

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İSKEMİ – REPERFÜZYONUN SIÇAN MİYOKARDİYAL
PAPİLLER KASINDA OLUŞTURDUĞU FONKSİYON
BOZUKLUKLARINDA Mito-TEMPO’NUN OLASI KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

AHMET AKKOCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ

KONYA 2018

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İSKEMİ – REPERFÜZYONUN SIÇAN MİYOKARDİYAL
PAPİLLER KASINDA OLUŞTURDUĞU FONKSİYON
BOZUKLUKLARINDA Mito-TEMPO’NUN OLASI KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

AHMET AKKOCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üy. Seçkin TUNCER

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 171318004 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2018

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **“Biyofizik”** Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **AHMET AKKOCA**’nın **“İskemi-Reperfüzyonun Sıçan Miyokardiyal Papiller Kasında Oluşturduğu Fonksiyon Bozukluklarında Mito-TEMPO’nun Olası Koruyucu Etkisinin Araştırılması”** başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden ***Yüksek Lisans Tezi*** olarak kabul edilmiştir. Konya, Türkiye / 12.06.2018

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ
Necmettin Erbakan Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Barkın ILHAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI
Selçuk Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 05/03/2018 tarih ve 16/01.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**Investigation of Possible Protective Effect of Mito-TEMPO on Dysfunction of Rat Myocardial Papillary Muscle Caused by Ischemia-Reperfusion.**” by “**AHMET AKKOCA**” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of “**Biophysics**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan Konya, Turkey / 12.06.2018.

Principal Advisor
Prof. Nizamettin DALKILIÇ, Ph.D.
University of Necmettin Erbakan

Examination Committee Member
Assoc. Prof. Barkın İLHAN, Ph.D.
University of Necmettin Erbakan

Examination Committee Member
Prof. Abdulkadir Kasım BALTACI, Ph.D.
University of Selçuk

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK
Director of Institute of Health Sciences

05 / 07 / 2018

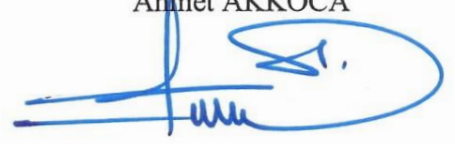


BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

12/06/2018

Ahmet AKKOCA



BENZERLİK RAPORU

13.06.2018

Turnitin

GÖRÜNTÜLENİYOR:

ANASAYFA > YÜKSEK LİSANS TEZİ > İSKEMİ – REPERFÜZYONUN SIÇAN MİYOKARDİYAL PAPİLLER KASINDA OLUŞTURDUĞU FONKSİYON BOZUKLUKLARINDA MİTO-TEMPO'NUN OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu sayfa hakkında

Bu sizin ödev kutunuzdur. Bir yazılı ödevi görüntülemek için yazılı ödevin başlığını seçin. Bir Benzerlik Raporunu görüntülemek için yazılı ödevin benzerlik sütunundaki Benzerlik Raporu ikonunu seçin. Tıklanabilir durumda olmayan bir ikon Benzerlik Raporunun henüz oluşturulmadığını gösterir.

İskemi – Reperfüzyonun Sıçan Miyokardiyal Papiller...

GELEN KUTUSU | GÖRÜNTÜLENİYOR: YENİ ÖDEVLER ▼

Dosyayı Gönder		Çevrimiçi Derecelendirme Raporu Ödev ayarlarını düzenle E-posta bildirmeyenler						
☐	YAZAR	BAŞLIK	BENZERLİK	PUANLA	CEVAP	DOSYA	ÖDEV NUMARASI	TARİH
☐	Ahmet Akkoca	İskemi – Reperfüzyonun Sıçan Miyokardiya...	%4	--	--		975137799	13-Haz-2018

Telif Hakkı © 1998 – 2018 Turnitin, LLC. Tüm Hakları Saklıdır.

https://turnitin.com/t_inbox.asp?r=92.9380963485148&svr=306&lang=tr&aid=69571066

ÖNSÖZ

Biyolojik olayları, fizik yasaları ile anlamayı ve açıklamayı hedefleyen Biyofizik branşına bu çalışma ile bir zerre de olsa katkı yapabildiysem, yüksek lisans eğitimimi tamamlamış olmanın yanında bu konu hakkındaki memnuniyetlerimi de bildirmek isterim.

Biyofizik yüksek lisans eğitimim boyuncaengin bilgi ve deneyimleri ile beni aydınlatan, ayrıca güler yüzü ile huzurlu bir çalışma ortamı tesis eden danışmanım Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ'a hassaten teşekkürlerimi sunarım.

Yine Biyofizik Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Seçkin TUNCER ve Arş. Gör. M. Cenk ÇELEN'e gerek yüksek lisans eğitimim süresince, gerekse tezimin deneyleri boyunca gösterdikleri fedakâr çabalardan dolayı minnettarım. Ayrıca Doç. Dr. Barkın İLHAN ve Öğr. Gör. Dr. Burcu GÜLTEKİN'e de destekleri dolayısıyla teşekkür ederim.

Tezimin deneyleri sırasında gösterdiği anlayış sebebiyle S. Ü. Ziraat Fakültesi öğretim üyesi ve Meslek Yüksekokulları Koordinatörü Prof. Dr. Alp Önder YILDIZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında maddi manevi destekleri nedeniyle S. Ü. Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Tahir BALEVİ'ne hürmetlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca şefkati ve ilgisini üzerimde hissettiğim, kıymetli aile büyüğümüz İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı emekli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Temel DAĞOĞLU'na şükranlarımı arz ederim.

Ve nihayetinde bu çalışma benden hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen kıymetli annem, babam, ailem ve sevgili eşime ithaf olunur.

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 171318004 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	i
<i>Tez Onay Sayfası</i>	ii
<i>Approval</i>	iii
<i>Beyanat</i>	iv
<i>Benzerlik Raporu</i>	v
<i>Önsöz</i>	vi
<i>İçindekiler</i>	vii
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i>	ix
<i>Şekiller Listesi</i>	x
<i>Tablolar Listesi</i>	xi
<i>Özet</i>	xii
<i>Abstract</i>	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>İskemi – Reperfüzyon</i>	3
2.2. <i>Serbest Radikaller</i>	5
2.3. <i>Antioksidanlar</i>	7
2.3.1. <i>Endojen Antioksidanlar</i>	7
2.3.2. <i>Eksojen Antioksidanlar</i>	12
2.3.3. <i>Mito-TEMPO</i>	12
2.4. <i>Miyokardiyal Papiller Kas</i>	15
2.4.1. <i>Kalp Kasında Uyarılma – Kasılma Çiftlenimi</i>	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. <i>Deney Grupları Hakkında Genel Bilgiler</i>	18
3.2. <i>Miyokardiyal Papiller Kas İzolasyonu</i>	19
3.3. <i>İzometrik Kasılma Kaydı</i>	20
3.3.1. <i>İzometrik Kasılma Kayıt Protokolleri</i>	21
3.3.2. <i>İzometrik Kasılma Kayıtlarının Analizi</i>	22
3.4. <i>Biyokimyasal Parametrelerin İncelenmesi</i>	23
3.5. <i>Histolojik Parametrelerin İncelenmesi</i>	24
3.6. <i>İstatistiksel Analiz</i>	24
4. BULGULAR	25

4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlıkları	25
4.2. Kasılma Kayıtlarına İlişkin Veriler	26
4.2.1. Uyarın Frekansı – Kasılma İlişkesine Ait Veriler	27
4.2.2. Ön Beklemeli Uyarın – Kasılma İlişkesine Ait Veriler.....	30
4.3. Biyokimyasal İncelemelere Ait Veriler	33
4.4. Histolojik İncelemelere Ait Veriler.....	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	36
5.1. Öneriler	41
6. KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ.....	46
EK-A : Hayvan Deneyleri Etik Kurul Kararı	47

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AP	: Aksiyon potansiyeli
CAT	: Katalaz
GCL	: Glutamin-sistein ligaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GS50	: Yarı gevşeme süresi
GSH	: Glutasyon
GSS	: Glutasyon sentetaz
GSSG	: Glutasyon disülfit
IR	: İskemi-reperfüzyon
KK	: Kasılma kuvveti
KS	: Kasılma süresi
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RSS	: Reaktif sülfür türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SR	: Sarkoplazmik retikulum
TAS	: Toplam antioksidan seviyesi
TFF	: Trifenil fosfonyum
TOS	: Toplam oksidan seviyesi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. İskemi ve reperfüzyon durumlarında hücrede gerçekleşen olaylar.	4
Şekil 2.2. Mitokondriyal ROS üretimine ait şematik bir model.	6
Şekil 2.3. Mito-TEMPO molekülünün açık formülü.	13
Şekil 2.4. TFF katyonunun mitokondri iç membranından geçişi.	15
Şekil 2.5. Kalp sol bölgeden bir kesit.	16
Şekil 2.6. Kalp kası aksiyon potansiyeli, kasılma ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ilişkisi.	17
Şekil 2.7. Kasılma-gevşeme süreçlerinde hücre içi kalsiyum konsantrasyonu değişimine dair şematik gösterim.	17
Şekil 3.1. İzole organ banyosu ve ilintili diğer mekanizmaların şematik gösterimi. .	21
Şekil 3.2. Kasılma kayıtlarından elde edilen parametreler.	23
Şekil 4.1. Mito-TEMPO ve ultra saf su enjekte edilen gruplardaki deney hayvanlarının ağırlık değişimleri.	25
Şekil 4.2. 0,2 Hz frekanstaki uyaranlar ile elde edilen kasılma eğrileri.	26
Şekil 4.3. Uyaran frekansı – kasılma ilişkisine ait KK değerleri.	27
Şekil 4.4. Uyaran frekansı – kasılma ilişkisine ait KS değerleri.	28
Şekil 4.5. Uyaran frekansı – kasılma ilişkisine ait GS50 değerleri.	29
Şekil 4.6. Uyaran frekansı – kasılma ilişkisine ait $+dF/dt_{max}$ ve $-dF/dt_{max}$ değerleri.	30
Şekil 4.7. Ön beklemeli uyaran – kasılma ilişkisine ait KK değerleri.	31
Şekil 4.8. Ön beklemeli uyaran – kasılma ilişkisine ait KS değerleri.	32
Şekil 4.9. Ön beklemeli uyaran – kasılma ilişkisine ait $+dF/dt_{max}$ ve $-dF/dt_{max}$ değerleri.	33
Şekil 4.10. Tüm deney gruplarının kan serumlarına ait TAS – TOS değerleri.	34
Şekil 4.11. Miyokardiyal papiller kas dokusuna ait histolojik görüntüler.	35

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Biyolojik sistemlerde serbest radikallere maruz kalan yapılar ve oluşan hasarlar.	5
Tablo 2.2. Antioksidanların sınıflandırılmasını gösterir özet tablo.	7
Tablo 4.1. 0,2 Hz frekanstaki uyaranlarla alınan kasılma kayıtlarına ilişkin veriler.	27

ÖZET

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İskemi-Reperfüzyonun Sıçan Miyokardiyal Papiller Kasında Oluşturduğu Fonksiyon Bozukluklarında Mito-TEMPO'nun Olası Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Ahmet AKKOCA

Biyofizik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi / KONYA – 2018

Kan dolaşımı ile hücre düzeyinde gerçekleşen metabolik olaylarda ihtiyaç duyulan maddelerin taşınması sağlanırken diğer taraftan da oksijenlenme ve atık maddelerin uzaklaştırılması gerçekleşir. Bu esnada herhangi bir nedenle dolaşımın durması olayına iskemi, durmasının ardından tekrar akışın başlaması ise reperfüzyon olarak adlandırılır. İskemiye maruz kalan hücrelerde fonksiyon bozukluğu ve hücrelerin ölümüne kadar giden bir dizi kimyasal olay gerçekleşirken reperfüzyonda ise oksijensiz kalan hücrelerin yeniden oksijenlenmesi ile serbest radikallerin oluşmasına sebep olan süreçler tetiklenir. Biyolojik sistemler için en önemli serbest radikal kaynağı ise mitokondri iç membranında lokalize olmuş elektron transport sistemidir.

Serbest radikaller üzerine yapılan çalışmalara duyulan ilgi, birçok hastalığa sebep olduklarının anlaşılmasının ardından oldukça artmıştır. Öyle ki; diyabet, nörodejeneratif rahatsızlıklar (Parkinson, Alzheimer), kardiyovasküler hastalıklar (ateroskleroz, hipertansiyon), solunum hastalığı (astım), katarakt gelişimi, romatizmal eklem iltihabı ve türlü kanserler (kalınbağırsak kanseri, prostat, göğüs, akciğer ve mesane kanserleri) gibi pek çok hastalığa artmış serbest radikal miktarının sebep olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur.

Canlı sistemler oksidatif strese karşı kendi içerisinde antioksidan üretecek bir takım savunma mekanizmalarına sahip olsa da bazı durumlarda antioksidanların dışarıdan da alınması zorunlu hale gelmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, özellikle oksidan madde oluşumu için en önemli mekanizma olan mitokondriyi doğrudan hedef alan, sentetik olarak üretilmiş ve ticari adı Mito-TEMPO olarak bilinen bir antioksidan molekülünün, iskemi-reperfüzyon sebebiyle artan serbest radikal miktarının miyokardiyal papiller kas kasılma fonksiyonu üzerinde oluşturacağı hasarlara karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Oluşturulan SHAM, IR ve MT+IR gruplarına ait izometrik kasılma kayıtlarından kasılma kuvveti, kasılma süresi, yarı gevşeme süresi, $+dF/dt_{max}$ ve $-dF/dt_{max}$ değerleri hesaplanmış, SHAM grubuna göre iskemi-reperfüzyon uygulanan grupta farklılık gösteren ilgili parametreler, MT+IR grubunda kısmen veya tamamen SHAM grubu değerlerinde kalmıştır. Biyokimyasal değerlendirmeler için her üç gruptan da alınan kan örnekleri santrifüjlenerek kan serumları elde edilmiş ve toplam oksidan/antioksidan seviyeleri tespit edilmiştir. Buna göre; IR grubu oksidan seviyesi artmış, antioksidan seviyesi azalmış, Mito-TEMPO enjekte edilen grupta bu değerler SHAM seviyesi yakınlarında ölçülmüştür. Ayrıca tüm deney gruplarından alınan miyokardiyal papiller kas örneklerinden histolojik boyamalar sonunda görüntüler alınmış ve IR grubunda miyofibril kayıpları ile intrasitoplazmik vakuolizasyon tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen bütün ölçüm ve analizler birlikte düşünüldüğünde iskemi-reperfüzyon ile miyokardiyal papiller kasta meydana gelen fonksiyon bozukluklarına karşı Mito-TEMPO büyük ölçüde koruyucu etki göstermiştir.

Anahtar Sözcükler : İskemi-reperfüzyon; Mito-TEMPO; papiller kas

ABSTRACT

T.C. UNIVERSITY of NECMETTİN ERBAKAN

INSTITUTE of HEALTH SCIENCES

Investigation of Possible Protective Effect of Mito-TEMPO on Dysfunction of Rat
Myocardial Papillary Muscle Caused by Ischemia-Reperfusion

Ahmet AKKOCA

Department of Biophysics

Master's Thesis / KONYA – 2018

Blood circulation allows the transport of substances needed for metabolic events at the cell level while the other side is oxygenated and the waste substances are removed. In the meantime, this is called ischemia the flow of circulation stop for any reason and reperfusion starting flow again after stopping. In the cells exposed to the ischemia, a series of chemical events leading to the dysfunction and the death of the cells occur, while in the reperfusion, oxygen-free cells re-oxygenate and triggers the processes that leading to produce of free radicals. The most important free radical source for biological systems is the electron transport system localized in the inner membrane of the mitochondria.

The interest in studies on free radicals has increased considerably after they have been known to cause many diseases. Such that; many studies have shown that increased amounts of free radicals are caused to many diseases such as diabetes, neurodegenerative disorders (Parkinson, Alzheimer), cardiovascular diseases (atherosclerosis, hypertension), respiratory disease (asthma), cataract development, rheumatoid arthritis and various cancers (cancers of the intestine, prostate, breast, lung and bladder cancers).

Although living systems have a number of defensive mechanisms to produce antioxidants against the oxidative stress, in some cases it is necessary to take antioxidants from the outside. In this thesis, we investigated that possible protective effect of trade name known as Mito-TEMPO, a synthetically-produced antioxidant molecule and directly targets mitochondria, on contractile dysfunction of rat myocardial papillary muscle caused by ischemia-reperfusion.

The contraction force, contraction time, semi-relaxation time, $+dF/dT_{max}$ and $-dF/dT_{max}$ values were calculated from the isometric contraction records of the generated SHAM, IR and MT groups, and the relevant parameters differing in the ischemia-reperfusion group according to the SHAM group, in the MT group it was trapped in the partially or completely SHAM group values. Blood samples taken from all three groups for biochemical evaluations were centrifuged to obtain blood serum and total oxidant/antioxidant levels were determined. Accordingly; the oxidant level of the IR group was increased, the level of antioxidant was decreased, and these values were measured nearly the SHAM level in the group of injected Mito-TEMPO. In addition, according to images of myocardial papillary muscle samples, intracytoplasmic vacuolization and myofibril losses was detected in the IR group.

All of the measurements and analyzes carried out together suggest that Mito-TEMPO has a great protective effect against myocardial papillary muscle dysfunctions caused by ischemia-reperfusion.

Key Words : Ischemia-reperfusion; Mito-TEMPO; papillary muscle

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklı ölüm oranında ciddi artış olmasına rağmen bu tip hastalıkların patogeneze mekanizması halen tüm açıklığıyla ortaya çıkarılamamıştır. Fakat serbest radikal miktarlarındaki artışın kardiyovasküler hastalıkların oluşum ve ilerleme süreçlerinde önemli rolü olduğu saptanmıştır (Panth ve ark., 2016; Byon ve ark., 2016). İskemi-reperfüzyon prosedürünün mitokondri hasarı sebebiyle serbest radikal oluşumunu artırarak kalp kusurlarına neden olduğu da bilinmektedir (Zhu ve Zuo 2013; He ve Zuo 2015).

Serbest radikallerin olumsuz etkilerini gösterir birçok çalışmaya kolayca ulaşmak mümkünken, sağlıklı yaşam için bu zararlı maddelerden kurtulmanın gerekliliği aşikardır. Serbest radikallerden kurtulmanın ilk aşaması bunları üreten etkenin ortadan kaldırılması olsa da fizyolojik şartlarda gerçekleşen birçok aktivite sonucunda bile oksidan maddeler oluşur (Panth ve ark., 2016). Dolayısı ile patofizyolojik durumlarda serbest radikallerin miktarlarının daha da artması muhtemeldir.

Serbest radikalleri üreten etkenin ortadan kaldırılamadığı durumlarda oksidan maddeler ile bağ kurup onları zararsızlaştıran antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Nitekim antioksidanların, artmış serbest radikal miktarları üzerine etkilerinin incelendiği birçok çalışma vardır. Özellikle de reaktif oksijen türleri seviyesinin artışındaki kilit aktör olan mitokondriyi hedefleyen antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerinden kurtulmak için oldukça önem arz etmektedir (Smith ve Murphy 2011).

Yaşam kalitesi ve devamlılığı için kalbin tüm fonksiyonlarını eksiksiz şekilde yerine getirebiliyor olması gerekmektedir. Buna karşılık kalpte artan serbest radikal miktarı sebebiyle fonksiyonunun bozulacağı ve birçok hastalığa sebep olacağı, hatta ölüme dahi götürebileceği bilinmektedir (Fujii ve ark., 1984; Cochrane 1991). Kalbin fonksiyonel önemi ve serbest radikallerin zararlı etkilerinin biliniyor olması, kalpte serbest radikal miktarlarındaki meydana gelebilecek artışın verebileceği hasarları

geriye döndürmeyi veya bu hasarlara karşı koruyucu metotlar geliştirmeyi bir hayli önemli hale getirmiştir.

Etik kurallara uyması şartı ile insanlık yararına olacağı düşünülen çalışmalarda bazı deneysel hayvan modelleri geliştirilmektedir. Bu tez çalışmasında da sıçan kalbinde serbest radikal miktarını artıran iskemi-reperfüzyon prosedürü ile deneysel hayvan modeli geliştirilmiş ve kimyasal yapısı bilinen bir antioksidan olan Mito-TEMPO'nun koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Kalbin kompleks yapısı içerisinde iskemi-reperfüzyon oluşumunun verdiği hasarı ve antioksidan uygulamasının olası koruyucu etkisinin daha net ortaya konulabilmesi için özel olarak miyokardiyal papiller kas üzerine yoğunlaşmış ve bu çerçevede her bir deney hayvanından ayrı ayrı papiller kaslar izole edilmiştir. İzole papiller kaslardan ise bazı fizyolojik parametreler ölçülerek nümerik analizler yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

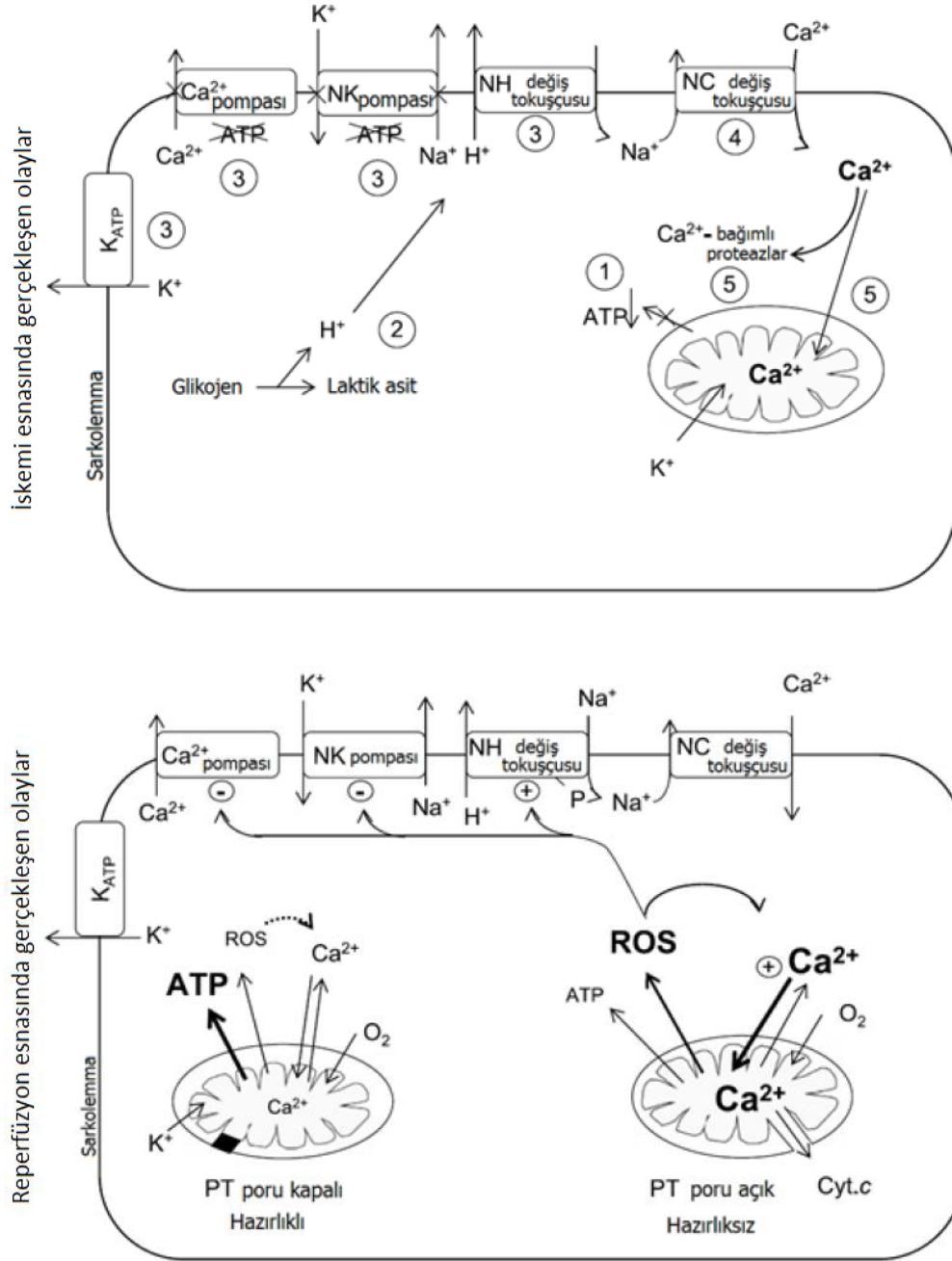
2.1. İskemi – Reperfüzyon

Kan dolaşımı ile hücre düzeyinde gerçekleşen metabolik olaylarda ihtiyaç duyulan maddelerin taşınması sağlanırken diğer taraftan da oksijenlenme ve atık maddelerin uzaklaştırılması gerçekleşir. Bu esnada herhangi bir nedenle dolaşımın durması olayına iskemi, durmasının ardından tekrar akışın başlaması ise reperfüzyon olarak adlandırılır. İskemiye maruz kalan hücrelerde fonksiyon bozukluğu ve hücrelerin ölümüne kadar giden bir dizi kimyasal olay gerçekleşirken reperfüzyonda ise oksijensiz kalan hücrelerin yeniden oksijenlenmesi ile serbest radikallerin oluşmasına sebep olan süreçler tetiklenir. İskemi-reperfüzyon, hemoraji durumlarının oluşması sebebiyle cerrahi işlemler sonrasında da meydana gelebilmekte, iskemik doku miktarı hacimsel olarak büyük ise hasarı sadece kan akışının kesildiği yerde değil, vücudun başka bölgelerinde de görmek mümkün olmaktadır (Tuncer 2013).

İskemi nedeni ile hücre düzeyinde metabolik ve yapısal bakımdan bazı değişiklikler oluşabilmekte ve bu değişiklikler sebebiyle hücresel oksidatif fosforilasyon miktarı azalmaktadır. Oksidatif fosforilasyon miktarında görülen bu azalış sonucunda ise ATP ve fosfokreatin benzeri fosfat türevlerinin sentezi de baskılanabilmektedir. Bu durumla ilintili olarak hücre membranında bulunan ATP bağımlı iyon kanallarının çalışma mekanizması dahi etkilenebilmekte ve hücre içi matriksin iyon dengesinde bozulmalar oluşabilmektedir (Collard ve Gelman 2001).

Reperfüzyonun sebep olduğu hasarlardan ise ilk defa 1965 yılında Baue ve Mcclerkin tarafından yapılan araştırmada bahsedilmiştir. Bu çalışmada reperfüzyon hasarının sebepleri arasında sistemik şok, hemorajik nekroz ve asidozdan bahsedilmektedir. Bu sebepler nedeni ile meydana gelen kimyasal olaylar sonucunda hücrelerin fizyolojik şartlardaki çalışma mekanizmaları için oldukça zararlı olan serbest radikaller ortaya çıkmaktadır (Tuncer 2013).

Şekil 2.1. İskemi ve reperfüzyon durumlarında hücrede gerçekleşen olaylar (Tuncer 2013).



Şekil 2.1.'den de görüldüğü gibi iskemi-reperfüzyon döngüsünün sebep olduğu serbest radikal miktarındaki artışa karşı tedbirler alınmalıdır.

2.2. Serbest Radikaller

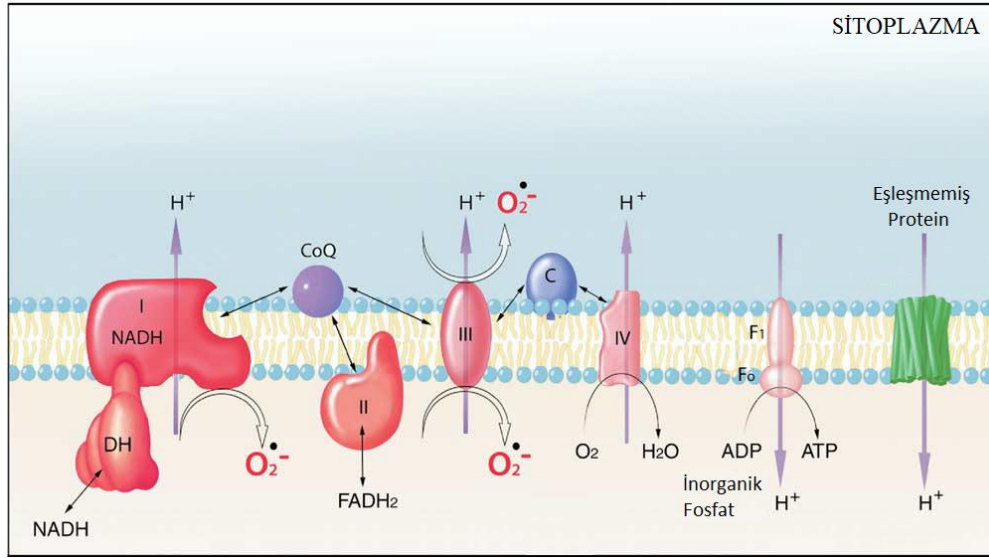
Modern atom teorisine göre atomlar, çekirdek ve onun etrafındaki farklı enerji seviyelerine göre belirli bir düzen içerisinde dağılmış elektrolardan oluşur. Atomlar arasında kurulan bağlar sayesinde de moleküllerin oluştuğu bilinmektedir. Serbest radikaller bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip kararsız haldeki atom veya moleküller olarak tanımlanır. Aşırı reaktif bu atom veya moleküller diğer atom ve moleküllerle elektron alışverişi yaparak onların kimyasal yapısını değiştirmek eğilimindedirler. Tablo 2.1’de biyolojik sistemlerde serbest radikallerin hedef aldığı yapılar ve yapısal değişimler sonucu oluşan hasarlar gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Biyolojik sistemlerde serbest radikallere maruz kalan yapılar ve oluşan hasarlar (Rehber 1998).

HEDEF	HASAR	SONUÇ
DNA / RNA	Deoksiriboz halkası yarılması, baz hasarı, zincir kırılması.	Mutasyonlar, translasyonel hatalar, protein sentezi inhibisyonu.
Proteinler	Agregasyon ve çapraz bağlanma, parçalanma ve kırılma, tiyol grupları modifikasyonu.	İyon taşınımının bozulması, hücre içine kalsiyum girişinde artış, enzim aktivitelerinde değişimler.
Poli-Doymamış Yağ Asitleri	Lipid peroksidasyon ürünleri olan MDA ve 4-hidroksi-2,3- trans nonenal oluşumu.	Lipid akışkanlığının değişmesi, membran permeabilitesinde değişme, membrana bağlı olan enzimlerin etkilenmesi.

Serbest radikaller oksijen, nitrojen ve sülfür kaynaklı olabilir. Oksijen kaynaklı olanlar “reaktif oksijen türleri” (ROS), nitrojen kaynaklı olanlar “reaktif nitrojen türleri” (RNS), sülfür kaynaklı olanlar ise “reaktif sülfür türleri” (RSS) olarak adlandırılır. Hücrede en önemli serbest radikal kaynağı mitokondri iç membranında lokalize olmuş elektron transport sistemidir. İskemi-reperfüzyon, hemoraji, entoksikasyonlar, radyoaktivite veya alerjik durumlarda mitokondrilerdeki aerobik solunum reaksiyon dengesi etkileneceği için elektron transport sisteminden elektron sızması sonucu ROS oluşumu artış göstermektedir (Murphy 2009). Mitokondriyal ROS üretimine dair şematik bir model Şekil 2.2’de verilmiştir.

Şekil 2.2. Mitokondriyal ROS üretimine ait şematik bir model (Balaban ve ark., 2005).



Serbest radikaller üzerine yapılan çalışmalara duyulan ilgi, birçok hastalığa sebep olduklarının anlaşılmasının ardından oldukça artmıştır. Öyle ki diyabet, nörodejeneratif rahatsızlıklar (Parkinson, Alzheimer), kardiyovasküler hastalıklar (ateroskleroz, hipertansiyon), solunum hastalığı (astım), katarakt gelişimi, romatizmal eklem iltihabı ve türlü kanserler (kalınbağırsak kanseri, prostat, göğüs, akciğer ve mesane kanserleri) gibi pek çok hastalığa artmış serbest radikal miktarının sebep olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Phaniendra ve ark., 2015). Bunların yanında oksidan maddeler, proteinlerin dekarboksilasyonuna, peptid bağlarının hidrolizine ve disülfid bağlarının oluşmasına da sebep olur. Bu durum hücreler için önemli olan Ca-ATPaz, Na/K ATPaz gibi enzimlerde fonksiyon bozukluğuna sebep olacağı için hücre içi ve dışı iyon dağılımının bozulmasına neden olabilmektedir (Halliwell ve Chirico 1993). Ayrıca nükleik asit bazlarının modifikasyonu nedeniyle DNA şeridinin kırılmasından da sorumludurlar (Dizdaroglu ve Jaruga 2012). Bütün bu bilinenlerden anlaşılmaktadır ki; biyolojik sistemlerin fonksiyonlarını sağlıklı bir şekilde gerçekleştirebilmeleri için oksidan maddelerin oluşumunun engellenmesi, engellenemediği durumlarda ise bu maddelerin sebep olabileceği hasarlara karşı koruyucu/önleyici tedbirler alınmalıdır.

2.3. Antioksidanlar

Serbest radikallerin oluşumunu engellemek, bu maddelerden kaynaklı hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” adı verilir (Şener ve Yeğen 2009).

Antioksidanlar kaynağı bakımından endojen ve eksojen olarak sınıflandırılabilir gibi (Jacop 1995), niteliği bakımından enzimatik, nonenzimatik ve vitaminler olarak da sınıflandırılabilirler (Sen ve ark., 2010). Bu durum Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Antioksidanların sınıflandırılmasını gösterir özet tablo (Karabulut ve Gülay 2016).

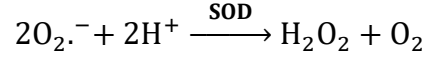
ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Ürik asit	α -Lipoik asit
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Seruloplazmin
	Albümin	Transferrin
EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR		
α -Tokoferol (Vitamin E)		
β -karoten (Vitamin A)		
Askorbik asit (Vitamin C)		
Folik asit (Vitamin B9)		

2.3.1. Endojen Antioksidanlar

Biyolojik sistemler için endojen kaynaklı antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak iki grupta sınıflandırılabilir (Tablo 2.2; Karabulut ve Gülay 2016).

2.3.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

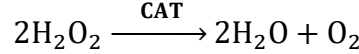
Süperoksit Dismutaz : Bu enzim, süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimatik bir antioksidandır. H_2O_2 daha sonra CAT ya da GPx ile ortamdan uzaklaştırılır (Young ve Woodside 2001).



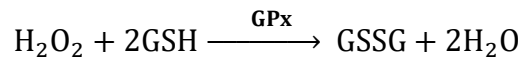
İnsanlarda bu enzimin üç farklı formu bulunmaktadır. Bunlardan bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD) sitozolde, manganez (Mn) içeren (Mn SOD) süperoksit dismutaz mitokondride ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD) ise hücre dışı sıvılarda bulunurlar (Sen ve Chakraborty 2011).

Katalaz : Katalaz enzimi, dört alt birimden meydana gelir ve her bir alt birim, bir HEM grubu ve bir NADPH molekülü içerir (Kirkman ve ark., 1987). Katalaz büyük ölçüde peroksizomlar gibi hücre içi organellerde ve daha az miktarda ise mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. Hidrojen peroksitin, H₂O ve O₂'ye dönüşümünü katalizler (Limon-Pacheco ve Gonsebatt 2009).

H₂O₂ bir radikal olmaması sebebiyle biyolojik sistemler için doğrudan olumsuz etkisi olmayan bir molekül olsa da, en reaktif oksijen türü olan hidroksil radikali (OH·) oluşumunda bir ön madde rolü oynamaktadır (Cheung ve ark., 2001).

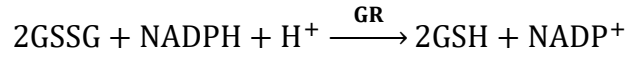


Glutasyon Peroksidaz : Bu enzim hücrelerin sitoplazmasında bulunur ve hücreleri H₂O₂'den kaynaklanan oksidatif hasara karşı korur. Enzim her bir alt protein biriminde selenyum atomu içeren dört bölümden oluşur (Sen ve Chakraborty 2011). Bu enzimin selenyuma bağımlı (Se-GPx) ve selenyuma bağımlı olmayan GPx olarak tanımlanan iki ana tipi vardır. Se-GPx, H₂O₂ ve organik hiperoksitlere karşı antioksidan etki gösterirken GPx ise organik hidroperoksitlere karşı etkilidir (Cnubben 2001). Bu indirgeme reaksiyonları esnasında GSH hidrojen verir, H₂O₂ ve hidroperoksitler indirgenirken GSH okside olarak glutasyon disülfite (GSSG) dönüşür (Reiter ve ark., 1995).



Glutasyon Redüktaz : GR flavoprotein bir enzimdir. GPx aracılığı ile gerçekleştirilen reaksiyonda GSH'nin, GSSG'ye dönüşmesi bir bakıma organizmada zaten kısıtlı olan GSH deposunu tüketmektedir. GR enzimi NADPH'nin bir

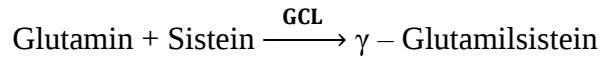
elektronunu okside glutatyona aktararak GSSG'nin tekrar GSH'a dönüştürülmesinde rol oynar (Ilio ve ark., 1985).



2.3.1.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

Glutasyon : GSH neredeyse bütün ökaryotik hücrelerde sentezlenmekle birlikte, biyolojik sistemlerde gerçekleşen birçok aktivitede (hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesi, gen ekspresyonu, apoptozis, detoksifikasyon sisteminin çalışması, eikosonoidlerin sentezlenmesi vb.) antioksidan olarak faaliyet göstermektedir (Townsend ve ark., 2003; Adeoye ve ark., 2018; Ren ve ark., 2018).

Glutasyonun sentezlenmesinde ilk olarak glutamin-sistein ligaz (GCL), glutamin ve sisteini bağlar ve γ -glutamilsistein oluşturulur, ardından glutasyon sentetaz (GSS), γ -glutamilsisteine glisin bağlar ve GSH molekülü meydana getirilir (Pei ve ark., 2013).



GSH, GPx'in katalitik etkisi sayesinde H_2O_2 'yi ve lipit peroksitleri detoksifiye ederken, plazma membranından aminoasitlerin taşınımını ve bazı önemli antioksidanların yeniden oluşumunu sağlar (Sen ve Chakraborty 2011).

Melatonin : Melatonin (N-asetil-5-metoksi-triptamin), temelde pineal bezden, karanlıkta triptofandan ve diğer birçok yerden de üretilir ve dolaşıma aktarılır (Hevia ve ark., 2014).

Antioksidan ve immün sistem koruyucu etkisi bilinen melatonin aynı zamanda bakteri, virüs ve parazitlerden kaynaklı hastalıklara karşı da tedavi edici alternatif bir kimyasal ajandır (Daryani ve ark., 2018). Melatonin hidroksil radikali,

hidrojen peroksit, singlet oksijen, nitrik oksit, peroksinitrit anyonu ve peroksinitrik asit içeren reaktif türleri ve serbest radikallerin farklı formlarına karşı hücreleri korur. Bunlara ek olarak protein ve lipidlerin yanı sıra çekirdek DNA'sı ve mitokondriyal DNA'yı korur (Reiter ve ark., 2001).

Ürik Asit : Bir atık madde olarak da değerlendirilen ürik asitin, kandaki miktarının artması nedeniyle kardiyovasküler rahatsızlıklara sebep olduğu bilinmektedir (Kei ve ark., 2017). Dahası kandaki artmış ürik asit miktarı diyabet, hipertansiyon gibi hastalıklarla da birleşince inmeyi bir hayli tetiklemektedir (Waring 2002). Fakat bunlara rağmen ürik asitin çok etkili bir antioksidan olduğu da bilinmektedir (Nieto ve ark., 2000). Ürik asit, peroksinitrik asit, peroksinitrit anyonu, singlet oksijen, süperoksit ve hidroksili etkisizleştirir. Güçlü bir antioksidan olmasının yanında Fe ve Cu gibi metal iyonlarının şelatörü (Fe ve Cu metal iyonları ile birleşip onların vücuttan atılımı) olarak da görev yapar (Karabulut ve Gülay 2016).

Bilirubin : Bilirubin, işlevini tamamlayan eritrositlerdeki HEM proteinlerinin sindirilmesi sonucu meydana gelir. Bilirubinin artmış serbest radikal miktarından kaynaklı rahatsızlıklara karşı güçlü bir antioksidan olduğu bilinmektedir. Öyle ki peroksil radikalini etkisizleştirmektedir (Gazzin ve ark., 2016).

Albumin : Albumin 66 kDa molekül ağırlığına sahip, 585 aminoasit içeren bir proteindir. İnsan plazmasında 35-50 mg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Vücutta birçok fizyolojik ve farmakolojik önemi olan albumin, metaller, yağ asitleri, yağ molekülleri, safra pigmentleri ve bazı ilaçların transferinde önemli rol üstlenir. Genel olarak albumin, vücutta sürekli olarak oksidanlara maruz kalan plazma için baskın bir antioksidan olarak değerlendirilmektedir (Roche ve ark., 2008).

Albumin bakır iyonlarını bağlayarak, bakır iyonlarından kaynaklanan lipid peroksidasyonunu ve HO $\cdot$ oluşumunu inhibe eder. Ayrıca etkin bir HOCl süpürücüsüdür (Rehber 1998).

Koenzim Q10 : İnsanlarda 20 yaşında maksimum konsantrasyonda bulunan ve yaş ilerledikçe konsantrasyonu azalan koenzim Q10, mitokondri, lizozom, golgi ve plazma membranında lokalize olup, oksidatif fosforilasyon ve ATP üretiminde anahtar bir bileşendir (Tsai ve ark., 2008).

Koenzim Q10'un indirgenmiş formu olan ubikinol, lipofilik antioksidan olarak davranır ve elektron taşıma sisteminin aktivitesine katılır. Oksidan maddeleri nötralize etmek üzere elektron vererek H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ gibi türlere karşı koruma sağlar (Karabulut ve Gülay 2016).

Selenyum : Selenyum antioksidan özelliğinin yanı sıra bağışıklığı düzenleyici etkisi ile de biyolojik sistemler için oldukça önemli bir elementtir. Öyle ki; AIDS, kanser, kalp rahatsızlıkları gibi hastalıklara karşı koruyucu etkisi vardır. Günümüzde en az 30 adet Se ihtiva eden selenoprotein olduğu keşfedilmiştir. Bunların yanı sıra glutatyon peroksidaz, tioredoksin redüktaz ve iyodotironin deiyodinazların aktivitelerini artırarak serbest radikal miktarının artışını baskılar (Tapiero ve ark., 2003; Tinggi 2008).

α -Lipoik Asit : Mitokondriyal dehidrojenaz reaksiyonlarında önemli rolü olan α -lipoik asit veya onun indirgenmiş bir formu olan dihidrolipoik asit, süperoksit radikali, hidroksil radikali, hipokloröz asit, peroksil radikali ve singlet oksijen gibi serbest radikal türleri için koruyucu etkiye sahiptir (Packer ve ark., 1995).

Seruloplazmin : Seruloplazmin, 6 adet bakır atomu içeren ve demir iyonları homeostazisi için oldukça önemli olan bir proteindir. Fe^{+2} iyonlarını, Fe^{+3} 'e yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu baskılar ve böylelikle serbest radikal oluşumu engellenmiş olur (Wu ve ark., 2018).

Transferrin : Esas olarak kan serumunda bulunan transferrin, serbest demir iyonlarını bağlayarak onların sayısını azaltır ve $HO^{\cdot}$ oluşumunu baskılar. Böylelikle lipid peroksidasyonu engellenmiş olur (Rehber 1998).

2.3.2. Eksojen Antioksidanlar

Biyolojik sistemler için eksojen kaynaklı antioksidanlardan bazıları aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Tablo 2.2; Karabulut ve Gülay 2016).

α -Tokoferol (Vitamin E) : Vitamin E, yağda çözünebilir ve yüksek antioksidan özelliği olan bir moleküldür. Vitamin E, α , β , γ , δ tokoferol ve α , β , γ , δ tokotrienol şeklinde sekiz stereoizomeri olan asimetric bir yapıdadır. Bunlardan sadece α -tokoferol formu biyoaktiftir. α -tokoferol lipid peroksidasyonunu engellemesi sebebiyle bir takım kardiyak rahatsızlıklar, katarakt oluşumu, nörolojik bozukluklar, kolon, prostat ve göğüs kanserleri gibi rahatsızlara karşı koruyucudur (Pham-Huy 2008).

β -karoten (Vitamin A) : β -karoten, aktif vitamin A'ya dönüştürülebilir, karotenoidlerin yağda çözünebilir bir üyesidir. β -karoten oldukça güçlü bir singlet oksijen süpürücüsüdür (Pham-Huy 2008).

Askorbik asit (Vitamin C) : Suda çözünebilir bir vitamin olan Vitamin C, askorbik asit olarak da bilinmektedir. Vitamin C singlet oksijen, ozon, süperoksit, hidroperoksil, nitrojen dioksit, peroksinitrit ve hipokloröz asit gibi reaktif oksijen ve nitrojen türlerini kolaylıkla temizler. Dolayısıyla oksidatif hasara karşı etkin şekilde koruma sağlar (Karabulut ve Gülay 2016).

Folik asit (Vitamin B9) : Folik asit, suda çözünebiliyor olup vitamin B üyesidir. Eksikliği kadın ve erkekler için infertilite problemine sebep olmaktadır. Reaktif oksijen türleri için çok etkin bir antioksidan özelliğe sahiptir (Karabulut ve Gülay 2016).

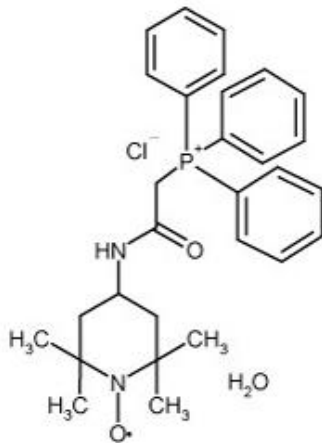
2.3.3. Mito-TEMPO

Yukarıda bahsedildiği gibi biyolojik sistemler oksidatif strese karşı kendi içerisinde antioksidan üretecek bir takım savunma mekanizmalarına sahip olsa da bazı durumlarda antioksidanların dışarıdan da alınması zorunlu hale gelmektedir.

Nitekim doku veya organların maruz kaldığı iskemi-reperfüzyon, hemoraji, entoksikasyonlar, radyoaktivite vb. durumlar sonucunda oksidan madde miktarındaki artışa, kendisinin üretmiş olduğu antioksidan miktarı yetersiz kalmaktadır. Bu durum ise hücrelerin ölümüne kadar giden süreçleri tetiklemektedir (Valko ve ark., 2006).

Özellikle oksidan madde oluşumu için en önemli mekanizma olan mitokondriyi doğrudan hedef alan, sentetik olarak üretilmiş antioksidan moleküller bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında ticari adı Mito-TEMPO ($C_{29}H_{35}N_2O_2P \cdot Cl$) olarak bilinen ve açık formülü Şekil 2.3’de verilen mitokondri spesifik antioksidanın koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Şekil 2.3. Mito-TEMPO molekülünün açık formülü.



Mitokondrinin oksidatif fosforilasyonun merkezi olmasının yanında birçok mekanizma için de oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Dolayısı ile hasara uğrayan mitokondri, hücre ölümü başta olmak üzere geniş bir yelpazede değerlendirilebilecek birçok hastalığın da kaynağı konumundadır. Bu olumsuz durumlardan serbest radikal miktarını artırması nedeniyle mitokondri organelinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Mitokondri son yıllarda birçok çalışmanın konusu olmuş, doğrudan mitokondriyi hedef alan antioksidan özellikli moleküllerin sentezlenmesini içeren çalışmalar yapılmıştır (Smith ve Murphy 2011).

Mitokondriyi hedefleyen antioksidanlar bu fonksiyonlarını lipofilik katyonlar ile bağ kurarak gerçekleştirirler. Çünkü lipofilik katyonların yükleri, hidrofobik bir

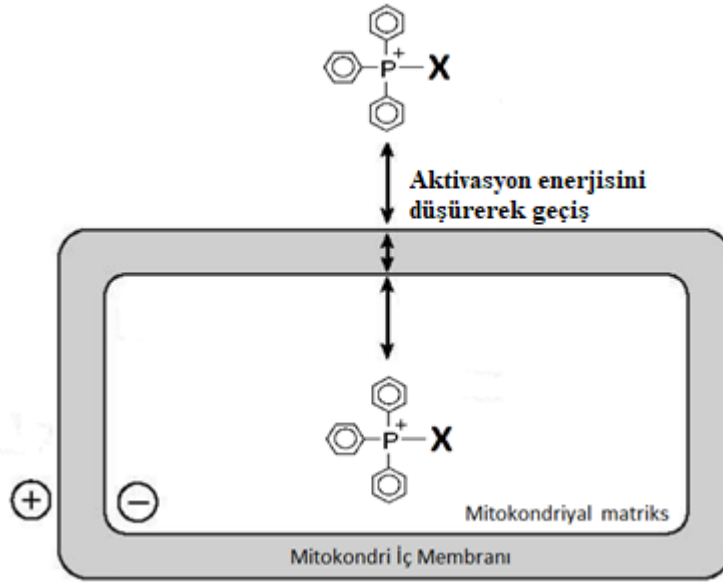
yüzey alanı içerisinde etkin şekilde dağılır ve hareketi boyunca aktivasyon enerjisini düşürerek plazma ve mitokondri iç zarını kolayca geçebilirler (Ross ve ark., 2005). Bu katyonların fosfolipit çift tabakayı geçerek mitokondriyal matrikste birikmeleri basitçe negatif mitokondri iç membran potansiyeline bir yanıttır. Yine bu katyonların hücre içersine yani sitoplazmaya alınması da aynı sürdürücü kuvvet etkisinde gerçekleşir (Smith ve Murphy 2011).

Antioksidanların mitokondriye ulaşmasına aracı olan ve bu amaç doğrultusunda en karakterize lipofilik katyon trifenil fosfonyum (TFF) olarak bilinmektedir. Başka lipofilik katyonlar da mitokondri iç membranını geçebiliyor olmasına rağmen yalnızca TFF sentetik olarak bu amaç uğruna kullanılabilir. TFF ile bir antioksidan bağ kurduğunda artık o antioksidanın hedefi doğrudan mitokondri organelidir (Murphy ve Smith 2007). Tez çalışmamıza konu olan ve doğrudan mitokondriyi hedefleyen Mito-TEMPO molekülü de [(2-(2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-oksil-4-ilamino)-2-oksoetil) **trifenil fosfonyum** klorid monohidrat] Şekil 2.3’de görüldüğü gibi TFF katyonuna bağlanmıştır. Şekil 2.4’de ise TFF katyonunun herhangi bir molekülü (X) kendine bağlayarak mitokondri iç membranından geçişi şematize edilmiştir. Mitokondriye ulaşan antioksidanlar ise oksidan maddeleri kaynağında etkisizleştirerek biyolojik sistemler için etkin bir koruma sağlarlar.

Bilinen bu özellikleri ile Mito-TEMPO birçok çalışmaya konu olmuştur. Ni ve ark. (2016)’nın yapmış olduğu çalışmada oluşturulan tip-1 ve tip-2 diyabetik hayvan modelinde gelişen kardiyomiyopati üzerine Mito-TEMPO’nun tedavi edici etkisi olduğu ve mitokondriyal ROS üretimini baskıladığı sonucuna ulaşılmıştır. Dikalova ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada ise Mito-TEMPO ve mitokondriyi hedef almayan başka bir antioksidanın anjiyotensin ile oluşturulan modeldeki kan basıncının düşmesi üzerine tedavi edici etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak, mitokondriyi hedef almayan antioksidanın basınç üzerinde herhangi bir değişime sebep olmadığı, buna karşı Mito-TEMPO’nun durumu kontrol seviyesine getirdiğini belirtmişlerdir. Liu ve ark. (2010)’nın araştırmalarında ise çeşitli sebepler ile kardiyak hücrelerde azalan sodyum akımlarını Mito-TEMPO’nun regüle ettiği belirtilmektedir. Miura ve ark. (2017)’nin araştırmalarında da femoral

arterden uygulanan iskemi sonucunda mitokondriyal ROS seviyesinin arttığı ve ardından Mito-TEMPO uygulaması sonucunda durumun kontrol grubu seviyelerine tekrar dönüş yaptığı gösterilmiştir. Mito-TEMPO'nun kronik kalp kalp yetmezliği sebebiyle oluşan diyafram kası fonksiyon bozuklukları üzerine koruyucu etkisi Laitano ve ark. (2016) tarafından araştırılmış ve Mito-TEMPO'nun kasılma parametreleri üzerinde anlamlı derecede koruyucu etkisi gösterilmiştir. Bu ve benzeri çalışmalardan Mito-TEMPO'nun biyolojik sistemler için oldukça zararlı olan serbest radikallerin etkisizleştirilmesinde büyük öneme sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Şekil 2.4. TFF katyonunun mitokondri iç membranından geçişi (Ross ve ark., 2005).

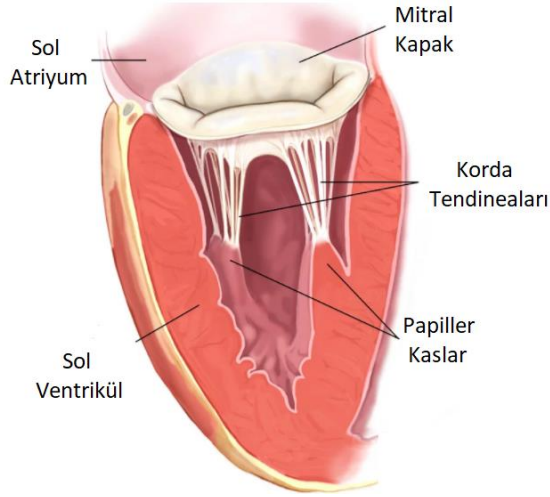


2.4. Miyokardiyal Papiller Kas

Miyokardiyal papiller kas, kalp dokusu düşünüldüğünde hacimsel olarak oldukça küçük bir yapıda olmasına rağmen, atriyoventriküler kapak yeterliliği bakımından hayati öneme sahiptir. Triküspit ve mitral kapaklar, sistol sırasında kapanarak kanın atriyumlar yönüne kaçmasını engelleme görevini papiller kaslar aracılığı ile gerçekleştirir. Şekil 2.5'te görüldüğü gibi papiller kaslar korda tendineaları aracılığı ile atriyoventriküler kapaklara tutunmuş durumdadırlar. Bir korda tendineası kopar veya miyokardiyal papiller kaslardan birisi felç olursa triküspit ve mitral kapaklar ventrikül kasılması esnasında geriye doğru esnerler. Bu esnemenin büyüklüğüne göre meydana gelen kalp yetmezliği ölümcül bile olabilir

(Madu ve D'Cruz 1997). Dolayısı ile kalp fonksiyonlarının sağlıklı şekilde gerçekleşebilmesinde miyokardiyal papiller kasın önemi göz ardı edilemez.

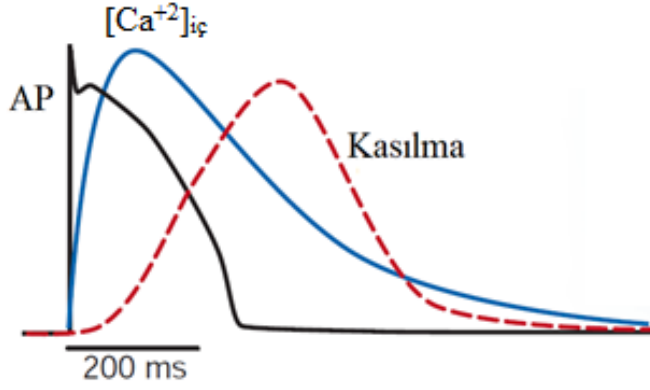
Şekil 2.5. Kalp sol bölgeden bir kesit (www.noyantemucinogus.com.tr/mitral-kapak-hastaliklari).



2.4.1. Kalp Kasında Uyarılma – Kasılma Çiftlenimi

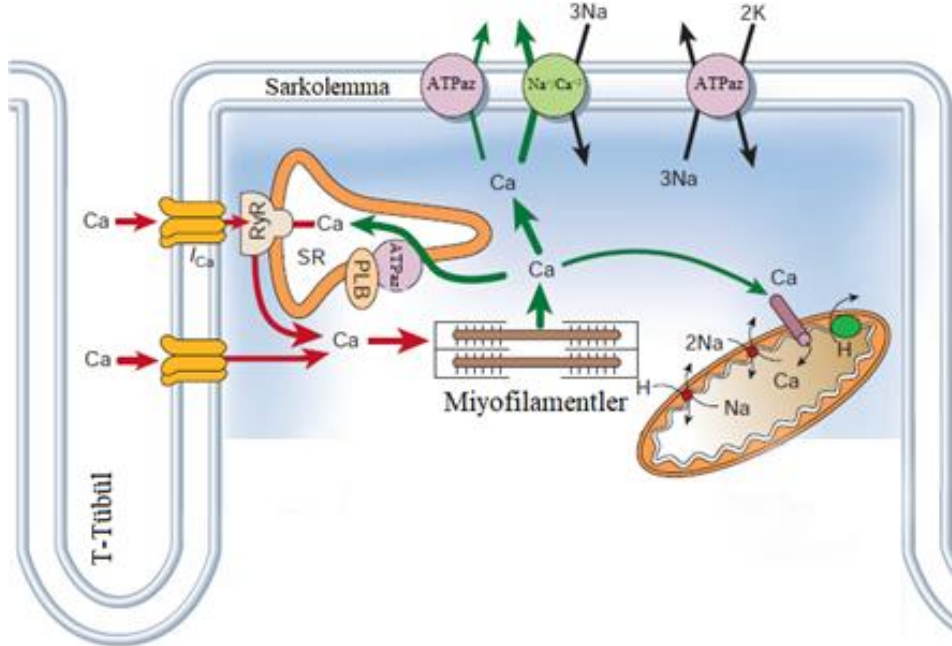
Kalp kasında uyarılma-kasılma çiftlenimi, kalbin kasılması için miyositlerin elektriksel uyarılması ile başlayan olaylar silsilesi ile gerçekleşir. Kalsiyum iyonları (Ca^{+2}) kardiyak elektriksel aktiviteler ve kasılmaya sebep olan miyofilamentlerin doğrudan aktivatörü olarak oldukça öneme sahiptir. Hatta Ca^{+2} 'nın doğru kontrol edilemediği durumlarda kasılma fonksiyonlarında bir takım kayıplar görülmektedir. Şekil 2.6'da görüldüğü gibi kardiyak aksiyon potansiyeli (AP)'nde depolarizasyonun başlaması ile birlikte içeri doğru kalsiyum akımı (I_{Ca}) da başlar. I_{Ca} için miyositlerde L-tipi ve T-tipi olmak üzere iki tip voltaj-bağımlı iyon kanalı bulunmaktadır. T-tipindeki kalsiyum iyon kanallarından sağlanan I_{Ca} ihmal edilebilir düzeyde olup, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ($[Ca^{+2}]_{iç}$)'nu değişikliğe uğratan I_{Ca} 'dan sorumlu iyon kanalı L-tipi olanlardır. Sitoplazmaya giren Ca^{+2} , Sarkoplazmik Retikulum (SR)'dan kalsiyum-bağımlı kalsiyum salınımını ryanodin reseptörlerini uyararak tetikler. Bu I_{Ca} ve SR'dan gerçekleşen salınım kombinasyonu $[Ca^{+2}]_{iç}$ 'nu artırır. Artan $[Ca^{+2}]_{iç}$, kasılma mekanizmasını devreye sokan miyofilament proteini troponin C'nin kalsiyum iyonları ile bağ kurması kolaylaştırır. Tüm bu süreçler ardından kasılma, kayan filamentler (aktin-miyozin) teorisi olarak adlandırılan tanımlamalar uyarınca gerçekleşir (Bers 2002).

Şekil 2.6. Kalp kası aksiyon potansiyeli, kasılma ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ilişkisi (Bers 2002).



Kasılma sonrası gevşeme süreci için ise, $[Ca^{2+}]_i$ düşüşe geçmelidir. Bu aşamada Ca^{2+} troponin C'den ayrılır. Ca^{2+} 'nın sitozolden taşınması SR Ca^{2+} -ATPaz, Sarkolemmal Na^+/Ca^{2+} değiş-tokuşçusu, Sarkolemmal Ca^{2+} -ATPaz, ve Mitokondriyal Ca^{2+} tekyönlü taşınımı olmak üzere toplam dört ayrı mekanizma tarafından sağlanır (Bers 2002). Kabaca anlatılan tüm bu kasılma-gevşeme süreçlerine dair $[Ca^{2+}]_i$ değişimi Şekil 2.7'de gösterilmektedir.

Şekil 2.7. Kasılma-gevşeme süreçlerinde hücre içi kalsiyum konsantrasyonu değişimine dair şematik gösterim. (Bers 2002).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyisel araştırma türündeki bu çalışma için sentetik olarak üretilmiş ve antioksidan özelliği olan bir kimyasal maddenin, deney hayvanları üzerinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon modelindeki olası koruyucu etkisi incelenmiştir. Bu uğurda hazırlık aşamasından, deneylerin sonlandırılmasına kadar gerçekleştirilen uygulamalara ait detaylar aşağıdaki gibidir.

3.1. Deney Grupları Hakkında Genel Bilgiler

Bilimsel araştırmalar kapsamında deney hayvanları kullanımına, mevzuat gereği bazı etik kurallara riayet edildiği takdirde izin verilmektedir. Bu tez projesi de, Selçuk Üniversitesi, Deneyisel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 27.09.2017 tarih ve 2017-36 sayılı "etik kurul yönergesi ilkelerine uygundur" kararı ile gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK-A).

Yapılan tüm deneylerde 14-16 haftalık erişkin Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanılmış olup fizyolojik varyasyonları minimize etmek adına yalnızca erkek sıçanlar tercih edilmiştir. Seçilen hayvanların başlangıç ağırlıkları 350-400 gram arasındadır ve toplam 28 gün süren enjeksiyon uygulamaları boyunca her 7 günün sonunda ağırlık değişimleri takip edilmiştir. Enjeksiyonlar süresince barınma koşullarında herhangi bir değişiklik yapılmamış, su ve yemlerinde de bir kısıtlamaya maruz bırakılmamışlardır.

Deney hayvanları farklı amaçlar doğrultusunda SHAM, iskemi-reperfüzyon (IR) ve Mito-TEMPO + iskemi-reperfüzyon (MT+IR) olmak üzere 3 gruba ayrılmış ve bu gruplardaki deneklerin bir kısmından kasılma kayıtları, diğer kısmından ise histolojik ve biyokimyasal incelemeler için örnekler alınmıştır. MT+IR gruplarına 28 gün boyunca 0,7 mg/kg/gün olacak şekilde Mito-TEMPO intraperitoneal enjeksiyonu yapılmıştır (Ni ve ark., 2016). SHAM ve IR gruplarına ise Mito-TEMPO ile aynı dozda olmak kaydesiyle hayvanların enjeksiyon stresini yaşamaları amaçlanarak 28 gün boyunca ultra saf su enjekte edilmiştir. Hayvanlar enjeksiyonun son günü deney

için hazır kabul edilmiş, günlük 3 adet hayvan ile çalışılabileceği öngörülerek farklı kafeslere ayrılmış ve enjeksiyonları birer gün ara ile başlatılmıştır. Yani kayıt veya örnek alınan her denek, deneyin yapıldığı gün 28. enjeksiyonu olacak şekilde ayarlanmıştır.

Deneylerde gerçekleştirilen cerrahi işlemler sırasında sıçanlar, 100-200 ml/dk O_2 + % 2-3 izofloran ile inhalasyon anestezisi altına alınmış, meydana gelecek hipotermi önlenmesi için vücut sıcaklıklarını sabit tutacak şekilde alttan ısıtmalı ameliyat masası kullanılmıştır (MAY RTC 9404-A Animal Rectal Temperature Controller). SHAM gruplarının abdominal bölgesi tüylerden arındırılarak açılmış, aortaya ulaşıldıktan sonra 1 saat beklenip ardından ilgili bölge kapatılarak 2 saat sonra kayıt ve örnekler alınmıştır. IR ve MT+IR gruplarında ise yine abdominal bölge tüylerden arındırılarak açıldıktan sonra aortaya vasküler bir klip yerleştirilerek 1 saat iskemi gerçekleştirilmiştir. Abdominal bölgede cerrahi işlemler sırasında oluşturulan kesiler bekleme periyodu öncesinde 4-0 ipek sütür ile dikilmiştir. Sonrasında ise tüm deney hayvanları normal yaşam koşullarına döndürülerek gözlem altında 2 saat süre ile reperfüze olması beklenmiştir.

3.2. Miyokardiyal Papiller Kas İzolasyonu

Bu çalışma kapsamında izometrik kasılma kayıtları ve histolojik incelemeler amacıyla sıçan kalbi sol ventrikülden papiller kaslar alınmıştır. Hayvanlar anestezisi altında iken sternotomi ile göğüs kafesleri açılarak kalplere ulaşılmış ve kalpler hızla çıkartılarak içerisinde pH 7.40 olarak ayarlanmış, %95 O_2 + %5 CO_2 karışımı ile gazlanan, taze Krebs solüsyonu (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 mM $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 15 mM $NaHCO_3$, 11 mM Glukoz) bulunan ve zemin kısmı slygard jel ile kaplı bir petri kabı içerisine alınmıştır. Bu solüsyon içerisinde kalpler dorsal bölgeden görülebilecek pozisyonda küçük çelik bir pin vasıtasıyla sağ ventrikülden sabitlenmiştir. Kalplere mekanik her türlü baskıdan kaçınarak mikrocerrahi bir makas ile her iki atriyum da kalplerden ayrılmıştır. Ventrikül duvarında atrioventriküler valf seviyesinden apex'e doğru bir kesi oluşturulmuş ve bu kısımdan ventrikül açılarak papiller kaslar görünür hale

getirilmiştir. Mümkmn olduğunca ilgili kaslara dokunmadan ventrikül dokusu ile olan bağı kesilip çevre dokulardan arındırılarak miyokardiyal papiller kaslar izole edilmiştir.

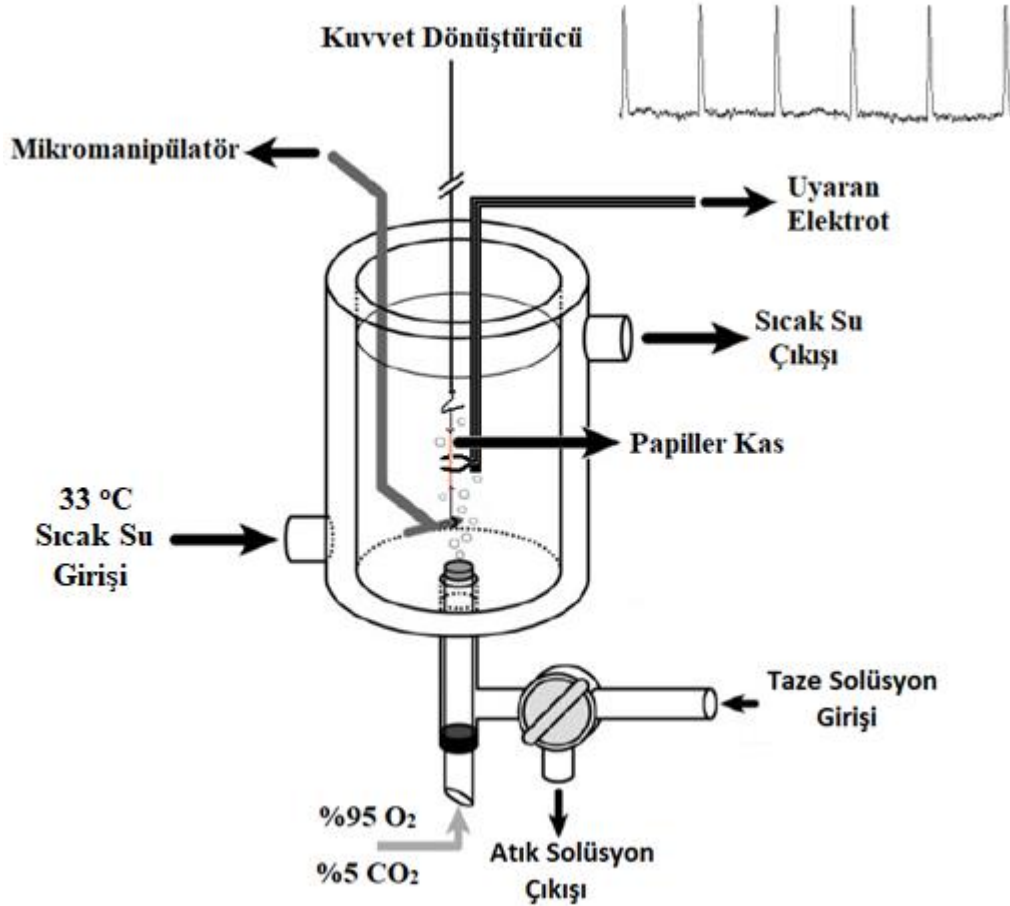
3.3. İzometrik Kasılma Kaydı

Temel olarak herhangi bir kas demeti kasıldığı zaman boyu kısalır, ardından gevşeme sürecinde tekrar eski haline döner. Bu aktivitenin değerlendirilmesinde farklı iki kıstas vardır, birincisi kasın kasılma esnasındaki boyunun değişimi, bir diğeri ise kasılma sebebi ile kasın uyguladığı çekme kuvvetidir. Laboratuvar ortamında yapılan araştırmalar genellikle bu parametrelerden bir tanesi sabit tutularak bir diğerrinin ölçümü veya gözlemi şeklinde gerçekleştirilir. Kasın uyguladığı kuvvet sabit tutularak boyundaki değişimin ölçülmesi izotonik kasılma kaydı, boy değişimi sabit tutularak uyguladığı kuvvetin ölçülmesi ise izometrik kasılma kaydı olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışma kapsamında miyokardiyal papiller kastan alınan kasılma kayıtları boy değişimine müsaade edilmeden uyguladığı kuvvetin ölçülmesi (izometrik kasılma kaydı) şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi, izole edilen papiller kaslar her iki ucundan da, diğerr taraflarında metal kancalar bulunan 6-0 ipek iplikle bağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan dokular içerisinde taze Krebs solüsyonu bulunan, 30 mL hacimli, ısı ceketli izole organ banyosuna (MAY IOBS 99 Isolated Tissue Bath and Circulator, Commat Ltd.) alınmıştır. Krebs solüsyonunun sıcaklığı, organ banyosunun etrafında bulunan ısı ceketinden sıcak su devri (MAY WBC 3044 Water Bath and Circulator, Commat Ltd.) ile 33 °C'de sabit tutulmuştur (Yarmohmmadi ve ark., 2017). Papiller kasların bağlı bulunduğu iplerdeki metal kancaların bir tanesi manuel olarak kontrol edilen bir mikromanipülatöre, diğeri ise kuvvet çevirecine (FT03 Force Displacement Transducer, Grass Co.) takılmış, kasın gerimi maksimum kasılmayı görecekt şekilde ayarlanmıştır. Supramaksimal kare biçimli uyarılar, papiller kasın anot-katot uçları arasında kalacağı şekilde tasarlanmış olduğumuz elektrot vasıtasıyla alan uyarısı şeklinde bir stimülatör (S48 Stimulator, Grass Co.) kullanılarak verilmiştir. Kasılmaya ait tüm veriler bir analog-dijital dönüştürücü (MP45 Two

channel data acquisition unit, Biopac System Inc.) aracılığı ve kendisine ait yazılım (BSL PRO 3.7.5, Biopac System Inc.) ile 1 kHz örnekleme hızında sabit diskte toplanmıştır.

Şekil 3.1. İzole organ banyosu ve ilintili diğer mekanizmaların şematik gösterimi. Figürün bir kısmında Jespersen ve ark. (2015)'nin çalışmasından yararlanılmıştır.



Kasılma kayıtlarının tamamlanmasının ardından papiller kaslar izole organ banyosundan çıkartılıp, uçlarına bağlı ipler çözülmüş ve 0,1 mg hassasiyetli bir terazi (SBA 31, Scaltec) ile ağırlıkları tartılmıştır.

3.3.1. İzometrik Kasılma Kayıt Protokolleri

Papiller kasın organ banyosuna asılmasının ardından kasta yorgunluk oluşturmayan 0,2 Hz temel frekansta 10-15 V, 2 ms süreli kare biçimli uyaranlar verilmiş ve bu aşamada Krebs solüsyonu her 15 dakikada bir değiştirilerek toplam 1 saat süre ile dokunun fizyolojik kondisyonlarına gelmesi beklenmiştir. Bu esnada

kasılmalar eşzamanlı olarak izlenmiş ve kasılma genliklerinin 1 saatlik süre sonunda kararlı hale geldiği gözlenmiştir.

Bekleme periyodunun ardından frekans-bağımlı kasılma yanıtını görmek için sırasıyla 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 Hz frekanslarda 10-15 V, 2 ms süreli kare biçimli uyaranlar verilmiş ve her bir frekans için 20 pik sayıldıktan sonra bir üst frekansa geçilerek kasılma eğrileri kaydedilmiştir (Uhl ve ark., 2015). İlgili kayıt tamamlandıktan sonra solüsyon tazelenerek 15 dakika temel uyaran frekansında beklemeye alınmıştır.

Bir diğer protokolde ise ön bekleme uyaranlara olan yanıtlar kaydedilmiştir. İzole edilen sıçan miyokardiyal papiller kas hücrelerinde SR'dan Ca^{+2} alım-salım mekanizmalarını araştırmak amacıyla 0,2 Hz frekanstaki 10-15 V, 2 ms süreli kare biçimli uyaranlar ile alınan her 100 saniyelik kayıtlar arasında 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100'er saniye beklenmiştir. Bu protokol kapsamında araştırılan parametrelerin hesaplanması, ilgili bekleme süresi sonrası kaydedilen ilk kasılma eğrilerinden yapılmıştır (Braveny ve Kruta 1958).

Bütün protokoller, her üç deney grubuna (SHAM, IR, MT+IR) da ayrı ayrı uygulanarak elde edilen veriler karşılaştırılmıştır.

3.3.2. İzometrik Kasılma Kayıtlarının Analizi

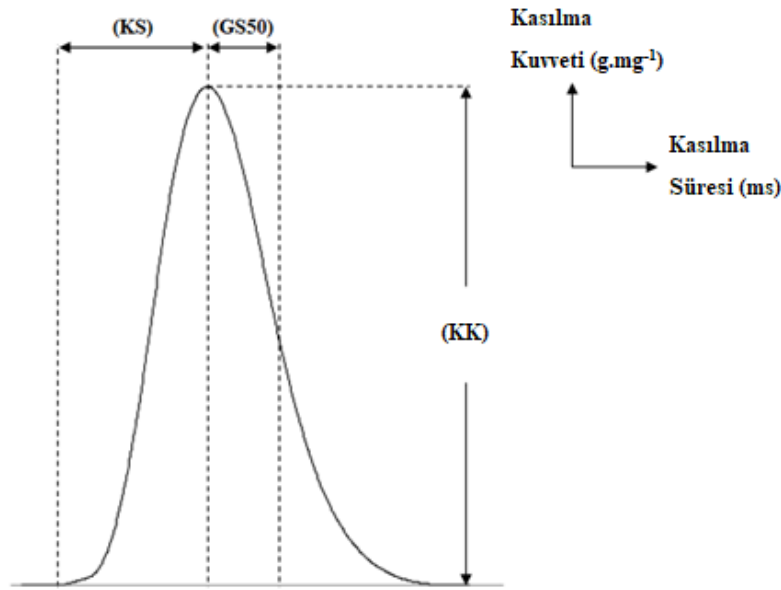
Elde edilen tüm kasılma kayıtlarından Şekil 3.2.'de görülen kasılma süresi (KS), yarı gevşeme süresi (GS50) ve kasılma kuvveti (KK) parametreleri ölçülmüştür. Bulgularda verilen tüm KS ve GS50 parametreleri milisaniye, normalize edilmiş KK verileri ise $g.mg^{-1}$ (gram cinsinden kaydedilen kasılma eğrilerinin ulaştığı maksimum genliğin, kasın miligram cinsinden ağırlığına oranı) birimindedir.

Kasılma ve gevşeme süreçlerindeki etkin kuvvetlerin zamana göre birinci türevlerinin maksimum değerleri ($+dF/dt_{max}$ ve $-dF/dt_{max}$) mg cinsinden ölçülen kas ağırlığına oranlanarak $g.mg^{-1}.s^{-1}$ biriminde verilmiştir. $+dF/dt_{max}$ ve $-dF/dt_{max}$ kasılma

ve gevşeme sırasında uygulanan kuvvetteki değişimin maksimum olduğu anı göstermektedir.

İlgili veriler (KS, GS50, KK, $+dF/dt_{max}$, $-dF/dt_{max}$) her papiller kas için frekans-bağımlı kasılma protokolünde ayrı ayrı frekanslarda kaydedilen verilerden 10 tanesinin ortalaması, ön bekleme uyaran protokolünde ise her bekleme süresi sonunda kaydedilen ilk kasılma eğrilerinin ortalamaları şeklinde oluşturulmuştur.

Şekil 3.2. Kasılma kayıtlarından elde edilen parametreler.



Örnek bir kasılma eğrisi üzerinde kasılma süresi (KS, ms), yarı gevşeme süresi (GS50, ms) ve kasılma kuvveti (KK, g.mg⁻¹) parametrelerinin ölçüm metodu şematik olarak gösterilmiştir.

3.4. Biyokimyasal Parametrelerin İncelenmesi

Tüm deney gruplarından (SHAM, IR ve MT+IR) kan örnekleri alınmış ve santrifüj cihazı ile 10 dakika boyunca 40000 devir/dk'da kan serumları ayrılarak -20 °C'de depolanmıştır. Tüm örnekler hazır olduktan sonra kan serumlarının toplam antioksidan seviyesi (TAS) ve toplam oksidan seviyesi (TOS) değerleri, fotometrik yöntem kullanılarak uygun kitler aracılığı (Total Antioxidant Status Assay Kit, Total Oxidant Status Assay Kit) ile belirlenmiştir. TAS değerleri 660 nm, TOS değerleri ise 530 nm dalga boyundaki absorpsiyon oranı kullanılarak belirlenmiştir. Kalibrasyon amacıyla TAS ölçümünde ticari adı Trolox Equivalent, TOS ölçümünde ise hidrojen peroksit solüsyonu kullanılmıştır.

3.5. Histolojik Parametrelerin İncelenmesi

Çıkarılan miyokardiyal papiller kas örnekleri %10'luk formaldehit ile fikse edildikten sonra alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilen dokular ksilol ve ardından sıvı parafinlerden de geçirilerek parafin bloklar oluşturulmuştur. Bu bloklardan mikrotomla 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alınarak hematoksilin eozin ile boyanmıştır. Hazırlanan preperatlar Nikon H550S marka mikroskopta histopatolojik olarak değerlendirilip, X20'lik büyütmede fotoğrafları çekilmiştir. Sonuç olarak, hücrelerin boyanma özellikleri, sitoplazma ve çekirdeklerindeki değişiklikler ve miyofibrillerin durumu değerlendirilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analiz

Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası formunda verilmiş olup, verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnow ile test edilmiştir. Bu test sonucu $p>0,05$ düzeyindeki verilerin normal dağılıma uyduğu, $p<0,05$ düzeyindeki verilerin ise normal dağılıma uymadığı kabul edilmiştir.

Deney hayvanlarının ağırlıklarına ilişkin verilerde iki grubun karşılaştırılması için bağımsız t-test (Unpaired Student's t-test), grupların kendi içerisindeki değişimlerin karşılaştırılmasında ise bağımlı t-test (Paired Student's t-test) kullanılmış ve $p<0,05$ düzeyindeki değişimler anlamlı kabul edilmiştir.

Kasılma ve biyokimya verilerine ilişkin grupların tek bir yönden kendi aralarında karşılaştırılması için One-way ANOVA, ardından farkın hangi gruplar arasında olduğunu tespiti için ise Tukey post test kullanılmış ve $p<0,05$ düzeyindeki veriler anlamlı olarak nitelendirilmiştir.

İstatistiksel testler, GraphPad Prism-5 Demo programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

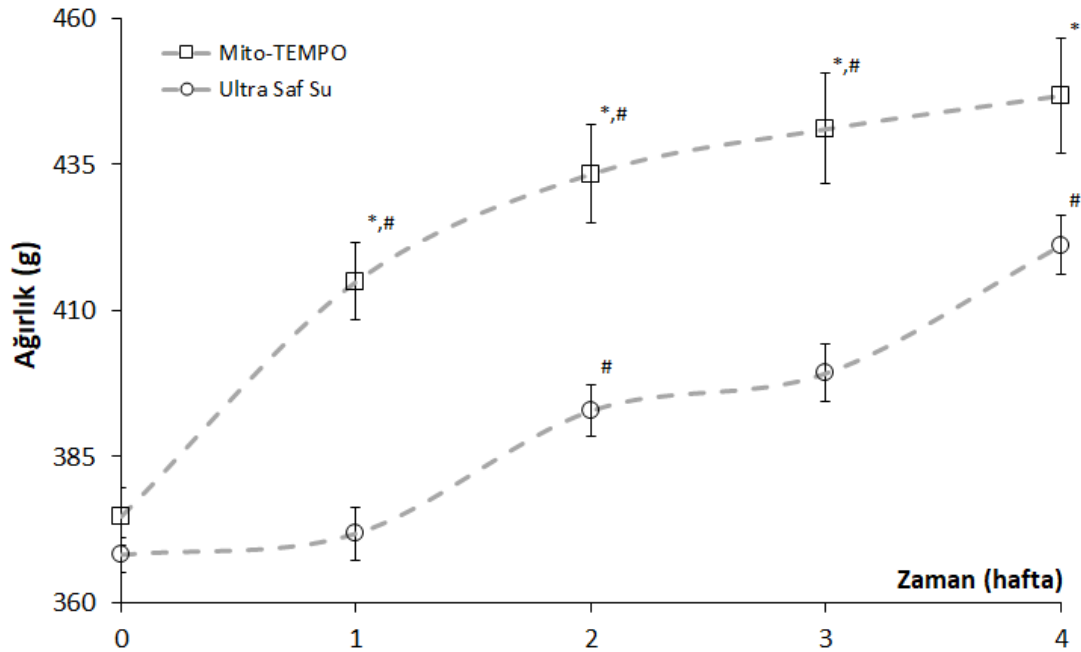
4. BULGULAR

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen tüm veriler (fizyolojik, elektrofizyolojik, histolojik, biyokimyasal) bu bölümde sunulmuştur.

4.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlıkları

Deney prosedürü gereği 28 gün boyunca yapılan Mito-TEMPO ve ultra saf su enjeksiyonunun deney hayvanlarının ağırlık değişimlerine etkisi bir haftalık periyotlar ile takip edilmiş, bu kapsamda başlangıç, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü hafta sonları itibariyle ağırlıkları ölçülmüştür. Elde edilen değerler Şekil 4.1’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Şekil 4.1. Mito-TEMPO ve ultra saf su enjekte edilen gruplardaki deney hayvanlarının ağırlık değişimleri.



Mito-TEMPO (n=10) ve ultra saf su (n=20) enjeksiyonu sonucu deney hayvanlarının bir haftalık periyotlar ile ağırlıklarındaki değişimler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. *, ultra saf su enjeksiyonu yapılan ile, # ise her uygulama grubu içerisindeki bir önceki ölçüm ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ düzeyindeki anlamlılığı göstermektedir.

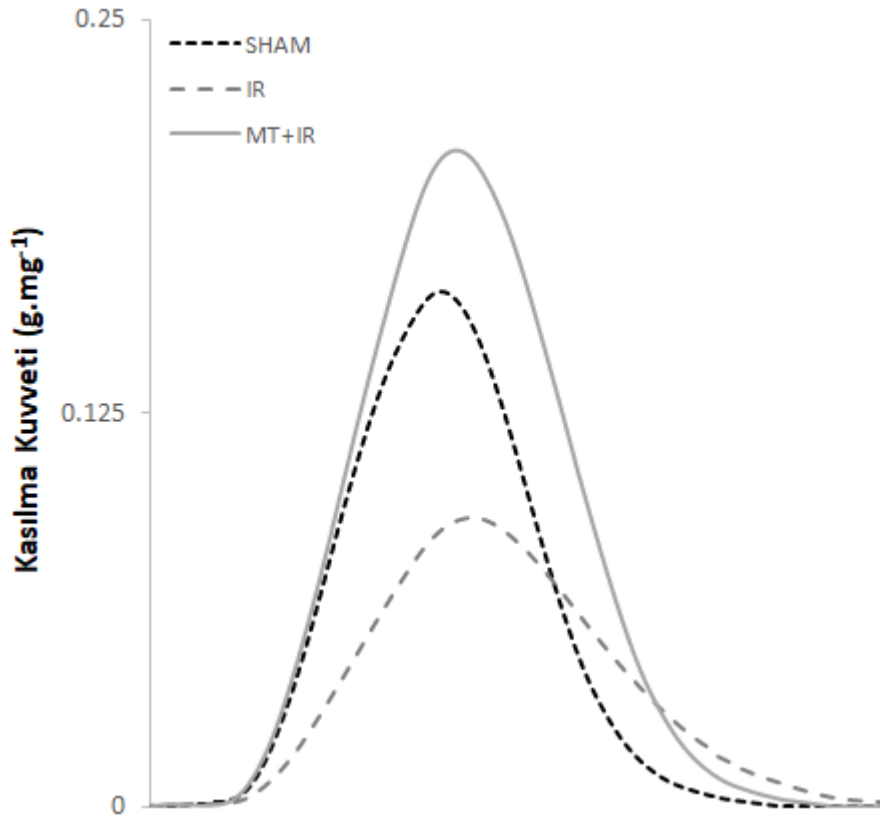
Başlangıç değerleri sonrasında alınan her ölçümde Mito-TEMPO enjekte edilen gruptaki deney hayvanlarının ağırlıkları ile ultra saf su enjekte edilen grup arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmektedir. Bunun yanında Mito-TEMPO

enjeksiyonunun üçüncü haftadan sonra anlamlı ağırlık artışı sağlamadığı anlaşılmaktadır (Şekil 4.1).

4.2. Kasılma Kayıtlarına İlişkin Veriler

Miyokardiyal papiller kasta yorgunluk oluşturmadığı kabul edilen 0,2 Hz frekanstaki uyarılarla SHAM, IR ve MT+IR deney gruplarından alınan kasılma kayıtlarına ait birer örnek eğri Şekil 4.2’de verilmiştir.

Şekil 4.2. 0,2 Hz frekanstaki uyarılar ile elde edilen kasılma eğrileri.



Her üç deney grubuna ait kasılma eğrilerinin nümerik analizlerinden elde edilen KK, KS, GS50, +dF/dt ve -dF/dt parametreleri, ortalama $\pm$ standart hata ve istatistiksel anlamlılıkları ile birlikte Tablo 4.1’de verilmiştir. İskemi-reperfüzyon tüm kasılma parametrelerinde anlamlı değişikliklere neden olurken, Mito-TEMPO uygulanan grupta ise GS50 haricindeki diğer parametreler SHAM seviyelerinde ölçülmüştür (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. 0,2 Hz frekanstaki uyarılarla alınan kasılma kayıtlarına ilişkin veriler.

	SHAM	IR	MT+IR
Kasılma Kuvveti (g.mg^{-1})	$0,15 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$ *	$0,18 \pm 0,01$ #
Kasılma Süresi (ms)	$132,78 \pm 5,28$	$154,03 \pm 5,65$ *	$143,06 \pm 2,11$ #
Yarı Gevşeme Süresi (ms)	$96,23 \pm 8,48$	$124,72 \pm 3,74$ *	$122,17 \pm 5,05$
$+dF/dt_{\max}$ ($\text{g.mg}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	$2,15 \pm 0,07$	$1,36 \pm 0,06$ *	$2,59 \pm 0,13$ #
$-dF/dt_{\max}$ ($\text{g.mg}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	$-1,31 \pm 0,08$	$-0,91 \pm 0,05$ *	$-1,56 \pm 0,19$ #

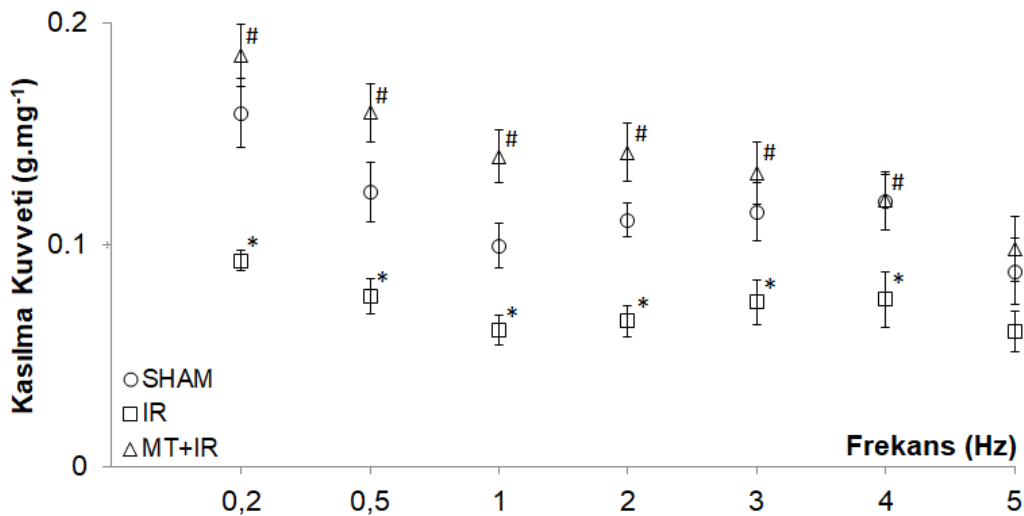
Tüm veriler (KK, KS, GS50, $+dF/dt$, $-dF/dt$) ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. *, SHAM (n=6) ve IR (n=6), # ise IR ve MT+IR (n=10) grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

4.2.1. Uyarı Frekansı – Kasılma İlişkisine Ait Veriler

İzole edilen sıçan miyokardiyal papiller kasların farklı uyarı frekanslarına ait yanıtlarının belirlenmesi amacı ile 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4 ve 5 Hz frekanslı uyarılar verilerek kasılma eğrileri kayıt edilmiştir. İlgili eğrilerden KK, KS, GS50, $+dF/dt_{\max}$ ve $-dF/dt_{\max}$ parametreleri elde edilmiştir.

İskemi-reperfüzyon, 0,2; 0,5; 1; 2; 3 ve 4 Hz frekanslı uyarılarla elde edilen kasılma kuvveti yanıtlarında anlamlı ölçüde azalmaya neden olmuş ve Mito-TEMPO enjeksiyonunun da bu azalmaya karşı koruyucu etkisi olduğu görülmektedir (Şekil 4.3).

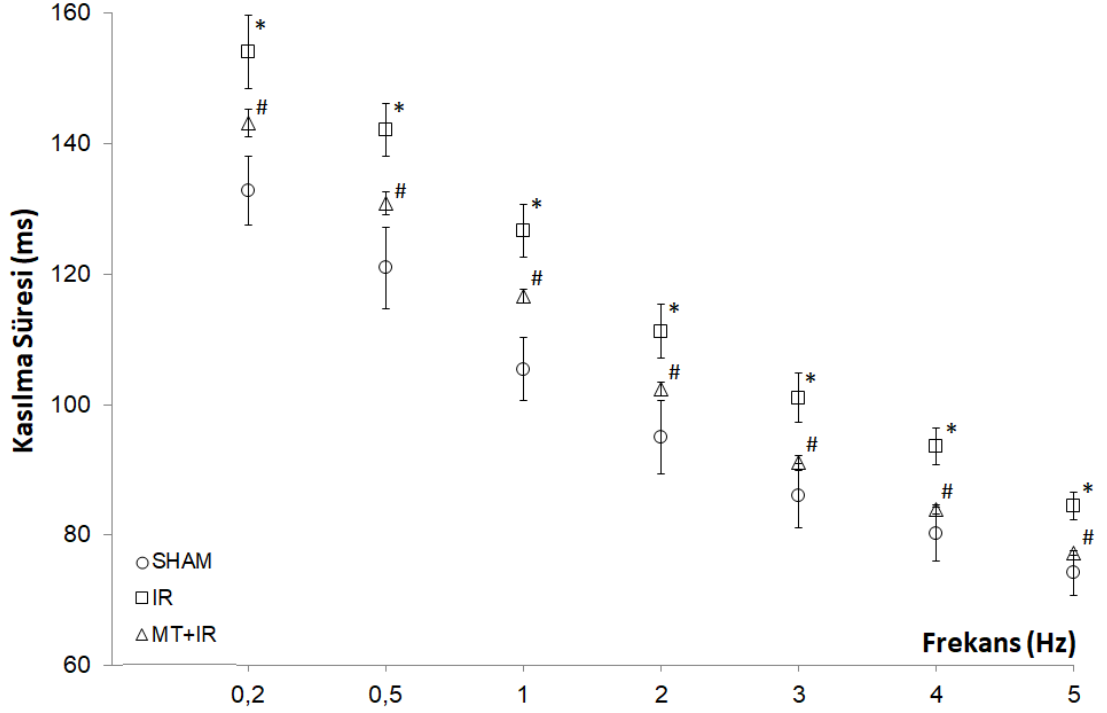
Şekil 4.3. Uyarı frekansı – kasılma ilişkisine ait KK değerleri.



KK'nin farklı frekanslardaki uyarılara olan yanıt değerleri ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. *, SHAM (n=6) ve IR (n=6), # ise IR ve MT+IR (n=10) grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

İskemi-reperfüzyon uygulamasının KS'yi anlamlı ölçüde uzattığı, Mito-TEMPO enjeksiyonunun ise kasılma süresindeki bu kısalmayı engellediği görülmektedir (Şekil 4.4).

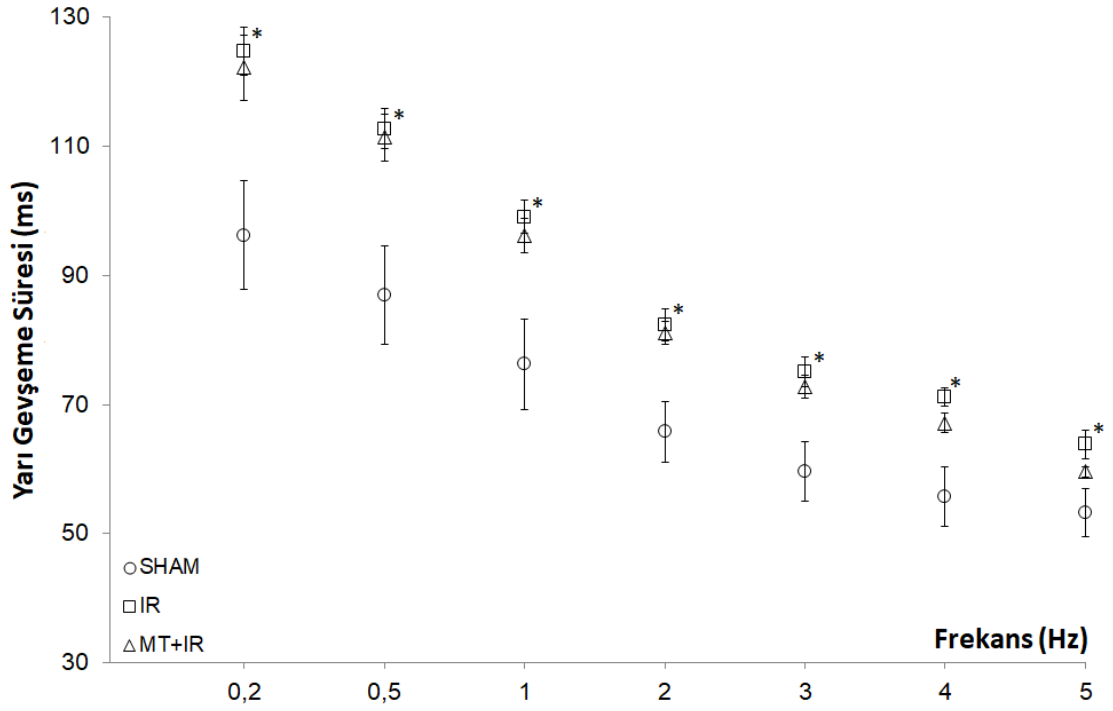
Şekil 4.4. Uyarın frekansı – kasılma ilişkisine ait KS değerleri.



KS'nin farklı frekanslardaki uyarılara olan yanıt değerleri ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. *, SHAM (n=6) ve IR (n=6), # ise IR ve MT+IR (n=10) grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

İskemi-reperfüzyon uygulaması, GS50 süresinde uzamaya neden olurken, Mito-TEMPO enjeksiyonunun yarı gevşeme süresinde önemli bir koruyucu etkisinin olmadığı görülmektedir (Şekil 4.5).

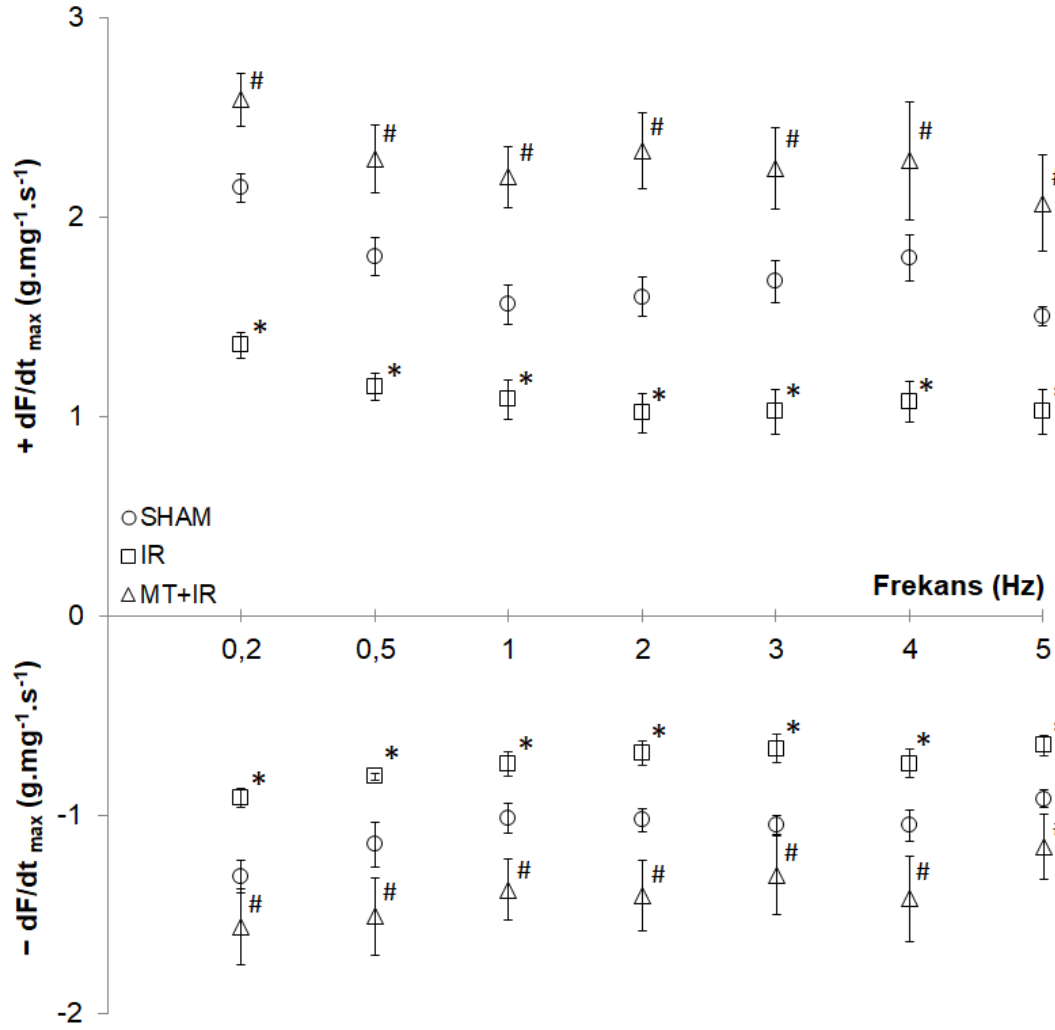
Şekil 4.5. Uyarın frekansı – kasılma ilişkisine ait GS50 değerleri.



GS50'nin farklı frekanslardaki uyarılara olan yanıt değerleri ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. *, SHAM (n=6) ve IR (n=6) grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir. IR ve MT+IR (n=10) grupları arasında ise anlamlı fark görülmemiştir.

İskemi-reperfüzyon uygulamasının $+dF/dt_{max}$ ve $-dF/dt_{max}$ değerlerinde anlamlı ölçüde azalmaya neden olduğu görülmüştür (dF/dt_{max} değerlerindeki tire (–) işaretleri yön bilgisi vermektedir). Mito-TEMPO enjeksiyonunun iskemi-reperfüzyonun neden olduğu değişimlere karşı koruyucu etki gösterdiği anlaşılmaktadır (Şekil 4.6).

Şekil 4.6. Uyarın frekansı – kasılma ilişkisine ait $+dF/dt_{\max}$ ve $-dF/dt_{\max}$ değerleri.

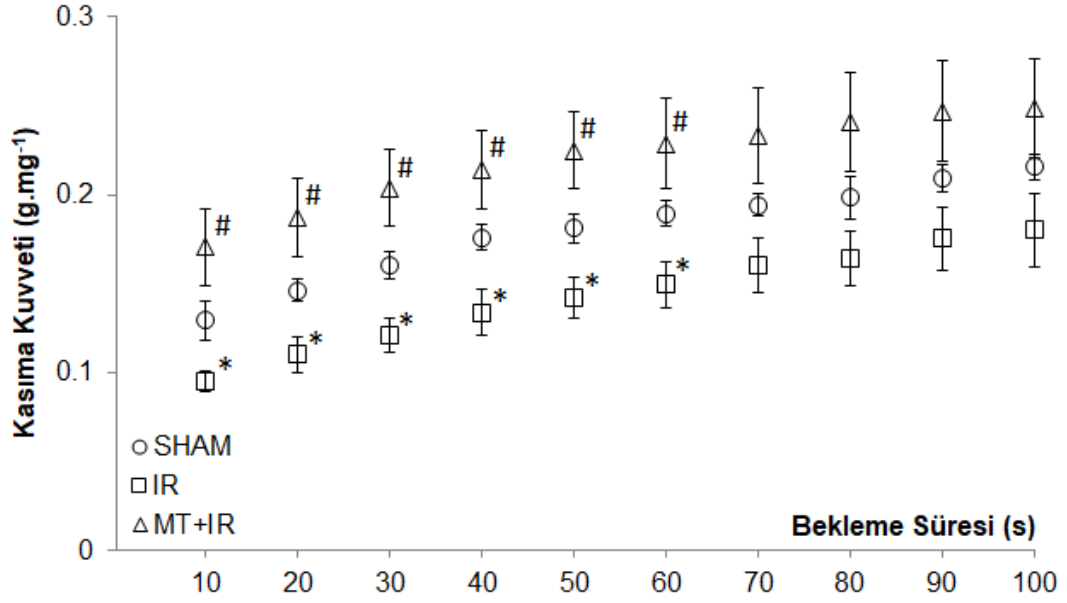


$+dF/dt_{\max}$ ve $-dF/dt_{\max}$ parametrelerinin farklı frekanslardaki uyarılara olan yanıt değerleri ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. *, SHAM (n=6) ve IR (n=6), # ise IR ve MT+IR (n=8) grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

4.2.2. Ön Beklemeli Uyarın – Kasılma İlişkisine Ait Veriler

İlgili protokol ile alınan kayıtlara ait KK değerleri her üç grup için Şekil 4.7.'de görülmektedir. Değerlerden görüldüğü gibi tüm gruplarda ön bekleme süresi ile KK arasında pozitif bir korelasyon olduğu anlaşılmaktadır. İskemi-reperfüzyon uygulaması ile 60 saniyelik bekleme süresince KK değerlerinde SHAM grubuna göre anlamlı fark oluşurken, sonraki bekleme sürelerinde ise anlamlı farkın oluşmadığı görülmektedir. Benzer seyir MT+IR grubunda da görülmektedir.

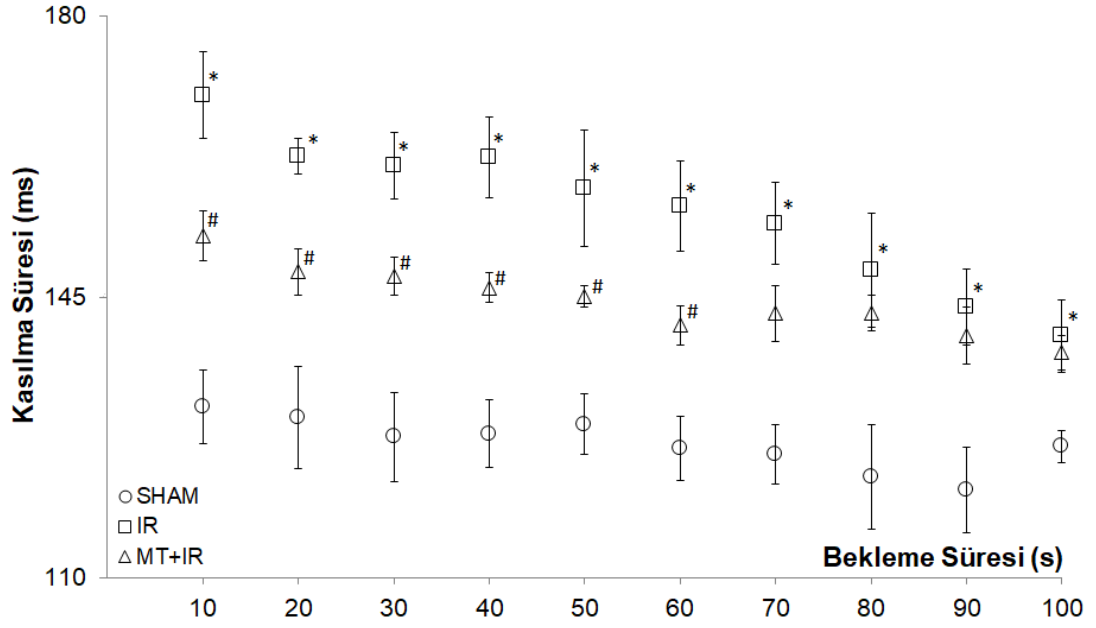
Şekil 4.7. Ön bekleme uyarı – kasılma ilişkisine ait KK değerleri.



KK parametresinin ön bekleme uyarılara olan yanıt değerleri ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. *, SHAM (n=6) ve IR (n=6), # ise IR ve MT+IR (n=8) grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

Ön bekleme uyarılar ile alınan kayıtlarda iskemi-reperfüzyon uygulaması tüm süreler için KS değerlerinde uzamaya neden olurken, Mito-TEMPO enjeksiyonunun olumlu etkisi yalnızca 60 saniyeye kadar olan ön bekleme sürelerinde görülmektedir (Şekil 4.8).

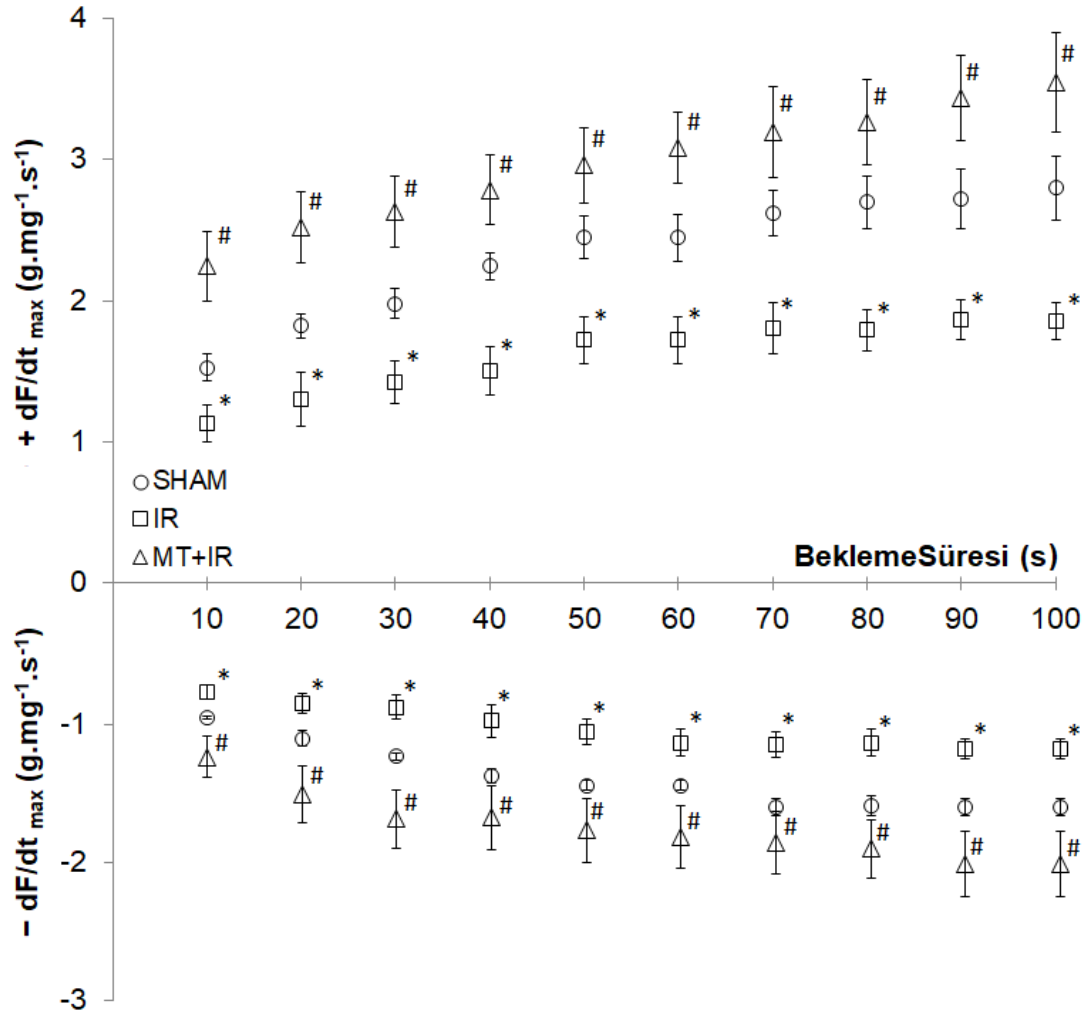
Şekil 4.8. Ön bekleme uyarı – kasılma ilişkisine ait KS değerleri.



KS parametresinin ön bekleme uyarılara olan yanıt değerleri ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. *, SHAM (n=6) ve IR (n=6), # ise IR ve MT+IR (n=8) grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

İskemi-reperfüzyon uygulamasının $+dF/dt_{max}$ ve $-dF/dt_{max}$ değerleri üzerindeki etkisi Şekil 4.9’da verilmiştir (dF/dt_{max} değerlerindeki tire (–) işaretleri yön bilgisi vermektedir). IR grubunda bu iki değer SHAM grubuna göre anlamlı azaldığı görülmektedir. Mito-TEMPO enjeksiyonunun iskemi-reperfüzyon uygulaması ile baskılanan bu değerlerin koruyucu etki göstererek SHAM grubu düzeyinde kalmasını sağladığı anlaşılmaktadır.

Şekil 4.9. Ön bekleme uyaran – kasılma ilişkisine ait $+dF/dt_{\max}$ ve $-dF/dt_{\max}$ değerleri.

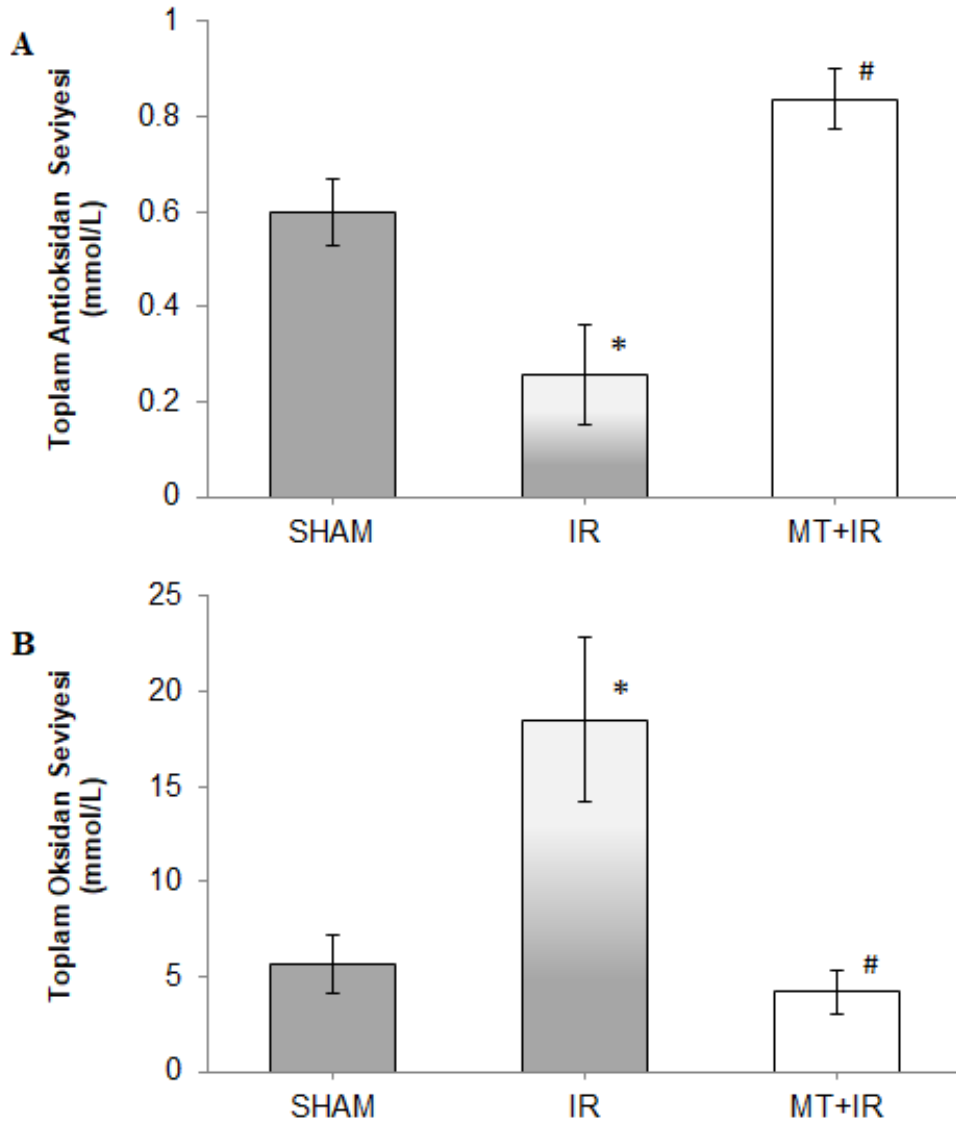


$+dF/dt_{\max}$ ve $-dF/dt_{\max}$ parametrelerinin farklı sürelerdeki ön bekleme uyaranlara olan yanıt değerleri ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. *, SHAM (n=6) ve IR (n=6), # ise IR ve MT+IR (n=8) grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

4.3. Biyokimyasal İncelemelere Ait Veriler

Deney grupları için tespit edilen toplam oksidan ve antioksidan seviyelerini gösteren bar grafikler karşılaştırmalı olarak Şekil 4.10'da verilmiştir. İskemi-reperfüzyon uygulaması kan serumlarındaki toplam oksidan seviyesinde anlamlı artışa neden olurken, MT+IR grubunda ise bu değer SHAM grubu değerlerine yakın ölçülmüştür. Toplam antioksidan seviyesi değeri ise, IR grubu için anlamlı azalırken, MT+IR grubunda SHAM değerine yakın bulunmuştur (Şekil 4.10).

Şekil 4.10. Tüm deney gruplarının kan serumlarına ait TAS – TOS değerleri.



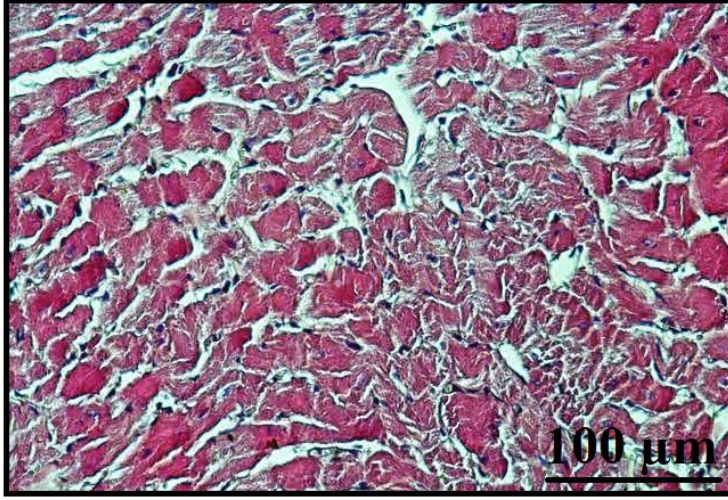
TAS, TOS parametrelerine ait değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. *, SHAM (n=6) ve IR (n=6), # ise IR ve MT+IR (n=6) grupları arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

4.4. Histolojik İncelemelere Ait Veriler

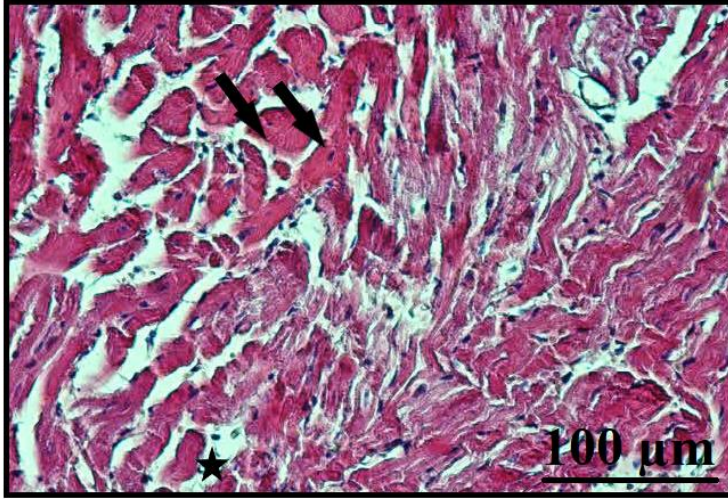
İzole edilen miyokadriyal papiller kasların, gereç ve yöntem kısmında belirtilen prosedürler sonrasında elde edilen preparatlara ait görüntüler Şekil 4.10'da verilmiştir. Bu görüntülerin analiz sonucuna göre; IR grubunda miyofibril kayıpları ve intrasitoplazmik vakuolizasyon görülürken, MT+IR grubunda miyofibriller normal görünümünde, IR ve SHAM grubuna göre oldukça düzenli ve intrasitoplazmik vakuolizasyon bulunmamaktadır. Ayrıca IR grubuna göre çekirdekler daha düzgün görünmektedir.

Şekil 4.11. Miyokardiyal papiller kas dokusuna ait histolojik görüntüler.

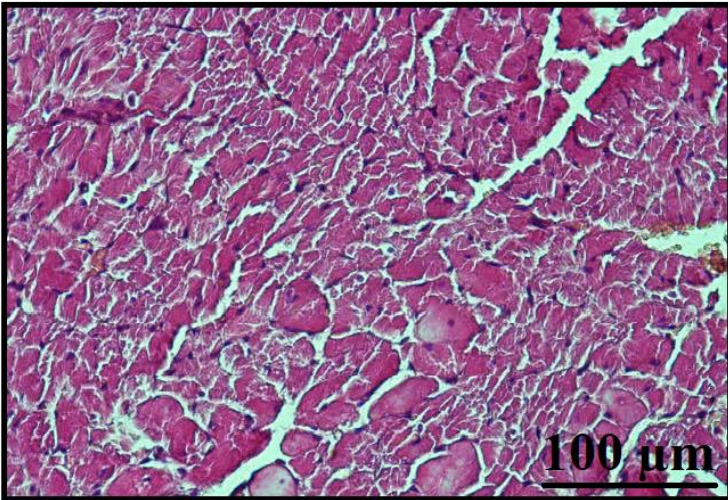
SHAM



IR



MT+IR



Miyokardiyal papiller kaslardan alınan kesitlerin hematoksilen eozin ile boyanması sonrası alınan histolojik görüntülerdir. Oklar eozinofilik boyanmış ve piknotik nükleuslu çekirdekler, yıldız ise intrasitoplazmik vakuolizasyonu göstermektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye İstatistik Kurumu 2017 yılı verileri ülkemizde gerçekleşen ölümlerin %39,7'sinin dolaşım sistemi bozuklukları, bunların da %39,7'sinin iskemik kalp kusurları sebebi ile gerçekleştiğini göstermektedir. Bu nedenle iskemik durumlar altında kalpte gerçekleşen fonksiyon bozukluklarına karşı koruyucu-önleyici ve tedavi edici uygulamaların geliştirilmesi daha da önem kazanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada kalpte önemli işlevleri olan miyokardiyal papiller kas üzerine odaklanılmış ve mekaniksel davranışlarıyla ilgili deneyler, ölçümler ve analizler gerçekleştirilmiştir. Genel olarak abdominal iskemi-reperfüzyon uygulaması deney hayvanlarında oksidan/antioksidan madde miktarlarını değiştirmekte ve buna bağlı olarak miyokardiyal papiller kasta KK, KS, GS50, $+dF/dt_{max}$ ve $-dF/dt_{max}$ gibi parametreler bundan etkilenmektedir. Koruyucu Mito-TEMPO enjeksiyonu ile bu durumların kısmen veya tamamen tolere edilebildiği görülmüştür.

Abdominal iskemi-reperfüzyon ile kalp fonksiyonları arasındaki ilişkiye dair literatürde pek çok çalışma vardır. Bown ve ark. (2001) iskemi-reperfüzyon sebebiyle kalp kası kasılma kuvvetinde azalma, Shahani ve ark. (2000) sol ventrikül maksimal basınç değerinde azalma, Kilic ve ark. (2018)'da kalp kusuru geliştiğini göstermişlerdir. Bunun yanı sıra abdominal iskemi-reperfüzyon ile spesifik olarak miyokardiyal papiller kas arasındaki ilişkiye dair literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Mitokondri; iskemi-reperfüzyon, hemoraji, entoksikasyonlar, radyoaktivite vb. durumlar sonucunda oksidan madde miktarındaki artışın meydana geldiği yer olmasıyla özellikle oksidatif fosforilasyonun merkezi ve hatta hücreleri ölüme götüren birçok sürecin de tetikleyicisi olarak görülmektedir (Valko ve ark., 2006; Smith ve Murphy 2011). Dolayısıyla oksidan maddelerin olumsuz etkilerinden kaçınmak amacıyla, bu maddelerin oluşumunun en çok meydana geldiği yer olan mitokondride yok edilmesi en etkili seçenek olarak görülmektedir. Literatürde özellikle son yıllarda doğrudan mitokondriyi hedef alan antioksidanlar ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır (Teixeira ve ark., 2018; Masi ve Virdis 2018; Rossman

ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında mitokondriyi hedef alan ve ticari adı Mito-TEMPO olarak bilinen bir antioksidanın koruyucu etkisi araştırılmıştır.

İntraperitoneal olarak 28 gün süreyle uygulanan Mito-TEMPO ve ultra saf su enjeksiyonları boyunca deney hayvanlarının başlangıç ve sonrasında yedişer günlük periyotlarla vücut ağırlıklarındaki değişimi belirlemek amacıyla tartımlar yapılarak kayıt altına alınmıştır. Liu ve ark. (2018)'nın kronik böbrek yetmezliği üzerine oluşturduğu hayvan modelinde kontrole kıyasla kilo kaybı oluşan hasta grubuna Mito-TEMPO tedavisi uygulanmış ve kilo kaybı anlamlı ölçüde geri dönmüştür. Yüksek yağlı diyet ile oluşturulan başka bir çalışmada ise ilgili diyetin sebep olduğu kilo artışının tedavi edici Mito-TEMPO enjeksiyonu ile kontrol seviyesine yaklaştığı tespit edilmiştir (Jeong ve ark., 2016). Özetle geçmişte yapılan çalışmalar göstermektedir ki, Mito-TEMPO uygulaması deney hayvanlarının ağırlıklarında değişimlere sebep olmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada da vücut ağırlığı ortalamalarındaki değişim literatürle uyumluluk göstermektedir (Şekil 4.1).

İzole kastan elde edilen kasılma kayıtları, çalışılan kası oluşturan kasılabilir hücrelerin toplam mekanik aktivitesinin bir sonucu olduğundan bu hücrelerin miktarının ilgili ölçümler üzerine doğrudan etkisi vardır. Bu durum KK , $+dF/dt_{max}$ ve $-dF/dt_{max}$ parametreleri için farklı metodlar ile bir normalizasyon işlemi yapılmasını zorunlu hale getirmektedir. Bu tezde verilen ilgili parametreler, literatürden örneklerine benzer şekilde kasın ağırlığına oranlanarak normalize edilmiştir (Avila ve ark., 2016; Belchior ve ark., 2016).

Kandaki oksijen dağıtımının azalması ya da kasın oksijen tüketiminin daha fazla olmasının kaslarda yorgunluk oluşturacağı ve kasılma aktivitelerinin bundan etkileneceği bilinmektedir (Vecchia ve Bussotti 2018). Benzer şekilde yüksek frekanslı uyaranlar ile kasın uyarılması kasta yorgunluk meydana getirmektedir. Bazal parametreleri değerlendirmek amacıyla yorgunluk oluşturmadığı bilinen 0,2 Hz frekanslı uyaranlar ile kas uyarılarak kasılma yanıtları (sarsı) kaydedilmiştir. Bu kasılmalarından hesaplanan parametrelerin ortalamaları, Mito-TEMPO ile yapılan birçok çalışmaya benzer şekilde iskemi-reperfüzyon uygulamasıyla bozulan kas fonksiyonlarına karşı koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermektedir (Tablo 4.1).

Farklı frekanslı uyaranlarla izometrik kasılma kayıtlarından kas liflerine ait hücrelerin mekanizmaları ile ilgili bazı temel bilgiler elde edilebilmektedir. Kalp kasında, kasılma-uyaran frekansı arasındaki ilişkiden ilk olarak 1871 yılında Amerika'lı fizyolog Henry P. Bowditch bahsetmiş ve uyaran frekansının artması ile kalp kası kasılma kuvvetinin arttığını belirtmiştir. Bu prensip Bowditch / treppe / staircase etkisi, Türkçe haliyle ise “merdiven etkisi” olarak adlandırılmaktadır. Merdiven etkisine, sistolik Ca^{+2} konsantrasyonunun uyaran frekansı ile doğru orantılı olarak artışının neden olduğu düşünülmektedir (Janssen 2010). Yapılan benzer çalışmalarda, kasılma kuvveti-uyaran frekansı arasındaki basamaklı pozitif korelasyonun (merdiven etkisinin), uyaran frekansının 1 Hz'den daha büyük olduğu frekans artışlarında görüldüğü belirtilmektedir (Uhl ve ark., 2015). Bizim bulgularımızda da bu bilgiler ile uyumlu şekilde merdiven etkisi her üç deney grubunda da görülmüştür (1-4 Hz arası). Ayrıca iskemi-reperfüzyon uygulaması ile kasılma kuvveti anlamlı ölçüde azalmıştır (Şekil 4.3). Kasılma kuvvetinin IR grubundaki bu azalışı iki olasılıkla ayrı ayrı ya da birlikte ilişkilendirilebilir. Bunlardan ilki, $[Ca^{+2}]_{iç}$ artışına sebep olan SR'dan kalsiyum-bağımlı kalsiyum salınım mekanizmasının bozulmuş olması, diğeri ise miyofilamentlerin Ca^{+2} yanıtının etkilenmiş olmasıdır.

Henry P. Bowditch kasılma-uyaran frekansı ilişkisi ile ilgili çalışmasında özellikle kasılma kuvvetine odaklanmış olsa da, kasılma ve gevşeme sürelerinde meydana gelen değişimler bazı patolojik durumların merkezinde olması açısından önemli olabilmektedir (Janssen 2010). Literatürdeki frekans bağımlı kasılma protokollerini içeren araştırma çalışmalarında kasılma sürelerine ilişkin ölçümlere genelde yer verilmemiş olsa da, bizim bulgularımızda uyaran frekansı ile kasılma süreleri arasında negatif korelasyon olduğu görülmüştür (Şekil 4.4). İskemi-reperfüzyon uygulanan grupta kasılma sürelerinin daha uzun olması SR'ın Ca^{+2} salım mekanizmasında yavaşlama olabileceğini düşündürmektedir.

Uyarım frekansı artırılarak oluşturulan kasılma yanıtlarının gevşeme fazında ise miyofilamentlerin Ca^{+2} duyarlılığının troponin-I (inhibe edici) tarafından azaltılmış olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle uyaran frekanslarındaki artışın GS50 değerlerinin azalmasına yol açtığı belirtilmektedir (Varian ve Janssen 2007).

Yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen veriler bu bilgiler ile uyumluluk göstermektedir (Şekil 4.5). Mito-TEMPO enjeksiyonunun GS50 değerleri üzerine herhangi bir etkisi olmazken, iskemi-reperfüzyon neticesinde uzayan KS üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Kasılma-gevşeme süreçlerinde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar ile kas hücrelerindeki kimyasal enerji mekanik enerjiye dönüştürülür ve kasa etkileyen kuvvet ile hareketlilik gerçekleşir. Bu kuvvet kasılma-gevşeme aktiviteleri boyunca farklı anlarda farklı değerler alır ve bu değişimlerin maksimumunun hesaplanması ile kasın mekanik aktiviteleri hakkında bilgi edinmek mümkündür (Avila ve ark., 2016). Yaptığımız çalışmada kaydedilen kasılma eğrileri için kuvvetteki değişimlerin maksimum değerleri Şekil 4.6'da verilmiştir. İlgili verilerden hem kasılma hem de gevşeme süreçleri boyunca kayıt alınan tüm frekanslar için iskemi-reperfüzyon uygulaması ile kuvvet değişim hızları yavaşlamış, Mito-TEMPO enjeksiyonu ise bu yavaşlamanın SHAM grubu seviyesinde kalmasını sağlayacak şekilde koruyucu etki göstermiştir. IR grubu kasılma-gevşeme esnasındaki etkin kuvvetin maksimum değişimindeki bu azalma aynı grup için kasılma kuvvetinin azlığı (Şekil 4.3), kasılma ve gevşeme sürelerinin uzunluğu (Şekil 4.4, Şekil 4.5) verilerimizle de uyum göstermektedir.

Kasılma süresince SR'dan salınan Ca^{+2} , gevşeme sürecinde ise bir sonraki kasılmada tekrar salınmak üzere SR'a geri toplanır. İki kasılma arasındaki bekleme süresinin uzunluğu ile bir sonraki kasılma evresinde salınmak üzere SR'da depolanan Ca^{+2} miktarı doğru orantılıdır. Bu bilgiler ışığında ön bekleme uyaranları ile çalışmalar ilk olarak 1958 yılında Braveny ve Kruta tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise uyaranlar arası dinlenme durumundaki sürenin uzaması ile kasılma kuvvetinin artacağı belirtilmektedir (Wohlfart 1979; Ravens ve ark., 1995). Deney hayvanı olarak sıçan kullanılan çalışmalarda kardiyak hücrelerin gevşeme sürecinde sitozolik Ca^{+2} geri toplama mekanizmaları içerisinde SR'ın etkinliğinin %92 olarak belirlenmiş olması da, SR'ın kasılma-gevşeme süreçlerindeki önemine ayrıca dikkat çekmektedir (Bers 2000). Yaptığımız çalışmada, uyaranlar arasında 10'ar saniyelik artan miktarlarda süreler tanınmış ve elde edilen veriler Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Buna göre; iskemi-reperfüzyon uygulaması ile 60

saniyeye kadar olan sürelerde kasılma kuvveti azalmış ve sonrasındaki sürelerde değişim olmadığı gözlenmiştir. 60 saniye sonrasında IR ve SHAM grupları kasılma kuvvetleri arasında bir fark gözlenmemiş olması, iskemi-reperfüzyon uygulaması ile SR’da meydana gelen fonksiyon bozukluğunun bekleme süresinin artışı ile tolere edilebildiğini düşündürmektedir. Genel olarak ön bekleme uyaranlar protokolü ile elde ettiğimiz veriler literatür bilgileri ile uyum göstermektedir.

İlgili protokol ile alınan kayıtlardan hesaplanan kasılma sürelerinin gruplar arasındaki farklılığı Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Bulgular kasılmanın frekans bağımlılığını test ettiğimiz protokoldeki veriler ile paralellik göstermektedir. Aynı şekilde $+dF/dt_{max}$ ve $-dF/dt_{max}$ hesaplamalarımız da bir önceki protokolde elde edilen veriler ile uyumludur (Şekil 4.9).

Deney hayvanlarının kan serumlarındaki toplam antioksidan seviyesi iskemi-reperfüzyon ile ya üretimi baskılanarak ya da oksidan maddeler ile bağ kurması neticesinde azalmış, MT+IR grubunda ise bu seviye uygulanan antioksidan enjeksiyonunun bir sonucu olarak SHAM grubu değerlerinde ölçülmüştür (Şekil 4.10-A). İskemik durumlar sonrasında reperfüzyonun sebep olduğu hasarlardan ilk defa 1965 yılında Baue ve McClerkin tarafından yapılan araştırmada bahsedilmiştir. Bu çalışmada reperfüzyon hasarının sebepleri arasında sistemik şok, hemorajik nekroz ve asidozdan bahsedilmektedir. Bu sebepler nedeni ile meydana gelen kimyasal olaylar sonucunda ise hücrelerin fizyolojik şartlardaki çalışma mekanizmaları için oldukça zararlı olan serbest radikaller ortaya çıkmaktadır (Tuncer 2013). Bizim bulgularımızda da bu bilgi ile uyumlu şekilde IR grubu toplam oksidan seviyesi artmış ve Mito-TEMPO enjeksiyonu bu seviyenin SHAM grubu değerlerinde kalmasını sağlayacak şekilde koruyucu etki göstermiştir (Şekil 4.10-B).

İskemi-reperfüzyon prosedürünün mitokondri hasarı sebebiyle serbest radikal oluşumunu artırarak kalp kusurlarına neden olduğu bilinmektedir (Zhu ve Zuo 2013; He ve Zuo 2015). Çalışmamız kapsamında miyokardiyal papiller kastan histolojik boyamalar sonrası alınan görüntüler, bu bilgilere paralel şekilde miyofibril kayıpları ve intrasitoplazmik vakuolizasyonu göstermektedir (Şekil 4.11).

5.1. Öneriler

Bulgularımızı bir bütün halinde değerlendirdiğimizde kasılma kayıtlarından elde edilen veriler abdominal iskemi-reperfüzyon uygulamasının SR'dan Ca^{+2} salım ve geri alım mekanizmalarını olumsuz yönde etkilediğini, histolojik görüntüler ise miyofibril kayıplarını göstermektedir. Kasılma parametreleri üzerinde gerçekleşen hem fonksiyonel hem de yapısal değişimlerin hangi oranda SR/miyofibril hasarı sebebiyle olduğu ya da var ise başka hangi mekanizmaların etkilendiği konusu gelecekte gerçekleştirilecek araştırmaların konusu olabilir.

İskemi-reperfüzyona günlük yaşam içerisinde gerçekleşen yaralanmaların yanı sıra, bypass ve anevrizma tedavisi operasyonları ile organ nakilleri gibi pek çok tedaviye yönelik girişimde maruz kalınabilmektedir. Dolayısıyla yapmış olduğumuz çalışma ile elde edilen bulgular, klinikte karşılaşılan pek çok ikincil komplikasyonların altında yatan temel nedenlerin anlaşılabilmesi açısından önem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod.* 2018;22(1):61-66.
- Avila RA, Silva MASC, Peixoto JV, Kassouf-Silva I, Fogaça RTH, Dos Santos L. Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. *Toxicol In Vitro.* 2016;36:38-45.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120(4):483-95.
- Balke CW, Goldman L. Excitation contraction coupling in cardiac muscle: is there a purely voltage-dependent component? *J Gen Physiol.* 2003;121(5):349-52.
- Baue AE, Mcclerkin WW. A Study Of Shock: Acidosis And The Declamping Phenomenon. *Ann Surg.* 1965;161:41-5.
- Belchior AC, Freire DD, da Costa CP, Vassallo DV, Padilha AS, Dos Santos L. Maternal protein restriction compromises myocardial contractility in the young adult rat by changing proteins involved in calcium handling. *J Appl Physiol (1985).* 2016;120(3):344-50.
- Bers DM. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res.* 2000;87(4):275-81.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198-205.
- Bowditch HP. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen'. *Arbeiten aus der Physiologischen Anstalt zu Leipzig.* 1871;139-70.
- Bown MJ, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. Cytokines and inflammatory pathways in the pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001;22(6):485-95.
- Braveny P, Kruta V. Dissociation De Deux Facteurs: Restitution Et Potentiation Dans L'action De L'intervalle Sur L'amplitude De La Contraction Du Myocarde. *Journal Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie.* 1958;66(4):633-52.
- Byon CH, Heath JM, Chen Y. Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells. *Redox Biol.* 2016;9:244-253.
- Cheung CC, Zheng GJ, Li AM, Richardson BJ, Lam PK. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat Toxicol.* 2001;52(3-4):189-203.
- Cnubben NH, Rietjens IM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2001;10(4):141-52.
- Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med.* 1991;91(3C):23S-30S.
- Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-8.
- Daryani A, Montazeri M, Pagheh AS, Sharif M, Sarvi S, Hosseinzadeh A, Reiter RJ, Hadighi R, Joghataei MT, Ghaznavi H, Mehrzadi S. The potential use of melatonin to treat protozoan parasitic infections: A review. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:948-957.
- Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, Nazarewicz RR, McCann L, Lewis W, Harrison DG, Dikalov SI. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ Res.* 2010;107(1):106-16.
- Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012;46(4):382-419.
- Fujii S, Dale GL, Beutler E. Glutathione-dependent protection against oxidative damage of the human red cell membrane. *Blood.* 1984;63(5):1096-101.
- Gazzin S, Vitek L, Watchko J, Shapiro SM, Tiribelli C. A Novel Perspective on the Biology of Bilirubin in Health and Disease. *Trends Mol Med.* 2016;22(9):758-768.

- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993;57(5 Suppl):715S-724S.
- He F, Zuo L. Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):27770-80.
- Hevia D, Mayo JC, Tan DX, Rodriguez-Garcia A, Sainz RM. Melatonin enhances photo-oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by an antioxidant reaction that renders N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK). *PLoS One.* 2014;9(10):e109257.
- Ilio C, Sacchetta P, del Boccio G, la Rovere G, Federici G. Glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer Lett.* 1985;29(1):37-42.
- Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research.* 1995;5:755-66.
- Janssen PM. Myocardial contraction-relaxation coupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(6):H1741-9.
- Jeong EM, Chung J, Liu H, Go Y, Gladstein S, Farzaneh-Far A, Lewandowski ED, Dudley SC Jr. Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Glucose Tolerance, Insulin Resistance, and Cardiac Diastolic Dysfunction. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(5).
- Jespersen B, Tykocki NR, Watts SW, Cobbett PJ. Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath-applications to pharmacology research. *J Vis Exp.* 2015;(95):52324.
- Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *MAE Vet Fak Derg.* 2016;1(1):65-76.
- Kei A, Koutsouka F, Makri A, Elisaf M. Uric acid and cardiovascular risk: What genes can say. *Int J Clin Pract.* 2018;72(1).
- Kilic S, Saracoglu E, Cekici Y. Clinical Efficacy of Transthoracic Echocardiography for Screening Abdominal Aortic Aneurysm in Turkish Patients. *Acta Cardiol Sin.* 2018;34(2):137-143.
- Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem.* 1987;262(2):660-6.
- Laitano O, Ahn B, Patel N, Coblenz PD, Smuder AJ, Yoo JK, Christou DD, Adhihetty PJ, Ferreira LF. Pharmacological targeting of mitochondrial reactive oxygen species counteracts diaphragm weakness in chronic heart failure. *J Appl Physiol (1985).* 2016;120(7):733-42.
- Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 2009;674(1-2):137-47.
- Liu M, Liu H, Dudley SC Jr. Reactive oxygen species originating from mitochondria regulate the cardiac sodium channel. *Circ Res.* 2010;107(8):967-74.
- Liu Y, Wang Y, Ding W, Wang Y. Mito-TEMPO Alleviates Renal Fibrosis by Reducing Inflammation, Mitochondrial Dysfunction, and Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:5828120.
- Madu EC, D'Cruz IA. The vital role of papillary muscles in mitral and ventricular function: echocardiographic insights. *Clin Cardiol.* 1997;20(2):93-8.
- Masi S, Virdis A. Targeting Mitochondria in Age-Related Vascular Changes: A New Arrow to the Bow of Antioxidant Treatment? *Hypertension.* 2018;71(6):1023-1025.
- Miura S, Saitoh SI, Kokubun T, Owada T, Yamauchi H, Machii H, Takeishi Y. Mitochondrial-Targeted Antioxidant Maintains Blood Flow, Mitochondrial Function, and Redox Balance in Old Mice Following Prolonged Limb Ischemia. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).
- Murphy MP, Smith RA. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:629-56.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1-13.
- Ni R, Cao T, Xiong S, Ma J, Fan GC, Lacefield JC, Lu Y, Le Tissier S, Peng T. Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med.* 2016;90:12-23.

- Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, Comstock GW, Cutler RG. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 2000;148(1):131-9.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med*. 1995;19(2):227-50.
- Panth N, Paudel KR, Parajuli K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. *Adv Med*. 2016;2016:9152732.
- Pei S, Minhajuddin M, Callahan KP, Balys M, Ashton JM, Neering SJ, Lagadinou ED, Corbett C, Ye H, Liesveld JL, O'Dwyer KM, Li Z, Shi L, Greninger P, Settleman J, Benes C, Hagen FK, Munger J, Crooks PA, Becker MW, Jordan CT. Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem*. 2013;288(47):33542-58.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4(2):89-96.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):11-26.
- Ravens U, Link S, Gath J, Noble MI. Post-rest potentiation and its decay after inotropic interventions in isolated rat heart muscle. *Pharmacol Toxicol*. 1995;76(1):9-16.
- Rehber ZH. Antioksidanlar ve Hiperlipidemi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 1998. (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa Kutlu).
- Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;939:200-15.
- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res*. 1995;18(1):1-11.
- Ren H, Meng Q, Yepuri N, Du X, Sarpong JO, Cooney RN. Protective effects of glutathione on oxidative injury induced by hydrogen peroxide in intestinal epithelial cells. *J Surg Res*. 2018;222:39-47.
- Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008;582(13):1783-7.
- Ross MF, Kelso GF, Blaikie FH, James AM, Cochemé HM, Filipovska A, Da Ros T, Hurd TR, Smith RA, Murphy MP. Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(2):222-30.
- Rossmann MJ, Santos-Parker JR, Steward CAC, Bispham NZ, Cuevas LM, Rosenberg HL, Woodward KA, Chonchol M, Gioscia-Ryan RA, Murphy MP, Seals DR. Chronic Supplementation With a Mitochondrial Antioxidant (MitoQ) Improves Vascular Function in Healthy Older Adults. *Hypertension*. 2018;71(6):1056-1063.
- Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free Radicals, Antioxidants, Diseases And Phytomedicines: Current Status And Future Prospect. *Regional Institute of Pharmaceutical Science and Technology*. 2010;3(1):91-100.
- Sen S, Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*. 2011 ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, USA.
- Shahani R, Marshall JG, Rubin BB, Li RK, Walker PM, Lindsay TF. Role of TNF-alpha in myocardial dysfunction after hemorrhagic shock and lower-torso ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(3):H942-50.
- Smith RA, Murphy MP. Mitochondria-targeted antioxidants as therapies. *Discov Med*. 2011;11(57):106-14.
- Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim - İstanbul Tabip Odası Süreli Bilimsel Yayın*. 2009;5-13.

- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(3-4):134-44.
- Teixeira J, Deus CM, Borges F, Oliveira PJ. Mitochondria: Targeting mitochondrial reactive oxygen species with mitochondriotropic polyphenolic-based antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;97:98-103.
- Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med.* 2008;13(2):102-8.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(3-4):145-55.
- Tsai KL, Huang YH, Kao CL, Yang DM, Lee HC, Chou HY, Chen YC, Chiou GY, Chen LH, Yang YP, Chiu TH, Tsai CS, Ou HC, Chiou SH. A novel mechanism of coenzyme Q10 protects against human endothelial cells from oxidative stress-induced injury by modulating NO-related pathways. *J Nutr Biochem.* 2012;23(5):458-68.
- Tuncer S. İskemi-Reperfüzyonun Sıçan Frenik Sinir Diyafram Preparatında Yarattığı Elektrofizyolojik Değişimlerin Nümerik Analiz Yöntemleriyle İncelenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya, 2013 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nizamettin Dalkılıç).
- Uhl S, Freichel M, Mathar I. Contractility Measurements on Isolated Papillary Muscles for the Investigation of Cardiac Inotropy in Mice. *J Vis Exp.* 2015;103.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.
- Varian KD, Janssen PM. Frequency-dependent acceleration of relaxation involves decreased myofilament calcium sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(5):H2212-9.
- Vecchia LAD, Bussotti M. Exercise training in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Thoracic Disease.* 2018;10(1):508-521.
- Waring WS. Uric acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke. *Q J Med* 2002;95:691-693.
- Wohlfart B. Relationships between peak force, action potential duration and stimulus interval in rabbit myocardium. *Acta Physiol Scand.* 1979;106(4):395-409.
- Wu Y, Shen L, Wang R, Tang J, Ding SQ, Wang SN, Guo XY, Hu JG, Lü HZ. Increased ceruloplasmin expression caused by infiltrated leukocytes, activated microglia, and astrocytes in injured female rat spinal cords. *J Neurosci Res.* 2018;1-12.
- Yarmohmmadi F, Rahimi N, Faghir-Ghanesefat H, Javadian N, Abdollahi A, Pasalar P, Jazayeri F, Ejtemaemehr S, Dehpour AR. Protective effects of agmatine on doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in rat. *Eur J Pharmacol.* 2017;796:39-44.
- Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001;54(3):176-86.
- Zhu X, Zuo L. Characterization of oxygen radical formation mechanism at early cardiac ischemia. *Cell Death Dis.* 2013;4:e787.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı : Ahmet
Soyadı : AKKOCA
Ünvanı : Öğretim Görevlisi
Doğum Yeri : Konya
Doğum Tarihi : 02.09.1989
Adresi : S.Ü. Taşkent Meslek Yüksekokulu Taşkent/Konya
İş Telefonu : 0332 497 14 06
e-mail : akkocaahmet@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Lisans : S.Ü., Fen Fakültesi, Fizik Bölümü (2013)
Lisans : A.Ü., İşletme Fakültesi, İşletme Bölümü (2015)
Y. Lisans : N.E.Ü., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik AD (halen)

Çalıştığı Kurumlar

S.Ü. Taşkent Meslek Yüksekokulu, Mülkiyet Koruma ve Güvenlik Bölümü (halen)

Yabancı Dil

İngilizce (YDS-57,50 puan)

EK-A : Hayvan Deneyleri Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL TIP UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2017-36

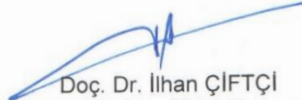
Toplantı Tarihi: 27.09.2017

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri / Biyofizik Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ, ve Arş. Gör. Ahmet AKKOCA, Arş. Gör. Murat Cenk ÇELEN, tarafından sunulan "İskemi-Reperfüzyonun Sıçan Miyokardiyal Papiller Kasında Oluşturduğu Fonksiyon Bozukluklarında MitoTEMPO' nun Olası Koruyucu Etkisinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans projesi kurul tarafından değerlendirildi.

Projede belirtilen anestezi maddenin (Xylazine 10 mg/kg, Ketamin 80 mg/kg, Sodyum Pentobarbital 50mg/kg) kullanılması uygun görülmüştür. Projede belirtilen ve istatistiksel olarak en güvenilir sonuç elde edilebilecek asgari sayıda kullanılacak olan (72 adet sıçan) hayvan sayısı uygun görülmüştür.

Projenin hayvan deneylerine ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde belirtilen "Etik Kurallar" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

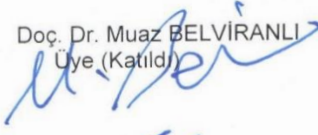
Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde yer alan kurallar ve belirtilen "Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "uygun" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.


Doç. Dr. İlhan ÇİFTÇİ
Başkan (Katıldı)

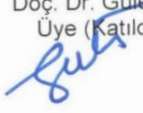
Prof. Dr. Banu BOZKURT
Üye (Katılmadı)

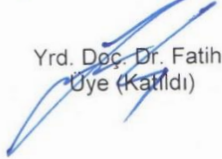

Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK
Başkan v. (Katıldı)

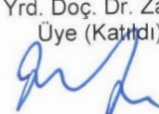
Prof. Dr. Ercan DURMUŞ
Üye (Katılmadı)


Doç. Dr. Muaz BELVİRANLI
Üye (Katıldı)


Doç. Dr. Kamil ÜNEY
Üye (Katıldı)


Doç. Dr. Güler YAVAŞ
Üye (Katıldı)

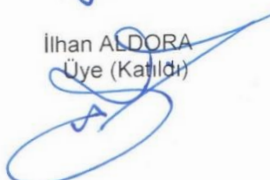

Yrd. Doç. Dr. Fatih KARA
Üye (Katıldı)


Yrd. Doç. Dr. Zafer SAYIN
Üye (Katıldı)


Yrd. Doç. Dr. İlhan ECE
Üye (Katıldı)


Vet. Hekim S. Metin GÖKYAPRAK
Üye (Katıldı)


Burhan YILMAZ
Üye (Katıldı)


İlhan ALDORA
Üye (Katıldı)