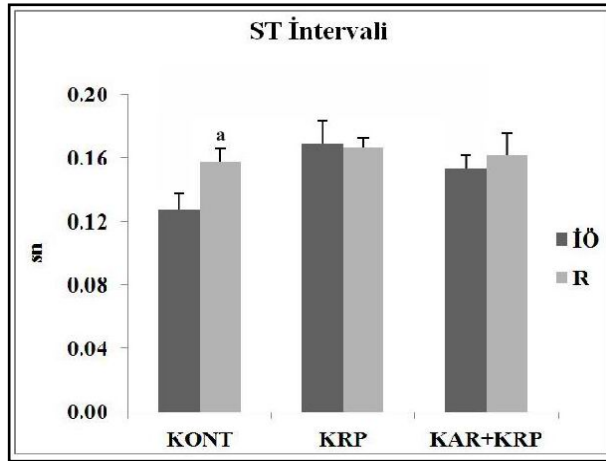
Şekil 4.1.2a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen QRS kompleksi. Grup içi değerlendirme; a:p<0.02 düzeyinde iskemi öncesine göre. Değerler ortalama ± SS olarak verildi.

QTc (düzeltilmiş QT) intervali grup içi değerlendirmede, KRP verilen grupta reperfüzyon sırasında iskemi öncesine göre anlamlı bir artış ($p<0.003$) göstermiş fakat bu artış KONT grubuna ($p<0.001$) kıyasla daha az olmuştur. KAR+KRP verilen grupta ise QTc intervalinde anlamlı bir değişim olmamıştır (Şekil 4.1.2b.).



Şekil 4.1.2b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen QTc (düzeltilmiş QT) intervali. **Grup içi değerlendirme; a:** $p<0.001$, **b:** $p<0.02$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

ST intervali grup içi değerlendirildiğinde sadece KONT grubunda anlamlı artış ($p<0.001$) olduğu gözlenirken, diğer iki grupta iskemi öncesine göre önemli bir değişiklik yoktur (Şekil 4.1.2c., Tablo 4.1.2a.).



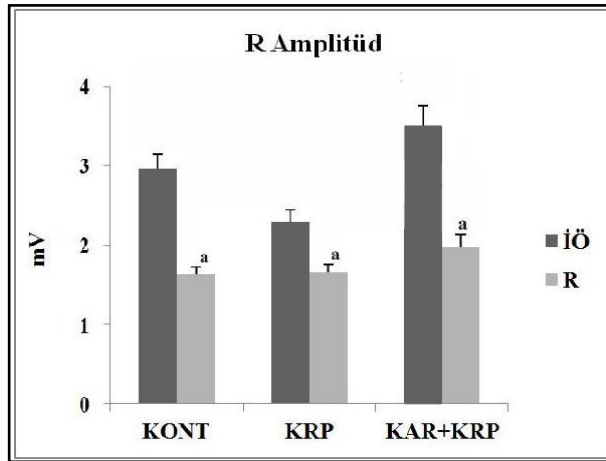
Şekil 4.1.2c. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen ST intervali. **Grup içi değerlendirme; a:** $p<0.001$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Tablo 4.1.2a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen EKG parametrelerinin değerlendirilmesi

EKG Parametreleri (sn)	KONT (n=9)	KRP (n=9)	KAR+KRP (n=9)
QRS (İÖ)	0.122±0.003	0.131±0.008	0.129±0.007
QRS (R)	0.129±0.004 ^a	0.134±0.008	0.125±0.009
QTc (İÖ)	0.300±0.008	0.382±0.031	0.388±0.047
QTc (R)	0.379±0.064 ^a	0.417±0.016 ^b	0.378±0.007
ST (İÖ)	0.127±0.009	0.168±0.051	0.152±0.035
ST (R)	0.157±0.006 ^a	0.166±0.048	0.161±0.026

QRS kompleksi için grup içi değerlendirme; a:p<0.02 iskemi öncesine göre. **QTc intervali için grup içi değerlendirme;** a:p<0.001,b: p<0.02 iskemi öncesine göre. **ST intervali için grup içi değerlendirme;** a:p<0.001 iskemi öncesine göre. Değerler ortalama ± SS olarak verildi.

İskemi öncesi ve reperfüzyon esnasından kayıtlanan R amplitüd değerleri grup içinde istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tüm gruplarda iskemi öncesine göre anlamlı düşüş bulunmuştur (p<0.001). Sadece KRP ile muamele edilen grubun iskemi öncesi ve reperfüzyon sırasındaki R amplitüd değerleri arasındaki fark diğerlerinden daha azdır. (Şekil 4.1.2d., Tablo 4.1.2b.).



Şekil 4.1.2d. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen R amplitüdü. **Grup içi değerlendirme;** a:p<0.001 iskemi öncesine göre. Değerler ortalama ± SS olarak verildi.

Tablo 4.1.2b. R amplitüd değerlendirmesi

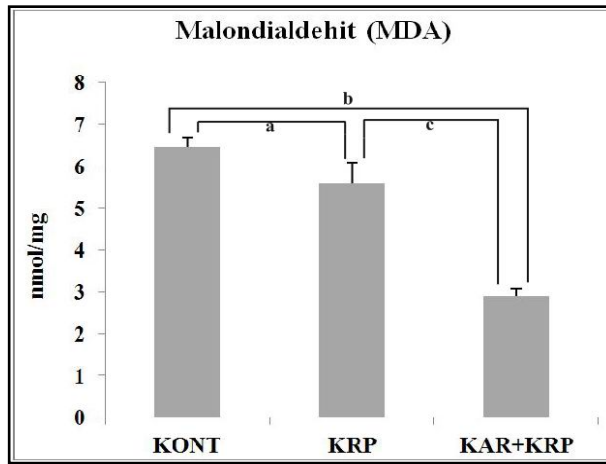
R- amplitüdü (mV)	KONT (n=9)	KRP (n=9)	KAR+KRP (n=9)
İskemi öncesi	0.122±0.003	0.131±0.008	0.129±0.007
Reperfüzyon	0.129±0.004 ^a	0.134±0.008 ^a	0.125±0.009 ^a

Grup içi değerlendirme a:p<0.001 iskemi öncesine göre. Değerler ortalama ± SS olarak verildi.

4.1.3. Biyokimyasal Analizler

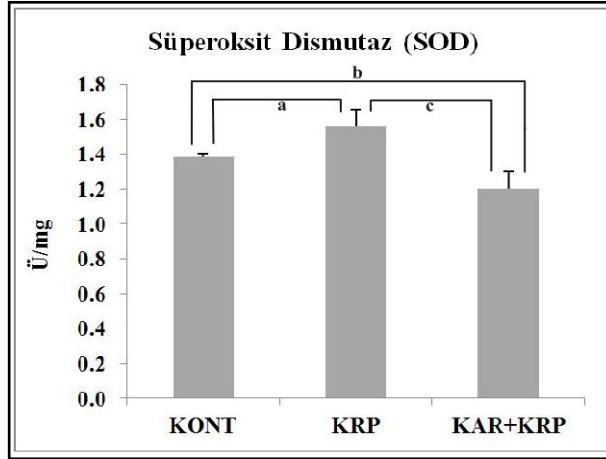
ROT'ların yapmış olduğu lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, ROT'lar aracılığı ile oluşan hücresel toksisite veya hücre ölümüne karşı organizmayı koruyan ve antioksidan sistem olarak bilinen SOD ve KAT enzim aktiviteleri reperfüzyon işlemi bitiminde alınan kalp doku homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Veriler, gruplar arası istatistiksel olarak değerlendirme ile yorumlanmıştır.

Grupların kalp dokularındaki MDA seviyesine bakıldığında, KRP grubunda KONT grubuna göre MDA değerinin anlamlı düzeyde azaldığı ($p<0.003$) fakat KAR ön tedavisi uygulanan ve KRP ile muamele edilen KAR+KRP grubunda bu azalmanın daha fazla olduğu ($p<0.001$) bulunmuştur (Şekil 4.1.3a.).



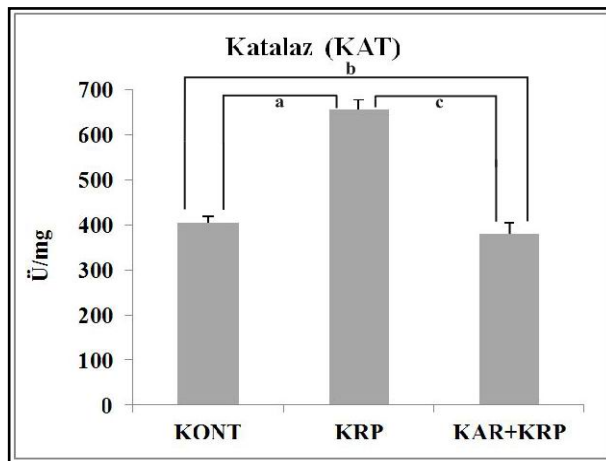
Şekil 4.1.3a. Gruplar arası MDA seviyesi; **a:** $p<0.003$ KONT grubuna göre, **b:** $p<0.001$ KONT grubuna göre, **c:** $p<0.001$ KRP grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

SOD aktivitesine bakıldığında KRP grubunun SOD aktivitesi KONT grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.006$) bulunmuştur. KAR verilen grubun KRP ile muamelesi (KAR+KRP) SOD aktivitesini KONT ve KRP grubuna göre anlamlı düzeyde azaltmıştır ($p<0.001$, Şekil 4.1.3b.).



Şekil 4.1.3b. Gruplar arası SOD aktivitesi; **a:** $p<0.006$ KONT grubuna göre, **b:** $p<0.001$ KONT grubuna göre. **c:** $p<0.001$ KRP grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi

Katalaz enzim aktivitesi ise KRP ile muamele edilen sıçan kalplerinde MDA'ya bağlı olarak KONT ve KAR+KRP grubuna göre anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0.001$). KAR ile birlikte KRP muamelesi, KAT enzim aktivitesini önemli düzeyde etkilememiştir. KAR+KRP'de bu değer KONT grubuna göre anlamlı düşüş göstermiştir ($p<0.03$, Şekil 4.1.3c., Tablo 4.1.3a.).



Şekil 4.1.3c. Gruplar arası KAT aktivitesi; **a:** $p<0.001$ KONT grubuna göre, **b:** $p<0.03$ KONT grubuna göre. **c:** $p<0.001$ KRP grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

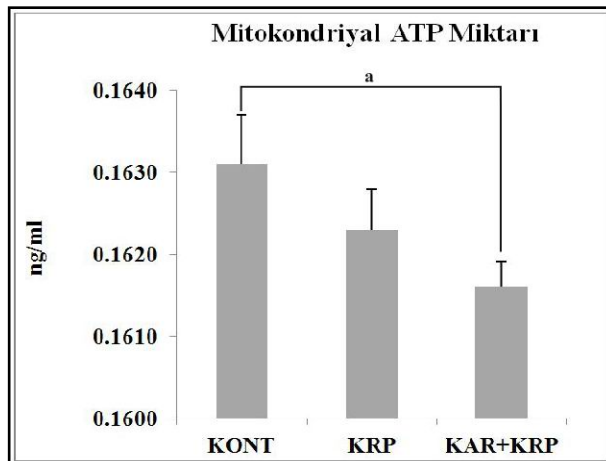
Tablo 4.1.3a. MDA seviyesi, SOD ve KAT aktivitelerinin biyokimyasal olarak değerlendirilmesi

PARAMETRELER	KONT (n=9)	KRP (n=9)	KAR+KRP (n=9)
MDA (nmol/mg)	6.46±0.22	5.61±0.48 ^a	2.910±0.16 ^{b,c}
SOD (Ü/mg)	1.38±0.026	1.52±0.09 ^a	1.20±0.10 ^{b,c}
KAT (Ü/mg)	405.2±13.7	657.9±21.7 ^a	380.6±23.9 ^{b,c}

Gruplar arası değerlendirme MDA için; a: p<0.003 KONT grubuna göre, b: p<0.001 KONT grubuna göre, c: p<0.001 KRP grubuna göre. **SOD için;** a: p<0.006 KONT grubuna göre, b: p<0.001 KONT grubuna göre, c: p<0.001 KRP grubuna göre. **KAT için a:** p<0.001 KONT grubuna göre, b: p<0.03 KONT grubuna göre, c: p<0.001 KRP grubuna göre. Değerler ortalama ± SS olarak verildi.

Mitokondriyal ATP üretim miktarı değerlendirildiğinde, KRP verilen grupta KONT grubuna göre bir azalma görülmüş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. KAR ön tedavisi alan grubun KRP ile muamele edilmesi iskemi reperfüzyon esnasında mitokondriyal fonksiyonu etkilemiş ATP üretimi KONT grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır (p<0.001, Şekil 4.1.3d., Tablo 4.1.3b).

KRP, ATP oluşumunu azaltmış, mitokondriyal fonksiyonu iyileştirmemiştir. Bu bulgu yukarda bahsedilen diğer biyokimyasal bulgular ve ventrikül fonksiyon parametreleri ile çelişen bir bulgudur.



Şekil 4.1.3d. Gruplar arası mitokondriyal ATP miktarı; a: p<0.001 KONT, KRP, ve KAR+KRP grubuna göre, b: p<0.001 KONT' a göre. Değerler ortalama ± SS olarak verildi.

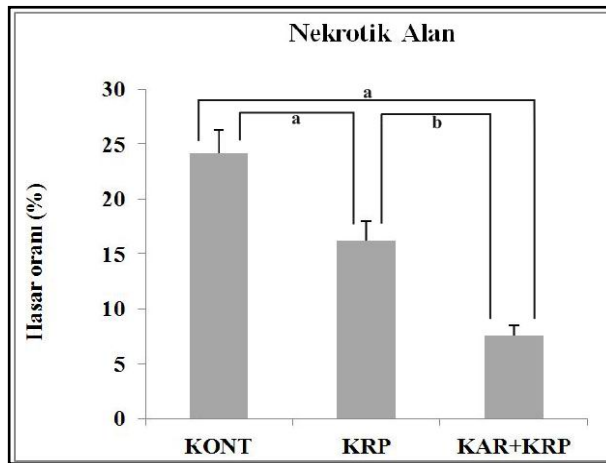
Tablo 4.1.3b. ATP miktarının biyokimyasal olarak değerlendirilmesi.

	KONT (n=9)	KRP (n=9)	KAR+KRP (n=9)
ATP miktarı (ng/ml)	0.1630±0.00067	0.1623±0.00058	0.1615±0.00032 ^a

Gruplar arası değerlendirme a: $p<0.001$ KONT göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

4.1.4. Nekrotik Alan Değerlendirilmesi

Gruplar arası yapılan istatistiksel değerlendirmede nekrotik alan %'si KRP grubunda KONT grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.001$). KAR ile birlikte KRP muamelesi gören kalplerdeki hasar, hem KONT hemde KRP ile muamele edilen gruplardan daha az olmuştur. ($p<0.001$, Şekil 4.1.4., Tablo 4.1.4.).



Şekil 4.1.4. İskemi / reperfüzyon sonrası alınan kalp dokularındaki nekrotik alan %'si **a:** $p<0.001$ KONT grubuna göre **b:** $p<0.001$ KRP grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Tablo 4.1.4. Kalp dokusunda meydana gelen nekrotik alan %'si

	KONT (n=6)	KRP (n=6)	KAR+KRP (n=6)
Nekrotik alan %'si	24.47±2.31	16.07±1.94 ^a	7.86±1.03 ^{a,b}

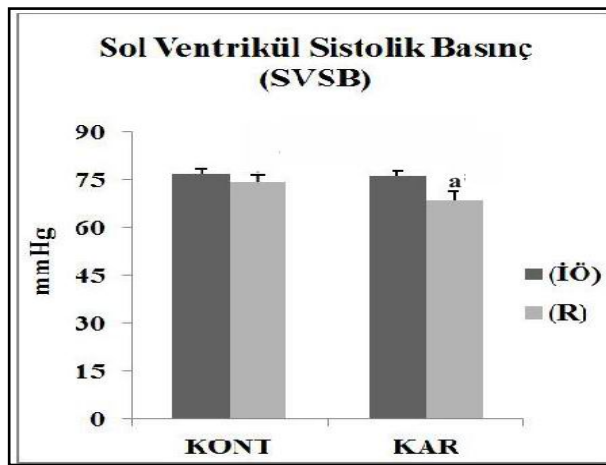
Gruplar arası değerlendirme a: $p<0.001$ KONT grubuna göre **b:** $p<0.001$ KRP grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

4.2. Karnozinin İskemi Reperfüzyon Hasarına Etkisi

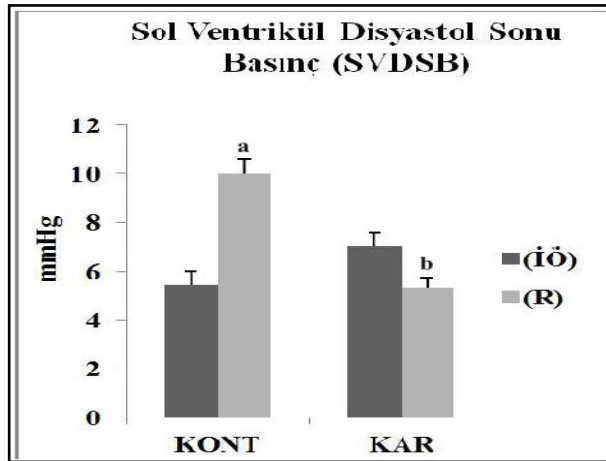
4.2.1. Sol Ventrikül Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

İki hafta süreyle KAR verilen gruba reperfüzyon esnasında KRP verilmesi (KAR+KRP) reperfüzyona bağlı gelişen ventrikül fonksiyon bozukluklarında beklenen iyileşmeyi yapmamıştır. KAR+KRP verilen grupta MDA seviyesinde önemli bir azalma ve buna bağlı olarak SOD ve KAT aktivitesinde KONT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Mitokondriyal ATP miktarına bakıldığında ise KAR+KRP grubunun ATP miktarı KONT ve sadece KRP verilen gruba kıyasla istatistiksel olarak daha az bulunmuştur. Bütün bu bulgular bize KAR ile birlikte KRP verilmesinin mitokondriyal fonksiyonların daha da bozulduğunu göstermiştir. Bu durumu daha açık bir şekilde ortaya koymak adına sadece KAR verilen başka bir grup oluşturulup KONT grubu ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

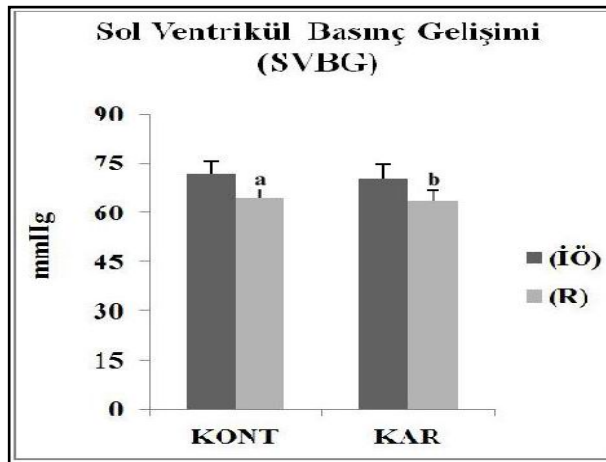
KAR verilen grupta KONT grubuna göre ventrikül basınç parametreleri incelendiğinde iskemi öncesine göre reperfüzyon esnasında SVSB, SVDSB, SVBG (Şekil 4.2.1a, 4.2.1b, 4.2.1c ve Tablo 4.2.1a) ve $+dP/dt$, $-dP/dt$ (Şekil 4.2.1d, 4.2.1e ve Tablo 4.2.1b) değerlerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.03$, $p<0.002$, $p<0.001$ ve $p<0.003$). Özellikle KAR grubunda SVDSB, iskemi öncesine göre anlamlı düzeyde azalırken KONT grubunda bu parametre anlamlı düzeyde yükselmiştir. Bu durum bize iki hafta süreyle KAR verilmesinin KRP'den bağımsız olarak SVDSB'deki azalmanın gelişmesinde KRP'ye göre daha fazla düzelme geliştiğini göstermiştir.



Şekil 4.2.1a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB). **Grup içi değerlendirme; a:** $p<0.001$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.



Şekil 4.2.1b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül diyastol sonu basıncı (SVDSB). **Grup içi değerlendirme; a:** $p < 0.001$, **b:** $p < 0.03$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

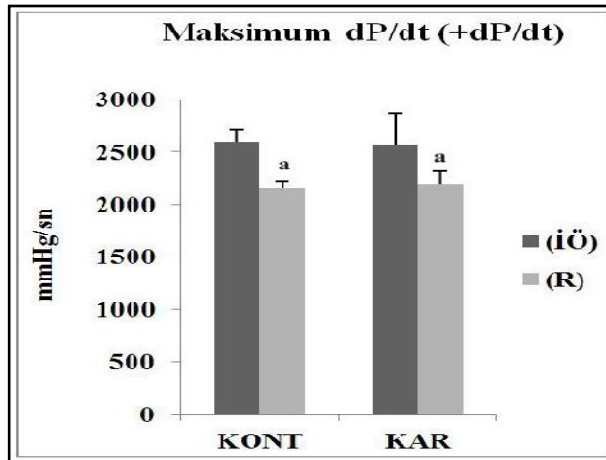


Şekil 4.2.1c. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül basıncı gelişimi (SVBG). **Grup içi değerlendirme; a:** $p < 0.004$, **b:** $p < 0.01$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

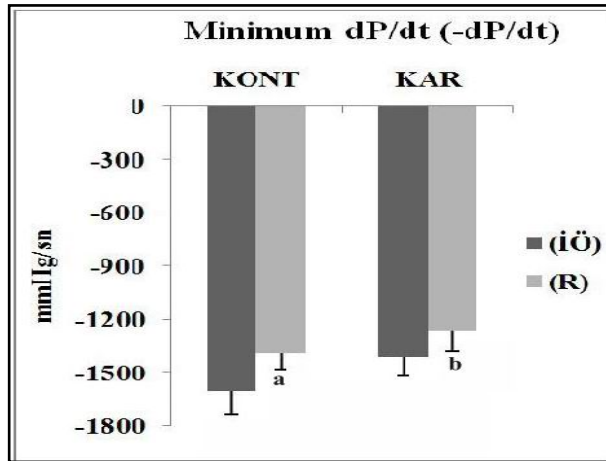
Tablo 4.2.1a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül sistolik basınç (SVSB), sol ventrikül diyastol sonu basınç (SVDSB) ve sol ventrikül basınç gelişimi (SVBG) ölçümlerine ait veriler

Parametreler (mmHg)	KONT (n=6)	KAR (n=6)
SVSB(İÖ)	77.17±1.58	76.70±1.43
SVSB (R)	74.26±2.62	68.98±2.54 ^a
SVDSB (İÖ)	5.41±0.60	7.01±0.59
SVDSB (R)	10.01±0.63 ^a	5.31±0.45 ^b
SVBG (İÖ)	71.75±4.07	70.18±4.63
SVBG (R)	64.36±2.63 ^a	63.56±2.99 ^b

SVSB grup içi değerlendirme; a: $p<0.001$ iskemi öncesine göre. SVDSB grup içi değerlendirme; a: $p<0.001$, b: $p<0.03$ iskemi öncesine göre. SVBG için grup içi değerlendirme; a: $p<0.004$, b: $p<0.01$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.



Şekil 4.2.1d. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç değişim hızı (+dP/dt). **Grup içi değerlendirme;** a: $p<0.001$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.



Şekil 4.2.1e. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül minimum basınç değişim hızı (-dP/dt). **Grup içi değerlendirme; a:** $p < 0.001$, **b:** $p < 0.003$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Tablo 4.2.1b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen sol ventrikül maksimum basınç değişim hızı (+dP/dt) ve minimum basınç değişim hızı (-dP/dt)

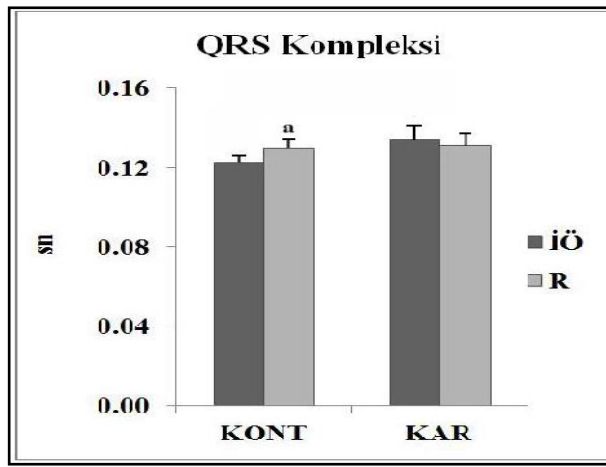
Parametreler (mmHg/sn)	KONT (n=6)	KAR (n=6)
+ dp/dt (İÖ)	2596.3 $\pm$ 111.4	2570.2 $\pm$ 293.6
+ dp/dt (R)	2159.3 $\pm$ 59.7 ^a	2196.8 $\pm$ 114.5 ^a
- dp/dt (İÖ)	1602.1 $\pm$ 132.0	1416.5 $\pm$ 107.3
- dp/dt (R)	1393.8 $\pm$ 87.4 ^a	1270.3 $\pm$ 110.0 ^b

+ dp/dt grup içi değerlendirme; a: $p < 0.001$ iskemi öncesine göre. - dP/dt grup içi değerlendirme; a: $p < 0.001$, b: $p < 0.003$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

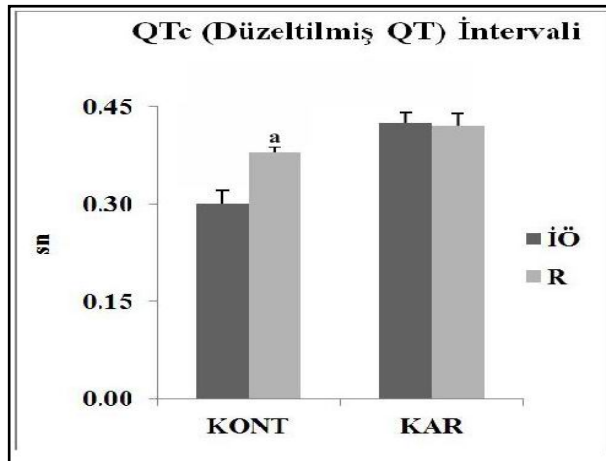
4.2.2. EKG Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Kalplerde Langendorff sistemi ile oluşturulan iskemi/ reperfüzyon geliştirme işleminde grup içi istatistiksel karşılaştırma yapılmıştır.

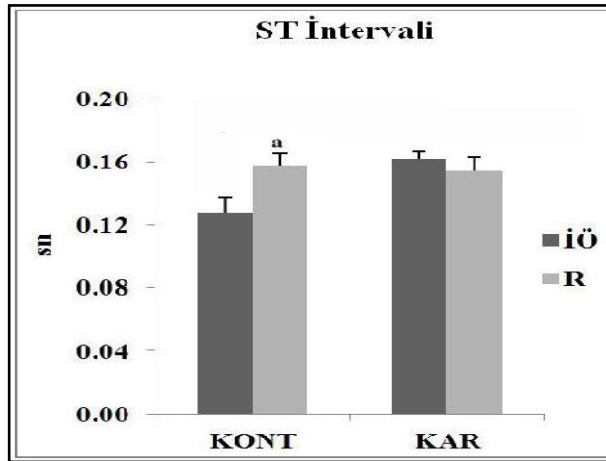
EKG parametrelerinde KAR verilen gruplarda patolojik bir bulguya rastlanmamıştır (Şekil 4.2.2a, 4.2.2b, 4.2.2c. ve Tablo 4.2.2a). R amplitüd büyüklüğü hem KONT hemde KAR gruplarında azalma bulunmuştur ($p<0.001$). Bu azalma KAR verilen grupta daha azdır (Şekil 4.2.2d ve Tablo 4.2.2b).



Şekil 4.2.2a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen QRS kompleksi. **Grup içi değerlendirme; a:** $p<0.01$ düzeyinde iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.



Şekil 4.2.2b. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen QTc (düzeltilmiş QT) intervali. **Grup içi değerlendirme; a:** $p<0.001$ grup içi iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

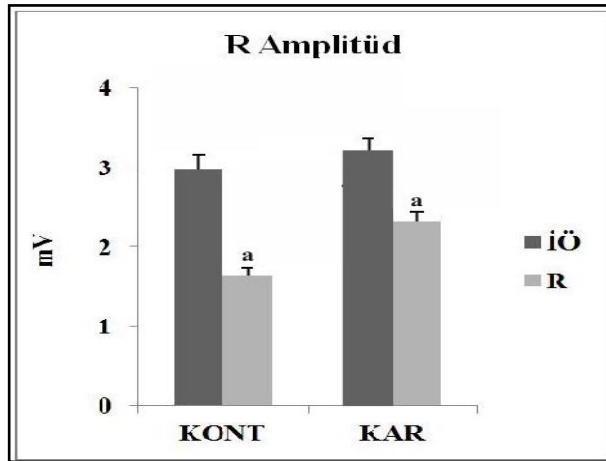


Şekil 4.2.2c. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen ST intervali. **Grup içi değerlendirme; a:** $p<0.001$ düzeyinde iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Tablo 4.2.2a. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen EKG parametrelerinin değerlendirilmesi

EKG Parametreleri (sn)	KONT (n=9)	KAR (n=9)
QRS (İÖ)	0.122±0.003	0.133±0.007
QRS (R)	0.129±0.004 ^a	0.130±0.006
QTc (İÖ)	0.300±0.008	0.424±0.016
QTc (R)	0.379±0.064 ^a	0.419±0.020
ST (İÖ)	0.127±0.009	0.161±0.012
ST (R)	0.157±0.006 ^a	0.154±0.028

QRS kompleksi için grup içi değerlendirme; a: $p<0.01$ iskemi öncesine göre. **QTc intervali için grup içi değerlendirme; a:** $p<0.001$ iskemi öncesine göre. **ST intervali için grup içi değerlendirme; a:** $p<0.001$ iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.



Şekil.4.2.2d. İskemi öncesi ve reperfüzyon süresince kaydedilen R amplitüdü. **Grup içi değerlendirme:** a:p<0.001 düzeyinde iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

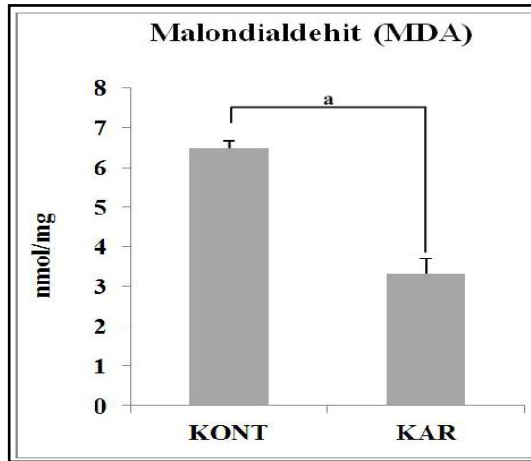
Tablo 4.2.2b. R amplitüd değerlendirmesi

R- amplitüdü (mV)	KONT (n=9)	KAR (n=9)
İskemi öncesi	0.122 $\pm$ 0.003	0.133 $\pm$ 0.007
Reperfüzyon	0.129 $\pm$ 0.004 ^a	0.130 $\pm$ 0.006 ^a

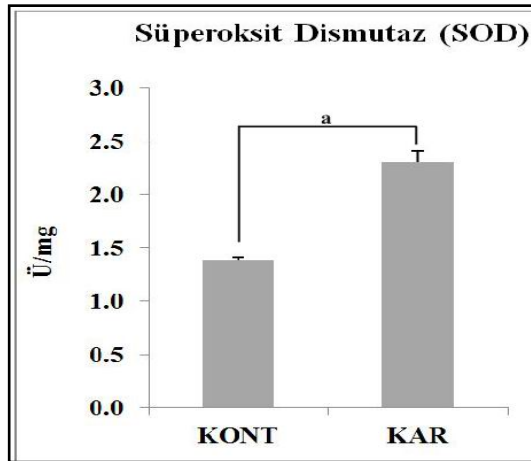
Grup içi değerlendirme a:p<0.001 düzeyinde iskemi öncesine göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

4.2.3. Biyokimyasal Analizler

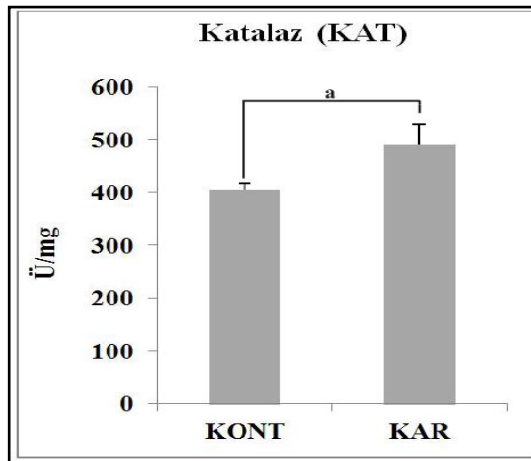
KAR verilen grubun kalp dokularındaki MDA seviyesi KONT grubuna göre önemli derecede düşük bulunmuştur (p<0.001, Şekil 4.2.3a.).KAR verilen grubun SOD ve KAT aktivitesi KONT grubuna göre anlamlı artış göstermiştir (p<0.001, Şekil 4.2.3b, 4.2.3c ve Tablo 4.2.3a). En önemli bulgu, mitokondriyal ATP seviyesinde KAR verilmesine bağlı olarak meydana gelen artış olmuştur (p<0.001, Şekil 4.2.3d ve Tablo 4.2.3b). Halbuki iki hafta süreyle KAR verilen ve reperfüzyon esnasında KRP verilen grupta (KAR+KRP) KRP verilmesi KAR'ın iyileştirici etkisini engellemiş ve mitokondriyal ATP üretimini KONT'a göre önemli derecede azaltmıştır.



Şekil 4.2.3a. Gruplar arası MDA seviyesi; **a:** $p<0.001$ KONT grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.



Şekil 4.2.3b. Gruplar arası SOD aktivitesi; **a:** $p<0.001$ KONT grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

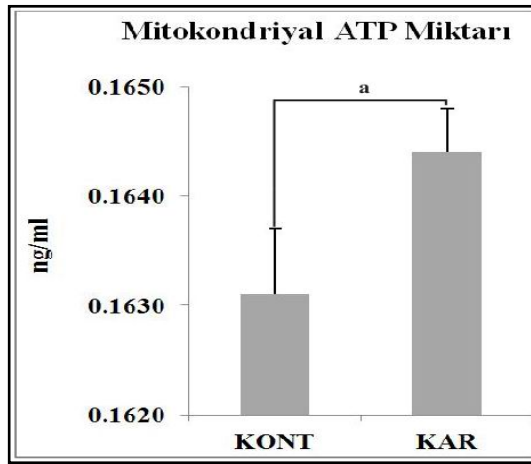


Şekil 4.2.3c. Gruplar arası KAT aktivitesi; **a:** $p<0.001$ KONT grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Tablo 4.2.3a. MDA seviyesi, SOD ve KAT aktivitelerinin biyokimyasal olarak değerlendirilmesi

Parametreler	KONT (n=9)	KAR (n=9)
MDA (nmol/mg)	6.46±0.22	3.33±0.37 ^a
SOD (Ü/mg)	1.38±0.026	2.32±0.10 ^a
KAT (Ü/mg)	405.2±13.7	491.3±37.5 ^a

Gruplar arası değerlendirme; a: p<0.001 KONT grubuna göre. Değerler ortalama ± SS olarak verildi.



Şekil 4.2.3d. Gruplar arası mitokondriyal ATP miktarı; **a:** p<0.001 KONT' a göre. Değerler ortalama ± SS olarak verildi.

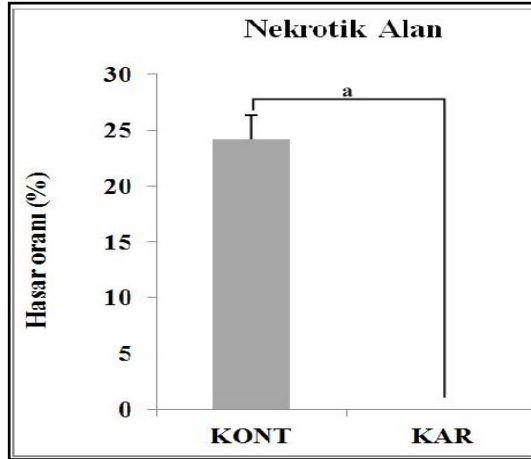
Tablo 4.2.3b. ATP miktarının biyokimyasal olarak değerlendirilmesi.

	KONT (n=9)	KAR (n=9)
ATP miktarı (ng/ml)	0.1630±0.00067	0.1644±0.00040 ^a

Gruplar arası değerlendirme; a: p<0.001 KONT' a göre. Değerler ortalama ± SS olarak verildi.

4.2.4. Nekrotik Alan Değerlendirilmesi

Nekrotik alan %'sinde sadece KAR'ın yapmış olduğu etki bariz bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.2.4. ve Tablo 4.2.4.). KAR grubu KONT grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuş ($p<0.001$) ve KAR verilen grupta nekrotik alan gözlenmemiştir.



Şekil 4.2.4. İskemi / reperfüzyon sonrası alınan kalp dokularındaki nekrotik alan %'si. **a:** $p<0.001$ KONT grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Tablo 4.4. Kalp dokusunda meydana gelen nekrotik alan %'si

	KONT (n=6)	KAR (n=6)
Nekrotik alan %'si	24.47 $\pm$ 2.31	0 ^a

Gruplar arası değerlendirme; **a:** $p<0.001$ KONT grubuna göre. Değerler ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yüksek lisans tez çalışmasında, sıçan kalplerinde geliştirilen kalp yetmezliğinin güçlü bir antioksidan olan KAR ile önemli düzeyde iyileştirildiğinin gözlenmesi, KAR ile ilgili proje çalışmalarımızı artırmıştır. Kalp fonksiyonunda ve histolojisinde gözlenen iyileşmenin KAR'ın sadece antioksidan özelliğine bağlı olarak gelişemeyeceğini, hücre içerisinde başka etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür. pH düzenlenme mekanizmasını açıklama amaçlı yapılan çalışmalarda, pHi hareketliliğine hem mobil hem de sabit tamponların aracılık ettiği, sabit tampon olan proteinlerin H^+ difüzyonunu kısıtlayan moleküler ağırlıklarından dolayı çok düşük intrasellüler hareketliliğe sahip olduğu belirlenmiştir (27). Hücre içindeki H^+ 'leri hücre içinden dışarı, dışarıdan içeri mekik dokuma şeklinde taşınmasını sağlayan mobil tamponların, H^+ 'leri NHE1'in yakınına taşıdığı, böylece pompa aktifliğini artırdığı, onları hücre içerisinde bağlayarak tamponlamaya yardımcı olduğu, aynı anda Ca^{+2} 'nin SR'dan miyofibril yakınına taşınmasında önemli rol aldığını ifade eden çalışmalar iskemi/reperfüzyon önleyici etki mekanizma açıklamalarında ilgi görmektedir (221). Kalbin kendine özgü mobil tamponlarının çoğunu ise histidin dipeptitler veya histidin içeren dipeptitlerin (asetilkarnozin, anserin ve homokarnozin gibi) oluşturduğu, sitoplazma ve sarkolemma arasında H^+ iyonlarını taşıdıkları ifade edilmiştir (28, 29).

Pek çok çalışmada, akut iskemik atak sırasında oksijen yokluğuna bağlı olarak ATP'nin glikolizis ile elde edildiği, biriken laktik asidin H^+ ile değiştirilmesine bağlı pHi konsantrasyonunda artış olduğu, hücrenin H^+ 'yi uzaklaştırmak için NHE1 sistemini kullandığı, aynı zamanda hücre içi tamponlar ile pH artışını engelleme mekanizmasını aktive ettiği belirtilmiştir. Bu dönemde oksidatif fosforilasyon ile ATP oluşturma mekanizması çalışmadığı için üretilen ATP yetersizdir. Bir müddet sonra pek çok iyon pompa aktivitesi ve buna bağlı sekonder aktif transport olayları azalacaktır. Hücre içi Na^+ , Ca^{+2} ve H^+ artışı hücre membran ya da organel membran yapı hasarlarını tetikleyecek ve iskemik hasarı başlatacaktır. Bu dönemde reperfüzyon periyoduna

kıyasla radikal oluşumunda fazla bir artış yoktur, hücrelerde apoptoz ve nekroz gelişimi reperfüzyon peryoduna kıyasla çok daha azdır (47, 50, 52, 53). Reperfüzyon başlayınca oksidatif fosforilasyon aktifleşecek, iyon dengesini yeniden oluşturacak olan pompalar yeniden aktive olacak ve ATP üretimi hızla mitokondrilerde başlatılacaktır. ATP üretiminde yüksek performansla çalışma radikal oluşumunun artması, buna bağlı apoptoz ve nekrozun artması anlamına gelir. İskemi esnasında gelişen hafif hasar reperfüzyon esnasında lipid peroksidasyonu artışı ile hücre ölüm oranı artışı demektir (49-53).

İskemi-reperfüzyon geliştirme işlemi sonunda kalp dokularında ROT'ların yapmış olduğu lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA değerlendirmesinde, reperfüzyon esnasında KRP ile muamale edilen kalp dokularının MDA seviyesi kontrolden düşük bulunmuştur. KAR ön tedavisi uygulanan ve KRP ile muamele edilen KAR+KRP grubunda bu azalmanın daha fazla olduğu görülmüştür. Sadece KAR verilen grubun değerleri ise kontrole yani iskemi ya da reperfüzyon süresince hiçbir müdahale yapılmayan gruba göre yaklaşık 2 kat azalma göstermiştir. KAR'ın lipid peroksidasyon azaltıcı etkisi bu çalışma ile daha da net olarak belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkisinin antioksidan özelliğine bağlı olup olmadığı ROT'lar aracılığı ile oluşan hücrel toksisite veya hücre ölümüne karşı organizmayı koruyan ve antioksidan sistem olarak bilinen SOD ve KAT enzim aktivite değerlendirmesi ile araştırılmıştır. KRP grubunda KONT grubuna kıyasla, SOD enzim aktivitesi önemli derecede artmış, KAR verilmiş sıçan kalpleri reperfüzyon esnasında KRP ile muamele edildiğinde ise SOD aktivitesi artmamıştır. Sadece KAR verilen grubun SOD aktivitesi kontrole göre oldukça anlamlı artış göstermiştir. MDA değerini KRP, KONT grubuna göre çok fazla azaltmamıştır. Buna bağlı olarak da SOD aktivitesi KONT ve KAR+KRP grubuna göre KRP grubunda daha yüksek bulunmuştur. KAR+KRP grubunda ise MDA değeri düşük olduğu için bağlantılı olarak SOD aktivitesi de düşük bulunmuştur. KAT aktivitesinde ise özellikle KRP grubunda KONT ve KAR+KRP gruplarına göre önemli düzeyde artış bulunmuştur. KAR ile birlikte KRP muamelesi, KAT enzim aktivitesini önemli düzeyde değiştirmemiş. Bu değer KONT grubuna göre anlamlı düşüş göstermiştir. Sadece KAR verilen grupta da KAR aktivitesi KONT'a göre artmıştır fakat bu artış KRP grubundan daha fazla olmamıştır.

Zhau ve ark.'ları tarafından yapılan çalışmada, sıçanlar anestezi edildikten sonra ventilatör vasıtasıyla entübe edilmiştir. Bu işlemten sonra kalbin sol tarafını besleyen

sol inen koronerin oklüzyonu ile 40 dk iskemiye takiben 2 saat süren reperfüzyon yapılmıştır. KRP (1mg/kg) reperfüzyon süresinden 5 dk önce intravenöz (i.v.) olarak hayvanlara verilmiştir. Reperfüzyon süresi tamamlandıktan sonra alınan kan serumlarından ölçülen MDA ile SOD aktivite değerleri sadece iskemi reperfüzyon yapılan gruba kıyasla KRP verilen grupta MDA'da azalma SOD aktivitesinde ise artış göstermiştir (222). Jung ve ark.'nın bir başka NHE1 inhibitörü olan KR-32560 ile yaptıkları çalışmada Langendorff sistemine asılan kalp dokularının 15 dk sisteme adaptasyonu sağlandıktan sonra içerisinde KR-32560 bulunan (10µm/L) Krebs solusyonu ile iskemi öncesi 10 dk muamele edilmiş, 25 dk iskemi yapılmış ve sonrasında 30 dk normal Krebs ile reperfüzyona devam edilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz metodlarla benzer şekilde kalp dokularında MDA seviyesi ve KAT aktivitesi değerlendirilmiştir. MDA seviyesinin anlamlı oranda azaldığı, KAT aktivitesinin arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir. KR-32560 inhibitörünün lipid peroksidasyonunu önlemedeki rolü ya antioksidan aktiviteyi artırıcı ya da ROT'ların üretimini azaltarak bu işi yaptığının bir göstergesidir. Bu inhibitörün antioksidan etkisi, özellikle reperfüzyonun erken safhalarında artan ROT'ların iskemi reperfüzyonunda içerisinde bulunduran kardiyovaskular patolojiler ile olan ilişkisi göz önünde bulundurulursa önemli olabilir (223). Scholz ve ark. insanlarda yapmış olduğu çalışmada kardiyak cerrahi sonrası MDA üzerine KRP'nin etkisine bakmışlardır. Bypass öncesi 20, 80 ve 120 mg i.v. olarak serum içerisinde KRP verilen hastalardan cerrahiden 10 gün sonra alınan serumlarda ölçülen MDA seviyelerinin cerrahi öncesinde ölçülen MDA seviyelerine göre anlamlı derecede farklı olmadığı, cerrahiden 1 saat sonra verilen KRP'nin MDA'yı yükselttiği ancak bunun da anlamlı olmadığı bildirilmiştir (224).

Evrans ve ark.'ları, tarafından 12 gün boyunca KAR ön tedavisi uygulanan ve sonrasında izoproterenol ile akut miyokardiyal hasar oluşturulan sıçanlarda MDA, SOD, (glutatyon peroksidaz) GSH-Px, konjuge dien, ve protein oksidasyonunun bir göstergesi olan protein karbonil üzerine olan etkisi kalp dokusu, plazma ve eritrositlerde araştırılmıştır. KAR ön tedavisi alan sıçanlarda MDA seviyesinin azaldığı, SOD aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (225). Dursun ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada adriyamisin (ADR) ile oluşturulan kardiyomiyopati üzerine KAR'ın etkisi araştırılmıştır. Kardiyomiyopati oluşturulan grup (ADR) ve KAR tedavisi almış grupta (KAR+ADR) bulunan hayvanların MDA seviyesi, SOD ve KAT aktivitesi

karşılaştırıldığında KAR tedavisi alan grubun, SOD ve KAT aktivitesinde artış gözlenirken, MDA seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu ifade edilmiştir (226). Çalışmamızı destekleyen bu sonuçlar KAR'ın iyi bir süperoksit ve hidroksil radikal temizleyicisi olduğunu ve kalp dokusunu oksidatif stresten koruduğu görüşünü desteklemektedir.

Mitokondride yapılan ATP üretim miktarı değerlendirildiğinde, sadece KRP verilmesinin ATP üretim miktarının KONT grubuna kıyasla azaltıcı yönde etkilediği fakat bu bulgunun anlamlı olmadığı, KAR ön tedavisi uygulanan KRP'li (KAR+KRP) grupta ise KONT grubuna göre mitokondriyal fonksiyonun bozulma yönünde etkilendiği ve buna bağlı olarak ATP üretiminde anlamlı bir azalmanın olduğu bulunmuştur. Sadece KAR verilen gruptaki ATP artışı önemli dercede yüksek olmuştur. KAR verilen grupta mitokondriyal ATP üretiminin en fazla olması önemli bulgular arasında olmuştur.

Reperfüzyon hasarı değerlendirildiğinde KRP ile muamele edilen kalp dokularında (KRP ve KAR+KRP grupları) KONT'a göre nekrotik hücre oranı daha azdır ama sadece KAR verilmiş sıçan kalplerine kıyasla bu oran daha fazla olmuştur. KAR verilenlerin kalp hücrelerinde nekrotik doku hiç görülmemiştir. Reperfüzyondan etkilenmiş fakat bir saatlik reperfüzyon süresinde hala canlılıklarını korumuşlardır.

İnsanlarla yapılan çalışmalarda, KRP ile yapılan tedavi süresinin 2-7 gün arasında değiştiği ifade edilen bilgiler arasındadır. Boyce ve ark.'larının yaptığı çalışmada önemli bulgular elde edilmiştir. Yüksek iskemi risk grubu olan hastalarda bypass yapılmadan önce 20, 80 ve 120 mg'lık dozlardaki KRP, serum fizyolojik içerisinde 8 saatte bir hastalara verilmiştir. İlacın infüzyon süresi ise 60 dk süre ile i.v. olarak belirlenmiştir. Hastalara verilen bu ilacın 120mg'lık dozu bu hastalarda %25 oranında miyokardiyal hasarı engellemiş, %32 oranında ise ölümcül olmayan miyokardiyal hasarı engellediği bildirilmiştir (227). Tesmiha ve ark. izole sıçan miyositleri ile yapmış oldukları çalışmada, hücrelere uygulanan H_2O_2 'nin kontrole göre hücre yaşayabilirliğini azalttığını, TUNEL metodu ile apoptoz değerlendirmesine göre apoptotik hücreleri arttırdığını, ancak KRP (10 μ m/L) ile birlikte H_2O_2 'nin (100 μ m/L) hücre ortamına ilavesinin apoptozu sadece H_2O_2 verilenlere göre yarı yarıya azalttığını, hücre yaşayabilirliğini de kontrole göre 2 kat arttırdığını ifade etmişlerdir (228). Kupatt ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise miyositler 12 saat 0.3mmol/L H_2O_2 ile muamele edildikten sonra 10 μ g/ml ve 100 μ g/ml KRP ile hücreler muamele edilmiş ve hücrelerin

kasılabilirlik skorlarına bakılmıştır. KRP'nin kasılabilirlik skorunu artırdığını ifade etmişlerdir (229). Bu bilgiler H_2O_2 'nin ortamda H_2O ve O_2 ye dönüşmesini KRP'nin artırmış olabileceğini destekler niteliktedir.

Tüm bu bulgular bir bütün halinde değerlendirildiğinde KRP ile muamele reperfüzyon süresince hiçbir muamele yapılmayan sıçan kalplerine göre MDA'yı azaltmış, SOD, KAT aktivitesini artırmış, nekrotik hücre oranını azaltmıştır, fakat bu etkisi KAR verilen grubun değerlerinden hep daha az olmuştur. Çalışma planlama aşamasındaki hipotezimiz, reperfüzyon sırasında KRP ile NHE1 inhibisyonu sağlandığında, reperfüzyonda gelişen hücre içi Na^+ iyon artışı, Ca^{+2} iyon artışı ve bunlara bağlı gelişen sırasıyla ozmotik hasar ya da kontraktürün önemli düzeyde azalması şeklindeydi. KAR verilmiş sıçan kalpleri reperfüzyon esnasında KRP ile muamele edildiğinde reperfüzyon hasarının daha da az olacağı düşünülmüştür. Yapılan çalışmaların değerlendirme sonucuna göre, KRP ile ozmotik hasar, kontraktür oluşum engellenmesi gelişecek, KAR'ın antioksidan ve H^+ tamponlama özelliği sayesinde karipoidin bu iyileştirici etkisini artıracığı yönünde hipotezimiz geliştirilmiştir. KAR beklediğimiz şekilde reperfüzyon hasarını önemli derecede azaltmıştır, ama KRP ile birlikte verildiğinde bu iyileştirici etkisi daha da artmamıştır. Sebebi, NHE1 inhibisyonu, buna bağlı H^+ konsantrasyonun normale getirilmesindeki gecikme işlemi olabilir. Bilindiği gibi özellikle proteinler pH değişikliklerinden çok kolay etkilenir, proteinlerin güçlü bir şekilde iyonlaşması onların tersiyer-kuartern yapılarını etkiler ve pH'daki herhangi bir değişiklik, proteinin fonksiyonunu kolay bir şekilde bozabilir. pH_i 'nin optimal aralığın dışına çıkması, reaksiyonlarda ciddi bir düşüşe sebep olur ve protein yapısına bağlı olan metabolik reaksiyonları bozar. SOD ya da KAT enzimleri de protein olup H^+ artışına bağlı aktivite kaybı gösterebilirler. pH azalmasının mitokondrial membran yapısını etkilediği, apoptoz artışına neden olduğu çalışmalar ile gösterilmiştir. KRP'ye bağlı ATP üretim azlığı bulgusu, başlı başına KRP ile KAR farklılığını açıklayan bir bulgudur.

EKG değerlendirmelerinde tüm grupların R amplitüd değerleri, grup içinde iskemi öncesi değerlerine göre önemli derecede azalma göstermiş. QTc intervalleri, iskemi öncesi değerlerine göre KONT ve KRP verilenlerde önemli derecede azalma göstermiş fakat KAR+KRP verilen ve sadece KAR verilenlerde ise herhangi bir değişiklik bulunmamıştır. Bu bulgu da KRP'nin tek başına yaptığı reperfüzyon hasar koruyucu etkisini desteklemektedir. Baartscheer ve ark.'ları tavşanlarda kalp yetmezliği

oluşturmuşlar ve tedavi grubu hayvanlarda diyetle KRP vermişler, bu hayvanlarda QRS kompleksi ve QT intervalini değerlendirmişler, KRP tedavisi alan tavşanlarda kalp yetmezliği oluşturulan tavşanlara göre QRS ve QT değerlerinin anlamlı derecede azaldığını bildirmişlerdir (230). Dursun ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmada kardiyomiyopati oluşturulan grup ve KAR tedavisi almış kardiyomiyopatili grup karşılaştırdıklarında KAR tedavisinin ST intervali ve QRS kompleks süresinde azalma, R amplitüdünde yükselme gösterdiği ifade edilmiştir (226). Bölümümüzde yapılan çalışma ile bu çalışma bulguları birbirine paralellik göstermektedir.

Sol ventrikül basınç değerlendirmesinde grupların kendi içerisinde karşılaştırılmasının yapıldığı SVDSB parametresi KONT, KRP ve KAR+KRP gruplarında iskemi öncesi değerlerine göre anlamlı olarak artış göstermiş, bu artış KRP grubunda daha az olmuştur. Sadece KAR verilen grupta bu değer azalmıştır. KAR grubunda KONT grubuna kıyasla SVDSB'nin azalması KAR'ın iyileştirici etkisini destekler niteliktedir. KAR ile birlikte KRP verilmesi sadece KAR'ın yaptığı iyileştirici etkiyi artırmamış aksine daha da bozmuştur.

Zhou ve ark.'nın çalışmasında kalp dokusu 40 dk iskemi ve 60 dk içerisinde KRP (10^{-4} mmol/L) bulunan Krebs solüsyonu ile reperfüze edilmiştir. Bu hayvanlarda kontrol grubuna göre SVSB ve $\pm dP/dt$ de artış, SVDSB'de ise azalma gözlenmiştir (222). Bu sonuçlar bizim çalışmamız ile uyumludur. Jung ve ark.'ları kalp dokusunda iskemiden 10 dk önce içerisinde KR-32560 bulunan ($10\mu\text{M/L}$) Krebs ile kalbi perfüze etmişler ve 25 dk iskemi, 30 dk reperfüzyon yapmışlar, perfüzyon süresince SVBG'nin kontrole göre arttığını bildirmişlerdir (223). Dursun ve ark.'ları tarafından yapılan çalışmada adriyaminin ile oluşturulan kalp yetmezliği üzerine KAR'ın etkisi araştırılmış, kalp yetmezliği olan grup (ADR) ile 14 gün boyunca (10 mg/kg/day, i.v.) KAR tedavisi almış adriyaminli grup (KAR+ADR) karşılaştırıldığında SVSB, SVDB, SVBG ve $\pm dP/dt$ değerlerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (231). Myers ve ark. kalp dokusunda 90 dk iskemi, 60 dk reperfüzyon yapmışlar, bir grup hayvana reperfüzyon süresince Krebs ile birlikte H_2O_2 vermişler, bir grup hayvana ise reperfüzyon süresince KRP vermişler, reperfüzyon süresince H_2O_2 verilen hayvanlardan elde edilen SVBG ve $\pm dP/dt$ nin kontrol grubu hayvanlara kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı, KRP verilen hayvanlarda ise bu iki parametrenin arttığı ifade edilmiştir (232).

KAR'ın reperfüzyon hasrından kalp hücrelerini koruma mekanizmasında antioksidan özelliği önemli rol oynamaktadır. H^+ tamponlama fonksiyonuna bağlı gelişecek ekstra

iyileştirici etkisi bu çalışma ile gösterilememiştir. KAR verilen, reperfüzyon esnasında da KRP ile muamele edilen grupta, sadece KAR verilenlere kıyasla MDA, SOD; KAT; mitokondrial ATP ya da elektrofizyolojik kayıtlarda daha iyi değerler elde edilmiş olsa KAR'ın hücre içi pH regülasyonu ile olan ilişkisi daha açık ifade edilebilirdi. Hücre içi H^+ , Na^+ , Ca^{+2} gibi iyon ölçümleri yapılabilseydi KAR+KRP birlikteliğinin reperfüzyon hasar engellemedeki başarısızlığının açıklanması kolaylaşacaktı. Swetach P. ve arkadaşları yazdıkları derleme yazısında normal hücrelerin içerisinde 10-20 mM gibi yüksek konsantrasyonda KAR gibi histidin türevi maddelerin bulunduğu, bunların sadece H^+ iyonunu tamponlamadığı aynı zamanda Ca^{+2} , Mg^{+2} gibi divalent katyonları da bağladığı, bu iyonların kendi aralarında KAR'a bağlanmak için yarışma halinde oldukları belirtilmiştir. Örneğin hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonu çok arttığında KAR'ın hücre içinde H^+ yerine Ca^{+2} bağladığı, sanki hücre membranlarında bulunan Ca^{+2} - H^+ değiştirici gibi davrandığı hatta bunlara doğal (kanonikal) Ca^{+2} - H^+ değiştirici denildiği ifade edilmiştir (221). Hücre içi hidrojen iyonu çoksa onu, Ca^{+2} iyonu çoksa Ca^{+2} 'yi bağlayan bir mobil tampon olan KAR ve reperfüzyon esnasında NHE1'in KRP ile inhibe edildiği çalışmamızda, KAR dipeptitleri hücre içi artan H^+ iyonlarını bağlamış olabilir. H^+ iyonlarını bağlayan KAR iskemi sırasında veya az da olsa reperfüzyon esnasında (NHE1 inhibe edildiğinde) hücre içi artan Ca^{+2} iyonlarını bağlayamayacağı için serbest Ca^{+2} 'nin mitokondri gibi önemli organellerde birikimine bağlı olarak hücre hasarında artışına neden olma ihtimali olabilir. Bizim kullandığımız dozdaki KRP reperfüzyon hasarını tam olarak iyileştirmemiştir, bu durum belkide verilen miktarın yetersizliği ile ilgilidir.

Sonuç olarak KRP ile NHE1 inhibisyonunun reperfüzyon hasar azaltıcı etkisinin sadece KAR verilenlerden daha az olduğu, KAR verilen sıçanlarda reperfüzyon esnasında KRP verilmesinin sadece KAR'ın yaptığı olumlu etkiyi daha da artırmadığı gösterilmiştir. Yüksek lisans tez çalışmamda ve bu çalışmada sadece KAR verilmesinin kalp hücrelerini daha fazla koruduğu, bu etkisinde lipit peroksidasyon azaltıcı ya da antioksidan özelliğinin önemli olduğu gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Orlowski J, Grinstein S. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 2004;447:549-65
2. Putney LK, Barber DL. Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:44645-9
3. Kapus A, Grinstein S, Wasan S, et al. Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 1994;269:23544-52
4. Pouyssegur J, Sardet C, Franchi A, et al. A specific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984;81:4833-7
5. Smets I, Ameloot M, Steels P, et al. Loss of cell volume regulation during metabolic inhibition in renal epithelial cells (A6): role of intracellular pH. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C535-44
6. Putnam RW. Intracellular pH regulation of neurons in chemosensitive and nonchemosensitive areas of brain slices. *Respiration physiology* 2001;129:37-56
7. Antosiewicz J, McCammon JA, Gilson MK. The determinants of pK_as in proteins. *Biochemistry* 1996;35:7819-33
8. Denker SP, Huang DC, Orlowski J, et al. Direct binding of the Na⁺-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁺ translocation. *Molecular cell* 2000;6:1425-36
9. Baysal K, Brierley GP, Novgorodov S, et al. Regulation of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ antiport by matrix pH. *Archives of biochemistry and biophysics* 1991;291:383-9
10. Casey JR, Grinstein S, Orlowski J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010;11:50-61
11. Tombaugh GC, Somjen GG. Effects of extracellular pH on voltage-gated Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ currents in isolated rat CA1 neurons. *The Journal of physiology* 1996;493 (Pt 3):719-32
12. Tombaugh GC, Somjen GG. Differential sensitivity to intracellular pH among high- and low-threshold Ca²⁺ currents in isolated rat CA1 neurons. *Journal of neurophysiology* 1997;77:639-53

13. Johnson RA. Changes in pH sensitivity of adenylate cyclase specifically induced by fluoride and vanadate. *Archives of biochemistry and biophysics* 1982;218:68-76
14. Srivastava J, Barber DL, Jacobson MP. Intracellular pH sensors: design principles and functional significance. *Physiology* 2007;22:30-9
15. Orlowski J, Grinstein S. Emerging roles of alkali cation/proton exchangers in organellar homeostasis. *Current opinion in cell biology* 2007;19:483-92
16. Abad MF, Di Benedetto G, Magalhaes PJ, et al. Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:11521-9
17. Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, et al. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:6803-8
18. Roos A, Boron WF. Intracellular pH. *Physiological reviews* 1981;61:296-434
19. Boron WF. Regulation of intracellular pH. *Advances in physiology education* 2004;28:160-79
20. Madias NE, Wolf CJ, Cohen JJ. Regulation of acid-base equilibrium in chronic hypercapnia. *Kidney international* 1985;27:538-43
21. Abe H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry Biokhimia* 2000;65:757-65
22. Vaughan-Jones RD, Spitzer KW, Swietach P. Intracellular pH regulation in heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2009;46:318-31
23. Ellis D, Thomas RC. Microelectrode measurement of the intracellular pH of mammalian heart cells. *Nature* 1976;262:224-5
24. Liu S, Piwnicka-Worms D, Lieberman M. Intracellular pH regulation in cultured embryonic chick heart cells. Na(+)-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange. *The Journal of general physiology* 1990;96:1247-69
25. Swietach P, Camelliti P, Hulikova A, et al. Spatial regulation of intracellular pH in multicellular strands of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular research* 2010;85:729-38
26. Halestrap AP, Wang X, Poole RC, et al. Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *The American journal of cardiology* 1997;80:17A-25A
27. Junge W, McLaughlin S. The role of fixed and mobile buffers in the kinetics of proton movement. *Biochimica et biophysica acta* 1987;890:1-5
28. Swietach P, Rossini A, Spitzer KW, et al. H⁺ ion activation and inactivation of the ventricular gap junction: a basis for spatial regulation of intracellular pH. *Circulation research* 2007;100:1045-54
29. Vaughan-Jones RD, Spitzer KW. Role of bicarbonate in the regulation of intracellular pH in the mammalian ventricular myocyte. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2002;80:579-96
30. Poole-Wilson PA. Regulation of intracellular pH in the myocardium; relevance to pathology. *Molecular and cellular biochemistry* 1989;89:151-5

31. Garlick PB, Radda GK, Seeley PJ. Studies of acidosis in the ischaemic heart by phosphorus nuclear magnetic resonance. *The Biochemical journal* 1979;184:547-54
32. Janse MJ, Opthof T, Kleber AG. Animal models of cardiac arrhythmias. *Cardiovascular research* 1998;39:165-77
33. Brett CL, Donowitz M, Rao R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C223-39
34. Putney LK, Denker SP, Barber DL. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2002;42:527-52
35. Orlowski J, Grinstein S. Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:22373-6
36. Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiological reviews* 1997;77:51-74
37. Alexander RT, Grinstein S. Na⁺/H⁺ exchangers and the regulation of volume. *Acta Physiol (Oxf)* 2006;187:159-67
38. Counillon L, Pouyssegur J. The expanding family of eucaryotic Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchangers. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:1-4
39. Numata M, Orlowski J. Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:17387-94
40. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, et al. The myocardial Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circulation research* 1999;85:777-86
41. Scholz W, Albus U, Counillon L, et al. Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovascular research* 1995;29:260-8
42. Petrecca K, Atanasiu R, Grinstein S, et al. Subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in rat myocardium. *The American journal of physiology* 1999;276:H709-17
43. Wang H, Silva NL, Lucchesi PA, et al. Phosphorylation and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger through mitogen-activated protein kinase. *Biochemistry* 1997;36:9151-8
44. Pedersen SF. The Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in stress-induced signal transduction: implications for cell proliferation and cell death. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2006;452:249-59
45. Hipkiss AR. Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Advances in food and nutrition research* 2009;57:87-154
46. Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium* 2004;11:123-32
47. Pantos C, Mourouzis I, Cokkinos DV. Myocardial Ischemia. In: ed. editor^editors., Springer, 2006 Date: p. 11-76.

48. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiological reviews* 1999;79:609-34
49. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007;357:1121-35
50. Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003;75:S644-8
51. Hoffman JW, Jr., Gilbert TB, Poston RS, et al. Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies. *J Extra Corpor Technol* 2004;36:391-411
52. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007;59:418-58
53. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 2005;14:170-5
54. Saini HK, Dhalla NS. Defective calcium handling in cardiomyocytes isolated from hearts subjected to ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2260-70
55. Netticadan T, Temsah R, Osada M, et al. Status of Ca²⁺/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. *The American journal of physiology* 1999;277:C384-91
56. Galinanes M, Fowler AG. Role of clinical pathologies in myocardial injury following ischaemia and reperfusion. *Cardiovascular research* 2004;61:512-21
57. Peyton RB, Van Trigt P, Pellom GL, et al. Improved tolerance to ischemia in hypertrophied myocardium by preischemic enhancement of adenosine triphosphate. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;84:11-5
58. Anderson PG, Bishop SP, Digerness SB. Transmural progression of morphologic changes during ischemic contracture and reperfusion in the normal and hypertrophied rat heart. *Am J Pathol* 1987;129:152-67
59. Snoeckx LH, van der Vusse GJ, Coumans WA, et al. Myocardial function in normal and spontaneously hypertensive rats during reperfusion after a period of global ischaemia. *Cardiovascular research* 1986;20:67-75
60. Anderson PG, Allard MF, Thomas GD, et al. Increased ischemic injury but decreased hypoxic injury in hypertrophied rat hearts. *Circulation research* 1990;67:948-59
61. Golden AL, Bright JM, Pohost GM, et al. Ischemic dysfunction and impaired recovery in hypertensive hypertrophied hearts is associated with exaggerated intracellular sodium accumulation. *Am J Hypertens* 1994;7:745-54
62. Ruuge EK, Ledenev AN, Lakomkin VL, et al. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion. *The American journal of physiology* 1991;261:81-6
63. Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular research* 2004;61:365-71

64. Friehs I, del Nido PJ. Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury. *Ann Thorac Surg* 2003;75:S678-84
65. Machado NG, Alves MG, Carvalho RA, et al. Mitochondrial involvement in cardiac apoptosis during ischemia and reperfusion: can we close the box? *Cardiovasc Toxicol* 2009;9:211-27
66. Busa WB, Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH. *The American journal of physiology* 1984;246:R409-38
67. Hochachka PW, Mommsen TP. Protons and anaerobiosis. *Science* 1983;219:1391-7
68. Nowak TJ, Handford AG. *Essentials of pathophysiology : concepts and applications for health care professionals*. 2nd ed. Boston, WCB/McGraw-Hill, 1999.
69. Putnam RW. *Intracellular pH Regulation*. 3rd ed. San Diego, Academic Press, 2001.
70. Whitten ST, Garcia-Moreno EB, Hilser VJ. Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:4282-7
71. Pope BJ, Zierler-Gould KM, Kuhne R, et al. Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:4840-8
72. Edmonds BT, Murray J, Condeelis J. pH regulation of the F-actin binding properties of Dictyostelium elongation factor 1 alpha. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:15222-30
73. Murer H, Hopfer U, Kinne R. Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *The Biochemical journal* 1976;154:597-604
74. Tanner MJ. The structure and function of band 3 (AE1): recent developments (review). *Molecular membrane biology* 1997;14:155-65
75. Alper SL. The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annual review of physiology* 1991;53:549-64
76. Lee BS, Gunn RB, Kopito RR. Functional differences among nonerythroid anion exchangers expressed in a transfected human cell line. *The Journal of biological chemistry* 1991;266:11448-54
77. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2004;447:619-28
78. Niederer SA, Swietach P, Wilson DA, et al. Measuring and modeling chloride-hydroxyl exchange in the Guinea-pig ventricular myocyte. *Biophysical journal* 2008;94:2385-403
79. Leem CH, Vaughan-Jones RD. Sarcolemmal mechanisms for pHi recovery from alkalosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *The Journal of physiology* 1998;509 (Pt 2):487-96

80. Steenbergen C, Deleeuw G, Rich T, et al. Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. *Circulation research* 1977;41:849-58
81. Philipson KD, Bersohn MM, Nishimoto AY. Effects of pH on Na⁺-Ca²⁺ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circulation research* 1982;50:287-93
82. Komukai K, Pascarel C, Orchard CH. Compensatory role of CaMKII on I_{Ca} and SR function during acidosis in rat ventricular myocytes. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 2001;442:353-61
83. Rousseau E, Pinkos J. pH modulates conducting and gating behaviour of single calcium release channels. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 1990;415:645-7
84. Balnave CD, Vaughan-Jones RD. Effect of intracellular pH on spontaneous Ca²⁺ sparks in rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology* 2000;528 Pt 1:25-37
85. Bountra C, Kaila K, Vaughan-Jones RD. Effect of repetitive activity upon intracellular pH, sodium and contraction in sheep cardiac Purkinje fibres. *The Journal of physiology* 1988;398:341-60
86. Harrison SM, Frampton JE, McCall E, et al. Contraction and intracellular Ca²⁺, Na⁺, and H⁺ during acidosis in rat ventricular myocytes. *The American journal of physiology* 1992;262:C348-57
87. Yamamoto T, Swietach P, Rossini A, et al. Functional diversity of electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in ventricular myocytes from rat, rabbit and guinea pig. *The Journal of physiology* 2005;562:455-75
88. Choi HS, Trafford AW, Orchard CH, et al. The effect of acidosis on systolic Ca²⁺ and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology* 2000;529 Pt 3:661-8
89. Ch'en FF, Villafuerte FC, Swietach P, et al. S0859, an N-cyanosulphonamide inhibitor of sodium-bicarbonate cotransport in the heart. *Br J Pharmacol* 2008;153:972-82
90. Alvarez BV, Johnson DE, Sowah D, et al. Carbonic anhydrase inhibition prevents and reverts cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of physiology* 2007;579:127-45
91. Spray DC, Harris AL, Bennett MV. Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science* 1981;211:712-5
92. Noma A, Tsuboi N. Dependence of junctional conductance on proton, calcium and magnesium ions in cardiac paired cells of guinea-pig. *The Journal of physiology* 1987;382:193-211
93. Vandenberg JI, Metcalfe JC, Grace AA. Mechanisms of pHi recovery after global ischemia in the perfused heart. *Circulation research* 1993;72:993-1003
94. Vaughan-Jones RD, Swietach P. Pushing and pulling the cardiac sodium/hydrogen exchanger. *Circulation research* 2008;103:773-5
95. Spitzer KW, Skolnick RL, Peercy BE, et al. Facilitation of intracellular H(+) ion mobility by CO(2)/HCO(3)(-) in rabbit ventricular myocytes is regulated by carbonic anhydrase. *The Journal of physiology* 2002;541:159-67

96. Vaughan-Jones RD, Spitzer KW, Swietach P. Spatial aspects of intracellular pH regulation in heart muscle. *Progress in biophysics and molecular biology* 2006;90:207-24
97. Zaniboni M, Rossini A, Swietach P, et al. Proton permeation through the myocardial gap junction. *Circulation research* 2003;93:726-35
98. Scheibe RJ, Gros G, Parkkila S, et al. Expression of membrane-bound carbonic anhydrases IV, IX, and XIV in the mouse heart. *J Histochem Cytochem* 2006;54:1379-91
99. Chen W, Steenbergen C, Levy LA, et al. Measurement of free Ca^{2+} in sarcoplasmic reticulum in perfused rabbit heart loaded with 1,2-bis(2-amino-5,6-difluorophenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid by ^{19}F NMR. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:7398-403
100. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovascular research* 2004;61:372-85
101. Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiporter. *Cell* 1989;56:271-80
102. Fuster D, Moe OW, Hilgemann DW. Steady-state function of the ubiquitous mammalian Na^+/H^+ exchanger (NHE1) in relation to dimer coupling models with $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ stoichiometry. *The Journal of general physiology* 2008;132:465-80
103. Malakooti J, Dahdal RY, Schmidt L, et al. Molecular characterization and expression of the human Na^+/H^+ exchanger isoform NHE-2. *Gastroenterology* 1998;114:A394-A
104. Bookstein C, Xie Y, Rabenau K, et al. Tissue distribution of Na^+/H^+ exchanger isoforms NHE2 and NHE4 in rat intestine and kidney. *The American journal of physiology* 1997;273:C1496-505
105. Chambrey R, St John PL, Eladari D, et al. Localization and functional characterization of Na^+/H^+ exchanger isoform NHE4 in rat thick ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F707-17
106. Attaphitaya S, Park K, Melvin JE. Molecular cloning and functional expression of a rat Na^+/H^+ exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:4383-8
107. Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, et al. Four Na^+/H^+ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:1561-72
108. Lin PJ, Williams WP, Kobiljski J, et al. Caveolins bind to $(\text{Na}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$ exchanger NHE7 by a novel binding module. *Cell Signal* 2007;19:978-88
109. Goyal S, Mentone S, Aronson PS. Immunolocalization of NHE8 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F530-8
110. Masereel B, Pochet L, Laeckmann D. An overview of inhibitors of Na^+/H^+ exchanger. *Eur J Med Chem* 2003;38:547-54

111. Slepko E, Fliegel L. Structure and function of the NHE1 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2002;80:499-508
112. Rotin D, Grinstein S. Impaired cell volume regulation in Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange-deficient mutants. *The American journal of physiology* 1989;257:C1158-65
113. Denker SP, Huang DC, Orlowski J, et al. Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁺ translocation. *Molecular cell* 2000;6:1425-36
114. Harguindey S, Orive G, Luis Pedraz J, et al. The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature. *Biochimica et biophysica acta* 2005;1756:1-24
115. Karmazyn M, Sostaric JV, Gan XT. The myocardial Na⁺/H⁺ exchanger: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure. *Drugs* 2001;61:375-89
116. Fliegel L. Regulation of myocardial Na⁺/H⁺ exchanger activity. *Basic Res Cardiol* 2001;96:301-5
117. Moor AN, Fliegel L. Protein kinase-mediated regulation of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:22985-92
118. Moor AN, Gan XT, Karmazyn M, et al. Activation of Na⁺/H⁺ exchanger-directed protein kinases in the ischemic and ischemic-reperfused rat myocardium. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:16113-22
119. Tominaga T, Barber DL. Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol Biol Cell* 1998;9:2287-303
120. Khaled AR, Moor AN, Li A, et al. Trophic factor withdrawal: p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalinization. *Mol Cell Biol* 2001;21:7545-57
121. White RL, Doeller JE, Verselis VK, et al. Gap junctional conductance between pairs of ventricular myocytes is modulated synergistically by H⁺ and Ca⁺⁺. *The Journal of general physiology* 1990;95:1061-75
122. Xu P, Spitzer KW. Na-independent Cl⁽⁻⁾-HCO₃⁻ exchange mediates recovery of pHi from alkalosis in guinea pig ventricular myocytes. *The American journal of physiology* 1994;267:H85-91
123. Firek L, Weingart R. Modification of gap junction conductance by divalent cations and protons in neonatal rat heart cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1995;27:1633-43
124. Wallert MA, Frohlich O. Alpha 1-adrenergic stimulation of Na-H exchange in cardiac myocytes. *The American journal of physiology* 1992;263:C1096-102
125. Fliegel L, Karmazyn M. The cardiac Na-H exchanger: a key downstream mediator for the cellular hypertrophic effects of paracrine, autocrine and hormonal factors. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2004;82:626-35

126. Ito N, Kagaya Y, Weinberg EO, et al. Endothelin and angiotensin II stimulation of Na⁺-H⁺ exchange is impaired in cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 1997;99:125-35
127. Gunasegaram S, Haworth RS, Hearse DJ, et al. Regulation of sarcolemmal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger activity by angiotensin II in adult rat ventricular myocytes: opposing actions via AT(1) versus AT(2) receptors. *Circulation research* 1999;85:919-30
128. Karmazyn M, Liu Q, Gan XT, et al. Aldosterone increases NHE-1 expression and induces NHE-1-dependent hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Hypertension* 2003;42:1171-6
129. Avkiran M, Marber MS. Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:747-53
130. Karmazyn M. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na⁺-H⁺ exchange. *The American journal of physiology* 1988;255:H608-15
131. Horikawa N, Nishioka M, Itoh N, et al. The Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger SM-20220 attenuates ischemic injury in in vitro and in vivo models. *Pharmacology* 2001;63:76-81
132. Jorgensen NK, Petersen SF, Damgaard I, et al. Increases in [Ca²⁺]_i and changes in intracellular pH during chemical anoxia in mouse neocortical neurons in primary culture. *J Neurosci Res* 1999;56:358-70
133. Phillis JW, Estevez AY, Guyot LL, et al. 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-amiloride, an Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange inhibitor, protects gerbil hippocampal neurons from ischemic injury. *Brain Res* 1999;839:199-202
134. Gores GJ, Nieminen AL, Wray BE, et al. Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes. Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death. *J Clin Invest* 1989;83:386-96
135. Rios EJ, Fallon M, Wang J, et al. Chronic hypoxia elevates intracellular pH and activates Na⁺/H⁺ exchange in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L867-74
136. Bobulescu IA, Di Sole F, Moe OW. Na⁺/H⁺ exchangers: physiology and link to hypertension and organ ischemia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:485-94
137. Karmazyn M, Moffat MP. Role of Na⁺/H⁺ exchange in cardiac physiology and pathophysiology: mediation of myocardial reperfusion injury by the pH paradox. *Cardiovascular research* 1993;27:915-24
138. Pulsinelli W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 1992;339:533-6
139. Wang Y, Meyer JW, Ashraf M, et al. Mice with a null mutation in the NHE1 Na⁺-H⁺ exchanger are resistant to cardiac ischemia-reperfusion injury. *Circulation research* 2003;93:776-82
140. Orlov SN, Adragna NC, Adarichev VA, et al. Genetic and biochemical determinants of abnormal monovalent ion transport in primary hypertension. *The American journal of physiology* 1999;276:C511-36
141. Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, et al. Exclusion of the Na⁽⁺⁾-H⁺ antiporter as a candidate gene in human essential hypertension. *Hypertension* 1991;17:8-14

142. Phan VN, Kusuhara M, Lucchesi PA, et al. A 90-kD Na(+)-H⁺ exchanger kinase has increased activity in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997;29:1265-72
143. Sweeney FP, Quinn PA, Ng LL. Enhanced mitogen-activated protein kinase activity and phosphorylation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 of human lymphoblasts in hypertension. *Metabolism* 1997;46:297-302
144. Iwamoto T, Kita S, Zhang J, et al. Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca²⁺ entry via Na⁺/Ca²⁺ exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nat Med* 2004;10:1193-9
145. Nakamura TY, Iwata Y, Arai Y, et al. Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circulation research* 2008;103:891-9
146. Gu JW, Anand V, Shek EW, et al. Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1998;31:1083-7
147. Hayasaka-Kajiwara Y, Kitano Y, Iwasaki T, et al. Na⁺ influx via Na⁺/H⁺ exchange activates protein kinase C isozymes delta and epsilon in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1999;31:1559-72
148. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, et al. Role of ion channels and exchangers in mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research* 1998;82:430-7
149. Teufel M, Saudek V, Ledig JP, et al. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:6521-31
150. Aldini G, Orioli M, Carini M, et al. Profiling histidine-containing dipeptides in rat tissues by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2004;39:1417-28
151. Gariballa SE, Sinclair AJ. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age Ageing* 2000;29:207-10
152. Babizhayev MA, Seguin MC, Gueyne J, et al. L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine) and carbinine (beta-alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *The Biochemical journal* 1994;304 (Pt 2):509-16
153. Bauer K. Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain. *Neurochem Res* 2005;30:1339-45
154. Bakardjiev A, Bauer K. Biosynthesis, release, and uptake of carnosine in primary cultures. *Biochemistry Biokhimiia* 2000;65:779-82
155. Bonfanti L, Peretto P, De Marchis S, et al. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Prog Neurobiol* 1999;59:333-53
156. Lenney JF. Separation and characterization of two carnosine-splitting cytosolic dipeptidases from hog kidney (carnosinase and non-specific dipeptidase). *Biol Chem Hoppe Seyler* 1990;371:433-40

157. Hipkiss AR. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:863-8
158. Jackson MC, Lenney JF. The distribution of carnosine and related dipeptides in rat and human tissues. *Inflamm Res* 1996;45:132-5
159. Hipkiss AR. Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Adv Food Nutr Res* 2009;57:87-154
160. Skulachev VP. Biological role of carnosine in the functioning of excitable tissues. Centenary of Gulewitsch's discovery. *Biochemistry Biokhimiia* 2000;65:749-50
161. Temperini C, Scozzafava A, Puccetti L, et al. Carbonic anhydrase activators: X-ray crystal structure of the adduct of human isozyme II with L-histidine as a platform for the design of stronger activators. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15:5136-41
162. Smith EC. The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine. *The Journal of physiology* 1938;92:336-43
163. Sale C, Saunders B, Harris RC. Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance. *Amino Acids* 2010;39:321-33
164. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological reviews* 2013;93:1803-45
165. Boldyrev AA, Dupin AM, Batrukova MA, et al. A comparative study of synthetic carnosine analogs as antioxidants. *Comp Biochem Physiol B* 1989;94:237-40
166. Boldyrev AA, Dupin AM, Siambela M, et al. The level of natural antioxidant glutathione and histidine-containing dipeptides in skeletal muscles of developing chick embryos. *Comp Biochem Physiol B* 1988;89:197-200
167. Boldyrev AA, Dupin AM, Bunin A, et al. The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. *Biochem Int* 1987;15:1105-13
168. Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, et al. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85:3175-9
169. Dahl TA, Midden WR, Hartman PE. Some Prevalent Biomolecules as Defenses against Singlet Oxygen Damage. *Photochem Photobiol* 1988;47:357-62
170. Pavlov AR, Revina AA, Dupin AM, et al. The Mechanism of Interaction of Carnosine with Superoxide Radicals in Water Solutions. *Biochimica et biophysica acta* 1993;1157:304-12
171. Hartman PE, Hartman Z, Ault KT. Scavenging of Singlet Molecular-Oxygen by Imidazole Compounds - High and Sustained Activities of Carboxy Terminal Histidine Dipeptides and Exceptional Activity of Imidazole-4-Acetic Acid. *Photochem Photobiol* 1990;51:59-66
172. Boldyrev AA, Stvolinsky SL, Tyulina OV, et al. Biochemical and physiological evidence that carnosine is an endogenous neuroprotector against free radicals. *Cell Mol Neurobiol* 1997;17:259-71

173. Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine - Its Properties, Functions and Potential Therapeutic Applications. *Molecular Aspects of Medicine* 1992;13:379-444
174. Boldyrev AA, Severin SE. The Histidine-Containing Dipeptides, Carnosine and Anserine - Distribution, Properties and Biological Significance. *Adv Enzyme Regul* 1990;30:175-+
175. Boldyrev AA. Problems and perspectives in studying the biological role of carnosine. *Biochemistry Biokhimiia* 2000;65:751-6
176. Hipkiss AR, Brownson C. A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:747-53
177. Kang KS, Yun JW, Lee YS. Protective effect of L-carnosine against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- or hydrogen peroxide-induced apoptosis on v-myc transformed rat liver epithelial cells. *Cancer Lett* 2002;178:53-62
178. Babizhayev MA, Deyev AI, Yermakova VN, et al. Efficacy of N-acetylcarnosine in the treatment of cataracts. *Drugs R D* 2002;3:87-103
179. Suzuki H, Mori M, Seto K, et al. Polaprezinc attenuates the *Helicobacter pylori*-induced gastric mucosal leucocyte activation in Mongolian gerbils--a study using intravital videomicroscopy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:715-25
180. Chez MG, Buchanan CP, Aimonovitch MC, et al. Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *J Child Neurol* 2002;17:833-7
181. Bauman L, Ingvaldsen T. Concerning histidine and carnosine. The synthesis of carnosine and An oxidation product of creatine. Baltimore, 1918.
182. Kalyankar GD, Meister A. Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides. *The Journal of biological chemistry* 1959;234:3210-8
183. Winnick T, Winnick RE. Pathways and the physiological site of anserine formation. *Nature* 1959;183:1466-8
184. Drozak J, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, et al. Molecular Identification of Carnosine Synthase as ATP-grasp Domain-containing Protein 1 (ATPGD1). *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:9346-56
185. Hanson HT, Smith EL. Carnosinase; an enzyme of swine kidney. *The Journal of biological chemistry* 1949;179:789-801
186. Yamashita T, Shimada S, Guo W, et al. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:10205-11
187. Bauchart C, Savary-Auzeloux I, Mirand PP, et al. Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release into the portal vein of minipigs. *J Nutr* 2007;137:589-93
188. Gardner ML, Illingworth KM, Kelleher J, et al. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *The Journal of physiology* 1991;439:411-22

189. Bhardwaj RK, Herrera-Ruiz D, Eltoukhy N, et al. The functional evaluation of human peptide/histidine transporter 1 (hPHT1) in transiently transfected COS-7 cells. *Eur J Pharm Sci* 2006;27:533-42
190. Botka CW, Wittig TW, Graul RC, et al. Human proton/oligopeptide transporter (POT) genes: identification of putative human genes using bioinformatics. *AAPS PharmSci* 2000;2:E16
191. Everaert I, De Naeyer H, Taes Y, et al. Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2013;113:1169-79
192. Nijima A, Okui T, Matsumura Y, et al. Effects of L-carnosine on renal sympathetic nerve activity and DOCA-salt hypertension in rats. *Auton Neurosci* 2002;97:99-102
193. Ririe DG, Roberts PR, Shouse MN, et al. Vasodilatory actions of the dietary peptide carnosine. *Nutrition* 2000;16:168-72
194. Miller DJ, O'Dowd A. Vascular smooth muscle actions of carnosine as its zinc complex are mediated by histamine H-1 and H-2 receptors. *Biochemistry-Moscow+* 2000;65:798-806
195. O'Dowd A, Miller DJ. Analysis of an H1 receptor-mediated, zinc-potentiated vasoconstrictor action of the histidyl dipeptide carnosine in rabbit saphenous vein. *Br J Pharmacol* 1998;125:1272-80
196. Greene SM, Margolis FL, Grillo M, et al. Enhanced carnosine (beta-alanyl-L-histidine) breakdown and histamine metabolism following treatment with compound 48/80. *Eur J Pharmacol* 1984;99:79-84
197. Nagai K, Tanida M, Nijima A, et al. Role of L-carnosine in the control of blood glucose, blood pressure, thermogenesis, and lipolysis by autonomic nerves in rats: involvement of the circadian clock and histamine. *Amino Acids* 2012;43:97-109
198. Roberts PR, Zaloga GP. Cardiovascular effects of carnosine. *Biochemistry Biokhimiia* 2000;65:856-61
199. Zaloga GP, Roberts PR, Black KW, et al. Carnosine is a novel peptide modulator of intracellular calcium and contractility in cardiac cells. *Am J Physiol-Heart C* 1997;272:H462-H8
200. Swietach P, Youm JB, Saegusa N, et al. Coupled $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ transport by cytoplasmic buffers regulates local Ca^{2+} and H^{+} ion signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:E2064-E73
201. Lee JW, Miyawaki H, Bobst EV, et al. Improved functional recovery of ischemic rat hearts due to singlet oxygen scavengers histidine and carnosine. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1999;31:113-21
202. Rusakov VV, Dolgikh VT. Reperfusion Damage to Myocardial-Cell Membranes after Acute Lethal Bleeding - Correction by Carnosine. *Biochemistry-Moscow+* 1992;57:963-6
203. Gercken G, Bischoff H, Trotz M. Myocardial Protection by a Carnosine-Buffered Cardioplegic Solution. *Arzneimittel-Forsch* 1980;30-2:2140-3

204. Dolgikh VT, Rusakov VV, Korpacheva OV, et al. Pathogenesis and Pharmacocorrection of Early Postresuscitation Cardiac-Arrhythmia. *Resuscitation* 1992;23:179-91
205. Alabovsky VV, Boldyrev AA, Vinokurov AA, et al. Effect of histidine-containing dipeptides on isolated heart under ischemia/reperfusion. *Biochemistry-Moscow* 1997;62:77-87
206. Alabovsky VV, Cragoe EJ, Winokurov AA. Importance of iontransporting sarcolemmal systems in loss of amino acids during Ca depletion and myocardial damage during the calcium paradox. *Vop Med Khim* 1999;45:238-45
207. Snimonii GV, Tatishvili NI, Shiliia D, et al. [The effect of carnosine on the activity of Na,K,ATPase: prospective uses in clinical cardiology]. *Biokhimiia* 1992;57:1343-7
208. Suslina ZA, Federova TN, Maksimova M, et al. [Antioxidant therapy in ischemic stroke]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2000;100:34-8
209. Kuklei ML, Gannushkina IV. Effect of carnosine on cerebral blood flow and EEG during brain ischemia in rats with different activity in open field. *Dokl Akad Nauk* 1997;352:416-9
210. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 1981;101:593-600
211. Klein HH, Puschmann S, Schaper J, et al. The Mechanism of the Tetrazolium Reaction in Identifying Experimental Myocardial-Infarction. *Virchows Arch A* 1981;393:287-97
212. Ytrehus K, Liu YG, Tsuchida A, et al. Rat and Rabbit Heart Infarction - Effects of Anesthesia, Perfusate, Risk Zone, and Method of Infarct Sizing. *Am J Physiol-Heart C* 1994;267:H2383-H90
213. Gazmuri RJ, Ayoub IM, Kolarova JD, et al. Myocardial protection during ventricular fibrillation by inhibition of the sodium-hydrogen exchanger isoform-1. *Crit Care Med* 2002;30:S166-71
214. Aydin AF, Kucukgergin C, Ozdemirler-Erata G, et al. The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. *Biogerontology* 2010;11:103-9
215. Celik I, Turker M, Tuluze Y. Abscicic acid and gibberellic acid cause increased lipid peroxidation and fluctuated antioxidant defense systems of various tissues in rats. *J Hazard Mater* 2007;148:623-9
216. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54
217. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol* 1984;105:328-31
218. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8
219. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500

220. Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis. 2d English ed. Weinheim New York, Verlag Chemie ; Academic Press, 1974.
221. Blancquaert L, Everaert I, Derave W. Beta-alanine supplementation, muscle carnosine and exercise performance. *Curr Opin Clin Nutr* 2015;18:63-70
222. Zhou Y, Gong G, Yang W, et al. The cardioprotective effect of TG-6, a newly synthesized compound, on ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol* 2012;683:190-6
223. Jung IS, Lee SH, Yang MK, et al. Cardioprotective effects of the novel Na⁺/H⁺-exchanger-1 inhibitor KR-32560 in a perfused rat heart model of global ischemia and reperfusion: Involvement of the Akt-GSK-3 β cell survival pathway and antioxidant enzyme. *Arch Pharm Res* 2010;33:1241-51
224. Scholz M, Wimmer-Greinecker G, Kleine P, et al. Cariporide (HOE642) limits S-100B release during cardiac surgery. *J Cardiovasc Pharm* 2003;41:468-73
225. Evran B, Karpuzoglu H, Develi S, et al. Effects of carnosine on prooxidant-antioxidant status in heart tissue, plasma and erythrocytes of rats with isoproterenol-induced myocardial infarction. *Pharmacol Rep* 2014;66:81-6
226. Dursun N, Taskin E, Ozturk F. Protection against adriamycin-induced cardiomyopathy by carnosine in rats: role of endogenous antioxidants. *Biol Trace Elem Res* 2011;143:412-24
227. Boyce SW, Bartels C, Bolli R, et al. Impact of sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide on death or myocardial infarction in high-risk CABG surgery patients: Results of the CABG surgery cohort of the GUARDIAN study. *J Thorac Cardiovasc Sur* 2003;126:420-7
228. Teshima Y, Akao M, Jones SP, et al. Cariporide (HOE642), a selective Na⁺-H⁺-exchange inhibitor, inhibits the mitochondrial death pathway. *Circulation* 2003;108:2275-81
229. Kupatt C, Hinkel R, Horstkotte J, et al. Selective retroinfusion of GSH and cariporide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in a preclinical pig model. *Cardiovascular research* 2004;61:530-7
230. Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MM, et al. Chronic inhibition of Na⁺/H⁺-exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure. *Cardiovascular research* 2005;65:83-92
231. Ozdogan K, Taskin E, Dursun N. Protective effect of carnosine on adriamycin-induced oxidative heart damage in rats. *Anadolu Kardiyol Der* 2011;11:3-10
232. Myers ML, Farhangkhoei P, Karmazyn M. Hydrogen peroxide induced impairment of post-ischemic ventricular function is prevented by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *Cardiovascular research* 1998;40:290-6

**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı
ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 08.06.2011

Toplantı Sayısı: 06

Karar No: 11/74

Etik kurul toplantısı

08.06.2011

tarihinde Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel

Etik Kurul

Prof.Dr. Harun ÜLGER

Başkanlığı'nda gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Harun Ülger	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	Katılmadı
Coşkun Tez	Doç. Dr.	Fen Fakültesi	Katılmadı
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	Katılmadı
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi(Farmakoloji)	Katılmadı
Abdullah İnci	Prof.Dr.	Veteriner Fakültesi	Katılmadı
Fusun Ferdağ Erdoğan	Doç.Dr	Tıp Fakültesi	Katılmadı
Ahmet Öztürk	Öğrt.Gör.Dr		Katılmadı
Serap Altuntaş Eroğlu	Avukat		Katılmadı
Asiye Gökdelen			Katılmadı

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Prof.Dr. Nurcan DURSUN tarafından yapılan " Na +/ H+ Transport İnhibisyonu ve Karnozin Uygulamasının, Kalp İskemi/ Reperfüzyonunda İyileştirici Etkisi"adlı araştırması incelenerek çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

ASLININ AYNIYIDIR

Dekan Sekreteri
Bingöl Kocaman

Tarih : 18.05.2011

Etik Kurul Başkanı İmzası

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr. Harun ÜLGER

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Kalender ÖZDOĞAN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 29.08.1983, KAYSERİ/Bünyan

Medeni Hali: Evli

Tel: 0505 585 46 43

Email: kalenderozdogan@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2009
Lisans	EÜ Fen Fakültesi	2005
Lise	Seyyid Burhaneddin EML	2000

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2010	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fak.	Araş. Gör.
2011 (Görevlendirme)	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens.	Araş. Gör.

YABANCI DİL : İngilizce

YAYINLAR

SCI, SSCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler (INDM)

1. Taskin E., Özdoğan K. , Kindap E.K., Dursun N., "The Restoration Of Kidney Mitochondria Function By Inhibition Of Angiotensin-Ii Production In Rats With Acute Adriamycin-Induced Nephrotoxicity", RENAL FAILURE, vol.36, pp.606-612, 2014

2. Taşkin E., Kunduz Kindap E. , Özdoğan K. , Aycan M.B., Dursun N., "Acute Adriamycin-Induced Cardiotoxicity Is Exacerbated By Angiotension Ii ", CYTOTECNOLOGY, vol.66, pp.1-11, 2014
3. Özdoğan K. , Taşkin E., Dursun N., "Protective Effect Of Carnosine On Adriamycin-Induced Oxidative Heart Damage In Rats", Anadolu Kardiyoloji Dergisi-The Anatolian Journal of Cardiology, pp.3-10, 2011

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler (DGDM)

1. Dursun N., Yürekli M. , Özdoğan K. , "Effect Of Physical Activity On Plasma Adrenomedullin Concentration And Its Relationship With Nitric Oxide In Athletes", Erciyes Medical Journal, vol.34, pp.1-6, 2012

Katıldığı Bilimsel Kongre / Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

1. Tıbbi Bilimlerde Araştırma Projesi Hazırlama ve Yürütme Eğitimi, Tübitak BİDEB 2237 projesi, Kayseri, Nisan 2014
2. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Kayseri, Eylül 2014
3. Laboratuvar Hayvanları Bilimi 3. Ulusal Kongresi, Kayseri, Eylül 2013
4. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara, Eylül 2013
5. 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress, Isparta, Haziran 2012
6. NACD2011 International Symposium on New Approaches in Cardiovascular disorders: From Genes & Molecules to Clinical Applications, Ankara, Mayıs 2011
7. 3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress Focus on: Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, Haziran 2010
8. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 36.Ulusal Fizyoloji Kongresi, Edirne, Eylül 2010