T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

# İZOPROTERENOL İLE OLUŞTURULAN MİYOKARD ENFARKTÜSÜ MODELİNDE MELATONİNİN AQUAPORİN KANALLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
NEZAHAT KÜBRA TÜFEKÇİOĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. METEHAN UZUN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2021

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

# İZOPROTERENOL İLE OLUŞTURULAN MİYOKARD ENFARKTÜSÜ MODELİNDE MELATONİNİN AQUAPORİN KANALLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Nezahat Kübra TÜFEKÇİOĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Metehan UZUN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2019-3081 sayılı karar ile desteklenmiştir.

ÇANAKKALE-2021

**BEYAN FORMU**

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına 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, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8'de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

**Tarih: 02/02/2021**

**Tez Sahibi Adı ve Soyadı:** Nezahat Kübra TÜFEKÇİOĞLU

**İmza:**

# ÖZET

Miyokard enfarktüsü (MI) kalp hastalıkları arasında önemli bir yer tutmakta ve yüksek oranda ölümle seyretmektedir. Miyokard enfarktüsünde kalp kasında meydana gelen ödem önemli patolojik değişikliklerden bir tanesi olmasına rağmen altta yatan mekanizmalar ve tedavi yöntemleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Su veya diğer küçük moleküllerin membran boyunca geçişini sağlayan Aquaporin (AQP) kanallarının kalpte de bulunduğu ve miyokard enfarküsünde rol alabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle çalılmamızda, MI modeli oluşturulmuş sıçanlarda bazı AQP kanallarındaki değişim ile melatoninin koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla 28 adet erkek sıçandan, Kontrol, Melatonin (MEL; 10 mg/kg melatonin) İzoproterenol (İZO; 85 mg/kg izoproterenol)ve İzoproterenol+Melatonin (İZO-MEL;85 mg/kg izoproterenol, 10 mg/kg melatonin) grupları oluşturuldu. Çalışmanın sonunda alınan EKG kayıtları MI açısından değerlendirildi. Kan örneklerinden ELISA yöntemi ile CK-MB ve cTnI düzeyleri belirlendi. Sol ventrikül dokusundan yapılan histopatolojik kesitlerde miyokardiyal ödem ve hasar bulguları araştırıldı. Sol ventrikül dokusunda ayrıca AQP1, AQP3, AQP4, AQP7, TNFα, Bcl2, Kaspaz3 ve BAX gen ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Bulgular olarak, İZO grubunda EKG kayıtlarında ST segment yükselmesi, sol ventrikül dokusunda artmış miyokardiyal ödem ve hücresel infiltrasyon, AQP1, AQP3, AQP4, AQP7, TNFα, Bcl2, Kaspaz3 ve BAX gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı artışlar belirlendi ($p<0,05$). Melatonin uygulamasının yukarıdaki parametrelerin birçoğunda istatistiksel olarak anlamlı azalmalara sebep olduğu gözlendi.

Sonuç olarak melatoninin MI'da ortaya çıkan ödemi azaltıcı etkisi olduğu ve bu etkilerin daha çok AQP1, AQP3 ve AQP4 üzerinden gerçekleştiği anlaşıldı. Bu sonuçlar melatoninin MI'da ödemi azaltmak amacı ile koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceğini gösterdi.



**Anahtar Kelimeler:** melatonin, aquaporin, miyokard enfarktüsü, miyokard ödemi.

## ABSTRACT

### Investigation of the Effects of Melatonin on Aquaporin Channels in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction Model

Myocardial infarction (MI) has an essential place among heart diseases and has a high mortality rate. Although edema in the heart muscle in myocardial infarction is one of the important pathological changes, the underlying mechanisms and treatment methods have not been fully elucidated. It has been stated that Aquaporin (AQP) channels, which allow water or other small molecules to pass through the membrane, are also present in the heart and may have a role in myocardial infarction. Therefore, in our study, we aimed to investigate the change in some AQP channels and the protective effects of melatonin in rats with MI model.

For this purpose, from 28 male rats, Control, Melatonin (MEL; 10 mg/kg melatonin) Isoproterenol (ISO; 85 mg/kg isoproterenol) and Isoproterenol+Melatonin (ISO-MEL; 85 mg/kg isoproterenol, 10 mg/kg melatonin) groups were designed. ECG records taken at the end of the study were evaluated in terms of MI.CK-MB and cTnI levels were determined from blood samples by ELISA method. Myocradial edema and signs of damage were investigated in histopathological sections obtained from left ventricular tissue. AQP1, AQP3, AQP4, AQP7, TNFα, Bcl2, Caspase3 and BAX gene expression levels were also determined in left ventricular tissue.

As findings, ST segment elevation in ECG recordings, increased myocardial edema and cellular infiltration in left ventricular tissue, and significant increases in AQP1, AQP3, AQP4, AQP7, TNFα, Bcl2, Caspase3 and BAX gene expression levels were detected in the ISO group ($p<0.05$). It was observed that melatonin administration caused statistically significant decreases in many of the above parameters.

As a result, it was concluded that melatonin had the effect of reducing edema in MI and these effects were mostly through AQP1, AQP3 and AQP4. These results revealed that melatonin can be used as a protective agent to reduce edema in MI.



**Keywords:** melatonin, aquaporin, myocard infarction, myocardial edema

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince göstermiş olduğu engin hoşgörüsü ve sabrının yanısıra bilimsel bakış açısı kazanmamda ve bu tezin oluşturulmasında büyük emeği olan değerli danışman hocam sayın Prof.Dr. Metehan UZUN'a fizyolojinin önemini kavramamı ve bu alanda gelişmemi sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa Edremitlioğlu ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Avni Eroğlu'na, yardımlarını esirgemeyen ve ihtiyaç duyduğum zamanlarda yanımda olan ve tezimin farklı bölümlerinde katkıları olan Doç. Dr. Başak Büyük'e, tecrübe ve bilgisi ile her zaman yol gösterici olan Dr. Mehmet Akif Ovalı'ya, akademik alanda ilerlememe konusunda sonsuz desteğini her zaman hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi R.Özlem Öztopuz'a, akademik alana yönelmeme vesile olan ve her zaman yol göstericim olan Prof. Dr. Şükran Yalçın Özdilek'e tezimde sabırla yardımcı olan başta Uz. Fzt. Cemre Aydeğer olmak üzere Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Lisansüstü öğrencilerine, bu süreçte her zaman yanımda olan ve beni destekleyen başta Sevda Baran olmak üzere tüm dostlarıma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (ÇOMÜBAP), önceliklerini her zaman benim önceliklerime göre değiştiren, bugünlere gelmemde büyük katkıları olan anne ve babama, ablam Şükran Bûşra Tüfekçioğlu ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER


**TEZ ONAY FORMU** ..... ii

**THESIS APROVAL FORM** ..... iii

**BEYAN** ..... iv

**ÖZET** ..... v

**ABSTRACT** ..... vi

**TEŞEKKÜR** ..... vii

**İÇİNDEKİLER** ..... viii

**TABLOLAR LİSTESİ** ..... xii

**ŞEKİLLER LİSTESİ** ..... xiii

**RESİMLER LİSTESİ** ..... xv

**KISALTMALAR LİSTESİ** ..... xvii

**1. GİRİŞ VE AMAÇ** ..... 1

**2. GENEL BİLGİLER** ..... 3

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ..... 3

2.2. Miyokard Enfarktüsü ..... 3

2.2.1. Miyokard Enfarktüsünde Biyokimyasal Belirteçler ..... 4

2.2.1.1. Troponinler ve Troponin I ..... 5

2.2.1.2. Kreatin Kinazlar ve Kreatin Kinaz MB ..... 6

2.2.2.Miyokard Enfarktüsünde Elektrokardiyografik Değişiklikler ..... 7

2.2.3. Deneysel Miyokard Enfarktüsü Modelleri ..... 8

2.2.3.1. Cerrahi Yöntemler ..... 8

2.2.3.2. Kimyasal Ajanlarla MI Oluşturulması ..... 10

2.2.4. Apoptoz ..... 10

2.2.4.1. Kaspazlar ve Kaspaz3 ..... 12

2.2.4.2. Bcl2 Ailesi Proteinleri ..... 13

2.2.4.3. Bcl2 ile İlişkili X Proteini (BAX) ..... 14

2.2.5. İnflamasyon ve Tümör Nekroz Faktör α ..... 14

2.2.6. Miyokardiyal Ödem ..... 16

2.2.7. Aquaporinler..... 17
2.2.7.1. Aquaporinler ve Kalp..... 20
2.2.7.2. Aquaorin 1..... 21
2.2.7.3. Aquaporin 3..... 23
2.2.7.4. Aquaporin 4..... 24
2.2.7.5. Aquaporin 7..... 25
2.2.7.6. Aquaporinler ve Miyokardiyal Ödem..... 27
2.3. Melatonin ..... 27
2.3.1. Melatoninin Fizyolojik Etkileri..... 31
2.3.2. Melatonin ve Kalp..... 32
**3. GEREÇ VE YÖNTEM**..... 32
3.1. Hayvan Materyali..... 33
3.1.1. Grupların Oluşturulması..... 33
3.2. İzoproterenol Çözeltisinin Hazırlanması..... 34
3.3. Melatonin Çözeltisinin Hazırlanması ve Uygulaması..... 34
3.4. Taşıyıcı Hazırlanması ve Uygulaması..... 34
3.5.Yöntem ..... 35
3.5.1. Miyokard Enfarktüsü Modelinin Oluşturulması ..... 35
3.5.2. Elektrokardiyografi (EKG) Alınması ve Değerlendirilmesi..... 35
3.5.2.1. Elektrokardiyografi (EKG) Alınması..... 35
3.5.2.2. Elektrokardiyogram Değerlendirilmesi..... 36
3.5.3. Sedasyon İşlemi..... 36
3.5.4. Anestezi İşlemi..... 37
3.5.5. Kan Örneklerinin Alınması..... 37
3.5.6. Sol Ventrikül Doku Örneklerinin Alınması..... 37
3.6. Doku Su Kaybı Oranını Belirleme..... 38
3.7. Biyokimyasal Analizler..... 38
3.7.1. cTnI ELISA Prosedürü..... 39
3.7.2. CK-MB ELISA Prosedürü..... 41

3.8. Genetik Analizler..... 42
3.8.1. Total RNA İzolasyonu..... 42
3.8.2. cDNA Eldesi..... 43
3.8.3. Real-Time PCR (qRT-PCR) Uygulaması..... 45
3.8.4. Western Blot Analiz Yöntemi..... 46
3.9. Histopatolojik Analizler..... 46
3.9.1. Hemotoksilen-Eozin Boyama Prosedürü..... 47
3.10. İstatiksel Analizler..... 47
**4. BULGULAR**..... 48
4.1. Vücut Ağırlığı Değerlerindeki Değişimler..... 48
4.2. EKG Verilerinin Değerlendirmeleri..... 49
4.2.1. ST Segmenti Değerlendirmesi..... 49
4.2.2. Kalp Atım Hızı ve RR süresi Verilerindeki Değişimler..... 52
4.2.3. QT Sürelerindeki Değişimler..... 54
4.3. Doku Su Kaybı Oranı Verileri..... 55
4.4. Biyokimyasal veriler..... 56
4.4.1. Kan cTnI Düzeyleri..... 56
4.4.2. Kan CK-MB Düzeyleri..... 58
4.5. Gen İfade Analiz Sonuçları..... 60
4.5.1. Sol Ventrikül AQP1 Gen Ekspresyonu ve Protein Düzeyindeki Değişimler..... 60
4.5.2. Sol Ventrikül AQP3 Gen Ekspresyon Düzeyindeki Değişimler..... 62
4.5.3. Sol Ventrikül AQP4 Gen Ekspresyonu ve Protein Düzeyindeki Değişimler..... 64
4.5.4. Sol Ventrikülde AQP7 Gen Ekspresyonu ve Protein Düzeyindeki Değişimler..... 66
4.5.5. Sol Ventrikül Kaspaz3 Gen Düzeyindeki Analizler..... 68
4.5.6. Sol Ventrikül Bcl2 Gen Ekspresyon ve Protein Düzeyindeki Değişimler..... 70
4.5.7. Sol Ventrikül BAX Gen Ekspresyonu Düzeyindeki Değişimler..... 72
4.5.8. Sol Ventrikül TNFα Gen Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler..... 74
4.6. Histopatolojik Veriler..... 76

**5. TARTIŞMA**..... 80
**6. SONUÇ VE ÖNERİLER**..... 94
**7. KAYNAKLAR**..... 95
**EK-1 Etik Kurul Onayı** ..... 116
**EK-2 Spiralli Tez Kontrol Formu** ..... 117
**EK-3 Spiralli Tez Yazım Listesi** ..... 118
**EK-4 Özgeçmiş**..... 119

## TABLOLAR LİSTESİ


| | | |
|---|---|---|
| **Tablo 1.** | cDNA sentez protokolü | 44 |
| **Tablo 2.** | PCR koşulları | 44 |
| **Tablo 3.** | Tüm gruplara ait ortalama vücut ağırlıklarının 1. ve 8. günlerdeki değişimi | 49 |
| **Tablo 4.** | Tüm gruplarda 8. gün EKG kayıtlarında ST yükselmesi görülen sıçan sayıları | 52 |
| **Tablo 5.** | Tüm gruplarda 1. ve 8. günde belirlenen kalp atım hızı verileri | 53 |
| **Tablo 6.** | Tüm gruplara ait RR süresindeki değişimler | 53 |
| **Tablo 7.** | Tüm gruplarda QT süresi değerlerindeki 1. ve 8. günlerdeki değişimler | 55 |
| **Tablo 8.** | Tüm gruplara ait cTnI düzeylerindeki değişimler | 57 |
| **Tablo 9.** | Tüm gruplara ait CK-MB seviyeleri | 59 |
| **Tablo 10.** | H-E boyama sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan skorlama kriterleri. | 77 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ


| | | |
|---|---|---|
| **Şekil 1.** | Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolakları | 12 |
| **Şekil 2.** | AQP'lerin yapısı | 17 |
| **Şekil 3.** | İnsan vücudunda farklı dokularda AQP kanallarının dağılımı | 19 |
| **Şekil 4.** | AQP 1'in yapısı | 22 |
| **Şekil 5.** | AQP 3'ün yapısı | 23 |
| **Şekil 6.** | Melatonin moleküler yapısı | 27 |
| **Şekil 7.** | Melatoninin insanlarda gün içerisinde sirkadiyen salgılanması | 28 |
| **Şekil 8.** | Melatoninin ana yıkımlanma mekanizması | 29 |
| **Şekil 9.** | Melatonin biyosentez mekanizması | 30 |
| **Şekil 10.** | Tüm gruplarda RR süresindeki değişimlerin grafiksel gösterimi | 54 |
| **Şekil 11.** | EKG kayıtlarından elde edilen QT sürelerinin karşılaştırılması | 55 |
| **Şekil 12.** | Doku kurutma yöntemi ile belirlenen doku su kaybı verilerinin karşılaştırılması | 56 |
| **Şekil 13.** | Tüm gruplara ait cTnI değerlerinin grafiksel gösterimi | 58 |
| **Şekil 14.** | Tüm gruplara ait CK-MB seviyelerinin karşılaştırılması | 60 |
| **Şekil 15.** | AQP1 genine ait amplifikasyon eğrisi | 61 |
| **Şekil 16.** | Tüm grupların AQP1 gen ekspresyon seviyelerinin grafiksel gösterimi | 62 |
| **Şekil 17.** | AQP3 genine ait amplifikasyon eğrisi | 63 |
| **Şekil 18.** | Tüm grupların AQP3 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması | 64 |
| **Şekil 19.** | AQP 4 genine ait amplifikasyon eğrisi | 65 |
| **Şekil 20.** | Tüm grupların AQP 4 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması | 66 |
| **Şekil 21.** | AQP 7 genine ait amplifikasyon eğrisi | 67 |
| **Şekil 22.** | Tüm grupların AQP 7 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması | 68 |
| **Şekil 23.** | Kaspaz3 genine ait amplifikasyon eğrisi | 69 |

**Şekil 24.** Tüm gruplarda Kaspaz3 gen ekspresyon seviyelerininkarşılaştırılması 70
**Şekil 25.** Bcl2 genine ait amplifikasyon eğrisi 71
**Şekil 26.** Tüm gruplarda Bcl2 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması 72
**Şekil 27.** BAX genine ait amplifikasyon eğrisi 73
**Şekil 28.** Tüm grupların BAX gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi 74
**Şekil 29.** TNFα genine ait amplifikasyon eğrisi 75
**Şekil 30.** Tüm gruplarda TNFα gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması 76
**Şekil 31.** Tüm gruplarda H-E boyama ile tespit edilen hücresel ödem sonuçlarının karşılaştırılması 78
**Şekil 32.** Tüm gruplarda H-E boyama ile tespit dilen mononükleer infiltrasyon sonuçlarının karşılaştırılması 79

## RESİMLER LİSTESİ

**Resim 1.** Sıçanlardan alınan ve tüm derivasyonların görüldüğü örnek bir EKG kaydı.

**Resim 2.** Sıçanlardan alınan kalp dokusuna ait bir görüntü.

**Resim 3.** ELISA ölçümlerinde kullanılan cihaz (Thermo Scientific Multiskan Go).

**Resim 4.** Dokuların homojenize edilmesi için kullanılan cihaz.

**Resim 5.** Kontrol grubuna ait 1. gün EKG örneği (II. derivasyon).

**Resim 6.** Kontrol grubuna ait 8. gün EKG örneği (II. derivasyon).

**Resim 7.** MEL grubuna ait 1. gün EKG örneği (II. derivasyon).

**Resim 8.** MEL grubuna ait 8. gün EKG örneği (II. derivasyon).

**Resim 9.** İZO grubuna ait 1. gün EKG örneği (II. derivasyon).

**Resim 10.** İZO grubundan 8. gün yapılan EKG kaydında ST yükselmesi (II. derivasyon).

**Resim 11.** İZO-MEL grubuna ait 1. gün EKG örneği (II. derivasyon).

**Resim 12.** İZO-MEL grubu 8. gün EKG örneği (II. derivasyon).

**Resim 13.** Kontrol grubuna ait normal kalp kası görüntüsü. Mavi oklar ökromatik sentral yerleşimli nükleusları göstermektedir (H-E x200).

**Resim 14.** MEL grubuna ait histolojik görüntü. Kontrol grubuna benzer histolojik yapı izlenmektedir (H-E x200).

**Resim 15.** İZO grubuna ait histolojik görüntü. Oklar mononükleer infiltrasyon alanları, yıldızlar ise ödemli alanları göstermektedir (H-E x200).

**Resim 16.** İZO-MEL grubuna ait histolojik görüntü. Oklar hafif mononükleer infiltrasyon izlenen alanları, yıldız ise ödemli alanları göstermektedir (H-E x200).

## KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|---|---|
| **MI** | Miyokard Enfarktüsü |
| **EKG** | Elektrokardiyografi |
| **İZO** | İzoproterenol |
| **AQP** | Aquaporin |
| **Bcl2** | B hücreli lenfoma 2 |
| **BAX** | Bcl2 ile ilişkili X proteini |
| **TNF** | Tümör Nekroz Faktör |
| **CK-MB** | Kreatin Kinaz MB |
| **cTnI** | Kardiyak Troponin I |
| **H-E** | Hemotoksilen- Eozin |

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünya genelinde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Bu hastalıklar arasında en sık görüleni ise miyokard enfarktüsü (MI)'dür. Miyokard enfarktüsü ani ölümlere sebep olmasının yanısı sıra insanların hayat kalitesinde de ciddi derecede bozulmalara yol açar. Bu nedenle, MI'ın gelişim fazının durdurulması veya risk gruplarındaki kişilerde koruyucu önlemlerin alınması bilimsel araştırmaların hedefi haline gelmiştir.

Miyokard enfarktüsünde kalp kasında ortaya çıkan histopatolojik değişikliklerden bir tanesi miyokardiyal ödemdir. Miyokardiyal ödem, enfarktüs dışında bazı klinik müdahaleler veya başka hastalıklara bağlı olarak da şekillenebilir. Kalp kası hücresinin özel yapısı nedeni ile kalp mikrovasküler damar geçirgenliğindeki artışlara ve ödeme diğer organlara göre daha duyarlıdır. Bazı organlar interstisyel sıvı hacmindeki değişiklikler veya ödem ile işlevlerinde önemli bir aksaklık meydana gelmeden başa çıkabilirler. Ancak, interstisyel veya hücre içi sıvı hacmindeki çok küçük miktardaki artışlar bile kalp işlevlerinde yaşamı tehdit edici düzeyde bozulmalara yol açabilir. Bu nedenle miyokardiyal ödem ve ödeme karşı koruyucu ve tedavi edici ilaç geliştirme çalışmaları önem arz etmektedir.

Melatonin, pineal bez tarafından sentezlenen bir hormon olup sentezi ve salgılanması karanlıkta artarken ışık ile inhibe edilir. İnsanlarda melatoninin yaklaşık % 80'i geceleri sentezlenir. Melatonin üzerine yapılan ilk çalışmalar melatoninin uyku döngüsünü düzenleme işlevi olduğunu göstermiştir. Günümüzde ise melatonin, antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuar ve antikanserojen etkilere sahip olan bir hormon olarak bilinmektedir.

Kardiyovasküler sistem ile melatonin ilişkisinin araştırıldığı çalışmalar, melatoninin miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı dâhil olmak üzere ateroskleroz, hipertansiyon, kalp yetmezliği, miyokardiyal hasar ve miyokard enfarktüsü gibi birçok kardiyovasküler hastalığa karşı koruyucu ve tedavi edici rolü olduğunu ortaya koymuştur.

Akuaporinler (AQP'ler), sıvı geçişini sağlayan birçok hücrenin plazma membranındabulunan bir protein ailesidir. AQP'lerin vücudun su dengesinin sağlanmasında çok önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Günümüze kadar 13 farklı AQP keşfedilmiştir. Bazı AQP'ler (AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 ve AQP8) sadece suyun geçişini sağlarken, akuagliseroporinler olarak bilinen bir grup AQP(AQP3, AQP7 ve AQP9) gliserol ve daha büyük çözünen maddelerin geçişini de sağlarlar. AQP'ler beyin, böbrek, karaciğer, akciğer, sindirim sistemi, göz ve deri gibi birçok dokuda eksprese edilir. Bazı AQP türleri kalpte de bulunur ve temel olarak su taşınmasında görev alırlar. Bununla birlikte kalpte gliserol taşınması ve pH'nın düzenlenmesinde de görev alırlar.

Miyokard enfarktüsünde hem ödem hem de AQP kanallarının rolleri konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Diğer taraftan melatonin ve kardiyak AQP kanalları arasındaki ilişkiyi ortaya koyan araştırmaya rastlanılamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, MI modeli geliştirilen sıçanlarda melatonin uygulamasının AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7 kanalları üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Böylelikle melatonin MI' da ortaya konulan koruyucu ve iyileştirici etkilerinin miyokard ödemi ve AQP kanalları ile bir ilişkisinin olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu etkinin ortaya konulması için izoproterenol uygulayarak oluşturulan deneysel MI modelinde;

- Elektrokardiyografik veriler,
- Apoptozis belirteçleri olan Kaspaz3, Bcl2 ve BAX ekspresyon düzeyleri,
- Yangı belirteci olarak TNFα gen ekspresyon seviyesi,
- Histopatolojik düzeyde miyokardiyal ödemin varlığı,
- AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7 kanallarının gen ekspresyon seviyeleri sol ventrikül dokusunda incelenmiştir. Elde edilen veriler ile miyokardiyal ödemin anlaşılmasına ve tedavisine katkı sunacak bilimsel sonuçların ortaya konulması amaçlanmıştır.

# 2.GENEL BİLGİLER

## 2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünyada en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Avrupa ülkelerinde bir yılda görülen ölümlerin % 80'e yakınının KVH nedeniyle olduğu bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise her üç ölümden birinin KVH kaynaklı olduğu rapor edilmiştir. Kardiyovasküler hastalıklar tüm kanser türleri ve solunum yolu hastalıklarının neden olduğu ölümlerden daha fazla ölüme yol açmaktadır (Benjamin ve ark., 2017). Dünya Sağlık Örgütü, KVH'a neden olan faktörler olarak, sigara kullanımı, yetersiz ve düzensiz beslenme, fiziksel aktivite eksikliği ile ailede kronik kalp hastalığı öyküsünün varlığınıbelirtmiştir (Van Camp, 2014; Tang ve ark., 2015). Bu nedenle, KVH'ın önlenmesi veya iyileştirilmesinin yanı sıra neden olduğu komplikasyonların da iyileştirilmesi ve önlenmesi birçok bilimsel çalışmanın konusu olmuştur.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 yılı analizi verilerine göre genç yetişkinlerde risk faktörlerini azaltmanın ve 50 yaşına kadar optimum risk profilini sürdürmenin KVH'ın görülme ihtimalini % 90 azaltabileceğini göstermektedir (Capawell ve ark., 2010). Neden olduğu komplikasyonlar ile milyonlarca insanın yaşam kalitesinde ciddi bozulmalara neden olan KVH'ın birçok çeşidi bulunmaktadır. Kalp yetmezliği, koroner kalp hastalığı (KKH) ve MIbunlar arasında sayılabilir (Klocke ve ark., 2007).

## 2.2.Miyokard Enfarktüsü

Genellikle kalp krizi olarak bilinenMI, kalbin bir kısmına kan akışı kesildiğinde veya engellendiğinde ortaya çıkan, kalp dokusunun ölümüne veya hasarına yol açan patalojik bir durumdur. MI'ya, kalpteki miyokardiyal kan akışı ile miyokardiyal oksijen talebi arasındaki dengesizlik neden olur (Upaganlawar ve ark., 2011). Kalp enfarktüsü olarak da adlandırılan koroner arterin tıkanması sonucu kalbe kan akışında kesinti miyokardı oksijen desteğinden yoksun bırakır. Oksijen yetersizliğine

maruz kalan miyokard dokusunda hasar veya nekroz görülür (Ambrose ve Singh, 2015).

İnsanlarda MI, sol kol veya boynun sol tarafında değişen şiddette görülen göğüs ağrısı, nefes darlığı, terleme, halsizlik, bulantı, kusma, aritmi, anksiyete, yorgunluk ve diğer faktörler ile karakterizedir. Miyokard enfarktüsü hastaların yaklaşık % 64'ünde 'sessiz' MI adı verilen göğüs ağrısı olmayan formunda seyreder (Vajreswari ve Narayanareddy, 1992; Upaganlawar ve ark., 2011). Bazı vakalarda ise MI bilinç kaybına ve ani ölüme de neden olmaktadır.

Miyokard enfarktüsü riski yaşla birlikte artar ve 65 yaşından büyük insanlarda çok yüksek bir orana sahiptir. Cinsiyete bağlı insidansına bakıldığında ise erkeklerin kadınlara göre daha fazla risk altında olduğu görülmektedir. Sigara kullanımı, yüksek tansiyon, yüksek kolesterol ve doymuş yağlar bakımından zengin diyetle beslenme, obezite, egzersiz eksikliği,arterioskleroz, stres, ağır egzersizler, uyuşturucu madde kullanımı ve diyabetMI için tanımlanan diğer risk faktörlerindendir (Ithayarasi ve Devi, 1996).

### 2.2.1.Miyokard Enfarktüsünde Biyokimyasal Belirteçler

Miyokard enfarktüsünün tanısında bazı kardiyak enzimlerin kandaki düzeylerinden faydalanılır (Thygesen ve ark., 2008). Kardiyak enzimler olarak, laktatdehidrojenaz, aspartattransaminaz ve kreatinkinazlar (CK) en çok kullanılan enzimlerdir. Kreatinkinaz, kas (M) ve beyin (B) kaynaklı izoenzimlere sahiptir. Kreatinkinaz miyoglobülin (CK-MB), hem enzimatik hem de immünoanaliz ile tüm CK'lardan ayırt edilebilir. CK-MB, hem iskelet hem de kalp kasının sitozolünden üretilir. Miyokard enfarktüsü sonrası kandaki CK-MB düzeyleri hızlı bir şekilde artar, bu nedenle MI'nün erken tanısındayaygın olarak kullanılır (Boateng ve Sanborn,2013).

Sarkomerin ince filamentlerinin bileşenleri olan kardiyak troponin T ve I, MI'nün tanısı için oldukça hassas bir başka iki enzimdir. Bu iki enzimin kan

düzeyleri CK-MB seviyelerinde bir değişiklik olmadığı durumlarda da artış gösterebilir. Kandaki troponin seviyelerinde küçük bir artışın bile kalp kası nekrozunu tanımlamada faydalı olacağı düşünülmektedir (French ve White, 2004).

### 2.2.1.1. Troponinler ve Troponin I

Troponinler, 1965 yılında Ebashi ve Kodoma tarafından keşfedilmiş tüm çizgili kas formlarında bulunan moleküllerdir. Kalpteki troponin formu farklı amino asit sekanslarını nedeni ile diğer formlardan ayırt edilebilmektedir. İlk keşfedildiğinde tek bir protein olarak düşünülen kardiyak troponinler yapılan araştırmalarla alt sınıflara ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre 3 çeşit troponin varlığı ortaya konulmuştur (Hartshorne ve Mueller, 1968). Bunlardan bir tanesi inhibitör olarak görev yaptığı düşünülen troponin I (cTnI)'dır. cTnI aktin-miyozin etkileşimlerini ve $Ca^{2+}$ yokluğunda çapraz köprü oluşumunu önleyerek hücre içi $Ca^{2+}$ 'a yanıtı düzenler. İkinci troponin türü olan troponin T (cTnT), tropomiyozine bağlanır ve troponin kompleksi arasında mekanik bağlantı görevi görür. Üçüncüsü ise troponin C (cTnC) olarak bilinir ve bir $Ca^{2+}$ bağlayıcı alt birim olarak ince filamentin aktivasyonunu düzenler (Farah ve Reinach, 1995).

Troponinler, hem sağlam proteinler hem de bozunma ürünleri olarak miyokardiyumdaki proteolitik hasarlanmaya bağlı olarak miyofibrillerden salınırlar. Troponinlerin kana salınımında 3 enzim grubunun etkin olduğu belirlenmiştir. Bunlardan birincisi $Ca^{2+}$ bağımlı bir sisteinproteaz olan kalpain1'dir. İkincisi apoptoza aracılık eden enzimlerden olan kaspaz3 ve kaspaz9'dur. Üçüncüsü ise, çinko bağımlı bir endopeptidaz olan matris metaloproteinaz-2'dir.Bu enzimler normal şartlarda kanda mevcut olmasına rağmen, kandaki seviyelerindeki artış bu enzimlere en duyarlı olan cTnI'nın ve diğer troponinlerin dolaşımdaki düzeylerinin artışına neden olur (Gaze ve Collinson, 2008; Thygesen ve ark., 2010).

Miyokardiyal hücrelerde kasılan yapıların bileşenleri olan cTnT ve cTnI miyokardiyuma spesifik moleküllerdir. MI durumda bu iki enizimin kandaki miktarlarında artış ortaya çıktığı için biyoberlirteç olarak kullanılırlar. Bununla

birlikte diğer birçok hastalık durumunda da kandaki düzeylerinde artış görülebilir (Blankenberg ve ark., 2019). Ancak, kardiyak olmayan koşullarda kandaki seviyelerindeki yükselişler çok nadir görülür. Bu nedenle, MI tanısı için tercih edilirler. Her iki enzim düzeyi MI semptomlarının başlamasından yaklaşık 4-6 saat sonra yükselmeye başlar, 18-24 saat içerisinde en yüksek düzeyine ulaşır. Miyokard enfarktüsü sonrasındaki 7-10 gün boyunca bile kan cTnT ve cTnI seviyelerinin yüksek kalabileceği belirtilmiştir (Boateng ve Sanborn, 2013).

İzoproterenol ile MI oluşturulan hayvan modellerinde model oluşumunu teyit etmek amacı ile cTnI ve CK-MB seviyeleri ölçülmektedir. Serum troponin ve CK-MB seviyerlerinde görülen artışlar MI oluştuğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir(Açıkel ve ark., 2003; Govindasami ve ark., 2020). Bertinchant ve ark., (2000) yaptıkları bir çalışmada izoprenalin kaynaklı miyokard hasarı oluşturdukları sıçanlarda kardiyak hasarın göstergesi olarak cTn seviyelerini ölçmüşlerdir. Miyokard hasarı oluşturulan sıçanlarda cTnI ve cTnT seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu belirlemişlerdir.Başka bir çalışmada ise MI modeli oluşturulan sıçanlarda kan cTnI seviyesi 589 pg/ml olarak belirlenmişken kontrol grubunda bu değer 489 pg/ml olarak ölçülmüştür (Wang ve ark., 2019).

#### 2.2.1.2. Kreatin Kinazlar ve KreatinKinaz MB

Kreatin kinaz, çizgili kas, düz kas ve beyinde bulunan, kasılma işlevi olan dokularda fosfat üretimi ve kullanımını düzenleyen bir enzimdir. Kreatin kinazın, sitoplazmada üç (CK-MM, CK-MB ve CK-BB), mitokondride ise iki izoenzimi (sarkomerik olmayan ve sarkomerik) bulunur. Serum CK seviyesi, iskelet kası ve miyokardiyumdaki yaralanmalarda hassas bir biyobelirteç olarak kullanılır.Kreatin kinaz izoenzimleri dokulara özgü oldukları için yaralanan doku hakkında daha spesifik bilgi sağlamaktadır. Örneğin CK-MM, kas distrofisi gibi iskelet kası hastalıklarında, CK-MB kalp ve beyin hasarında, CK-BB ise mide-bağırsak sisteminde kötü huylu tümörlerin tespitinde kullanılan dokuya özel biyobelirteçlerdir (Takagi ve ark., 2001).

CK-MB düzeyleri MI'a troponinlerden daha az spesifiktir, ancak dokuya özgü oldukları için CK'ya göre çok daha spesifiktirler. Bu nedenle MI'nün tanısında kardiyak troponinlere en iyi alternatif olarak değerlendirilebilirler. İnsanlarda, kardiyak cerrahi ve miyokardit gibi durumlarda CK-MB izoenziminin serum düzeylerinde artış görülür. Serum CK-MB seviyeleri MI sonrası yaklaşık 4-8 saat içinde artar, 24. saatte en yüksek düzeyine ulaşır ve 48-72 saat içinde normal seviyesine geri döner (Boateng ve Sanborn, 2013).

Kan CK-MB düzeyleri deneysel MI çalışmalarında da yayıgın olarak kullanılır. Sol koroner arterligasyonu ile MI oluşturulan sıçanlarda CK-MB değerleri MI biyobelirteci olarak incelenmiş ve serum seviyelerinde artış görülmüştür (Yu ve Wang, 2018). Başka bir çalışmada ise yine MI oluşturulan sıçanlarda kan CK-MB seviyesikontrol grubunagöre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Du ve ark., 2015). Shukla ve Sharma (2015) yaptıkları çalışmada, izoproterenol (İZO) ile MI modeli oluşturdukları sıçanlardaölçtükleri CK-MB düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Benzer şekilde, İZO ile indüklenen MI modeli oluşturulan başka bir çalışmada da CK-MB seviyesinde artış tespit edilmiştir (Parveen ve ark., 2011).

### 2.2.2. Miyokard Enfarktüsünde Elektrokardiyografik Değişiklikler

Myokard enfarktüsü geçiren hastalardakalpte elektriksel işlev bozuklukları ortaya çıkar. Yapılan çalışmalar MI hastalarının % 90'ından fazlasında aritmi ve iletim anormallikleri görüldüğünü ortaya koymuştur (Gligić ve ark., 2003; Nairooz ve ark., 2014; Dangas ve ark., 2016). Miyokard enfarktüsüne bağlı ortaya çıkan iskemi miyokardda iletim gecikmesini yansıtan uzun T dalgaları oluşmasına neden olur (Thygesen ve ark., 2008). Tam AV blok, ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyon gibi ventriküler artimiler de MI geçiren hastalarda oluşabilir. MI sonrası sinüs düğümü bozuklukları sinüs bradikardisine veya daha sık olarak sinüs taşikardisine yol açabilir. MI hastalarının yaklaşık% 10'unda atriyalfibrilasyon da görülebilir (Boateng ve Sanborn, 2013).

Miyokard enfarktüsünde en tipik belirtiler T dalgası ve ST segmentinde ortaya çıkar. Bu nedenle MI sonrası tanı amaçlı EKG kaydında ST segment elevasyonu değerlendirilir (Thygesen ve ark., 2008). Miyokard enfarktüsü tanısında insanlarda klinik olarak ST segmenti yükselmesi önemli bir veri olarak kabul edilir. Bu veri hayvanlarda deneysel MI çalışmalarında da önemli bir bulgu olarak kabul edilmektedir. Nitekim, İZO ile indüklenen MI modeli geliştirilmiş ST segmentinde yükselme belirlenmiş ve bu yükselmenin MI kaynaklı olduğu kanaatine varılmıştır (Kannan ve ark., 2011). Patel ve ark., (2010) da kendi çalışmalarında benzer bir sonuca ulaşmışlardır.

### 2.2.3. Deneysel Miyokard Enfarktüsü Modelleri

Miyokard enfarktüsü modelleri cerrahi ve kimyasal yöntemler olarak iki ana başlıkta değerlendirilebilir. Her iki yöntemin de birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.Deneysel MI modeli oluşturmak için göz önüne alınan temel mekanizmalar koroner arterin blokajı, koroner arterin bir arterosklerotik plak tarafından tıkanması veya koroner arter spazmı oluşturma esasına dayanır (Wang ve Eitzman, 2013; Dominguez-Rodriguez ve ark., 2014; Hung ve ark., 2014).

#### 2.2.3.1. Cerrahi Yöntemler

Cerrahi yöntemle MI modeli geliştirlmesinin temel mekanizması, koroner arterdeki kan akımının kesilmesi veya engellenmesi ile kalp kasının besin ve oksijen desteğinin azaltılması ve böylelikle miyokard hasarı oluşturulması esasına dayanır (Ambrose ve Singh, 2015). Hayvanlar üzerinde bu modellemeyi gerçekleştirmek için çeşitli cerrahi yöntemler geliştirilmiştir. Hidrolik tıkayıcı ve ameroid sıkıştırıcı, sol koroner arterembolizasyonu ve miyokardiyaliskemi sonrası reperfüzyon (İ/R) uygulanmasıyaygın olarak kullanılanMI indükleme modelleridir (Klocke ve ark., 2007; Silva ve Emter, 2020).

Hidrolik tıkayıcı ile MI oluşturma modeli, oklüderimplantasyonu ile koroner arter dallarının tamamen veya kısmen tıkanması esasına dayalıdaha çok domuz gibi

büyük hayvanlarda kullanılır (Harada ve ark., 1994).Bu yönteme benzer özellikler gösterenameroid sıkıştırıcı MI modeli ise, implantasyon şeklindeki farklılıktan dolayı hidrolik tıkayıcı modelinden ayrışır (Roth ve ark., 1987). Koroner arter embolizasyonu, MI oluşturmak için kullanılmasının yanı sıra iskemikkardiyomiyopati oluşturmak amacı ilede büyük hayvanlarda sık tercih edilen MI modelidir. Bu modellemenin esası,agaroz veya polistiren boncuklar ile intrakoronerembolizasyon oluşturulmasına veya intrakoroner otojen kan enjeksiyonuna dayanmaktadır (Sabbah ve ark., 1991). Bu teknik, miyokardiyumda giderek artan iskeminin kronik etkilerini göstermede başarılı omasına rağmen, enfarkt alanlarının tutarlılığı ve tekrarlanabilirliği konusunda yetersiz kalmaktadır (Silva ve Emter, 2020).

Yaygın kullanılan bir diğer cerrahi teknik ise İ/R modellemesidir. Bu modelde miyokardiyuma giden koroner kan akışı kapatılır (iskemi) ve ardından iskemik alana kan akışının yeniden başlamasına izin verilir (reprfüzyon). Bu modelde, kalsiyum yüklenmesi ve oksidatif stresin neden olduğu miyokardiyal hasar ortaya çıkar. Aynı zamanda mikrovasküler sistem ve endoteldisfonksiyon da şekillenir. Bu yöntem çoğunlukla sol ön inen koroner arter veya sol sirkumfleks koroner arterin kapatılması şeklinde uygulanır (Silva ve Emter, 2020).

En sık kullanılan model sol ön inen koroner arterin cerrahi olarak kapatılmasına dayalı ligasyon modelidir vebirçok hayvan türünde uygulamaya elverişli olması nedeniyle tercih edilmektedir. Bu model, insanlarda görülen MI vekonjestif kalp yetmezliğine oldukça benzer şekilde doku hasarına sebep olur (Bayat ve ark., 2002). Koroner arter ligasyonu modellemesinde, kan akışı tam olarak bloke edilir ve geri döndürülemez hipoksi meydana gelir. Bu durum da kalp dokusunda enfarktealanın oluşmasına ve hasara neden olur. Bu avantajlarının yanı sıra koroner arter ligasyonu modeli yüksek mortaliteye sebep olması gibi bir dezavantaja da sahiptir (De Villiers ve Riley, 2020).

Koroner arterde kan akışının durdurulması esasına dayalı cerrahi MI modellemelerinde en büyük sınırlayıcı faktör miyokardiyumavasküler akımın kalıcı olarak durdurulmasının klinik olarak nadiren görülmesidir (Silva ve Emter, 2020). Bununla birlikte bu model, sıçanlara yalnızca enfarktüs sonrası yeniden şekillenme

sürecinin patofizyolojisini incelemek amacı ile değil, aynı zamanda olumsuz durumlar için farmakolojik ve/veya terapötikstratejilerin etkinliğini test etmek için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Klocke ve ark., 2007).

#### 2.2.3.2. Kimyasal Ajanlarla MI Oluşturulması

Cerrahi tekniklerin dezavantajları nedeniyle geliştirilen kimyasal MI hayvan modellerinden biri İZOile indüklenen MI modelidir. İZOile indüklenen sıçan MI modeli cerrahi modellere göre etkinlik, pratiklik, güvenilirlik ve düşük mortalite ve morbidite oranıgöstermesi gibi avantajlara sahiptir. Non-invaziv bir yöntem olması bu modelin tercih edilmesine sebep olan bir diğer faktördür (Wong ve ark., 2017).

Açık adı 4-[1-hidroksi-2- (propan-2-ilamino) etil] benzen-1,2-diol olan İZO, bir β adrenerjik reseptör-agonisti olansentetik bir katekolamindir (Upaganlawar ve ark., 2011; Liu ve ark., 2013). İZO uygulaması ile kalpte ilk olarak bazı biyokimyasal ve elektrofizyolojik değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikleri takiben kalp kasında histopatolojik düzeyde bozulmalar da ortaya çıkar. İZO uygulaması sonrasında; kardiyak disfonksiyon, artmış lipidperoksidasyonu,miyokardiyallipid seviyesinde artış, miyokardiyal nekroz, ödem, apoptoza, oksidatif stresbulguları rapor edilmiştir (Patel ve ark., 2010; Liu ve ark., 2013; Meeran ve ark., 2020). Bu nedenlerden dolayı İZO ile indüklenen MI sıçan modeli, çeşitli kardiyak işlev bozukluklarını değerlendirmek ve çeşitli doğal veya sentetik kardiyoprotektif ajanların etkinliğini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Upaganlawar ve ark., 2011; Liu ve ark., 2013).

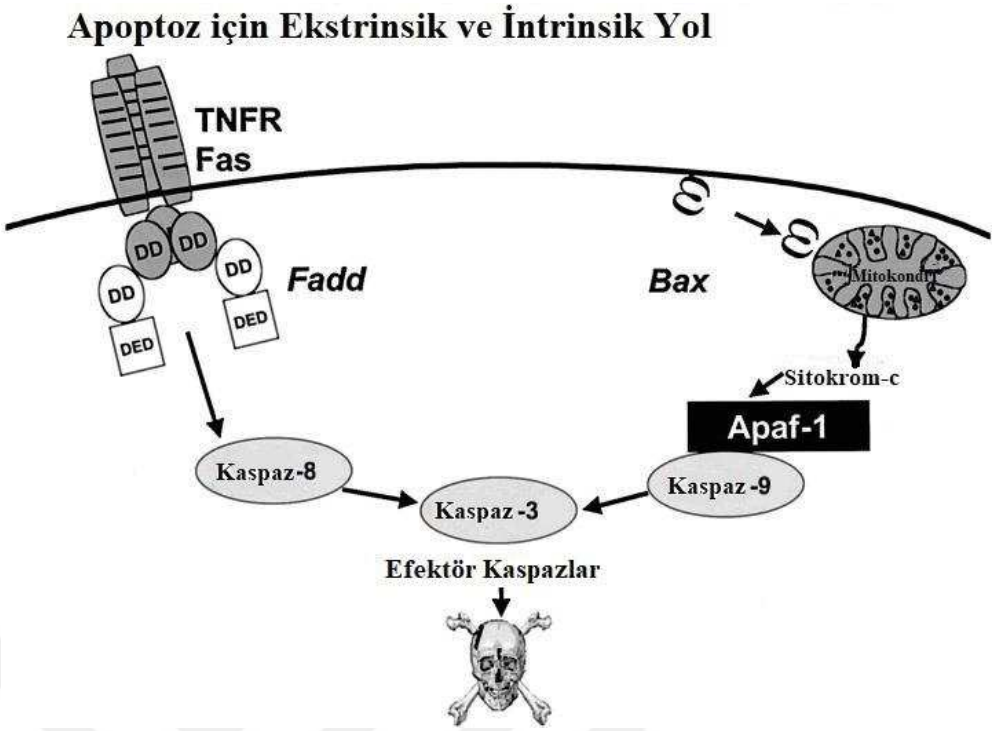
### 2.2.4. Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin düzgün işleyişi ve gelişimi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü dâhil olmak üzere çeşitli süreçlerde önem taşıyan bir mekanizmadır (Elmore, 2007). Apoptoz, gelişim ve yaşlanma sırasında doku ve hücreleri korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptoz

bağışıklık reaksiyonlarında olduğu gibi bir savunma mekanizması olarak da ortaya çıkabilir. Böyle durumlarda apoptoz, hücrelerin hastalık ve zararlı maddeler tarafından hasar gördüğü durumlarda faydalı bir mekanizma olarak değerlendirilir (Norbury ve Hickson, 2001).

Yapılan çalışmalarda, ekstrinsik ve intrinsik yolak olmak üzere iki apoptoptik yolak bildirilmiştir. Perforin\Granizm yolağı olarak üçüncü bir apoptotik yolak olarak tespit edilmiş olsa da bu konuda sınırlı düzeyde bilgi bulunmaktadır. Apoptozun düzenlenmesinde; kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler rol oynar (Igney ve Krammer, 2002; Martinvalet ve ark., 2005; D'Arcy, 2019).

Apoptoz sırasında kaspaz aktivasyonu iki yolla gerçekleştirilir. Ekstrinsik yol, TNFα , TRAIL ve CD95 ligand dâhil olmak üzere çeşitli apoptoz indükleyici sitokinlerin kaspaz8'in aktivasyonuna yol açan ilgili reseptörlerine bağlanması ile aktive edilir (Peter ve Krammer, 2003). İntrinsik yol, sitokrom-c ve mitokondriyal zarlar arası boşluk proteinlerinin, sırası ile kaspaz9'u aktive etmesi ve apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) sitozole salınması ile etkin hale gelir. Aktive edilmiş kaspaz8 ve kaspaz9, daha sonra kaspaz3 ve kaspaz7 gibi efektör kaspazları aktive eder. Bu aktivasyon hücre içi apoptozun başlaması ile sonuçlanır (Lindsten ve ark., 2000; Reed, 2000).




**Şekil 1.**Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolakları (Reed, 2000).

### 2.2.4.1. Kaspazlar ve Kaspaz3

Apoptozun başlaması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein-aspartik proteazın aktivasyonu ile gerçekleşir. Kaspazlar başlatıcı kaspazlar, uygulayıcı kaspazlar ve inflamatuarkaspazalar olmak üzere üç grup olarak incelenir (Elmore, 2007). Hücre hasarı tespit edildiğinde, başlatıcı kaspazlar (kaspaz8 ve 9) akif hale gelir ve uygulayıcı kaspazların (kaspaz 3, 6 ve 7) aktif forma dönüşmesini sağlarlar. Uygulayıcı kaspazların aktivasyonu, endonükleazların aktivasyonu, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin yok edilmesi, proteinlerin çapraz bağlanması, fagositik hücreler için ligandların ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi sonuçların meydana geldiği bir dizi olaylar zincirini başlatır (Poon ve ark., 2014). Apoptoz sürecinde önemli bir faktör olan kaspaz3, prokaspaz3'ün aktif formudur. Kaspaz3, kaspaz8, kaspaz9, kaspaz10 ve granzimB tarafından aktive edilebilir (Fan ve ark., 2005).

Yapılan birçok çalışma MI'da apoptozun önemli bir patagonez olduğunu göstermiştir (Zidar ve ark., 2006; Burke ve Virmani, 2007; Yuan ve ark.,2019; Hu ve ark., 2020). MI oluşturulup kaspaz3 inhibisyonu ile MI nedeniyle oluşan apoptozun engellenmesinin amaçlandığı bir çalışmada, kaspaz3'ün inhibe edilmesi ile kardiyak fonksiyonlarda görülen bozuklukların ve kalp kasında ortaya çıkan hasarların düzeldiği görülmüştür (Chandrashekhar ve ark.,2004).

#### 2.2.4.2. Bcl2 Ailesi Proteinleri

Apoptozda mitokondriye bağımlı yol, Bcl2 ailesi proteinleri tarafından yönetilir. Bcl2 ailesi proteinleri birçok canlı çeşidinde bulunur. Hem proapoptotik hem de antiapoptotik Bcl2 ailesi proteinleri mevcuttur. Buproteinlerin çoğu fiziksel olarak birbirine bağlanır. Birçok patolojik durumda hücrede Bcl2 gen ekspresyonu artar ve apoptoz süreci başlar (Reed, 1997). Bugüne kadar yapılan araştırmalar sonucu Bcl2 protein ailesinin 20'den fazla üyesi tanımlanmıştır. Bunların arasında Bcl2 antiapoptotik protein olarak sınıflandırılırken BAX proapoptotik protein olarak sınıflandırılmıştır (Reed, 1996).

Bcl2 proteini, apoptozu kontrol etmede ve hücre sağkalımını artırmada önemli bir rol oynar (Bruckheimer ve ark., 1998). Bcl2 geni ilk olarak insan foliküler B hücresi lenfomalarınınkromozomal kırılma noktasında tanımlanmıştır. Bcl2'nin proliferasyonu teşvik etmekten çok programlanmış hücre ölümünü engellediği kanıtlanmıştır (Korsmeyer, 1999). Bcl2 mitokondri, endoplazmikretikulum ve nükleer membranlarda, ayrıca reaktif oksijen türlerinin oluşum bölgelerinde lokalize olmuştur. Bcl2 hücrelerdeoksidatif hasarı önler (Korsmeyer ve ark., 1993).

Deneysel MI modeli oluşturulmuş farelerde hesperetininantiapoptotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Bcl2 gen ekspresyon seviyelerideğerlendirilmiştir.Bu çalışmada, MI oluşturulan gruplarda Bcl2 gen ekspresyon seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Meng ve ark., 2018). Başka bir çalışmada ise, miyokardiyaliskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda apoptoz oluşumu ve remifentanilininantiapoptotik etkileri araştırılmış veiskemi/reperfüzyon sonrasında Bcl2 gen ekspresyon seviyelerinde artış belirlenmiştir (Li ve ark., 2018). Her iki

çalışmada da, Bcl2'deki artışlar artan apaoptoza karşı antiopoptotik bir ajan olarak etki göstermesine bağlanmıştır. Bu sonuçlar myokardial hasarı ve apoptozu azaltmak için uygulanan moleküllerin etkisini incelemek amacı ile yapılan çalışmalarda Bcl2'yi hedef bir protein haline getirmiştir.

### 2.2.4.3.Bcl2 ile İlişkili X Proteini (BAX)

Bcl2 ile ilişkili X proteini, Bcl2'nin homolog bağlanma partneri olarak tanımlanmıştır. Stres uyaranlarına yanıt olarak ortaya çıkar Bcl2'nin aksine apoptozuteşvik eder (Edlich, 2018).BAX mitokondriyalapoptotik yolun aşağı akış medyatörü olarak kabul edilirler. Nitekim, BAX ekspresyonunun azaldığı durumlarda çoğu apoptotik tepkinin ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Aksine aktive edildiklerinde, BAX dış mitokondriyalmembranı geçirgen hale getirir. Daha sonra kaspazların aktivasyonuna sebep olan sitokrom-c gibi proapoptotik faktörlerin serbest bırakılmasına yol açar (Wong ve Puthalakath, 2008).BAX'ın aktivasyonu, hücre içiapoptoz yolağında geri dönüşü olmayan ilk adımdır ve genellikle hücre ölümüne kadar giden bir süreci başlatır(Edlich, 2018).

İZO ile indüklenen MI modeli oluşturulan sıçanlarda yapılan bir çalışmada MI sonrası apoptoz değerlendirmesi için BAX gen ekspresyonu düzeyi belirlenmiş vebu değerde bir artış olduğu gözlenmiştir (Jiang ve ark., 2019). Benzer bir sonuca ulaşılan başka bir çalışmada iseα- bisabolol uygulanması ile BAX gen ekspresyon seviyesinde azalma olduğu belirlenmiştir(Meeran ve ark., 2020). MI modeli oluşturulmuş sıçanlarda BAX gen ekspresyon seviyelerinde artış belirlenen başka bir çok çalışma daha bulunmaktadır (Sui ve Gao, 2014; Du ve ark., 2015).

### 2.2.5. İnflamasyon ve Tümör Nekroz Faktör α

Tümör Nekroz Faktörα (TNFα), inflamasyonun ana düzenleyicisi moleküllerden bir tanesidir ve sitokin ağında kilit bir role sahiptir.Aynı zamanda birçok hücre tipindebüyüme ve farklılaşmayı da düzenler. Yangı sırasında makrofajlar/monositler tarafından üretilen enflamatuar bir sitokin olanTNFα,programlanmış hücre ölümü,

nekroz, proliferasyon ve inflamasyonu da içeren birçok farklıfizyolojik süreçte görev alır (Micheau ve Tschopp, 2003;Balkwill, 2009). TNFα, etkilerini bir trimer olan TNFR-1 olarak adlandırılan 55 kDa'lık bir hücre zarı reseptörüne veya TNFR-2 olarak adlandırılan 75 kDa'lık bir hücre zarı reseptörüne bağlanarak gösterir (Idriss veNaismith, 2000).

TNFα'nın endojen bir pirojen olarak vücutta yüksek ateşe de neden olduğu tespit edilmişitr. TNFα seviyesinde azalma kaşeksi, zayıflama sendromu ve depresyona neden olabilir. TNFα sadece kendi sekresyonunu indüklemekle kalmaz, aynı zamanda diğer inflamatuarsitokinlerin ve kemokinlerin üretimini de uyarır (Chu, 2013).

TNFα kardiyak stresi takiben incelenen en yaygın proinflamatuar sitokinler arasındadır. Miyokardiyal enfarktüsün akut fazı sırasında hücre hasarına yanıt olarak sitokinlerin üretimi gerçekleşir. Miyokard enfarktüsünde sitokin salınımına neden olan etkenler arasında iskemi-reperfüzyon sırasında salınan reaktif oksijen türleri, hücrehasarı ve mekanik stres sayılabilir (Gullestad ve ark., 2012). Deneysel bir çalışmada, enfarktüs alanının çok büyük olmasının özellikle enfarktüs olmayan bölgelerde de TNFα gen ekspresyonunda artışa sebep olduğunu gösterilmiştir (Ono ve ark., 1998). Birçok farklı dokuyu etkileyen TNFα, kalp kasını da etkilemekte, miyokardın kasılabilirliğini azaltarak doku perfüzyonunun bozulmasına yol açmaktadır. TNFα bu etkisini,kardiak miyositteki NOS'u aktive ederek argininden, sitrülin ve NO oluşmasını sağlayarak gerçekleştirir (Müller-Werdan ve ark., 1997).

TNFα'nın MI'daki etkinliği, sadece bir sitokin yolağını tetikleyicisi olması ile sınırlı değildir.Nitekim, TNFα reseptörleri olmayan ve MI modeli oluşturulan farelerdedaha büyük enfarktüs alanları ve artmış apoptoz düzeyi belirlenmiştir (Kurrelmeyer ve ark., 2000). MI modeli oluşturularak yapılan başka bir çalışmada ise, enfarkte olmuş alanın yanı sıra sağlam dokuda da TNFα gen ekspresyonlarında artış gözlenmiştir (Jacobs ve ark., 1999).

### 2.2.6. Miyokardiyal Ödem

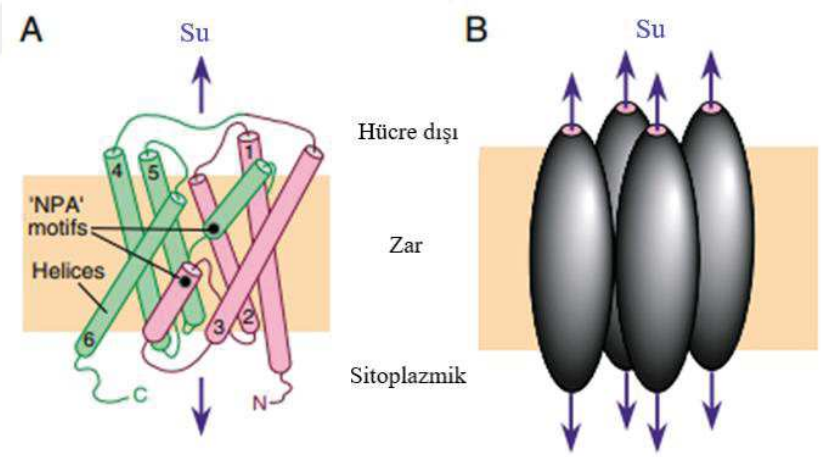
Miyokard enfarktüsü artmış vasküler geçirgenliğe bağlı olarak vazojenik ve interstisyel ödeme yol açabilir. Miyokardiyal ödem MI'da miyositlerde iskemik faz sırasında oluşmaya başlar ve reperfüzyonun ilk dakikalarında aniden artış gösterir. İnterstisyel boşluk içindeki hidrostatik basıncı artırarak kılcal kompresyona ve hücre hasarının şiddetlenmesine neden olur (Thuny ve ark., 2012).

Hem akut hem de kronik miyokardiyal ödemin kardiyak işlevlerde bozulmalara yol açtığı bilinmektedir. Miyokardiyal ödem öncelikli olarak diyastolik işlevler başta olmak üzere kalp kasının etkin pompalama yeteneğini önemli oranda azaltır (Egan ve ark., 2006). Kalp kasının interstisyel alanındafazla sıvı birikmesi interstisyel fibrozu güçlendirir ve bunun bir sonucu olarakda kardiyak işlevleri bozabilir. Aşırı miyokardiyal interstisyel sıvı veya miyokardiyal ödem varlığı sol ventrikülün uyumunu da azaltır. Miyokardiyal ödem damar çökmesine ve reperfüzyon aritmilerine de neden olur. Bu nedenle, vasküler geçirgenliği ve ortaya çıkan ödemi azaltmak, akut MI tedavisi için dikkat çekici bir terapötik yaklaşım olarak görülmektedir (Laine ve Allen, 1991; Weis ve ark., 2004).

Miyokard enfarktüsü sonrası görülen apoptoz, nekroz veya inflamasyon gibi komplikasyonların tedavi edilmesi ve önlenmesi birçok çalışmanın konusu olmuştur. Bununla birlikte birçok teröpatik hedefin etki mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır (Wang ve ark., 2018). Miyokardiyal ödemin azaltılması ve önlenmesi de diğer komplikasyonlar kadar önem taşımaktadır. Ayrıca MI sonrası görülen miyokardiyal ödemin azlatılmasında kullanılan teröpatik maddelerin etki mekanizmaları da araştırılmaya açık bir konudur. Hücrelerde su taşınımından sorumlu olan aquaporin kanalları miyokardiyal ödemin önlenmesinde ve iyileştirilmesinde yeni bir teröpatik hedeftir (Huang ve ark., 2019). Bununla birlikte melatonin kalpte kardiyoprotektif etkileri iyi bilinen bir hormondur (Pourhanifeh ve ark., 2020). Melatoninin bu etkileri altında yatan mekanizmalar yeterince araştırılmış olsa da, MI sonrası görülen miyokardiyal ödem üzerine gerçekleştirdiği etkilerin altında yatan mekanizmalardan birinin aquaporin kanalları ile ilişkili olup olmadığına dair literetürde yeterince bilgi bulunmamaktadır.

### 2.2.7. Aquaporinler

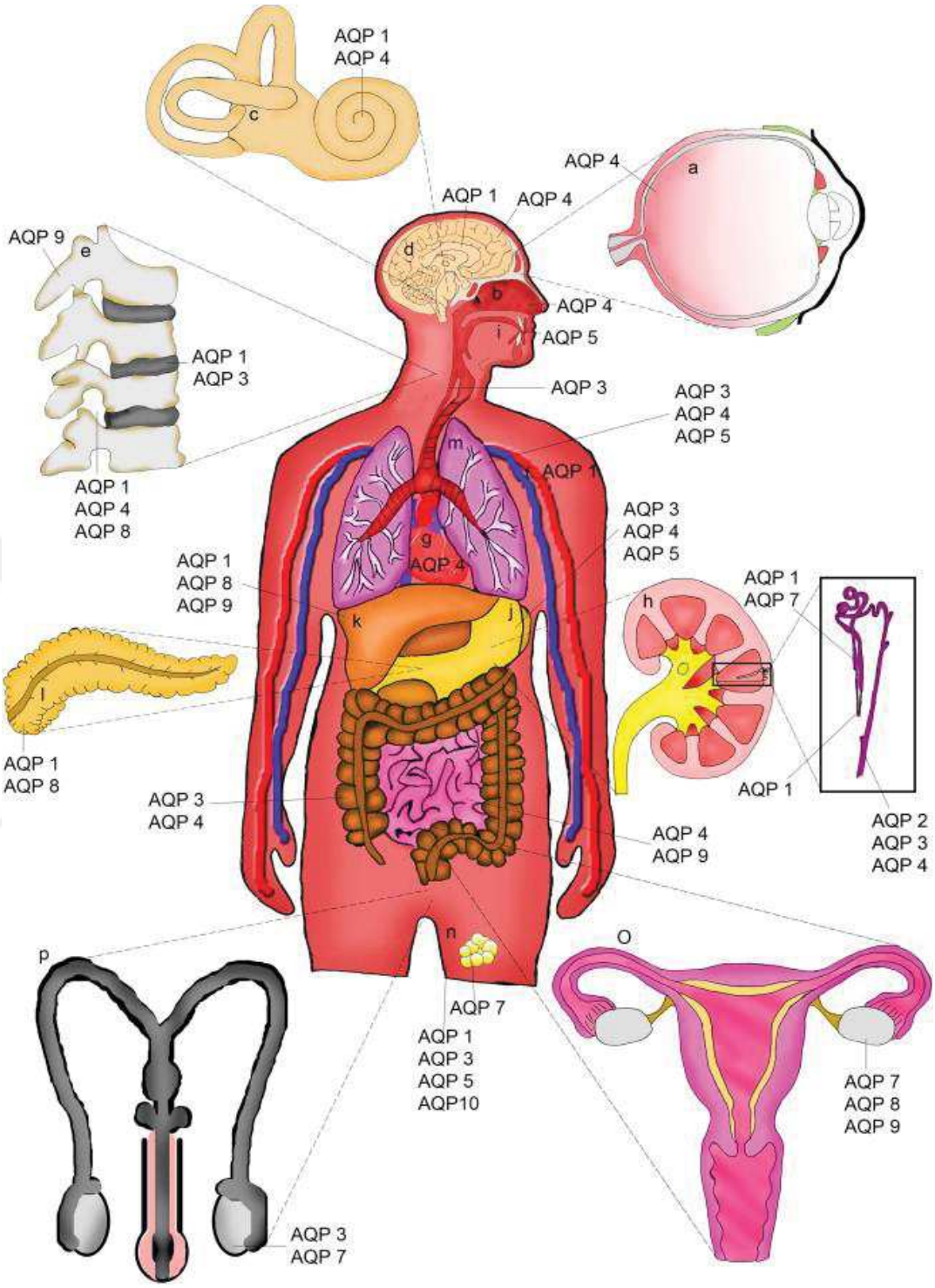
Aquaporinler (AQP'ler), suyu ozmotik gradient farkına göre plazma membranı boyunca taşıyan bir entegre plazma membran protein ailesidir. AQP1'in 1991 yılında keşfedilmesi ile bu alanda çalışmalar önem kazanmıştır. Yapılan araştırmalar ile AQP'lerin 13 üyesi (AQP0-12) tanımlanmıştır (Ishibashi ve ark., 1994; Agre ve Kozono, 2003 ). AQP'ler iki alt grup altında incelenmektedir. AQP 0,1,2,4,5, 6 ve 8 sadece suya geçirgen olan AQP'ler olarak tanımlanmışdır. Gliserol gibi diğer küçük moleküllerin, $CO_2$ ve $NH_3$ gibi gazların, hidrojen peroksit, arsenik, bor ve silikon gibi yüksüz iyonların geçişini sağlayan AQP 3,7 ve 9 kanalları ise aquagliseroporin olarak adlandırılmıştır (Ishibashi ve ark., 2009; Roche ve Törnroth-Horsefield, 2017). AQP'ler vücutta, beyin, kalp, böbrekler, göz ve karaciğer gibi çeşitli dokularda ve hücrelerde eksprese edilir (Day ve ark., 2014; Verkman ve ark., 2014).




**Şekil 2.**AQP'lerin yapısı (Verkman ve ark., 2005).

AQP kanallarının yapısı, elektron ve X-ışını kırınımı kullanılarak tanımlanmıştır. Kanallar genellikle asparajin-prolin-alanin (NPA) şeklinde üç aminoasit dizisi içerirler (Wu ve Beitz, 2007). AQP'ler, dört özdeş monomerin

homotetramerik yapı oluşturduğu proteinlerdir. Bu yapıların her biri su kanalı gibi davranmaktadır. Monomerler, yakınındaki diğer iki monomerle etkileşime girer. Dört bitişik monomerin tümü merkezi gözenek adı verilen tetramer yapısını oluşturur. Monomerlerin su geçişini sağlamasına ek olarak su moleküllerini uzaklaştırma rolünün olduğu da tespit edilmiştir. Merkezi gözeneğin bazı gazları hücre zarından geçirdiği ve belirli katyonlar için taşıyıcı olduğu ileri sürülmüştür (Kreida ve Törnroth-Horsefield, 2015). Difüzyonda su geçişi çift taraflı olmasına rağmen, AQP'ler ozmotik gradient veya hidrolojik gradient tarafından kontrol edilen tek taraflı geçişe izin verirler (Preston ve ark., 1993).




**Şekil 3.**İnsan vücudunda farklı dokularda AQP kanallarının dağılımı (Day ve ark., 2014).

Birçok canlı türünde eksprese edilen AQP'ler çeşitli patolojik süreçlerde de etkinlik gösterirler. Seçici geçirgenözelliğe sahip olmaları AQP'leri birçok hastalığın tedavisinde hedef kanallar haline getirmiştir. Kanser dokusunda AQP5 ekspresyonunun yukarı regülasyonu olduğu gözlemlenmiştir (Chen ve ark., 2017). Başka bir çalışmada ise, farklı AQP5 ekspresyonuna sahip akciğer kanseri hücreleri tümör hücre biyolojisi için iki önemli parametre olan hücre proliferasyonunu ve göçünü incelemek için kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, düşük AQP5 ekspresyonlu kanser hücrelerinde proliferasyon ve metastaz potansiyelinin azaldığı, yüksek AQP5 ekspresyonuna sahip kanser hücrelerinde ise proliferasyon ve migrasyon potansiyelinin arttığı tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2010). Optik sinir hasarı oluşturulan bir çalışmada AQP4'ün inhibisyonunun retina gangliyon hücrelerinin kaybını ve retina hasarlarını arttırdığı gösterilmiştir (Nishikawa ve ark., 2016). Travmatik beyin hasarı modelinde hasarlı bölgede AQP4'ün yukarı regülasyonunun meydana geldiği bildirilmiştir. AQP4'ün fizyolojisini ve beyin hasarını takiben düzenlenmesinin incelenmesi, kafa travmasına eşlik eden serebral ödem için yeni tedavilerin geliştirilmesine izin verebileceği söylenmiştir (Sun ve ark.,2003). AQP blokerlerinin hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliğinde akuaretik, kafa travması veya felç sonrası beyin ödemi inhibitörleri, pulmoner ödem modülatörleri ve artmış kafa içi ve göz içi basıncı düzenleyicileri olarak klinik uygulamaları olabileceği düşünülmektedir (Verkman ve Mitra, 2000). Yapılan bir çalışmada, çoğalan tümör mikrodamarlarında AQP1'in güçlü ekspresyonu gösterilmiştir. Bu bilgiye dayanarak AQP1'in tümör anjiyogenezinde önemli bir role sahip olabileceğini düşünülmektedir (Kaneko ve ark., 2008). Literatürde yer alan tüm bu çalışmalardan elde edilen bilgilere bakılarak AQP'ler birçok patalojik durumda tedavi edici veya önleyici bir hedef olarak düşünülebilir.

#### 2.2.7.1. Aquaporinler ve Kalp

AQP'ler birçok dokuda olduğu gibi kalp dokusunda da eksprese edilmektedir. İnsan ve hayvanlarda kalpte bulunan AQP kanalları açısından farklılıklar bulunmaktadır. AQP1, AQP4, AQP7 ve AQP9 dahil olmak üzere bazı AQP'lerin

kardiyovasküler sistemde endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri gibi birçok dokuda eksprese olduğu bilinmektedir (Tie ve ark., 2017). Verkerk ve ark (2019) yaptıkları bir çalışmada,insan kardiyak AQP'lerinin AQP1, AQP3 ve AQP7'den oluştuğunubelirtmişlerdir.

Kalp dokusunda eksprese edilen AQP çeşitleri ile ilgili kesin bilgiler olmamakla birlikte bu konuda araştırmalar halen devam etmektedir. Kardiyak AQP'ler, kardiyovasküler fonksiyonda ve kalp yetmezliği, hipertansiyon ve anjiyogenez gibi ilgili hastalıkların patolojik sürecinde rol oynarlar. Bu nedenle, KVH önlemek ve tedavi etmek için AQP'ler ile kardiyovasküler sistem arasındaki ilişkinin aydınlatılması önem arz etmektedir (Tie ve ark., 2017).

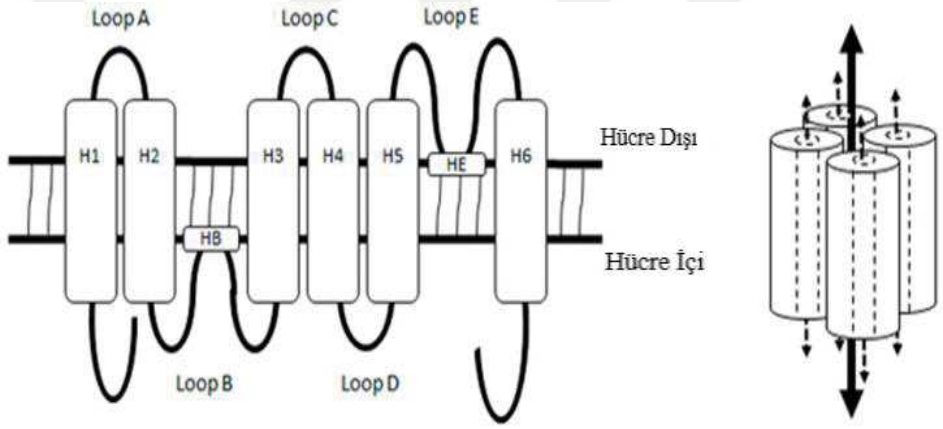
Kardiyak AQP kanallarının önemi, kardiyak ödemin kalp işlevlerini önemli oranda azalttığının belirlenmesi ile artmıştır (Butler ve ark., 2006). Kardiyak ödem öncelikli olarak diyastolik işlevler başta olmak üzere kalp kasının etkin pompalama potansiyelini önemli oranda azaltır (Egan ve ark., 2006). Kardiyak AQP kanalları birçok dokuda olduğu gibi kalp kasında da su transportundan sorumludurlar ve fizyolojik şartlarda kardiyomyositlerde su transportunun % 30'unu AQP kanalları gerçekleştirir. Patolojik durumlarda ise sıvı transportu büyük oranda AQP'ler tarafından yürütülür(Rutkovskiy ve ark., 2012). Miyokardiyal ödemin yaşamı tehdit eden bir olgu olması, MI sonrası miyokardiyal ödem ortaya çıkması, AQP kanallarının sıvı ve solüt transportunu düzenleyen ajanlar olması bu alanda yapılacak çalışmaları oldukça değerli kılmaktadır.

#### 2.2.7.2. Aquaporin 1

Aquaporin 1 (AQP1), moleküler olarak tanımlanan ilk akuaporindir ve ilk kez Peter Agre tarafından belirlenmiştir (Preston ve ark., 1992). AQP1 böbrek medulla ve korteksi, koroidpleksus, kan-beyin bariyerindeki mikro damarlar, nöronlar, korneal endotelyum, lakrimal bezler, lens epitel hücreleri, peritoneal mezotelyum, kırmızı dalak pulpası, bağırsak kript hücreleri, pankreas kanalları, kondrositler, safra

kesesi, tüm solunum sisteminin epiteli, kalpve iskelet kaslarında bulunur (Rutkovskiy ve ark., 2012).

AQP1, plazma membranını boydan boya kateden bir tetramer olarak düzenlenmiştir. AQP1 monomeri, beş döngü (A – E) ile birbirine bağlanan altı eğimli α-sarmal alanlardan (H1 – H6) oluşan ~ 28 kDa'lık bir proteindir. Döngü B ve E'de bulunan iki NPA motifini içeren ilmeklerin oluşturduğu gözenekler su ve çözünen maddeleri taşırken, AQP1 homotetramerinin merkezi gözeneğinin gaz ve bazı iyonları taşıdığı bildirilmiştir (Tomita ve ark., 2017).




**Şekil 4.** AQP 1'in yapısı. (Tomita ve ark., 2017).

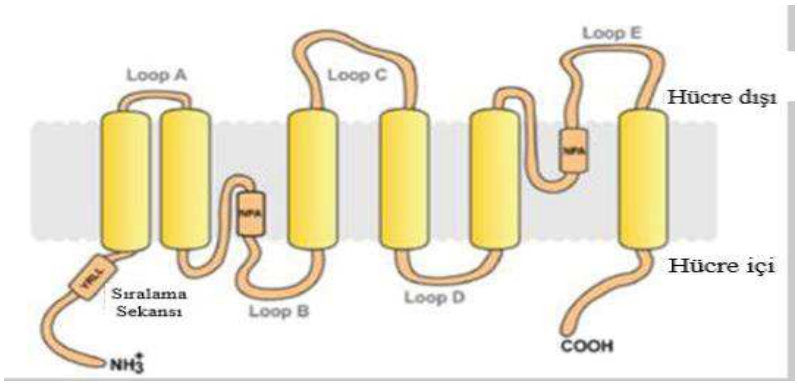
AQP1 birçok organda su transportundan sorumlu bir aquaporin kanalıdır. Bu özellikleri sayesinde böbreklerde idrarın, gözde ise aguoz sıvısının oluşmasına katkı sağlar (Zhang ve ark., 2002). AQP1 beyinde serebrospinal sıvının da oluşmasını sağlayan kanallardan bir tanesidir (Nesic ve ark., 2008). AQP1'in sıvı tarnsportunun yanı sıra $CO_2$ için de bir taşıyıcı kanal işlevi gördüğü bildirilmiştir (Endeward ve ark., 2006). Diğer taraftan, AQP1'in $NH_3$, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve oksijen için de taşıyıcı işlev gördüğü bilinmektedir (Musa-Aziz ve ark., 2009; Almasalmeh

ve ark., 2014). Kardiyovasküler sistemin ana AQP'i, endotel tabakasından kana su akışına aracılık ederek kalbin kılcal ağlarının su geçirgenliğini düzenleyen AQP1'dir. AQP1, interstisyel boşluktan kılcal damarlara fazla suyun emilmesine yardımcı olmaktadır (Day ve ark., 2014).

Kardiyopulmoner baypas uygulanan koyun kalplerinde yapılan incelemelerde miyokard ödemine bağlı olarak AQP1 seviyesinde artışlar olduğu gözlenmiştir (Ding ve ark., 2013). AQP1'in sıçan kalp dokusunda bulunup bulunmadığına ilişkin bilgiler ise oldukça sınırlıdır. Diğer tarfatan,AQP'nin sıçan kalp dokusundaki işlevlerine ilişkin yeterli sayıda araştırma da bulunmamaktadır. Bu nedenle AQP1 ile kalp işlevleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar önem taşımaktadır. AQP1 gen ekspresyonlarının yaşlı sıçanlarda da bulunduğu ve sarkolemmal yerleşim gösterdiği belirtilmiştir.

### 2.2.7.3. Aquaporin3

AQP su kanalı ailesinin bir üyesi olan Aquaporin 3 (AQP3), su, gliserol ve $H_2O_2$ dâhil olmak üzere birçok küçük molekülün de hücre membranından geçişini sağlar (İshibashi ve ark., 1994; Verkman ve ark., 2014).




**Şekil 5.** AQP3'ün yapısı (Marlar ve ark., 2017).

Birçok doku ve organ sisteminde AQP3 kanalları konusunda güncel çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar ile AQP3'ün inflamasyonu azaltarak doku hasarını engellediği gösterilmiştir (Hara-Chikuma ve ark., 2020). Başka bir çalışmada toplama kanalındaki ana hücrenin bazolateral membranında eksprese edilenAQP3'ün su çıkışını kolaylaştırmada ve idrar konsantrasyonunu sağlamada önemli olduğu kanıtlanmıştır (Roudier ve ark., 2002). Başka bir çalışmada ise,AQP3'ün GI sistemde, kolitin neden olduğu hasarlı kolon epitelinin rejenerasyonunu sağladığı bildirilmiştir. Gliserolün taşınmasının, özellikle kolitli AQP3 yoksun farelerde bozulmuş geri emilimin oral gliserol uygulamasıyla kolaylaştırılması açısından önemli olduğu düşünülmektedir (Thiagarajah ve ark., 2007).

Melatonin AQP3 ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, melatonin uygulamasınınrenal AQP3 ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir (Ewida ve ark., 2016). Birçok farklı dokuda ekprese edildiği ve farklı görevler yerine getirdiği tespit edilen AQP3'ün insan, ve fare kalp dokusunda da ekprese edildiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Butler ve ark., 2006). Bununla birlikte, sıçan kalbinde AQP3'ün bulunup bulunmadığı konusunda birbiri ile çelişen veriler vardır (Egan ve ark., 2006).

#### 2.2.7.4. Aquaporin 4

Aquaporin 4 (AQP4) beyindeki baskın akuaporindir ve beyin dokusunda astroglial hücrelerin perivasküler membranında bulunmaktadır. AQP4'ün bir ozmoreseptör olarak işlev gördüğü ileri sürülen vazopressin salgılama nöronlarını çevreleyen glial lamellerde, serebrospinal sıvıyla dolu boşlukları kaplayan ependimal hücrelerde ve retinada eksprese edildiği gösterilmiştir (Nielsen ve ark., 1997). AQP4 knockout farelerde, beyin su içeriğini belirlemek için ıslak/kuru kütle yöntemi kullanılarak ölçülen beyin su içeriğinde % 31'lik bir düşüş gözlenmesi, beyin su içeriğinin önemli düzeyde AQP4'e bağlı olduğunu düşündürmektedir (Haj-Yasein ve ark., 2011). Beyin iskemi modeli oluşturulup beyin su içeriğine bakılan başka bir çalışmada ise,iskeminin neden olduğu beyin ödeminin AQP4 yoksun farelerde daha

az olduğu tespit edilmiştir. İskemi sonrası beyinde AQP4'ün inhibe edilmesinin, beyin ödemi gelişimini sınırlayarak beyin hasarını azaltacağı düşünülmüştür (Papadopoulos ve Verkman, 2007).

Farklı türlerde yapılan araştırma sonuçlarına göre kalp dokusunda AQP4'ün interkale disklerde eksprese edildiği görülmüştür. Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise AQP4'ün ventriküler miyokardda bulunmadığı belirtilmiştir (Butler ve ark.,2006).

AQP4 ile MI arasındaki ilişki de araştırmaların konusu olmuştur. Yapılan bir çalışmada, MI sonrası AQP4 gen ekspresyonlarında 1 hafta içerisinde artış gözlendiği belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2013). Bir başka çalışmada ise MI sonrası AQP4 kanalları gen ekspresyon seviyeleri akut dönemde incelenmiştir. Bu çalışmada MI sonrası 15. dakikada AQP4 gen ekspresyonlarında artış olduğu ve 45. dakikada en yüksek seviyeye ulaştığı anlaşılmıştır. (Warth ve ark., 2007). Warth ve ark (2007) fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında aynı zamanda AQP4 gen ekspresyonları ile infarkt büyüklüğü arasında da bir ilişki olduğunu ve gen ekspresyonu arttıkça infarkt alanlarının da arttığını belirlemişlerdir. Song ve ark (2018) kardiyopulmoner resustasyon modeli uyguladıkları sıçanlarda AQP4 ekspresyonlarının artığını belirlemişlerdir. Çalışmalarında PI3K/Akt yolağı ile AQP4 arasında bir ilişki olduğunu ve miyokardiyal hasarın azaltılmasında bu yolağın etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. AQP4'ün kalpte eksprese edildiği tespit edilmiş olmasına ve MI sonrası AQP4 ekspresyonunun incelendiği çalışmalarda AQP4'ün miyokardiyal ödemin çok önemli bir bileşeni olduğunu göstermiş olmasına rağmen AQP4'ün miyokard ödemi üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir. AQP4'ün ödem durumunda su geçişinde etkinliği düşünüldüğünde miyokardial ödemin düzeltilmesi veya önlenmesi için yeni bir hedef molekül olabileceği düşünülmektedir.

### 2.2.7.5. Aquaporin7

Aquaporin7 (AQP7), su geçişini sağlamasının yanında esas olarak gliserole geçirgen olan bir akuagliseroporindir. AQP7'nin, beyaz ve kahverengi yağ dokusu

iletestislerde yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir. Öte yandan, çeşitli dokularda AQP7 gen ekspresyon ve protein seviyesinin incelendiği çalışmalara göre kalp, iskelet kasları ve böbreklerde zayıf AQP7ekspresyonu gözlenmiştir (Fujii ve ark., 2019).

AQP7'nin yağ dokusunda ana gliserol kanalı olduğu gösterilmiştir. Gliserolü taşıması nedeni ile yağ dokudaki işlevleri konusunda araştırmalar yapılmıştır. Bu bilgiye dayanarak AQP7'nin kalpte gliserol geçişinde etkinlik gösterdiği de düşünülmektedir (Mobasheri ve ark., 2005; Skowronski ve ark., 2007). AQP7'den yoksun farelerde kalp kası gliserol içeriğinin daha düşük olduğu ve buna bağlı olarak ATP seviyelerinin de azaldığı bildirilmiştir (Hibuse ve ark., 2009). AQP7 yoksun farelerde adipositlerden veya yağ dokusundan gliserol çıkışının azalmasının yağ birikimine ve/veya daha fazla yağ asidi sentezlemek için gliserolkinaz aktivitesinde artışa yol açtığı görülmüştür (Hibuse ve ark., 2005).

Kardiyomiyositler enerji üretimi için yağ asitlerine ve glikoza ihtiyaç duyarlar. Gliserolün kardiyak enerji üretimi için bir substrat olarak kullanıldığı bilinmektedir. AQP7, kardiyomiyositlerde enerji üretiminde kullanılan gliserolün geçişini sağlar. Yapılan bir çalışmada, AQP7 eksikliği olan kalp dokusunda, miyokardiyal metabolik iş yükünde artış durumunda kalp hücrelerinin adaptasyounnda bozulmalar görülmüştür (Hibuse ve ark., 2009). Metabolik hastalık veya iskemik kalp hastalığı gibi patalojik durumlarda aşırı yağ asidi tüketimi şekillenir. Bu durumda yağ asidi/glikoz oranı önem taşımaktadır. Gliserol artan yağ asidi oksidasyonunu baskılayan kardiyak substrat olarak kabul edilebilmektedir. Kalpteki AQP7'nin bu gibi patalojik süreçlerde kalp dokusunda enerji üretiminde kullanılmasını arttırmak üzere gliserolgeçişini sağladığı gösterilmiştir (Galdka ve ark., 2009).

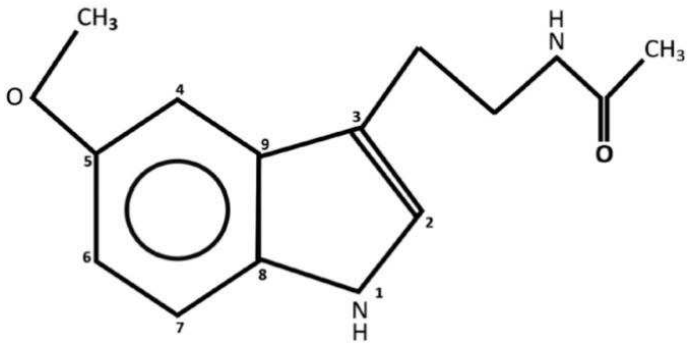
AQP7 kanalının kalp kası enerji ihtiyacının karşılanmasında rolü tam olarak biliniyor olmasına rağmen miyokardiyal ödem üzerine etkisi olmadığı belirtilmektedir. Hibuse ve ark (2009), yaptıkları çalışmada AQP7 ile miyokardiyal ödem arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir.

### 2.2.7.6. Aquaporinler ve Miyokardiyal Ödem

Kardiyomiyositlerde homeostazın sağlanmasında su taşınımı büyük önem arzetmekte, suyun taşınımı ise büyük oranda AQP kanalları ile gerçekleşmektedir. Bu kapsamda AQP'lerin kardiyomiyositlerdeki ana su taşıma mekanizmasını oluşturduğu düşünülmektedir (Ogura ve ark., 2002). AQP'ler ile ödem ilişkisibirçok farklıdokuda gösterilmiştir. Bir glial membran su kanalı olan AQP4 eksikliği olan farelerin, akut su zehirlenmesinin neden olduğu beyin ödemi modelinde vahşi tip farelerden çok daha iyi hayatta kaldıkları ortaya konulmuştur (Manley ve ark., 2000).

Literatürde MI kaynaklı miyokardiyal ödem üzerine AQP kanalları ile ilgili bilgiler bulunmasına karşın ödemin iyileştirilmesinde etkili bir yol olacağı konusunda kesin bilgilere rastlanılamaıştır. Kalpte bulunduğu ispatlanan AQP1,AQP3, AQP4 ve AQP 7'nin kalp dışı dokularda ortaya çıkan işlevleri göz önüne alındığında MI sonrası ödemin düzeltilmesinde de teröpatik bir hedef olabilecekleri anlaşılmaktadır.

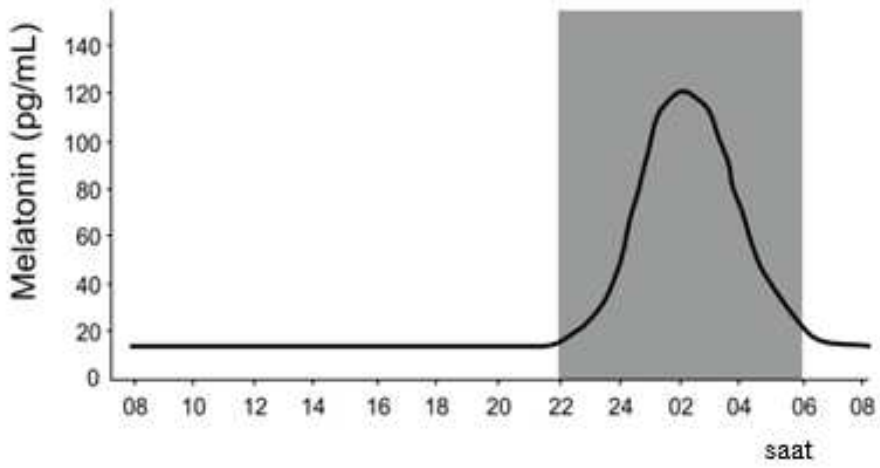
## 2.3. Melatonin




**Şekil 6.** Melatoninin moleküler yapısı (Amaral ve Cipola-Neto, 2018).

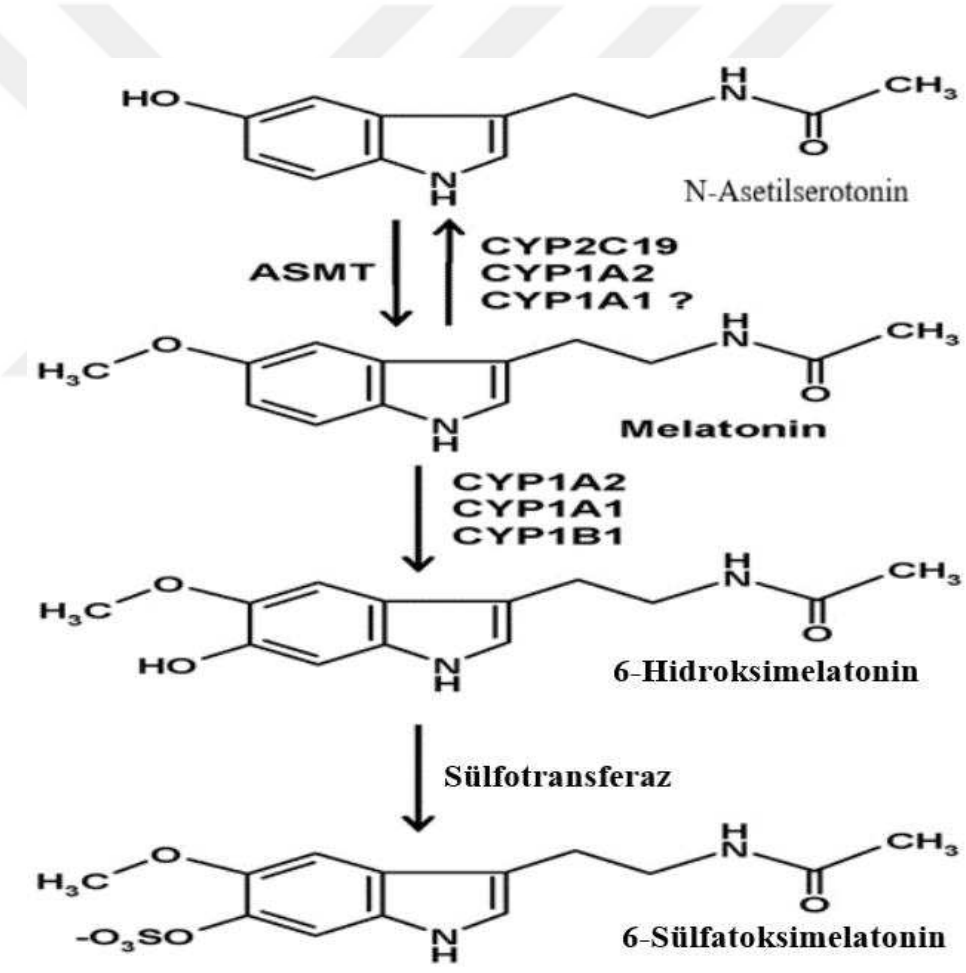
Melatonin (N–asetil-5-metoksitriptamin) ilk olarak 1958 yılında Lerner tarafından keşfedilmiş pineal bez tarafından salgılanan bir nörohormondur (Lerner ve ark., 1958). Yapısal olarak incelendiğinde melatonin, hidrofilik özelliklere sahip olmasının yanı sıra oldukça lipofilik bir moleküldür. Bu nedenle, salgı organında depolanmadan dolaşıma salınır. Dolaşımda ise albümine bağlanarak taşınır (Macchi ve Bruce, 2004).

Melatoninin pineal bezden üretimi karanlık fazda gerçekleşir ve ışıkla akut olarak bastırılır. Bu nedenle plazma melatonin düzeyleri, geceleri yüksek, gün boyunca ise düşük seviyelerde olmak üzere sirkadiyen bir ritim gösterir. Salgılanması genellikle 21:00–22:00 saatleri arasında başlar ve 07:00-09:00 saatlerinde durur. Gün boyunca, hormonun serum konsantrasyonları 10-20 pg/ml aralığındadır. Gece 02:00 - 04:00 saatleri arasında plazma melatonin seviyesi en yüksek konsantrasyonlarına ulaşır ve bu saat diliminde 80-120 pg/ml aralığındadır. Daha uzun gecelerde ise daha uzun süreli melatonin salgılanır (Lerner ve ark., 1958; Pandi-Perumal ve ark, 2008).



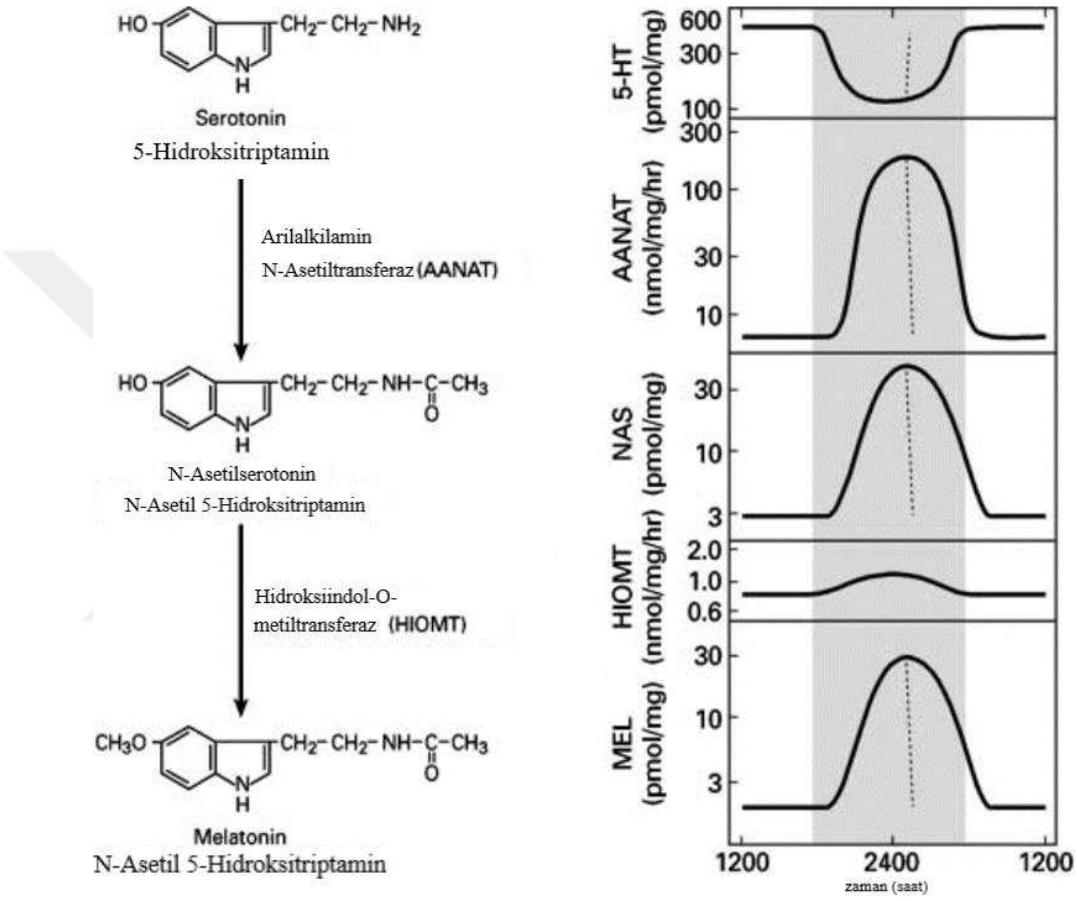

**Şekil 7.** Melatoninin insanlarda gün içerisinde sirkadiyen salgılanması (Karasek ve Winczyk, 2006).

Melatonin karaciğerde metabolize edilir. Karaciğerde melatonin ilk olarak sitokrom P450 monoksijenazlar ile hidroksillenir ve ardından 6-hidroksimelatonine metabolize edilir. Daha sonra 6-sülfatoksimelatonin oluşturmak için sülfatla konjüge edilir. Ayrıca melatonin kynuramin türevlerine de metabolize olur (Pandi-Perumal ve ark, 2008; Hardeland, 2017). Metabolizasyon ürünlerinden biri olan sülfatoksimelatoninin melatoninin plazma, tükürük veya idrarda seviyesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Claustrat ve Leston, 2015). Melatoninin kandaki yarılanma ömrü 30-45 dakika civarındadır (Carocci ve ark., 2014; Macchi ve Bruce, 2004).




**Şekil 8.** Melatoninin ana yıkımlanma mekanizması (Hardeland, 2017).

Temel olarak, melatonin biyosentezi omurgalıların retina ve pineal bezinde aynıdır. Vücuda besinler ile alınan esansiyel bir aminoasit olan triptofan melatoninin öncüsüdür. Melatonin, triptofandan dört enzimatik aşamada sentezlenir. (Galzin ve ark., 1988). Melatoninin sentez aşamaları Şekil 12'de gösterilmiştir.




**Şekil 9.** Melatonin biyosentez mekanizması (Ganguly ve ark., 2002).

Melatonin hücrelerde MT1 ve MT2 olarak adlandırılan iki G proteini bağlı reseptörün aktivasyonu yolu ile etkinlik gösterir. Gece epifiz bezinden salınan endojen melatonin, SCN'ye geri bildirim gönderme yolu ile MT1 ve MT2 reseptörlerini aktive ederek melatonin salgılanmasını etkileyebilir (Emet ve ark., 2016). Membran melatonin reseptörleri retina, sinir sistemi (suprakiazmatik

çekirdekler, hipokampus, serebellar korteks, prefrontal korteks, bazal gangliyonlar, substantia nigra, ventral tegmental bölge, nükleus akumbens ve retina yatay, amacrin ve ganglion hücreleri, pars tuberalis), serebral ve periferik arter sistemi ve periferik organlar (kan damarları, meme bezi, gastrointestinal sistem, karaciğer, böbrek ve mesane, yumurtalık, testis, prostat, adrenal bez, gonadlar ve bağışıklık sistemi) dahil olmak üzere çok çeşitli dokuda eksprese edilir (Pandi-Perumal ve ark., 2008, Sapède ve Cau, 2013). MT 1 ve MT 2 reseptörlerinin varlığı, kalpte sol ventrikül dokusunda da tespit edilmiştir (Ekmekçioğlu ve ark., 2001). Ek olarak, MT1'in vasküler daralmaya, MT2'nin ise vazodilatasyona aracılık ettiği belirlenmiştir (Slominski ve ark., 2012).

### 2.3.1. Melatoninin Fizyolojik Etkileri

Memelilerde melatonin, çeşitli fizyolojik, nöroendokrin ve üreme fonksiyonlarında, uyku-uyanıklık döngüsü, pubertal gelişim ve mevsimsel değişikliklere yanıtın düzenlenmesinde büyük bir öneme sahiptir. Bu fizyolojik etkilerine ek olarak hipotalamus ve retinada dopamin (DA) salınımının inhibisyonu, yaşlanma sürecine katılım, kan basıncı kontrolü ve bağışıklık sisteminin oluşturduğu yanıtların düzenlenmesinde de rol oynar (Petit ve ark., 1999). Gün içinde ekzojen olarak vücuda melatonin alımının, melatoninin gece işlevlerine benzeyen soporifik etkiler oluşturduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. (Pandi-Perumal ve ark., 2008).

Melatoninin hücrelerde oksidatif strese karşı koruma sağladığı bilinmektedir. Melatonin, çeşitli reaktif oksijen ve nitrojen türleri ve organik radikallerle etkileşiminde antioksidan enzimleri artırırken prooksidan enzimleri de azaltarak etki göstermektedir (Veneroso ve ark., 2009). Melatonin kanser, metabolik sendrom, inme gibi birçok hastalığa karşı büyük bir terapötik potansiyele sahiptir. Yapılan araştırmalar, vücudun çeşitli bölgelerinde koruyucu etkiler gösterdiği bilinen melatoninin çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde de önemli bir rol oynadığını göstermektedir KVS'de bilinen birçok etkisinin yanı sıra bu etkinliğinin altında yatan mekanizmalarda aydınlatılmaya çalışılmıştır. Kapsamlı çalışmalar ile

apoptoz, nekroz, inflamasyon gibi patolojik süreçlere etki mekanizmaları incelenmiştir. Günümüzde hala melatoninin etki mekanizmaları araştırılmaktadır.

### 2.3.2. Melatonin ve Kalp

Arterioskleroz ve MI gibi kardiyovasküler hastalıklara karşı Melatoninin koruyucu etkileri yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. KKH olan hastaların, özellikle miyokard enfarktüsü ve/veya ani ölüm riski olanlarda, melatonin seviyelerinin düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle özellikle miyokardiyal iskemi sonrasında kalp kasını hasara karşı koruyabilmek için melatoninin etkilerinden faydalınabileceği düşünülmektedir (Mızrak ve ark., 2004). Melatonin, serbest radikallerin dahil olduğu kardiyak iskemi/reperfüzyondan kaynaklanan moleküler ve hücresel hasarları iyileştirir. Sahip olduğu antiinflamatuar ve antioksidatif özellikleri sayesinde ateroskleroz gibi damar hastalıklarına karşı korumada rol oynar (Dominuguez- Rodrigeguez ve ark., 2009).

Kalp kasında AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7 kanallarının etkisi ortaya konulmuş olsa da, miyokardiyumda melatonin ve AQP kanalları ile ilişkisi üzerine yoğunlaşan çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte diğer doku ve organlarda melatonin ile AQP kanal ilişkisini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Nitekim, melatoninin medulla spinalis hasarlarında artan AQP4 gen ekspresyonlarını azaltarak ödeme karşı koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Liu ve ark., 2015). Benzer bir etki Li ve ark (2014) tarafından da belirlenmiştir. Melatonin antagonistleri verilmesi travmatik beyin hasarında ödemi ve AQP4 ekspresyonlarını artırıcı etki göstermiştir (Shahrokhi ve ark., 2018).

Bu bilgiler ,MI'ın kalp dokusunda ciddi derecede miyokardiyal ödeme neden olduğunu, kalp dokusunda eksprese edilen AQP kanallarının miyokardiyal ödemin düzeltilmesi ve önlenmesinde etkili olabileceğini, melatonin kardiyoprotektif bir molekül olarak MI sonrası görülen miyokard ödemini düzeletebileceğini ve bu etkisini AQP kanalları üzerinden gerçekleştirebileceğini düşündürmektedir.

# 3. YÖNTEM VE GEREÇ

Bu araştırma ÇOMÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun izni ile gerçekleştirildi. (2019/07-04). Çalışmanın hayvan deneyleri aşaması, elde edilen dokulardan RNA izolasyonu, cDNA eldesi, RT-PCR analizi, Western Blot analizi, histopatolojik boyama işlemleri ve ELISA ölçümleri ÇOMÜ Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (ÇOMÜDAM) gerçekleştirildi.

## 3.1. Hayvan Materyali

Araştırmada ÇOMÜDAM'dan temin edilen 12 haftalık Wistar ırkı toplam 28 adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Çalışma süresince, tüm sıçanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ve 22±2 °C'lik ortam ısısına sahip oda koşullarında barındırıldı. Çalışma için her biri 7'şer adet sıçandan oluşan 4 grup oluşturuldu. Deney hayvanlarının beslenmesi için standart yem ad libitum olarak, içme suyu olarak normal şebeke suyu kullanıldı.

### 3.1.1. Grupların Oluşturulması

Çalışmada deney grupları sıçanların ağırlıkları göz önünde bulundurularak oluşturuldu. Çalışma grupları ve denek sayıları aşağıda belirtilmiştir. Sıçanlar toplam 7 günlük bir deneysel sürece tabi tutuldu. Tüm gruplarda enjeksiyonlar sabah 08:00'da başlatıldı ve en geç 10:00'da tamamlandı.

**Grup 1 (KONTROL, n=7):** Bu gruptaki hayvanlara deney boyunca diğer gruplara uygulanan izoproterenolun çözündürüldüğü 940 µl % 0,9 NaCl solüsyonu ve melatoninin çözündürüldüğü 60 µl etanol solüsyonu karıştırılarak intraperitoneal (ip) yolla 7 gün boyunca günde bir kez uygulandı. Deney sürecinin 1. ve 8. günlerinde EKG kaydı alındı.

**Grup 2 (MEL, n=7):** Bu gruptaki hayvanlara melatonin (10 mg/kg) 7 gün boyunca günde bir kez aynı saat diliminde olacak şekilde ip yolla enjekte edildi.

**Grup 3 (İZO, n=7):** Bu gruptaki hayvanlara 85 mg/kg dozunda % 0,9 NaCl solüsyonunda çözündürülen izoproterenol, 24 saat aralıklarla çalışmanın 6. ve 7. günlerinde uygulandı.

**Grup 4 (İZO-MEL, n=7):** Bu gruptaki hayvanlara melatonin (10 mg/kg) 7 gün boyunca günde bir kez aynı saat diliminde olacak şekilde ip yolla enjekte edildi. Çalışmanın 6. ve 7. günlerinde melatonin enjeksiyonundan 1 saat sonra 85 mg/kg dozunda İZO 24 saat aralıklarla iki kez uygulandı.

### 3.2. İzoproterenol Çözeltisinin Hazırlanması

İzoproterenol (Sigma-Aldrich, I6504) oda sıcaklığında 1 ml % 0,9 NaCl solüsyonu içerisinde çözündürülüp bekletilmeden her gün taze olarak hazırlandı ve ip olarak aynı saat diliminde uygulandı (Murugesan ve ark., 2011).

### 3.3. Melatonin Çözeltisinin Hazırlanması ve Uygulaması

Melatonin % 5'lik etanol (Absolute GR for analysis, MERCK, Almanya) içeren serum fizyolojik çözeltisi içerisinde çözündürülerek 10 mg/kg/gün dozunda 7 gün süresince günde bir kez aynı saat diliminde olacak şekilde ip olarak uygulandı. Melatonin uygulama çözeltisinin nihai etanol içeriği % 2,4 olarak belirlendi. Uygulanacak melatonin belirlenen dozlarda her gün taze olarak hazırlandı ve bekletilmeden uygulandı (Ovalı ve Uzun, 2016).

### 3.4. Taşıyıcı Hazırlanması ve Uygulaması

Taşıyıcı uygulaması için, 60 µl % 5'lik etanol 940 µl serum fizyolojik çözeltisi içerisinde çözündürüldü ve ip olarak uygulandı. Uygulanacak bu etanol çözeltisi deney süresince taze olarak hazırlandı. Taşıyıcı içerisindeki nihai etanol konsantrasyonu % 2,4 olarak belirlendi.

### 3.5. Yöntem

Oluşturulan gruplarda uygulanan işlemlerin ayrıntıları aşağıda belirtilmiştir.

#### 3.5.1. Miyokart Enfarktüsü Modelinin Oluşturulması

Miyokart enfarktüsü oluşturmak için İzoproterenol (Sigma-Aldrich I6504, Germany) 24 saat aralıklarla iki kez çalışmanın 6. ve 7. günlerinde 85 mg/kg olacak şekilde % 0,9 NaCl solüsyonunda çözülerek ip yolla uygulandı (Murugesan ve ark., 2011).

#### 3.5.2. Elektrokardiyografi (EKG) Alınması ve Değerlendirilmesi

##### 3.5.2.1. Elektrokardiyografi (EKG) Alınması

EKG kayıtları tüm gruplardaki sıçanlardan 1. ve 8. günlerde 9:00-9:30 saatleri arasında alındı. İkinci EKG kaydı alınırken son İZO uygulaması üzerinden 24 saatlik sürenin geçmesine özen gösterildi. EKG kaydı amacı ile I., II. ve III. ekstremite derivasyonları ile artırılmış unipolar ekstremite derivasyonları olan aVR, aVL ve aVF derivasyonları kaydedildi. EKG kayıtları non-invaziv yolla yapıldı (Poly-Spectrum 12 channel ECG-System, Poly-Spectrum-8, Neurosoft, 5, Voronin str., Ivanovo, Rusya). EKG kayıtları; 1 mV=20 mm, hız 100 mm/sn olacak şekilde ve filtre kullanılarak (75 Hz) alındı. EKG kayıtları alınmadan 10 dakika önce

hayvanlara sedatif amaçlı anestezi işlemi uygulandı EKG verileri genel olarak değerlendirildikten sonra kalp atım hızı hesaplandı (Ovalı ve Uzun, 2016). Çalışmada kullanılan bir sıçana ait örnek EKG görüntüsü Resim 1'de verilmiştir.




**Resim 1.** Sıçanlardan alınan ve tüm derivasyonların görüldüğü örnek bir EKG kaydı.

### 3.5.2.2. Elektrokardiyogram Değerlendirilmesi

Alınan EKG kayıtları öncelikle genel bir değerlendirilmeye tabi tutuldu. Daha sonra ST segmentinde yükselme ve çökme olup olmadığı araştırıldı. RR süresi iki R dalgası arasındaki mesafeden hesaplandı. Elde edilen RR süresi değerlerinden kalp atım hızı belirlendi. Q dalgasının başlangıcından T dalgasının sonuna kadar olan mesafe belirlenerek QT süresi hesaplandı.

### 3.5.3. Sedasyon İşlemi

Sedasyon işlemi sadece EKG alınması için uygulandı ve 30 mg/kg ketamin HCl (Ketasol %10, 0513277AA, İnterhas A.Ş., Ankara) ve 5 mg/kg ksilazinin (Xylazinbio %2, 525120A, İntermed, Ankara) kas içi yolla verilmesi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla sıçanların yaklaşık 10 dakika hafif sedasyonda kalmaları yeterli görüldü (Ovalı ve Uzun, 2016).

### 3.5.4. Anestezi İşlemi

Deneysel sürecin sonunda kan örneklerinin alınamsı ve ötenazi işlemi için hayvanlara genel anestezi uygulandı.. Bu amaçla ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) kas içi yolla uygulandı (Ovalı ve Uzun, 2016).

### 3.5.5. Kan Örneklerinin Alınması

EKG kaydı alımı tamamlandıktan sonra kan alma işlemine geçildi. Anestezi altında sıçanlardan kardiyak kan alınarak soğutmalı santrifüjde +4˚C'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen serumlar ELISA testi yapılmak üzere ependorf tüplere aktarıldı analiz yapılacak güne kadar -80 ˚C'de saklandı.

### 3.5.6. Sol Ventrikül Doku Örneklerinin Alınması

Tüm sıçanlar 8. günde genel anestezi altında sakrifiye edildi ve kalpleri çıkarıldı. Elde edilen kalp dokusu örneklerinden, sol ventrikül alınarak üç parçaya ayrıldı. Genetik analizlerde kullanılmak üzere alınan parça ''DNAse/RNAse free'' olan tüplere konulup bekletilmeden sıvı azot içerisine atıldı. Histopatolojik analizlerde kullanılmak üzere alınan doku parçası % 10 'luk formaldehit içerisinde sabitlendi. Doku sıvı oranını belirlemek amacı ile kullanılacak parçanın ağırlığı tartılıp kurutma işlemi için etüve konuldu. Tüm dokular uygun koşullarda alındıktan sonra genetik

analizler yapılıncaya kadar -80 ºC'de saklandı. Her bir işlem için tüm sıçanlarda sol ventrikülün aynı bölümünün aynı büyüklükte alınmasına özen gösterildi.



**Resim 2.** Sıçanlardan alınan kalp dokusuna ait bir görüntü.

### 3.6. Doku Su Kaybı Oranını Belirleme

Doku su kaybı belirleme işlemi amacı ile alınan sol ventrikül parçalarının hızlı bir şekilde ıslak ağırlıkları ölçüldü. Daha sonra doku parçaları +80 °C'de 24 saat süre ile etüvde tutuldu. Yirmi dört saat sonrasında doku parçaları etüvden çıkarıldı ve kuru ağırlıkları ölçüldü. Islak ve kuru ağırlık oranı (%) olarak belirlendi (Weis ve ark., 2004).

[(Islak Ağırlık - Kuru Ağırlık) / Islak Ağırlık] x %100

### 3.7. Biyokimyasal Analizler

ELISA ölçümleri, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Bu amaçla, ilk olarak alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen serumlardan; cTnI ve CK-MB düzeyleri kullanılan ticari kitte belirtilen yönteme uygun olarak yapıldı.




**Resim 3.** ELISA ölçümlerinde kullanılan cihaz (Thermo Scientific Multiskan Go).

### 3.7.1. cTnI ELISA Prosedürü

Kan serum örneklerinden cTnI düzeyleri ticari ELISA kiti (Troponin I (TNI), ELISA Kiti, Katalog no: MBS2104797) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla kitte belirtilen yöntemler uygulandı. Çalışmaya başlamadan önce yapılan hazırlıklar;

1. Yıkama tamponu: Konsantre 20 ml yıkama tamponu 580 ml distile su ile dilüe edildi ve hazırlanan bu dilüsyon ELISA plate yıkama cihazına (ELISA Plate Yıkayıcı Biotek ELx50) yerleştirildi.

2. Standart solüsyonunun hazırlanması: Standart tüpün içine 1 ml örnek/standart dilüsyonu eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

3. Altı adet efendorf tüp 1'den 6'ya kadar numaralandırıldı. Her bir tüpe 120 µl örnek/standart dilüsyon tamponu eklendi. 1. tüpten 2. tüpe 120 µl aktarıldı. 2. tüpten 3. tüpe 120 µl aktarıldı ve bu aktarma işi 6. tüpe kadar aynı miktarda devam ettirildi.

Tüm bu hazırlıklar yapıldıktan sonra sırası ile aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Standartlar ve örnekler plate'deki kuyulara yüklenmeden önce plate yıkama cihazında 2 kez yıkandı.

2. Standartlar her bir kuyu için 50 µl olacak şekilde kuyulara yüklendi. Serumlar vortekslendi ve 40 µl olacak şekilde kuyulara yüklendi.

3. 10 µl Biotin detection antibody working solüsyon her bir kuyuya eklendi.

4. 50 µl STR-HRP (streptavidin) working solüsyonu her bir kuyuya eklendi. Plate kaplandı ve 37˚C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

5. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra plate yıkama cihazına yerleştirilerek yıkandı.

6. Yıkamanın ardından, önce 50 µl Kromojen A sonra 50 µl Kromojen B kuyucuklara dağıtıldı.

7. Karanlıkta 37˚C'de 15-20 dakika inkübe edildi ve renk değişimi gözlemlendi 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi. Daha sonra plate spektrofotometre cihazına

(Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific™, Finlandiya) konuldu ve 450 nm'de okuma yapıldı.

### 3.7.2. CK-MB ELISA Prosedürü

Kan serum örneklerinden CK-MB düzeyleri ticari ELISA kiti (Kreatin Kinaz MB İzoenzim ELISA Kiti, Katalog no: MBS2515061) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla kitte belirtilen yöntemler uygulandı. Çalışmaya başlamadan önce yapılan hazırlıklar:

1. Yıkama tamponu: Konsantre 20 ml yıkama tamponunu 580 ml distile su ile dilüe edildi ve hazırlanan bu dilüsyon ELİSA plate yıkama cihazına (ELISA Plate Yıkayıcı Biotek ELx50) yerleştirildi.

2. Standart solusyonunun hazırlanması: Standart tüpün içine 1 ml örnek/standart dilüsyonu eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

3. Altı efendorf tüp 1'den 6'ya kadar numaralandırıldı. Her bir tüpe 120 µl simple/standart dilüsyon tamponu eklendi. 1. tüpten 2. tüpe 120 µl aktarıldı. 2. tüpten 3.tüpe 120 µl aktarıldı ve bu aktarma işi 6. tüpe kadar aynı miktarda devam ettirildi.

Tüm bu hazırlıklar yapıldıktan sonra sırası ile aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Standartlar ve örnekler plate'deki kuyulara yüklenmeden önce plate yıkama cihazında 2 kez yıkandı.

2. Standartlar her bir kuyuya 50 µl olacak şekilde yüklendi. Serumlar vortexlendi ve 40 µl volümlerle kuyulara yüklendi.

3. 10 µl Biotin detection antibody working solüsyon her bir kuyuya eklendi.

4. 50 µl STR-HRP (streptavidin) working solüsyonu her bir kuyuya eklendi. Plate kaplandı ve 37˚C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

5. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra plate yıkama cihazına yerleştirilerek yıkandı.

6. Yıkamanın ardından, önce 50 µl Kromojen A sonra 50 µl Kromojen B kuyucuklara dağıtıldı.

7. Karanlıkta 37˚C'de 15-20 dakika inkübe edildi ve renk değişimi gözlemlendi. 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi, plate spektrofotometre cihazına (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific™, Finlandiya) konuldu ve 450 nm'de okuma yapıldı.

### 3.8. Genetik Analizler

#### 3.8.1. Total RNA İzolasyonu

Ötenazi sonrasında kalp dokusu örnekleri hızlı bir şekilde alındı ve işlem yapılıncaya kadar -80 ºC'de bekletildi. Sol ventrikül dokusundan ilk olarak total RNA izolasyonu yapıldı. Bu amaçla dokulardan yaklaşık 25-30 mg alınarak 2 ml' lik steril tüplere aktarıldı ve ependorf tüpler 10 sn sıvı azotta bekletildi. Her birine bir adet steril çelik bilye konulduktan sonra homejanizatör cihazına (Retsch MM400) yerleştirilerek homojenize edildi. Elde edilen homejenatlardan PURE Link RNA MiniKit (CatNo. 12183018A) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayini NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirildi ve sonrasında örnekler kullanılıncaya kadar -80ºC'de saklandı. Saflık oranı 260/280 nm'de ölçüm yapılan RNA'lardan 1.8-2.1 arası değerler kullanılabilir kabul edildi (Ovalı, 2015).



**Resim 4.** Dokuların homojenize edilmesi için kullanılan cihaz.

### 3.8.2. cDNA Eldesi

İzole edilen RNA'lar işlem yapılıncaya kadar -80 ºC'de saklandı. cDNA eldesinden önce örneklerin RNA yoğunlukları spektrofotometrik olarak belirlendi ve PCR tüplerine aktarıldı. cDNA eldesi kit prosedürüne göre yapıldı (High Capacity cDNA Revere Transcription Kit, ABD). cDNA elde etmek için uygulanan yöntem aşağıda belirtilmiştir.

**Tablo 1.** cDNA sentez protokolü

| Bileşenler | Örnek Başına Hacim |
|---|---|
| 10x Buffer | 2 µl |
| dNTP | 0,8 µl |
| Random Primer | 2 µl |
| Enzim | 1 µl |
| Su | 4,2 µl |
| RNA | 10 µl |
| **Toplam** | 20 µl |

Yukarıda bileşimi belirtilen karışım PCR tüplerine aktarıldı ve belirlenen şartlarda PCR cihazında çalışıldı (The Applied Biosystems®, 2720 Thermal Cycler 96-Well PCR). Bu amaçla uygulanan protokol aşağıda belirtilmişir.

**Tablo 2.** PCR koşulları

| Sıcaklık | Zaman |
|---|---|
| 25 ºC | 10 dk |
| 37 ºC | 120 dk |
| 85 ºC | 5 dk |

dk. dakika

### 3.8.3. Real-Time PCR (qRT-PCR) Uygulaması

cDNA örnekleri çoğaltıldıktan sonra quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR, StepOnePlus™ Real-Time PCR System) çalışması için kullanıldı. TaqMan (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, Ampliqon, Litvanya) kullanılarak gen ekspresyon seviyeleri analiz edildi.

qRT-PCR yönteminde gen ifade düzeylerine bakılan AQP1, AQP3, AQP4, AQP7, Kaspaz3, Bax, Bcl2 ve TNFα genleri için normalizasyon yapıldı. Bu amaçla β-actin kullanıldı. Bu çalışmada, kısmi miktarlara dayalı PCR yönteminde bulunan sonuçları doğrulamak için Real-Time PCR yöntemi kullanıldı ve qRT-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Belirtilen gen bölgeleri için kullanılan tagman primer-problar aşağıda belirtilmiştir.

TaqMan® Gene Expression Assays, 250 rxns AQP1..Rn00562834_m1

TaqMan® Gene Expression Assays, 250 rxns AQP3..Rn00581754_m1

TaqMan® Gene Expression Assays, 250 rxns AQP4..Rn01401327_s1

TaqMan® Gene Expression Assays, 250 rxns AQP7..Rn00569727_m1

TaqMan® Gene Expression Assays, 250 rxns Kaspaz3..Rn00563902_m1

TaqMan® Gene Expression Assays, 250 rxns Bcl2..Rn99999125_m1

TaqMan® Gene Expression Assays, 250 rxns Bax..Rn01480161_g1

TaqMan® Gene Expression Assays, 250 rxns TNFα..01525859_g1

TaqMan® Gene Expression Assays, 250 rxns ACTB..Rn00667869_m1

### 3.8.4. Western Blot Analiz Yöntemi

Western blot analizi çalışmamızda AQP1, AQP3, AQP4, AQP7 ve Bcl2 için uygulandı. Bu amaçla alınan sol ventrikül dokusu örnekleri ilk olarak PRO-PREP™ protein ekstraksiyon solüsyonu (Intron Biotechnology) kullanılarak homojenize edildi. Süpernatanın santrifüj sonrası protein konsantrasyonu, Bradford deney kiti (Sigma) ile ölçüldü. Lizatlar (~ 50 ug), Laemmli protokolüne riayet edilerek % 4-12 Bis-Tris SDS-PAGE jeli kullanılarak elute edildi. Daha sonra proteinler, iBlot® Kuru Blotlama Sistemi (Thermo Fischer) kullanılarak nitroselüloz membrana aktarıldı. Nitroselüloz membran, iBind ™ Automated Western System (ThermoFisher) üzerine yerleştirildi. Nitroselüloz membran, 150 dakika boyunca anti-rat AQP1, AQP3, AQP4, AQP7 ve Bcl2 birincil antikorları (Thermo Fisher) ve anti-tavşan IgG-HRP (Horseradish Peroksidazı) - konjuge sekonder antikorlar (Thermo Fisher) ile inkübe edildi. Bu işlemden sonra nitroselüloz membran, Western blot luminol reaktifleri kullanılarak C-DiGit Chemiluminescence Blot Scanner (LI-COR, NE, ABD) ile tarandı. Bant yoğunlukları, kontrol grubu olarak β-aktin yoğunluğu ile kıyaslanarak normalize edildi.

## 3.9. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik inceleme için alınan dokular ilk olarak % 10'luk formaldehitte tespit edildi. Sabitlenen dokular çeşme suyunda bir gece yıkandıktan sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan alınan 5 μm kalınlığındaki kesitler lamlar üzerine yayıldı. Hazırlanan doku örnekleri hematoksilen-eosin ile boyandı ve ışık mikroskobu altında (x200) değerlendirildi.

### 3.9.1. Hemotoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

Alınan kesitlere hemotoksilen-eosin boyama protokolü aşağıdaki şekilde uygulandı.

1. Kesitler etüvde yaklaşık 65 $^{0}$C'de bir saat bekletilerek parafin eritildi.
2. Kesitler 10'ar dk 2 farklı ksilolde bekletildi.
3. Kesitler azalan alkol serilerinde rehidrate edildi.
4. Kesitler akan su ile 1 dk yıkandı.
5. Mayer's hematoksilende yaklaşık 25 dakika bekletilerek boyanma sağlandı.
6. Kesitler 1 dakika akan su ile yıkandı.
7. Daha sonra 1 dakika Bluing Reagent içerisinde bekletildi.
8. Ardından kesitler 1 dakika çeşme suyunda yıkandı.
9. Kesitler 5 dakika eozin içerisinde bekletildi.
10. Yükselen alkol serilerinde her birinde 1'er dakika bekletilerek geçirilen kesitler daha sonra ksilolde bekletildi.
11. Son olarak ise kesitler entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.
12. Lamel ile kapatılan kesitler ışık mikroskobu altında incelendi.

## 3.10. İstatiksel Analizler

Genetik analizler qRT-PCR yönteminden elde edilen CP (crossing points) değerleri düzenlendi. Genetik istatistik için ise qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Elde edilen ağırlık, EKG, histopatolojik ve biyokimyasal inceleme verileri ortalama ± standart hata (SH) olarak belirtildi. Verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri IBM Statistics SPSS 20.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Çoklu grup karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmada ise Mann Whitney U-testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi en az $p<0.05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

# 4. BULGULAR

Bu çalışmada sıçanlardan KONTROL, MEL, İZO ve İZO-MEL olmak üzere toplam 4 farklı grup oluşturuldu ve 28 adet sıçan kullanıldı. Araştırma süresince deney hayvanları üzerinde vücut ağırlığı ölçümleri yapıldı ve EKG kayıtları alındı. Elde edilen kan örneklerinden cTnI ve CK-MB düzeyleri ölçüldü.Sıçanlar ötenazi edilereksol ventrikül dokusu alındı ve doku örnekleri üzerinde;

a) Doku kurutma işlemi yapılarak ıslak/kuru doku oranı,
b) Histopatolojik analizler,
c) AQP1, AQP3, AQP4, AQP7, Kaspaz3, BAX, Bcl2 ve TNFα gen ekspresyonları düzeylerini belirlemek üzere RT-PCR analizi,
d) AQP1, AQP3, AQP4, AQP7 ve Bcl2 için Western blot analizleri yapıldı.

Araştırmaya alınan tüm sıçanlar çalışmayı sağlıklı bir şekilde tamamladı, araştırma sonucunu etkileyecek herhangi bir olumsuzlukla karşılaşılmadı.

## 4.1. Vücut Ağırlığı Değerlerindeki Değişimler

Çalışmaya başlamadan önce sıçanlar tartılarak tüm grupların birbirine yakın ağırlık değerlerine sahip olması sağlandı. Bu amaçla ortalama ağırlıkları 250-300 g aralığında olan sıçanlar çalışmaya dâhil edildi. Deneysel sürecin 1. ve 8. günlerinde vücut ağırlıkları ayrıca kaydedildi. Vücut ağırlıkları için elde edilen veriler Tablo 3.'te belirtildi. Çalışmanın 1. ve 8. gün vücut ağırlığı değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

**Tablo 3.** Tüm gruplara ait ortalama vücut ağırlıklarının 1. ve 8. günlerdeki değişimi.

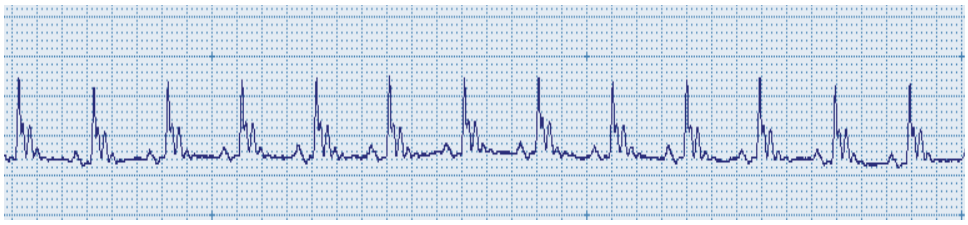
| | Ortalama vücut ağırlığı (g) | |
|---|---|---|
| **Gruplar** | **1. gün** | **8. gün** |
| KONTROL | 268 ±26 | 295 ±22 |
| MEL | 268 ± 23 | 286 ±19 |
| İZO | 272 ±24 | 292 ± 18 |
| İZO-MEL | 266 ± 26 | 287 ± 19 |

### 4.2. EKG Verilerinin Değerlendirmeleri

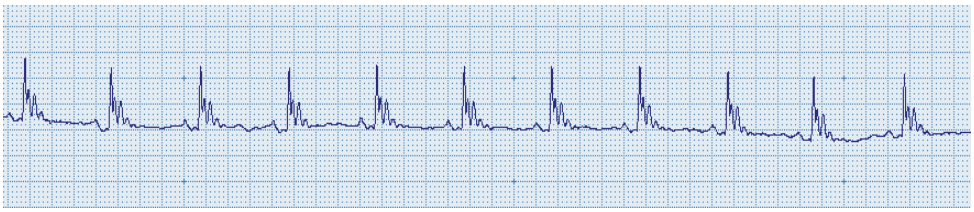
Çalışmanın 1. ve 8. günlerinde tüm sıçanlardan EKG kaydı alındı. EKG örneklerinden kalp atım hızı ve QT süreleri II. derivasyondan hesaplandı.

#### 4.2.1. ST Segmenti Değerlendirmesi

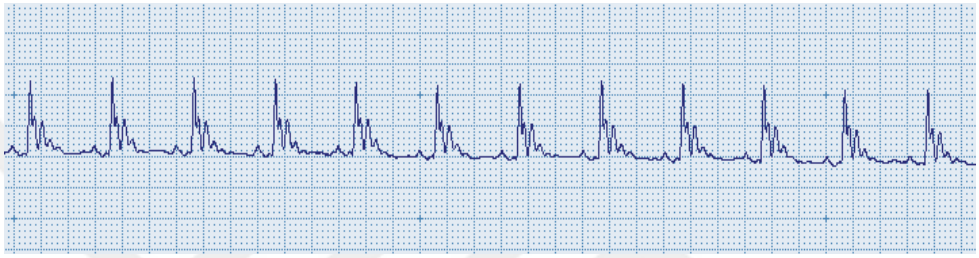
Alınan EKG kayıtları öncelikli olarak miyokard enfarktüsü açısından değerlendirildi. Bu amaçla her bir EKG'de ST segmenti incelendi ve yükselme veya çökme olup olmadığına bakıldı. Tüm gruplara ait 1. ve 8. gün kaydedilen EKG'lerden elde edilen II. derivasyona ait kayıtlar Resim5-12'de gösterildi.



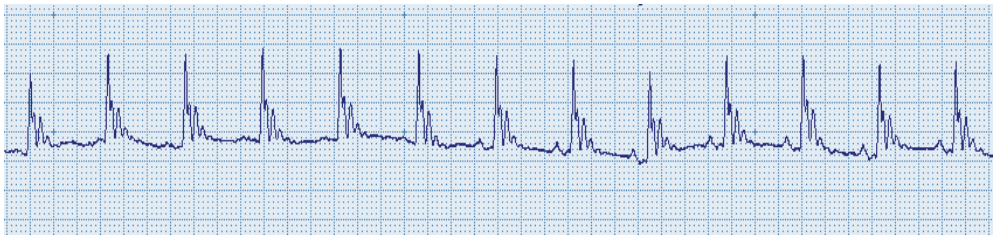
**Resim 5.** Kontrol grubuna ait 1. gün EKG örneği (II. derivasyon).



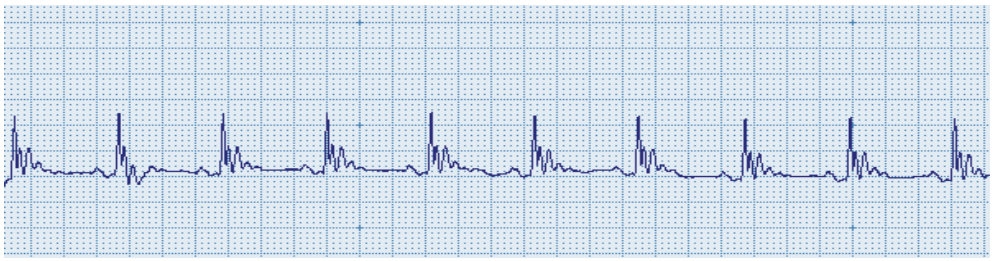
**Resim 6.** Kontrol grubuna ait 8. gün EKG örneği (II. derivasyon).



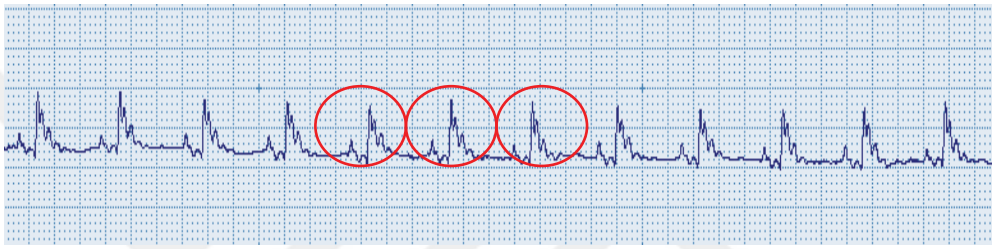
**Resim 7.** MEL grubuna ait 1. gün EKG örneği (II. derivasyon).



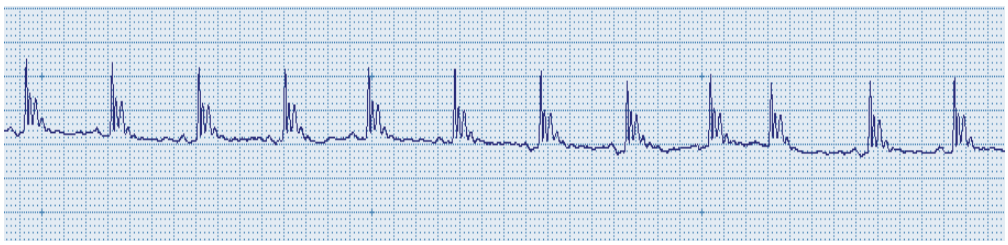
**Resim 8.** MEL grubuna ait 8. gün EKG örneği (II. derivasyon).



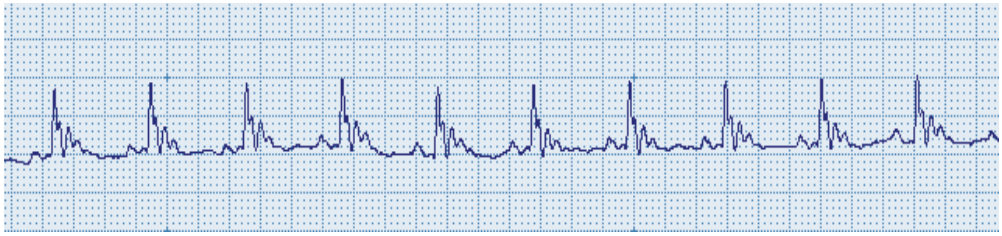
**Resim 9.** İZO grubuna ait 1. gün EKG örneği (II. derivasyon).



**Resim 10.** İZO grubundan 8. gün yapılan EKG kaydında ST yükselmesi (II. derivasyon).



**Resim 11.** İZO-MEL grubuna ait 1. gün EKG örneği (II. derivasyon).



**Resim 12.** İZO-MEL grubu 8. gün EKG örneği (II. derivasyon).

Tüm gruplar için ST segmenti değerlendirmesine ait veriler Tablo 4'de verildi. ST segmenti değerlendirmesi sonucunda KONTROL ve MEL gruplarında 1. ve 8. günlerde herhangi bir yükselme belirlenmedi. İZO grubunda ise 1. günde ST segmenti izoelektrik çizgide belirlenmişken, 8. günde 7 sıçanda ST yükselmesi belirlendi (Resim 10). Benzer şekilde İZO-MEL gurubunda 1. günde ST segmentinin tüm EKG kayıtlarında izoelektrik çizgide olduğu anlaşıldı. Ancak 8. günde sadece 2 sıçanda ST elevasyonu belirlendi.

**Tablo 4.** Tüm gruplarda 8. gün EKG kayıtlarında ST yükselmesi görülen sıçan sayıları.

| **Gruplar** | **ST Yükselmesi (n)** |
|---|---|
| KONTROL | 0 |
| MEL | 0 |
| İZO | 7 |
| İZO-MEL | 2 |

### 4.2.2. Kalp Atım Hızı ve RR süresi Verilerindeki Değişimler

Tüm gruplara ait kalp atım hızı verileri Tablo 5'te verildi. Kalp atım hızı verileri gruplar arasında farklılık gösterse de, bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Her grup için 1. ve 8. gün verileri grup içinde karşılaştırıldığında da anlamlı farklılık bulunamadı ($p>0,05$).

**Tablo 5.** Tüm gruplarda 1. ve 8. günde belirlenen kalp atım hızı verileri.

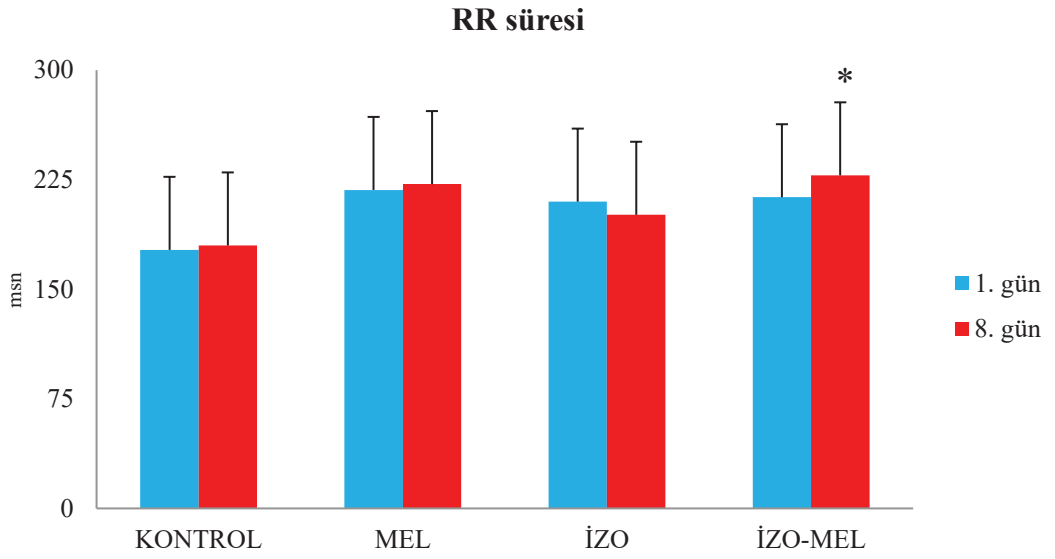
| | **Kalp Atım Hızı (atım/dakika)** | |
|---|---|---|
| **Gruplar** | **1. gün** | **8. gün** |
| KONTROL | 77 ± 6 | 76 ± 6 |
| MEL | 78 ± 5 | 69 ± 2 |
| İZO | 75 ± 5 | 84 ± 7 |
| İZO-MEL | 79 ± 6 | 68 ± 4 |

RR aralığı sürelerinde görülen değişimlere ait veriler Tablo 6 ve Şekil 10'da verildi. İZO-MEL grubunda RR aralığı süresinin kontrol grubuna göre 8. günde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p <0,01$). Tüm gruplarda 1. ve 8. gün RR süresi verileri grup içinde karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

**Tablo 6**. Tüm gruplara ait RR süresindeki değişimler.

| | **RR süresi (msn)** | |
|---|---|---|
| **Gruplar** | **1. gün** | **8. gün** |
| KONTROL | 177 ± 8 | 180 ± 9 |
| MEL | 218 ± 3 | 222 ± 2 |
| İZO | 210 ± 2 | 201 ± 4 |
| İZO+MEL | 212 ± 3 | 228 ± 3* |

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık $p<0,01$.




**Şekil 10.**Tüm gruplardaRR süresindeki değişimlerin grafiksel gösterimi (*: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık p<0,01).

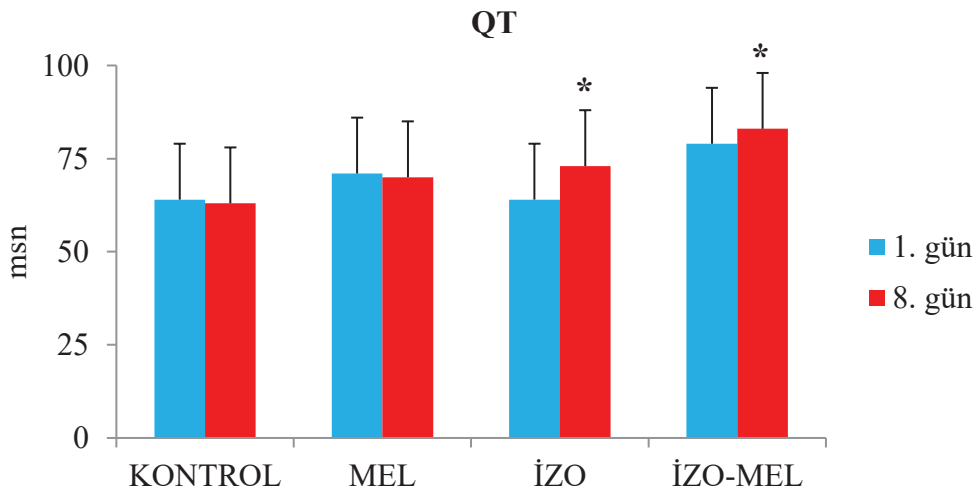
### 4.2.3. QT Sürelerindeki Değişimler

QT süreleri için elde edilen veriler Tablo 7 ve Şekil 11'de verilmiştir. Tüm grupların verileri karşılaştırıldığında 1. gün kayıtlarından elde edilen QT sürelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. 8. gün alınan EKG kayıtlarından elde edilen QT süresi değerlerinde İZO ve İZO-MEL gruplarında 1. gün verilerine göre 8. gün QT sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü (p<0,01).

**Tablo 7.** Tüm gruplarda QT süresi değerlerindeki 1. ve 8. günlerdeki değişimler.

| | QT süresi (msn) | |
|---|---|---|
| **Gruplar** | **1. gün** | **8. gün** |
| KONTROL | 64 ± 3 | 62 ± 3 |
| MEL | 71 ± 1 | 70 ± 1 |
| İZO | 64 ± 1 | 72 ± 1* |
| İZO-MEL | 78 ± 1 | 82 ± 1* |

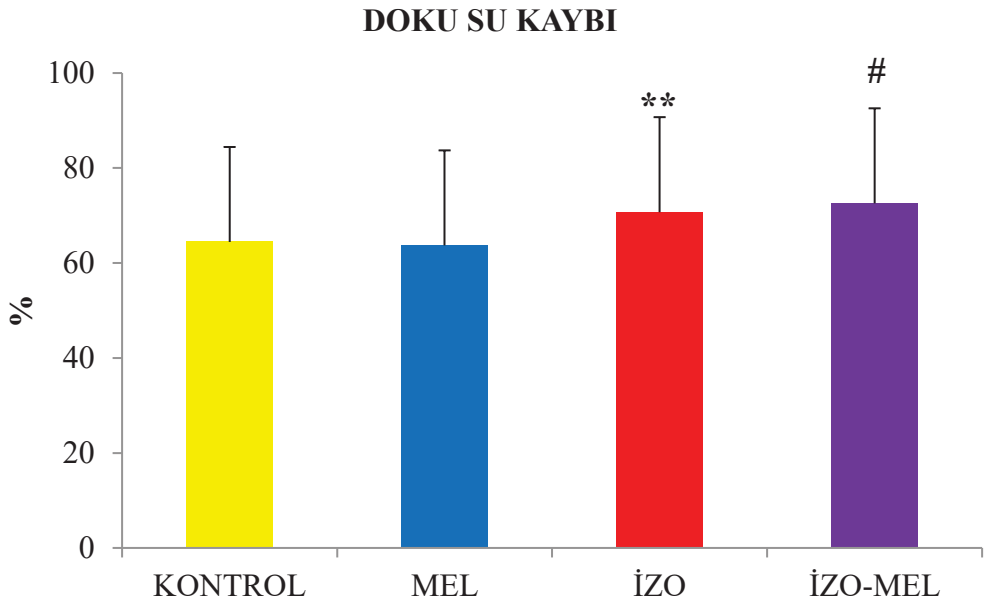
*1. gün verileri ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık, p<0,01.




**Şekil 11.**EKG kayıtlarından elde edilen QT sürelerinin karşılaştırılması(*:1. gün verilerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık p<0.01).

### 4.3. Doku Su Kaybı Oranı Verileri

Sol ventrikül dokusunda uygulanan doku kurutma yöntemi ile elde edilen veriler Şekil 12'de sunulmuştur. İZO ve İZO-MEL gruplarında doku su kaybı için elde edilen verilerde artış olduğu belirlendi. Kontrol grubunda % 65 olan değer MEL grubunda % 64 ile Kontrol grubuna oldukça yakın belirlendi. Ancak bu değer İZO grubunda % 71'e ulaştı ve Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,01$). Aynı parametrenin İZO-MEL grubunda % 73 ile hem Kontrol hem de MEL grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu anlaşıldı ($p<0,01$).




**Şekil 12.** Doku kurutma yöntemi ile belirlenen doku su kaybı verilerinin karşılaştırılması.(**: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,01$;#: Kontrol ve MEL grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık,$p<0,01$).

### 4.4. Biyokimyasal veriler

Çalışmada biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere sıçanlardan alınan kan örneklerinden serum elde edildi. Elde edilen serum örneklerinden miyokard hasarının göstergelerinden olan cTnI ve CK-MB düzeyleri belirlendi.

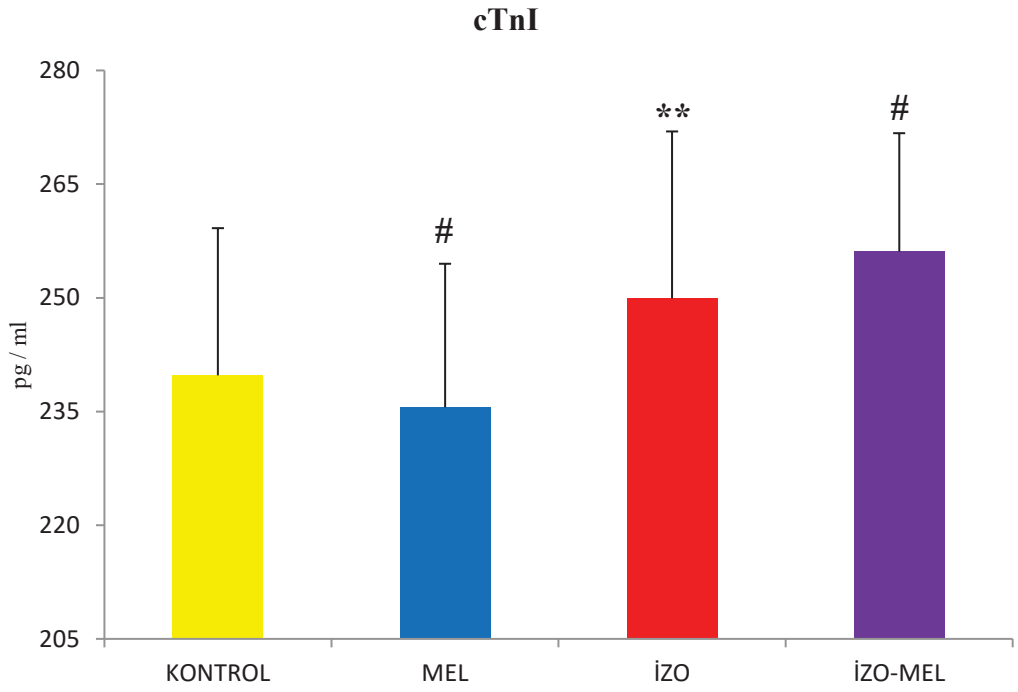
#### 4.4.1. Kan cTnI Düzeyleri

Elde edilen serum örneklerinden belirlenen cTnI seviyeleri Tablo 8 ve Şekil 13'de verilmiştir. Gruplar arasında serum cTnI seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre İZO grubunda anlamlı artış tespit edildi ($p<0,01$). Aynı zamanda İZO grubu ile karşılaştırıldığında İZO-MEL grubunda serum cTnI seviyeleri anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$).

**Tablo 8.** Tüm gruplara ait cTnI düzeylerindeki değişimler.

| Gruplar | cTnI Seviyeleri (pg/ml) |
|---|---|
| KONTROL | 240 ± 20 |
| MEL | 237 ± 21 ** |
| İZO | 249 ± 24 # |
| İZO-MEL | 255 ± 17# |

**Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık ($p<0,01$), # İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık ($p<0,05$)




**Şekil 13.** Tüm gruplara ait cTnI değerlerinin grafiksel gösterimi.(**: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık $p<0,01$; #: İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık $p<0,05$)

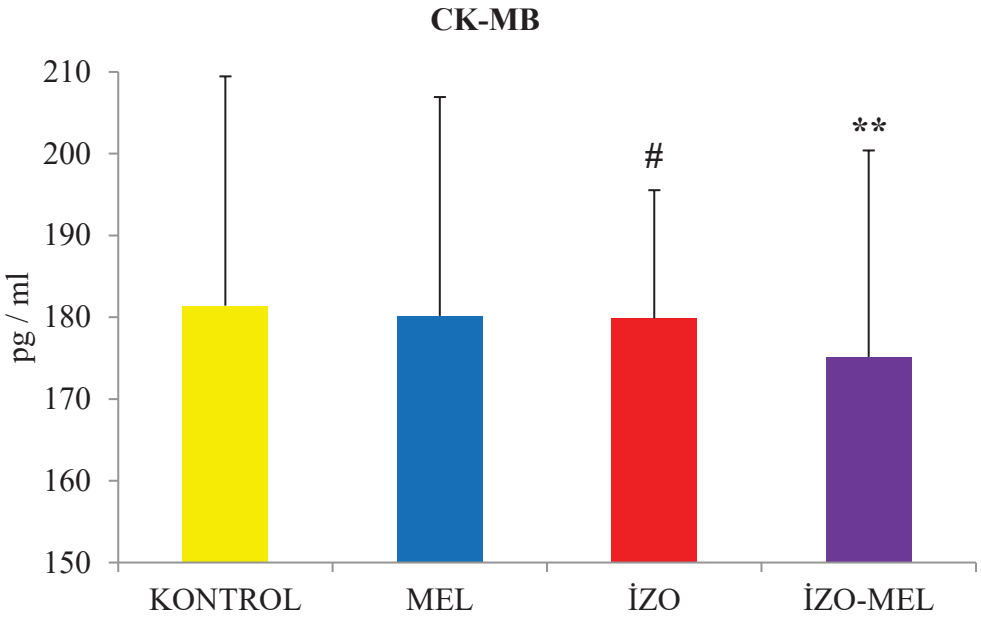
### 4.4.2. Kan CK-MB Düzeyleri

Elde edilen serum örneklerinde belirlenen CK-MBseviyeleri Tablo 9 ve Şekil 14'te verilmiştir. Kontrol grubu ile İZO grubu arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$). MEL grubu ile kıyaslandığında İZO grubunda anlamlı azalış görüldü ($p<0,01$). İZO-MEL grubunda hem Kontrol hem de İZO grubuna göre anlamlı düzeyde azalış tespit edildi ($p<0,01$).

**Tablo 9.** Tüm gruplara ait CK-MB seviyeleri.

| **Gruplar** | **CK-MB Seviyeleri (pg/ml)** |
|---|---|
| KONTROL | 175,08 ± 36 |
| MEL | 178,36 ± 18 |
| İZO | 174,60 ± 34$^{\#}$ |
| İZO-MEL | 170,71 ± 30$^{**}$ |

$^{**}$: Hem KONTROL hem İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, ($p<0,01$), $^{\#}$:MEL grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, ($p<0,01$).

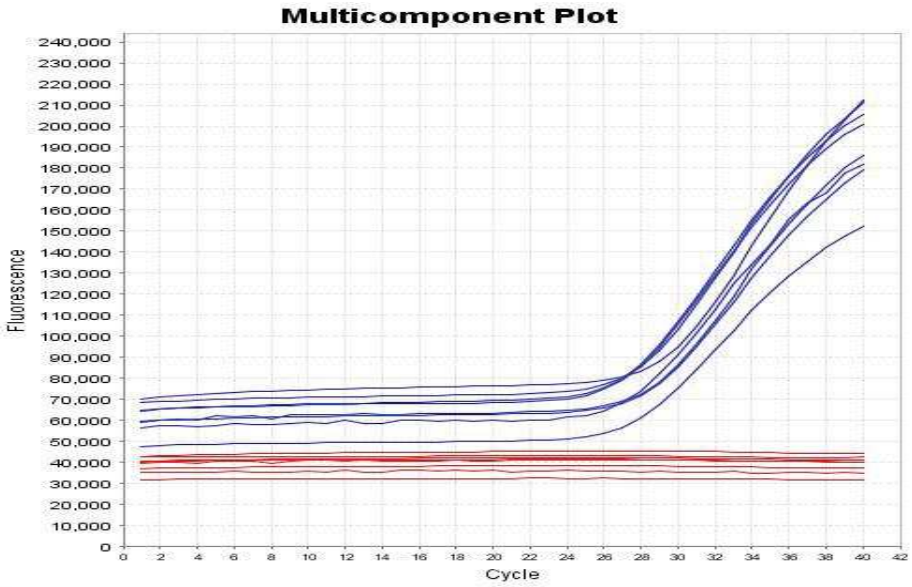



**Şekil 14.** Tümgruplara ait CK-MB seviyelerinin karşılaştırılması(**: Hem KONTROL hem İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık p<0,01; #: MEL grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık p<0,01).

## 4.5. Gen İfade Analiz Sonuçları

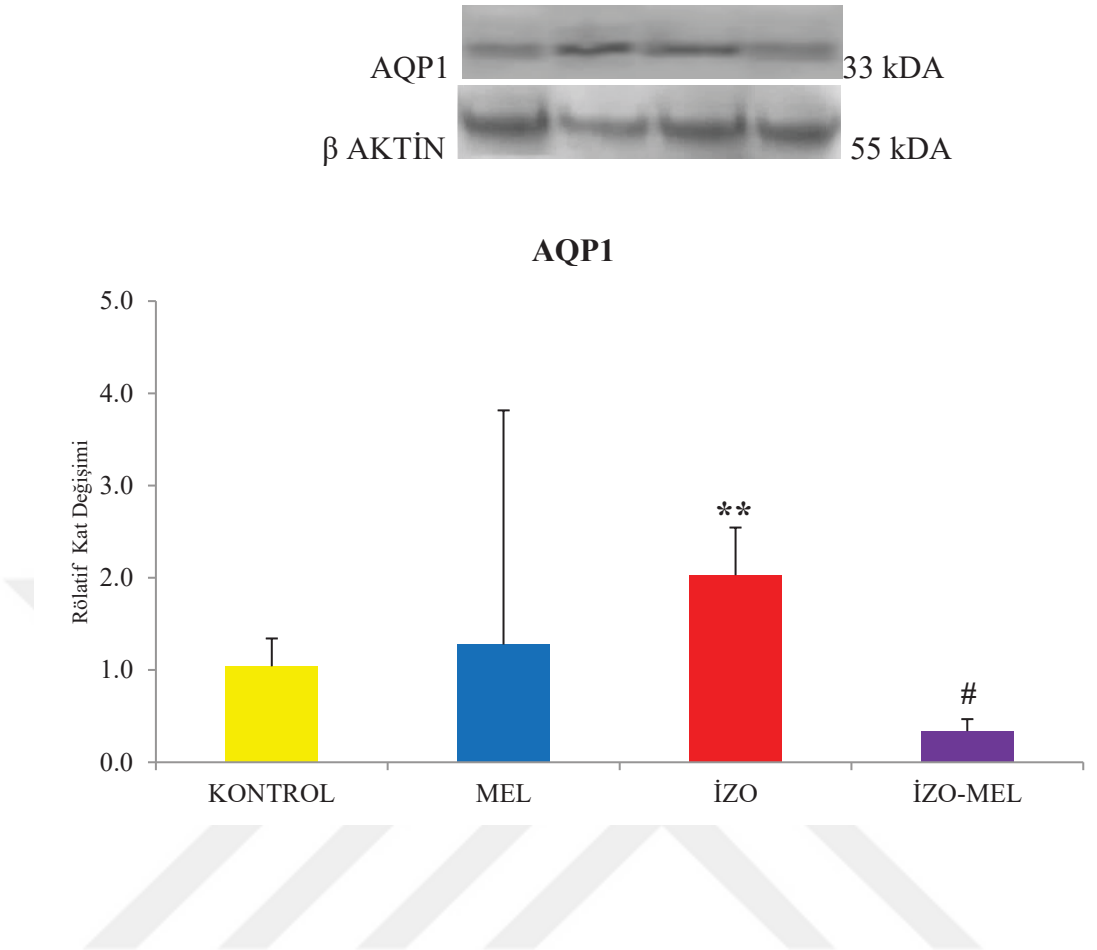
### 4.5.1. Sol Ventrikül AQP1 Gen Ekspresyonu ve ProteinDüzeyindeki Değişimler

RT-PCR yöntemi ile elde edilen AQP1 genine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 15'te verilmiştir.




**Şekil15.** AQP1 genine ait amplifikasyon eğrisi.

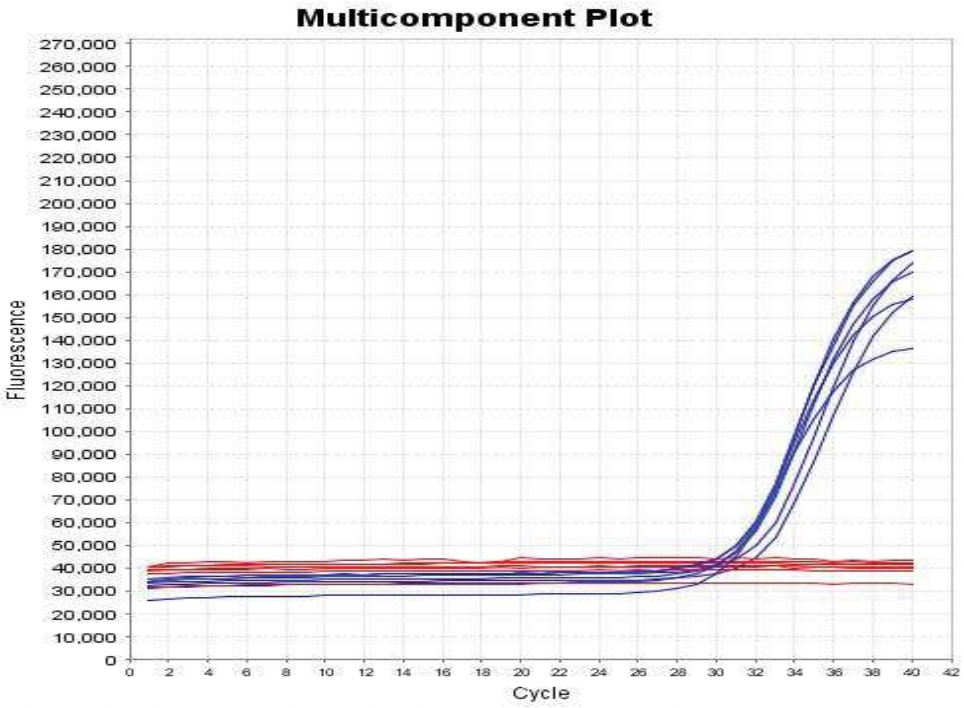
AQP1 gen ekspresyonu açısından İZO grubunun en yüksek değere sahip olduğu anlaşıldı. İZO grubunda gözlemlenen bu artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$). İZO grubunda belirlenen AQP1 gen ekspresyon değeri aynı zamanda MEL grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). Bu sonuç melatoninin İZO sonrası kalpte artan AQP1 gen ekspresyonları üzerine anlamlı düzeyde azaltıcı etkisi olduğunu gösterdi (Şekil 16).




**Şekil 16.** Tüm grupların AQP1 gen ekspresyon seviyelerinin grafiksel gösterimi (**: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, p<0,01; #: İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, p<0,01).

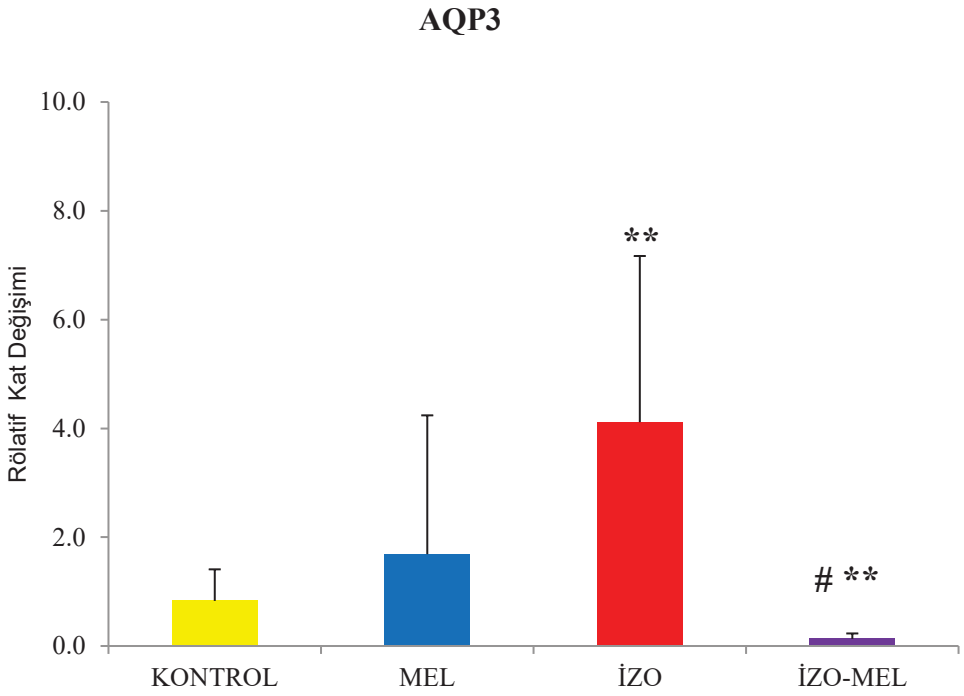
### 4.5.2. Sol Ventrikül AQP3 Gen Ekspresyon Düzeyindeki Değişimler

AQP3 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi Şekil 17'de verilmiştir.




**Şekil 17.**AQP3 genine ait amplifikasyon eğrisi.

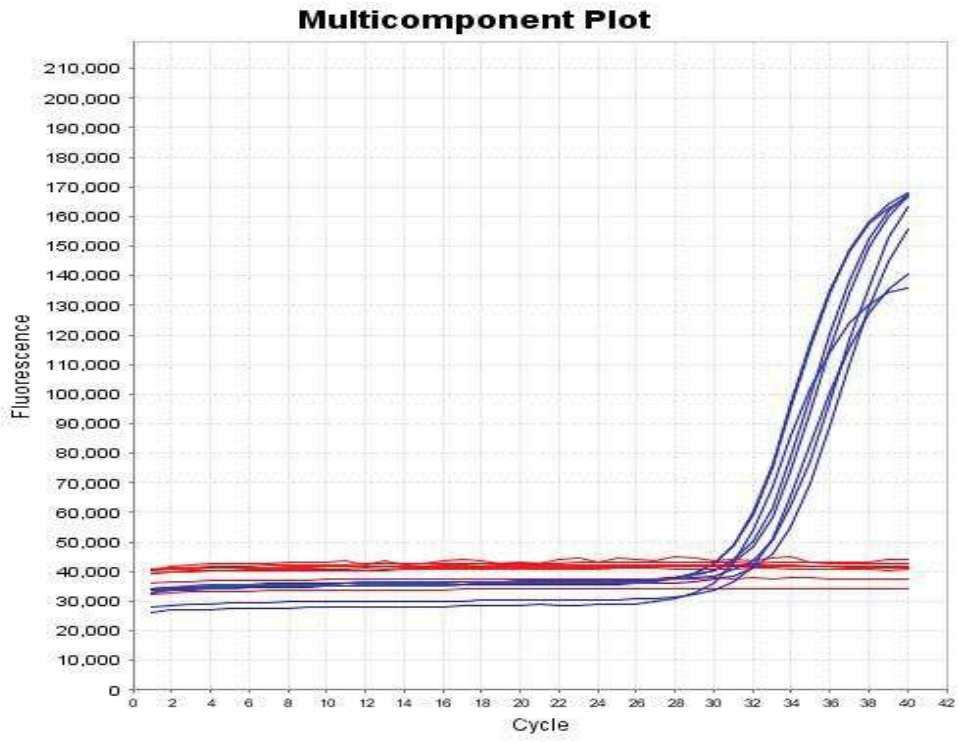
AQP3 gen ekspresyon seviyesi İZO grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,01$). İZO grubu ile karşılaştırıldığında İZO-MEL grubunda ise anlamlı azalış görüldü ($p<0,01$). İZO uygulaması sol ventrikül dokusunda AQP3 gen ekspresyonunu arttırırken, melatonin uygulamasının AQP3 gen ekspresyonlarındaki artışı azalttığı anlaşıldı (Şekil 18).




**Şekil 18.** Tüm grupların AQP3 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (**: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, p<0,01; #: İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, p<0,01)

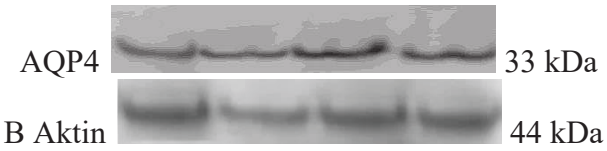
### 4.5.3. Sol Ventrikül AQP4 Gen Ekspresyonu Düzeyindeki Değişimler

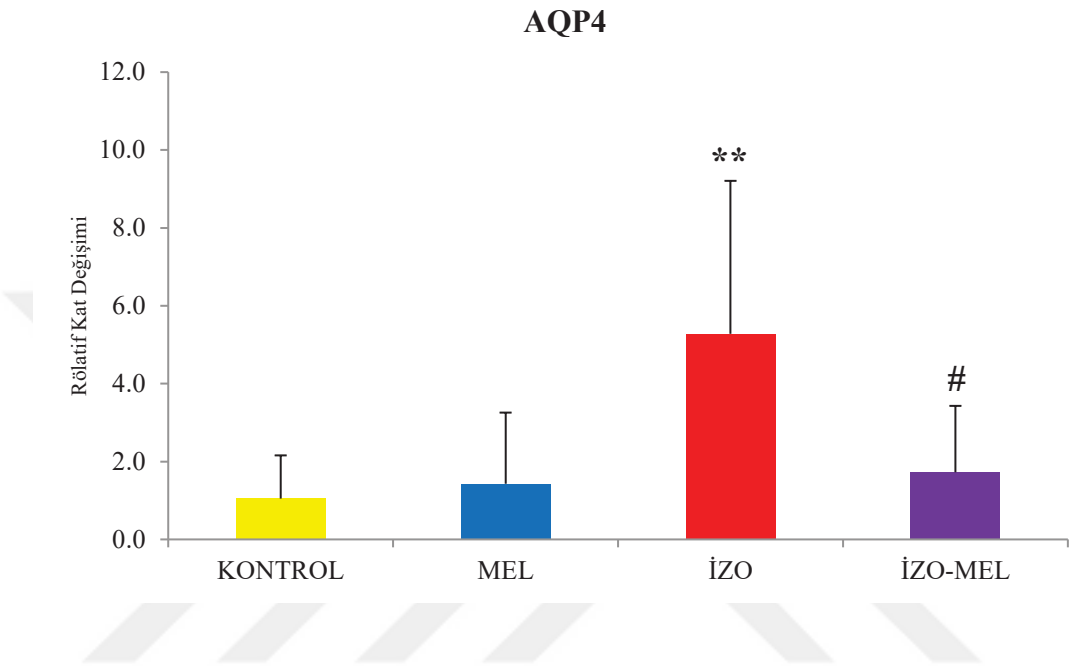
AQP4 genine için RT-PCR'da elde edilen amplifikasyon eğrisi Şekil 19'da verilmiştir.




**Şekil 19.** AQP 4 genine ait amplifikasyon eğrisi.

AQP4 gen ekspresyon değerleri için elde edilen verilere göre Kontrol grubuna göre İZO grubunda anlamlı düzeyde artış gözlemlendi ($p<0,01$). İZO grubu ile karşılaştırıldığında, İZO-MEL grubunda AQP4 gen ekspresyon seviyesi anlamlı düzeyde azaldı ($p<0,05$). Melatoninin İZO ile indüklenen MI sonrasında artan AQP4 gen ekspresyon seviyesini azalttığı tespit edildi (Şekil 20).

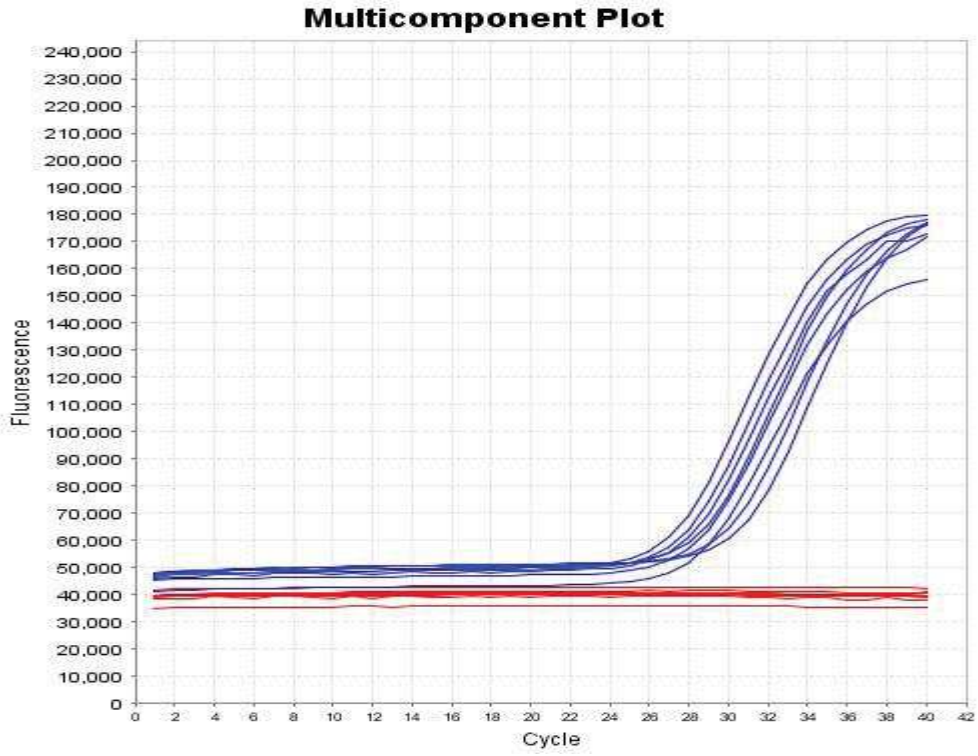



**Şekil 20.** Tüm grupların AQP 4 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (**: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık p<0,01; #: İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, p<0,05)

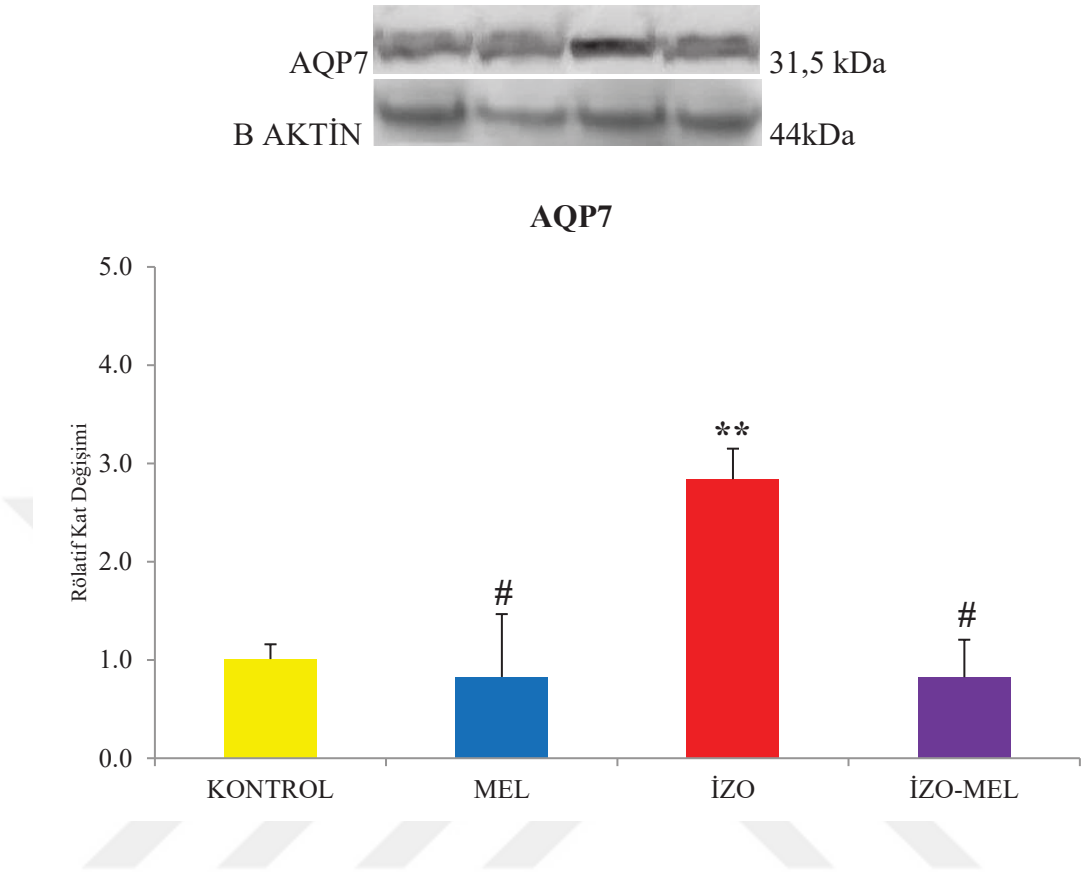
### 4.5.4. Sol Ventrikülde AQP7 Gen Ekspresyonu ve Protein Düzeyindeki Değişimler

RT-PCR yöntemi ile elde edilen AQP7 genine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 21'de verilmiştir.




**Şekil 21.** AQP7 genine ait amplifikasyon eğrisi.

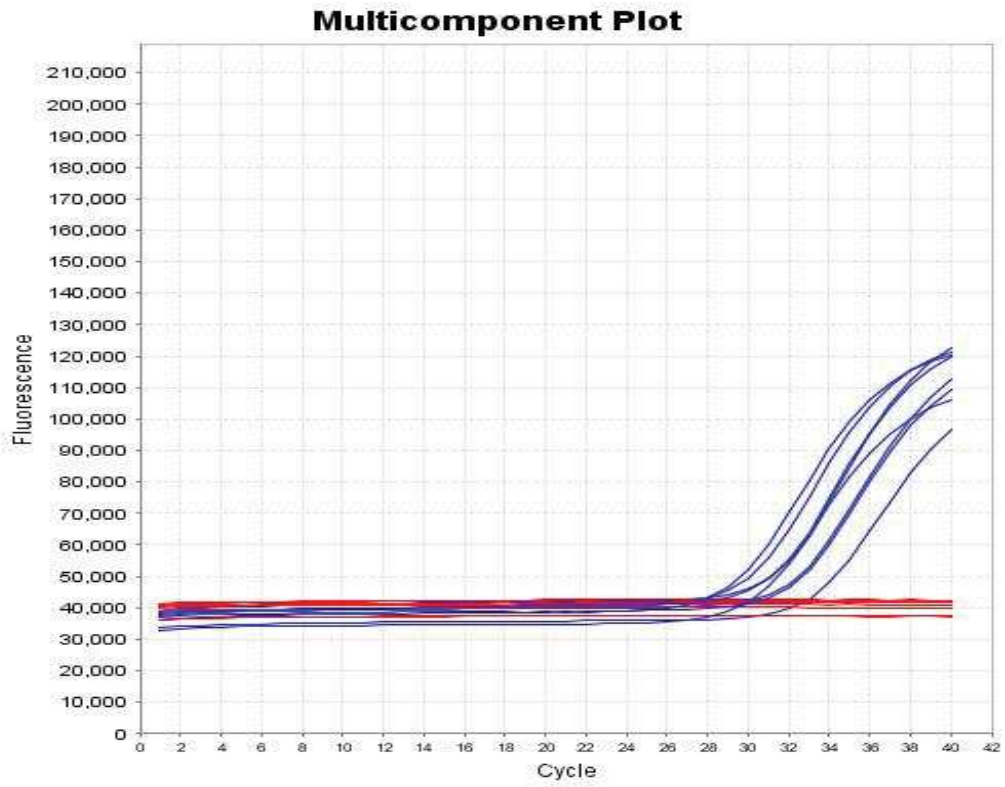
Tüm gruplara ait veriler AQP7 gen ekspresyonu açısından Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece İZO grubundaki artış anlamlı bulundu ($p<0,01$). İZO grubuna göre kıyaslandığında hem MEL grubunda hem de İZO-MEL grubunda elde edilen AQP7 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı düzeyde düşük olduğu görüldü ($p<0,01$). Melatonin MI oluşturmak üzere verilen İZO uygulaması ile artan AQP7 gen ekspresyon seviyelerini azalttı ( Şekil 22).




**Şekil22.** Tüm grupların AQP 7 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (**: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,01$; #: İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,01$).

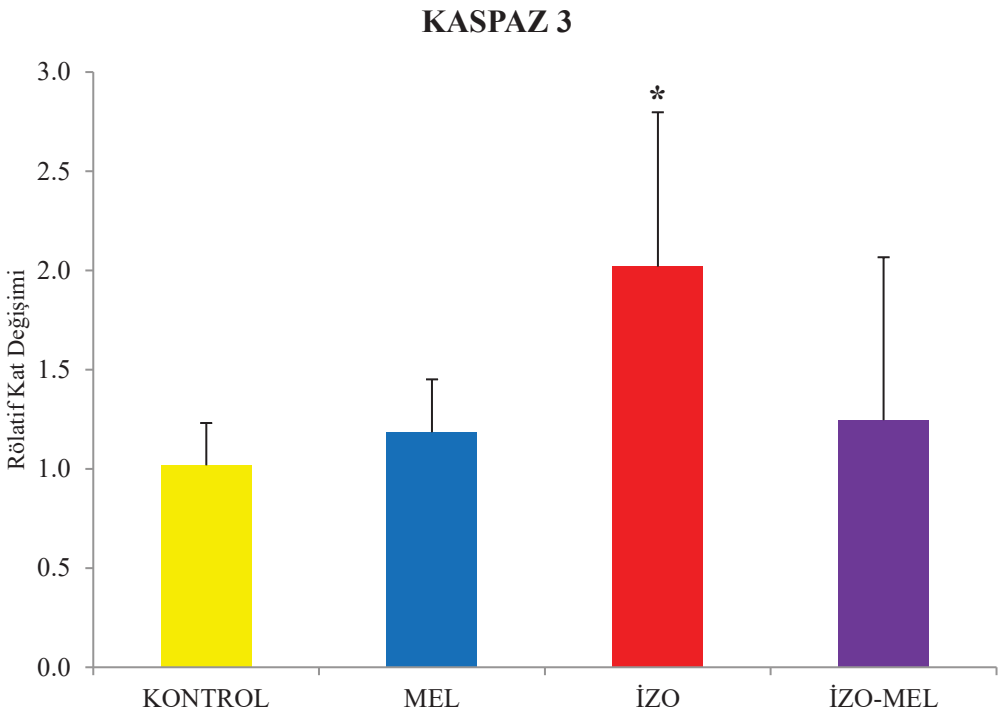
### 4.5.5. Sol Ventrikül Kaspaz3 Gen Düzeyindeki Analizler

Sol ventrikül dokusunda Kaspaz3 genine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 23'te verilmiştir.




**Şekil 23.** Kaspaz3 genine ait amplifikasyon eğrisi.

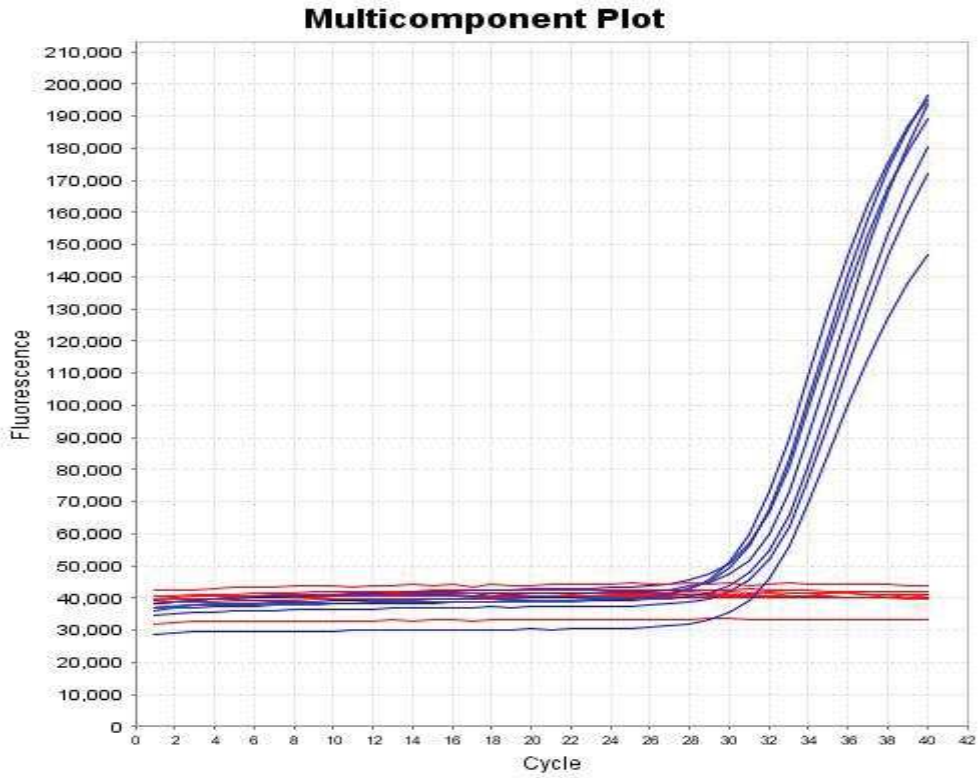
Kaspaz3 gen ekspresyonuna ait en yüksek değer İZO grubunda belirlendi ve bu artış Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). MEL ve İZO-MEL gruplarındak değişimler açısından anlamlı bir farklılık belirlenmedi (Şekil 24). Bu sonuçlar MI modeli oluşturulan grupta apoptozisin diğer gruplara göre anlamlı düzeyde daha yüksek olarak ortaya çıktığını gösterdi. Melatonin uygulanan grupta en düşük Kaspaz3 gen ekspresyon seviyesi belirlenmiş olmasına rağmen bu değer İZO grubuna göre anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).




**Şekil 24.** Tüm gruplarda Kaspaz3 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (*: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,05$).

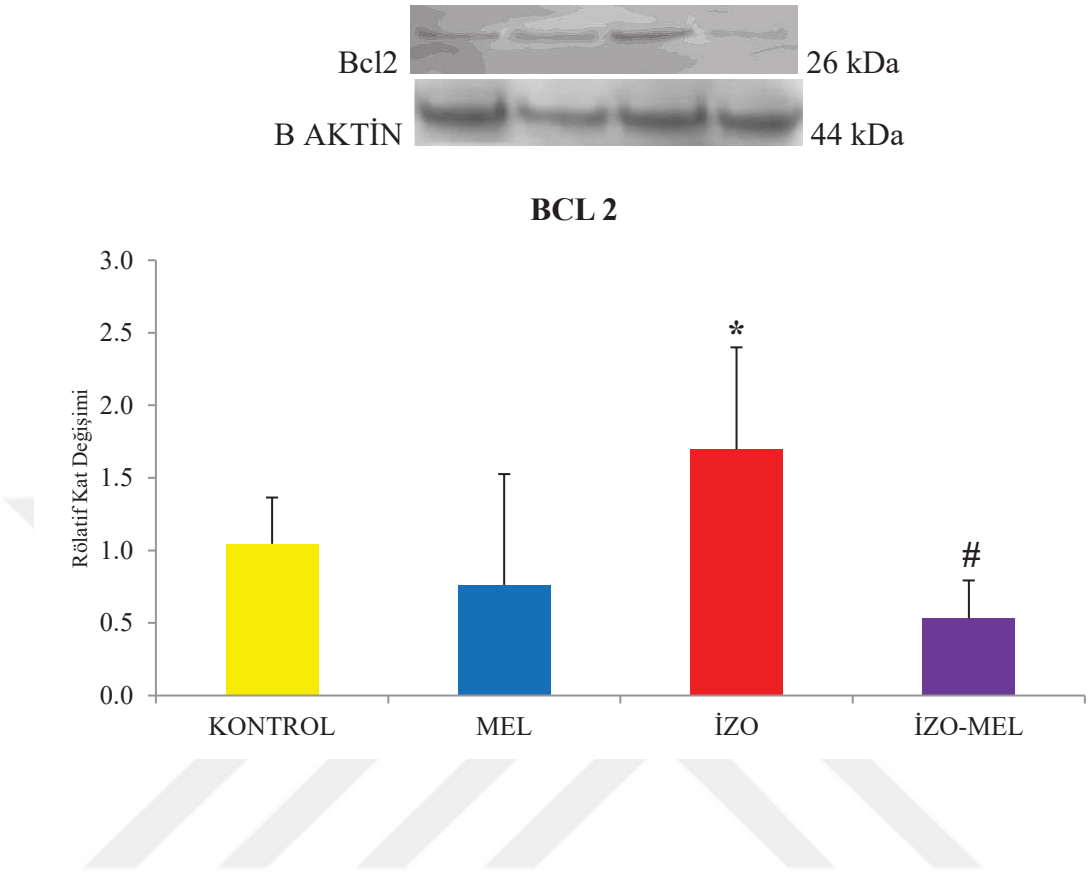
### 4.5.6. Sol Ventrikül Bcl2 Gen Ekspresyon ve Protein Düzeyindeki Değişimler

Sol ventrikül dokusunda Bcl2 genine ait amplifikasyon eğrisi ve ekspresyon seviyeleri Şekil 25'te verildi.




**Şekil25.** Bcl2 genine ait amplifikasyon eğrisi.

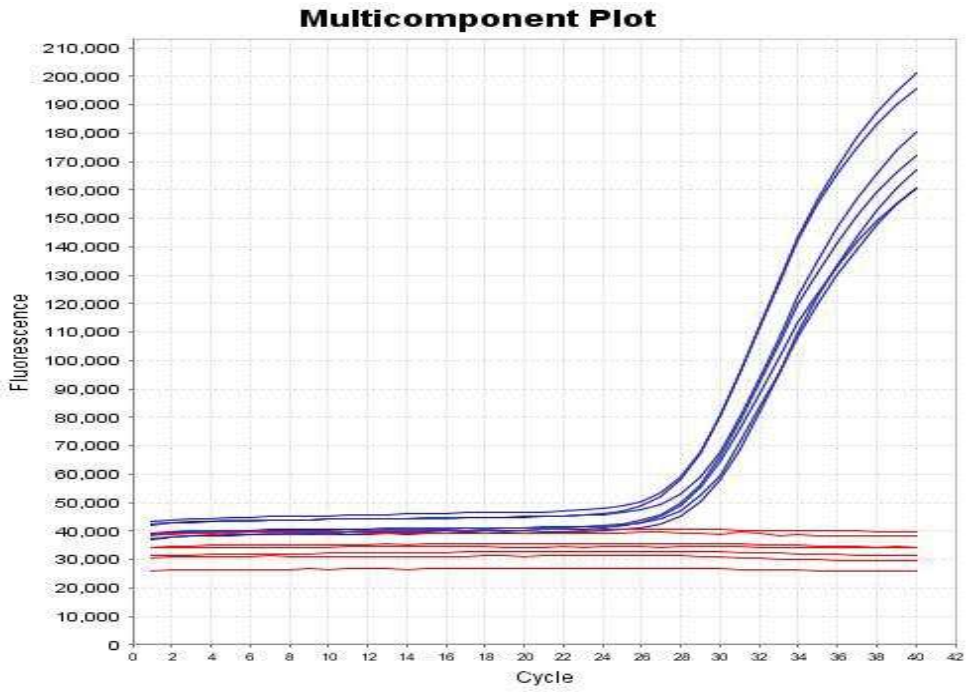
Bcl2 gen ekspresyon seviyelerine bakıldığında Kontrol grubuna kıyasla İZO grubunda anlamlı düzeyde yüksek bir değer belirlendi ($p<0,05$). İZO grubu ile kıyaslandığında ise İZO-MEL grubunda anlamlı düzeyde düşük Bcl2 gen ekspresyon seviyesi belirlendi ($p<0,05$; Şekil 26).




**Şekil 26.** Tüm gruplarda Bcl2 gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (*: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,05$; #: İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,05$)

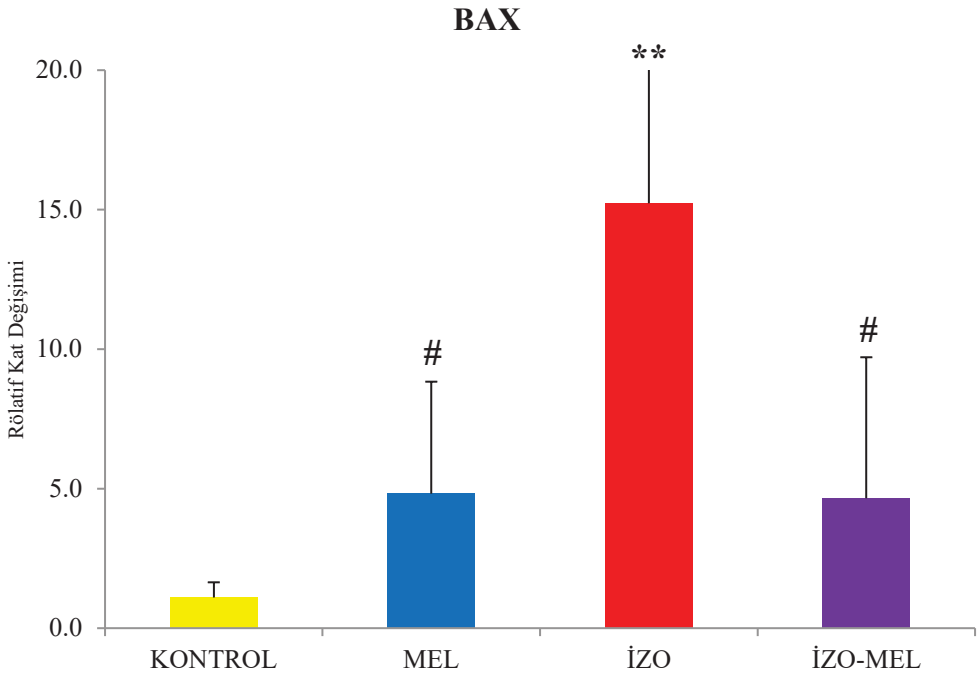
### 4.5.7. Sol Ventrikül BAX Gen Ekspresyonu Düzeyindeki Değişimler

Sol ventrikül dokusunda Bax genine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 27'de gösterilmiştir.




**Şekil27.** BAX genine ait amplifikasyon eğrisi.

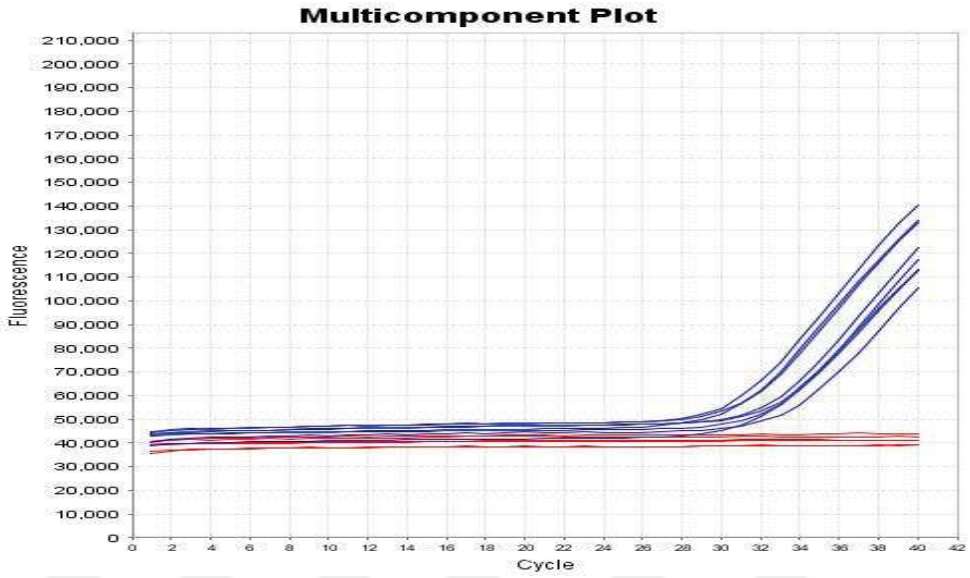
BAX gen ekspresyon değerleri açısından en yüksek değerin İZO grubunda ortaya çıktığı ve Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu anlaşıldı ($p<0,01$). İZO grubundaki yüksek BAX gen ekspresyon seviyelerinin aynı zamanda MEL ve İZO-MEL gruplarına göre de anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). Sonuçlar bir proapoptotik protein olan BAX'ın gen ekspresyonlarının İZO ile indüklenen MI modelinde arttığını ve bu durumun apoptozisi uyardığını gösterdi. Melatonin uygulamasının ise, BAX gen ekspresyon seviyesini azaltarak sol ventrikülü apoptozise karşı koruduğunu gösterdi (Şekil 28).




**Şekil 28.** Tüm grupların BAX gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin grafiksel gösterimi (**: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,01$; #: İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,01$)

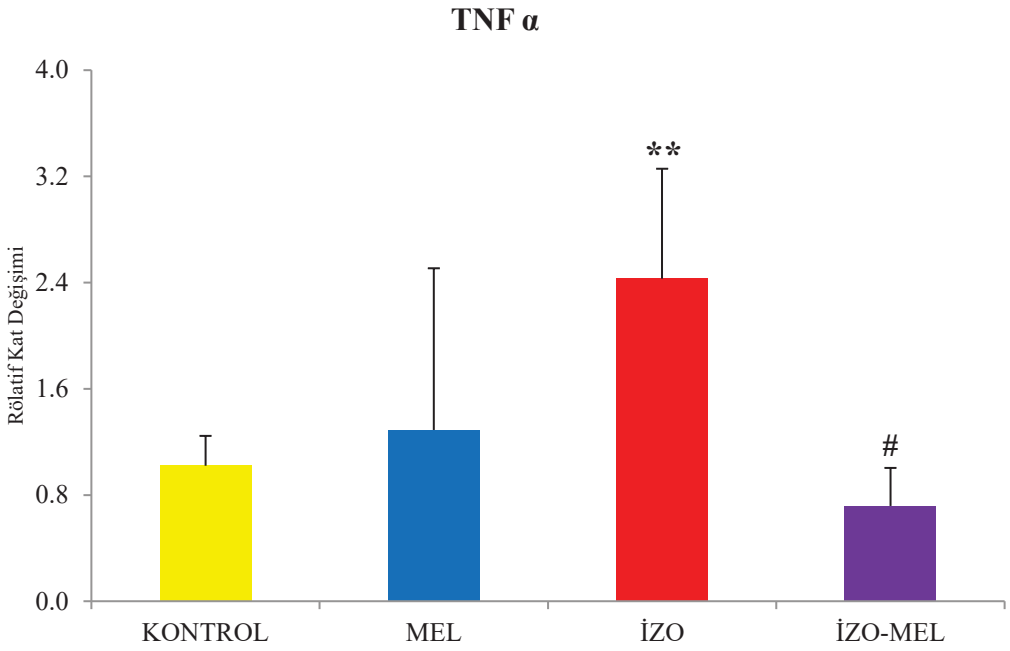
### 4.5.8. Sol Ventrikül TNF α Gen Ekspresyon Seviyelerindeki Değişimler

Sol ventrikül dokusunda TNFα genine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 29'da verilmiştir.




**Şekil29.** TNFα genine ait amplifikasyon eğrisi.

TNFα gen ekspresyonu için İZO grubunda elde edilen veriler Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İZO grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p<0,01$). İZO grubu ile karşılaştırıldığında İZO-MEL grubu gen ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalış tespit edildi ($p<0,01$). İZO uygulamasının TNFα gen ekspresyon seviyelerinde artışa sebep olduğu görülürken melatonin uygulanmasının TNFα gen ekspresyon seviyesini azalttığı görüldü. (Şekil 30).




**Şekil 30.** Tüm gruplarda TNFα gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (**: Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılık, p<0,01; #: İZO grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, p<0,01).

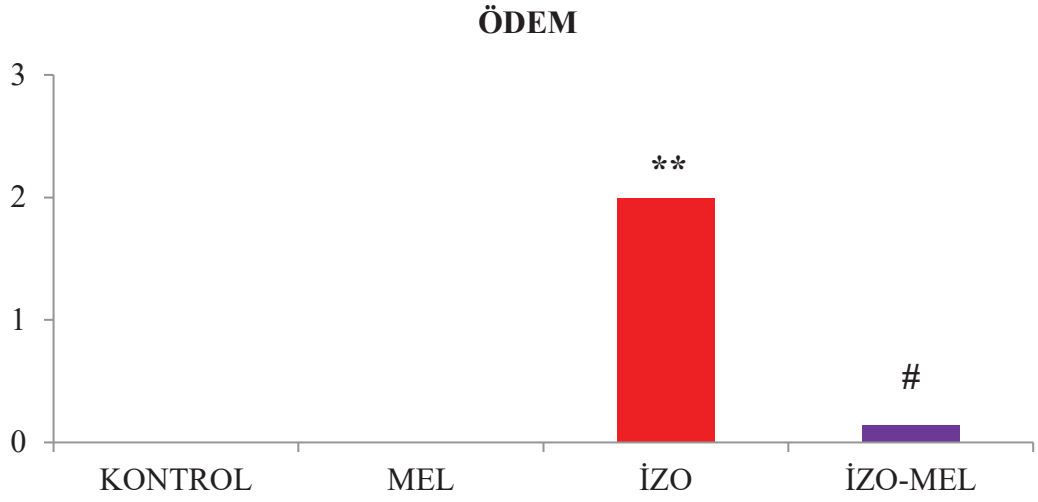
### 4.6. Histopatolojik Veriler

Sıçan kalplerinden elde edilen sol ventrikül dokusunda histopatolojik değerlendirmeler için H-E boyaması yapıldı. Yapılan boyamalarda hücresel ödem ve mononükleer hücresel infiltrasyon parametreleri değerlendirildi. Elde edilen veriler 0'dan 4'e kadar skorlandı.

**Tablo 10.** H-E boyama sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan skorlama kriterleri.

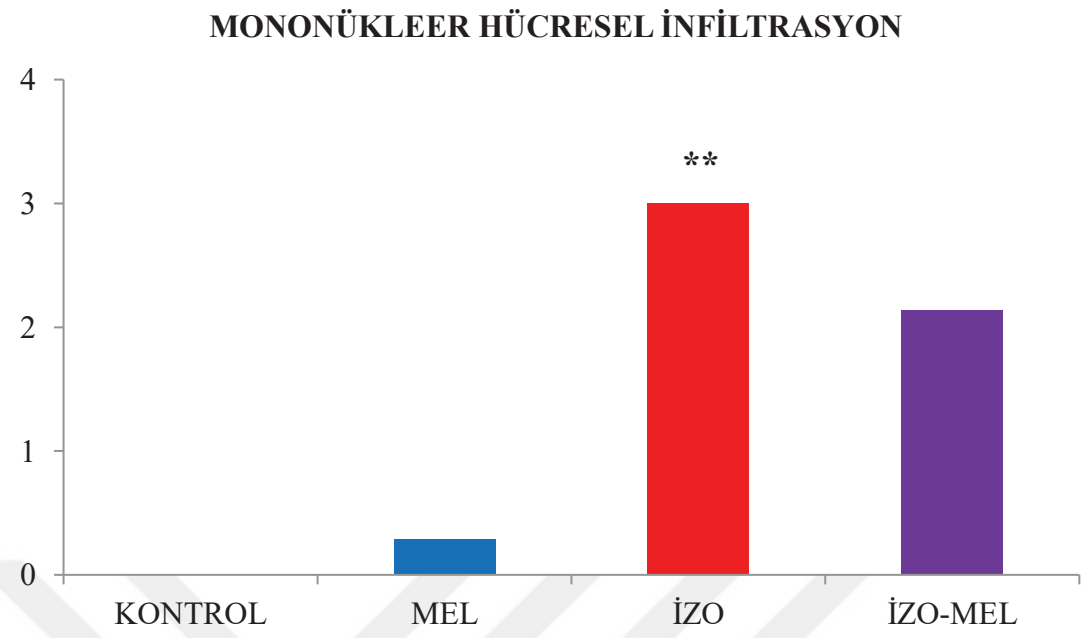
| | |
|---|---|
| Derece 0 | Yok |
| Derece 1 | Hafif |
| Derece 2 | Orta |
| Derece 3 | Şiddetli |
| Derece 4 | En ciddi |

H-E boyamada gözlenen ödem değerlendirme sonuçlarına göre Kontrol grubunda herhangi bir ödemli alana rastlanmadı (Resim 13). MEL grubunda kontrol grubuna benzer bir görüntü tespit edildi ve ödemli bir alanın olmadığı anlaşıldı (Resim 14). İZO grubunda ödemli alanlar belirlendi ve skorlandı. Elde edilen skorlar için yapılan istatistiksel değerlendirmede İZO grubundaki verilerin diğer tüm gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu anlaşıldı ($p<0,01$; Resim 15 ve Şekil 31). İZO uygulamasını takiben melatonin uygulanan grupta (İZO-MEL) ödem skorunun İZO grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı ve kontrol ile MEL grubu değerlerine yaklaştığı görüldü ($p<0,01$). Bu bulgular melatoninin İZO kaynaklı kardiyak ödemi histopatolojik düzeyde azaltıcı bir etkiye sahip olduğunu gösterdi.

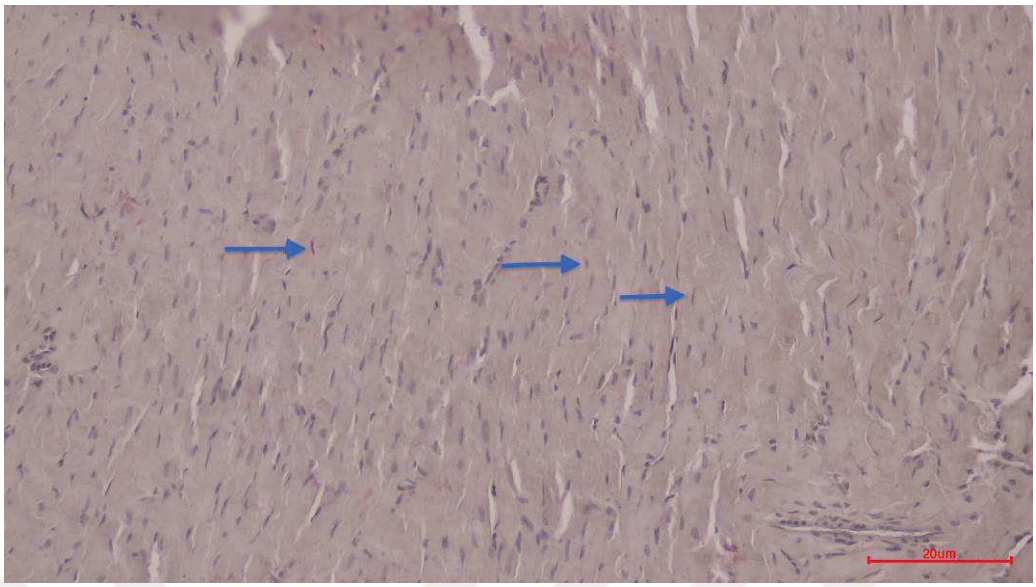



**Şekil 31.** Tüm gruplarda H-E boyama ile tespit edilen hücresel ödem sonuçlarının karşılaştırılması. ($^{**}$: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,01$; $^{\#}$: İZO grubuna istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,01$).

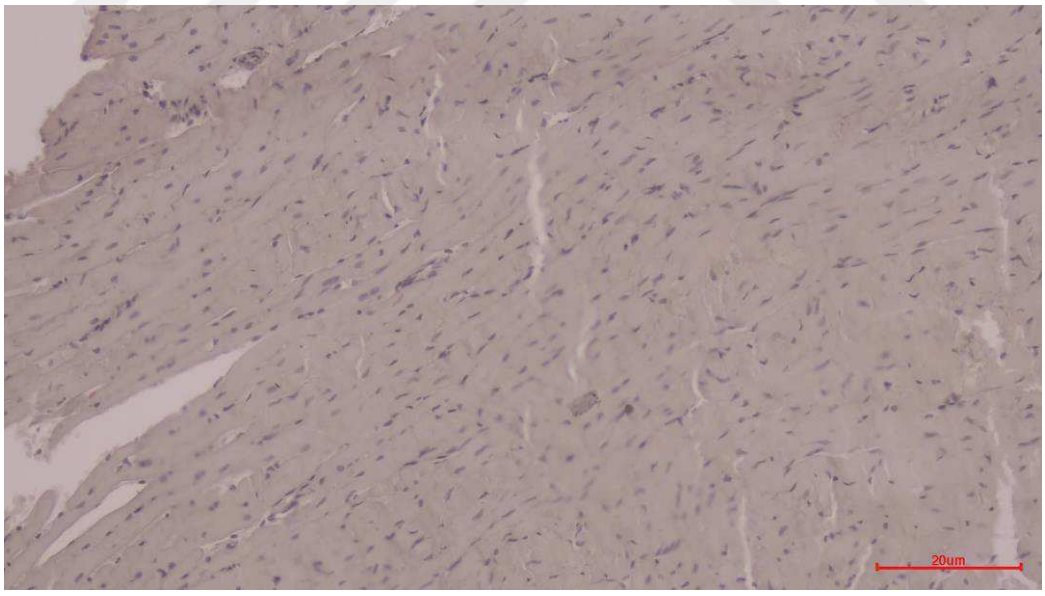
H-E boyama yapılan sol ventrikül dokuları ödemin yanı sıra mononükleer hücre infiltrasyon skorlaması yönü ile de değerlendirildi (Resim 15 ve Resim 16). Kontrol grubunda herhangi bir mononükleer hücre infiltrasyonu belirlenmedi. MEL grubunda ise mononükleer hücresel infiltrasyonun oldukça düşük düzeyde olduğu anlaşıldı. İZO uygulanan grupta mononükleer hücresel infiltrasyon skoru ise 3 olarak belirlendi. Bu artış hem kontrol hem de MEL grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$). İZO sonrası melatonin uygulaması mononükleer hücresel infiltrasyon skorunda bir azalmaya yol açtı ancak bu düşüş anlamlı bulunmadı. Bu sonuçlar İZO tarafından oluşturulan miyokard infarktüsü modelinde melatoninin mononükleer hücresel infiltrasyon skoru üzerine olan etkisinin ödem üzerine olan etkisine göre daha zayıf olduğunu gösterdi (Şekil 32).



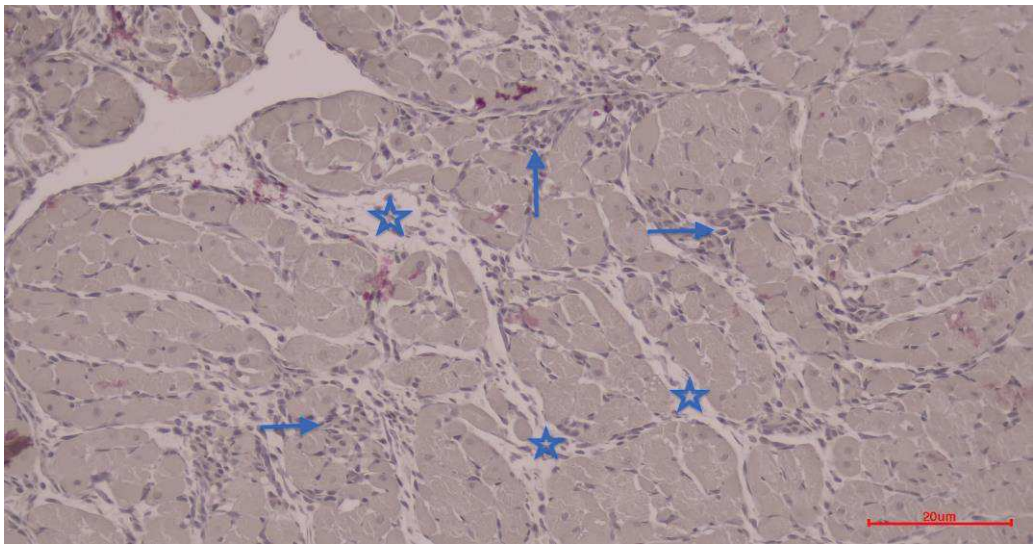

**Şekil 32.** Tüm gruplarda H-E boyama ile tespit dilenmononükleer infiltrasyon sonuçlarının karşılaştırılması (**: Kontrol ve MEL grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık, $p<0,01$).



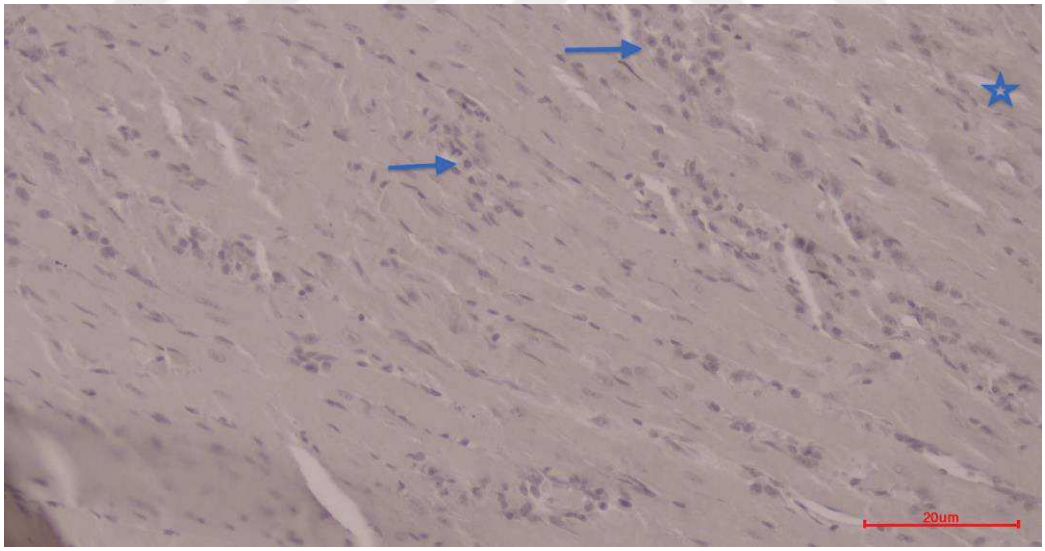

**Resim 13.** Kontrol grubuna ait normal kalp kası görüntüsü. Mavi oklar ökromatik sentral yerleşimli nükleusları göstermektedir (H-E x200).




**Resim 14.** MEL grubuna ait histolojik görüntü. Kontrol grubuna benzer histolojik yapı izlenmektedir (H-E x200).




**Resim 15.** İZO grubuna ait histolojik görüntü. Oklar mononükleer infiltrasyon alanları, yıldızlar ise ödemli alanları göstermektedir (H-E x200).




**Resim 16.** İZO-MEL grubuna ait histolojik görüntü. Oklar hafif mononükleer infiltrasyon izlenen alanları, yıldız ise ödemli alanları göstermektedir (H-E x200).

# 5.TARTIŞMA

Bu çalışmada İZO ile indüklenen MI modeli oluşturulan sıçanlarda melatoninin miyokard ödemi üzerine koruyucu etkileri araştırıldı. Bu amaçla İZO uygulamasından 24 saat sonra hedeflenen parametreler için noninaziv ve invaziv işlemler yapıldı. İlk olarak sıçanlardan EKG alınarak kalp atım hızı ve QT süresi belirlendi. Elde edilen EKG'ler MI göstergesi olarak ST segment elevasyonu açısından değerlendirildi. MI'ın biyokimyasal belirteçleri olarak cTnI ve CK-MB düzeyleri alınan kan örneklerinde ELISA yöntemi ile ölçüldü. Sıçanlar ötenazi edildikten sonra, sol ventrikül dokusundan miktarı bilinen bir parça alınarak suyu uçuruldu ve ödemin varlığı fiziksel olarak da belirlendi. Miyokardiyal ödemi histopatolojik düzeyde ortaya koyabilmek için sol ventrikül dokusuna hematoksilen-eozin boyaması yapıldı. Aynı kesitlerden doku hasarının göstergesi olarak hücresel infiltrasyon düzeyleri elde edildi. İZO ile indüklenen MI'ın sol ventrikül dokusunda inflamasyon üzerine olan etkisi TNF α gen ekspresyon değerleri incelenerek belirlendi. MI sonrası miyokardiyal apoptozun belirlenmesi için kaspaz3, Bcl2 ve BAX gen ekspresyon düzeyleri ortaya konuldu. Tüm bu parametrelerin AQP kanalları ile ilişkisini ve MI sonrası AQP kanalarındaki değişimi belirlemek amacı ile AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7 gen ekspresyon düzeyleri belirlendi. İZO uygulamasından önce ve sonrasında bir gruba melatonin verilerek koruyucu bir etki gösterip göstermediği araştırıldı. Gen ekspresyonlarındaki değişimlerin protein üretimine dönüşüp dönüşmediğinin belirlenmesi amacı ile AQP1, AQP4, AQP7 ve Bcl2 için Western Blot analizi yapıldı.

Çalışmamızda, MI oluşturmak üzere İZO uygulaması yapıldı. MI modeli oluşturmada literatürde yaygın olarak iki yöntem kullanılmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan yöntem sol ön inen koroner arterin (LAD) cerrahi olarak kapatılmasıdır. Bu model, insanlarda görülen MI ve konjestif kalp yetmezliğine benzer şekilde doku hasarına sebep olur (Bayat ve ark., 2002). LAD ligasyonu, kan akışının tam olarak bloke edilmesine ve geri döndürülemez hipoksiye yol açar. Bu durum ise kalp dokusunda enfarkte alanın oluşmasına ve hasara sebep olur. Bu

avantajlarının yanı sıra, LAD ligasyon modeli yüksek mortalite oranına sahip bir modellemedir (De Villiers ve Riley, 2020).

MI modeli oluşturmada göz önüne alınan temel mekanizmalar koroner arterin blokajı, koroner arterin bir arterosklerotik plak tarafından tıkanması veya koroner arter spazmı oluşturma esasına dayanır (Wang ve Eitzman, 2013; Dominguez-Rodriguez ve ark., 2014; Hung ve ark., 2014). Koroner arterdeki akımının kesilmesi veya engellenmesi kalp kasının besin ve oksijen desteğinin azalmasına ve miyokard hasarına yol açar (Ambrose ve Singh, 2015). MI sonrası miyokardda ortaya çıkan patofizyolojik değişikliklerin nedeni olarak inflamasyon ve oksidatif stres gösterilir (Neri ve ark., 2015).

Çalışmamızda MI modeli oluşturmak üzere İZO uygulaması seçilmiştir. İZO uygulaması da LAD ligasyonu gibi yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bir β-adrenerjik reseptör agonisti olan İZO, yüksek dozda uygulandığında kalp kasında hipoksiye, kalsiyum birikmesine, serbest radikal oluşmasına ve inflamasyona yol açar (Yeager ve ark., 1981; Rona, 1985; Meeran, 2020). Sıçanlarda bu model yaygın olarak kullanılmakta ve bir çok molekülün koruyucu etkisinin test edilmesine imkan vermektedir (Nandave ve ark., 2007; Patel ve ark., 2010; Garg ve Khanna, 2014; Moradi-Arzeloo, 2016; Al-Rashees ve ark., 2018). Bu amaçla İZO uygulaması 24 saat ara ile 2 kez olmak üzere hem derialtı (80-150 mg/kg) hem de intraperitoneal (85-150 mg/kg) yolla yapılmaktadır (Prabhu ve ark., 2006; Patel ve ark., 2010; Jiang ve ark., 2020; Meeran ve ark., 2020). Yukarıdaki literatür bildirimine uygun olarak, bizim çalışmamızda da intraperitoneal yol kullanılmış, 24 saat ara ile 85 mg/kg dozunda iki uygulama yapılmıştır.

Deneysel MI modelinde, elektrokardiyografik, biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler yaygın olarak değerlendirilmektedir. EKG verilerinde en fazla göz önünde bulundurulan değişiklik ST segment yükselmesidir. Çalışmamızda İZO uygulanan gruptaki 7 sıçanın tamamında ST segmenti yükselmesi belirlendi (Tablo 4). Yapılan bir çalışmada İZO ile indüklenen MI sonrası sıçanlardan alınan EKG kayıtlarında ST segmenti incelenmiş ve bizim çalışmamızdakine benzer şekilde MI kaynaklı yükselmeler tespit edilmiştir (Kannan ve ark., 2011). MI sonrası ST segment yükselmesinin görüldüğü başka bir çalışma daha bulunmaktadır (Patel ve

ark., 2010). ST segmenti yükselmesi MI modelinin ortaya çıktığını gösteren EKG bulgularından en önemlisidir. Bizim çalışmamızda İZO uygulanan grubun tamamında ST yükselmesi ortaya çıkmış ve bu sonuç MI modelinin oluştuğunu gösteren verilerden bir tanesi olarak kabul edilmiştir.

MI sonrası biyokimyasal belirteçlerde görülen değişiklikler de MI'ın tanısı açısından önemlidir. Bunlardan, cTn'ler ve CK-MB, MI sonrası hasar göstergesi olarak yaygın olarak kullanılırlar. Troponin T ve I miyokardiyal hasarlanma için oldukça spesifiktir ve MI tanısında kullanılır. Bu iki enzim düzeyi kardiyak doku dışındaki başka organ veya doku hasarlanmalarında nadiren yükselir. CK-MB düzeyleri miyokard enfarktüsünde troponinlere göre daha az spesifik olmakla birlikte yaygın olarak ölçülen bir diğer enzimdir (Boateng ve Sanborn, 2013). Bu nedenle İZO ile indüklenen MI sonrasında miyokardiyal hasarın göstergesi olarak cTnI ve CK-MB seviyelerinin incelenmesi MI oluşumunun doğrulanması açısında önem arz eder. Birçok çalışmada İZO ile indüklenen MI sonrası bu belirteçlerin seviyeleri ölçülmüştür (Rajadurai ve Prince, 2007; Shukla ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda, İZO ile indüklenen MI sonrasında sıçanlarda cTnI ve CK-MB seviyelerinde artış belirlenmiştir (Açıkel ve ark., 2003; Govindasami ve ark., 2020). İZO ile oluşturulan MI modelinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise CK-MB değerlerinde artış görülmüştür (Prince, 2011). Biz de çalışmamızda, İZO uygulaması ile oluşturduğumuz MI modelinde model oluşumunu teyit etmek ve kalp hasarını belirlemek üzere sıçanlardan aldığımız kan örneklerinden cTnI ve CK-MB değerlerini belirledik. İZO uygulanan grupta cTnI düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü ($p<0.01$; Şekil13). CK-MB açısından ise somut değişiklikler gözlemlenmedi. Bu durum, CK-MB'deki değişikliklerin cTnI'ya göre daha uzun süre sonra ortaya çıkmasına ve miyokardiyal hasar için cTnI kadar spesifik olmamasına bağlı olabilir (Boateng ve Sanborn, 2013).

İZO grubunda histopatolojik düzeyde gözlemlediğimiz ödem ve hücresel infiltrasyon bulguları MI modelinin gerçekleştiğini gösteren diğer bulgular olarak değerlendirilmiştir. Miyokardiyal hücrelerin düzensizleşmesi, inflamatuar hücrelerin infiltrasyonu (mononükleer hücresel infiltrasyon), miyokardiyal liflerde bozulmalar dahil olmak üzere İZO ile indüklenen sıçanlarda birçok patolojik değişiklik ortaya

çıktığı bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2020). Zhou ve ark (2008) yaptıkları bir çalışmada, İZO ile indüklenen MI sonrasında kalp dokusundan elde ettikleri heomotoksilen-eozin boyamalarda hücresel infiltrasyonu düzeylerinde artış belirlemişlerdir. Kannan ve ark (2011) ise yaptıkları diğer bir çalışmada, İZO ile indüklenen MI sonrasında hücresel infiltrasyonda artışla birlikte kalp kası liflerinde yapısal bozulmalar da tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamamızda da yukarıdaki literatür bildirimlerine uygun olarak hem ödem hem de hücresel infiltrasyon belirlenmiştir.

Çalışmamızda, EKG verilerinde gözlemlenen ST yükselmesi, cTnI değerlerindeki artış ve histopatolojik değişiklikler birlikte değerlendirildiğinde İZO ile indüklenen MI modelinin başarılı bir şekilde ortaya çıktığını söyleyebiliriz.

İZO ile indüklenmiş MI sonrası oluşan doku hasarında melatoninin koruyucu ajan olarak kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Melatoninin kardiyoprotektif etkileri antioksidan, antiiflamatuar ve endotel koruyucu özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Simko ve ark., 2014). Melatoninin, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini uyararak ve Krebs döngüsü enzimlerinin inhibisyonunu ortadan kaldırarak İZO kaynaklı oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Naaz ve ark., 2020). Sıçanlara İZO uygulanması sonucu lipid peroksidasyon ürünlerinin seviyesi artmış ve kalp dokusunda glutatyon seviyeleri düşmüştür. Bu durumun oksidatif hasarı indüklediği gösterilmiştir. Melatonin uygulanması ile bu etkiler engellenmiş kalp dokusunda hasar oluşumunun önlendiği görülmüştür (Mukherjee ve ark., 2010). Çalışmamızda İZO sonrası MI hasarına karşı koruyucu etkileri bilinen melatonin uygulaması tercih edilmiştir. Ancak İZO sonrası kalp kasında ortaya çıkan oksidatif hasar gibi birçok farklı hücresel yolak üzerine melatoninin etkileri çok iyi bilindiğinden araştırmamızın odak noktası melatonin ile ilişkisi bilinmeyen AQP kanalları olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda AQP kanallarını seçmemizin bir diğer nedeni ise MI sonrası AQP kanallarındaki değişim ve bu değişimle miyokardiyal ödem arasındaki ilişkinin de bilinmiyor olmasıdır.

İZO ile indüklenmiş MI modelinde melatoninin koruyucu etkilerini araştırdığımız çalışmamızda, İZO uygulanan grupta 7 sıçanda ST elevasyonu görülmüşken, melatonin uygulanan grupta sadece 2 sıçanda ST elevasyonu

belirlenmiştir (Tablo 4). Melatonin uygulaması aynı zamanda İZO sonrası artan kardiyak ödemi hem histopatolojik düzeyde hem de doku su oranı sonuçlarına göre azaltmıştır. Çalışmamızda melatonin İZO uygulamasından önce verilmeye başlanmış ve İZO uygulaması sırasında ve sonrasında da verilmeye devam edilmiştir. Bu durum melatoninin İZO ile indüklenen MI üzerine hem koruyucu hem de tedavi edici bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. ST segmenti elevasyonu MI sonrası şekillenen iskemiye bağlı ortaya çıkmaktadır. Miyokardın oksijen ihtiyacının karşılanması ile ise düzelebilmektedir (O'gara ve ark., 2013). Aygün ve Gül (2019) sıçanlarda oluşturdukları doksorubusin kaynaklı kardiyak hasarda melatonin uygulamasının ST segment elevasyonunu düzelttiğini belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise Bilginoğlu ve ark (2014) sıçanlara uyguladıkları adriamisinin kardiyotoksik etkilerini araştırmışlar ve ST segment elevasyonu belirlemişlerdir. Bu hasarın infarkt alanındaki hücrelerde uyarılma-kasılma eşleşmesindeki bozukluktan kaynaklanabileceğini belirtmişler ve tedavi amaçlı melatonin uygulamasının bu durumu düzeltici etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda literatür bildirimine uygun olarak melatonin uygulamasının ST segment elevasyonunu düzeltici etki gösterdiğini belirledik.

Koroner arter baypas graftleme sonrası kalpte sık görülen atriyal fibrilasyon oluşumuna melatoninin koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada serum CK-MB seviyeleri incelenmiş ve melatonin uygulanan grupta CK-MB seviyelerinde azalma tespit edilmiştir (Barati ve ark., 2020). Literatürde yer alan başka bir çalışmada sıcak çarpması ile oluşan MI sonrası kalpte melatoninin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre MI belirteci olan cTnI ve CK-MB seviyeleri değerlendirilmiş ve MI ile artan cTnI ve CK-MB seviyelerinin melatonin uygulamsı ile azaldığı tespit edilmiştir (Lin ve ark., 2018).

Çalışmamızda melatoninin kardiyak enzimler olan cTnI ve CK-MB üzerine olan etkilerinin genel literatür bildirimi ile tam olarak uyumlu olmadığını gözlemledik. Çünkü, Açıkel ve ark (2003) İZO ile indükledikleri MI modelinde melatonin uygulamasının cTnI düzeylerini azalttığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde, insanlarda iskemi reperfüzyon sonrası artan cTnI ve CK-MB düzeylerinin kan melatonin seviyeleri ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Sokullu ve ark., 2009).

Çalışmamızda cTnI ve CK-MB için her ne kadar istatistiksel anlamlı birkaç değer bulsak da dramatik artış ve azalışlar belirlemedik. Bu durum uyguladığımız İZO dozundan da kaynaklanıyor olabilir. Histopatolojik, elektrokardiyografik ve moleküler düzeyde anlamlı sonuçlar belirlemiş olmamıza rağmen enzim yönü ile güçlü değişiklikler belirleyememiş olmamız sıçanlarda orta düzeyde bir MI oluştuğunu düşündürmektedir. Çünkü enzim düzeyleri ile miyokardiyal hasar oranı arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda melatoninin MI sonrası iyileştirici etkisinin enzim düzeylerine yansımasının 24 saatten daha uzun bir süre alabileceğini akla getirmektedir.

Deney hayvanlarında ve insanlarda yapılan çalışmalar, apoptozun MI dahil olmak üzere çeşitli kalp hastalıklarının patogenezinde önemli bir mekanizma olduğunu göstermektedir (Zidar ve ark., 2006). Kaspazlar apoptozda önemli bir rol oynarlar (Kim ve Kang, 2010). Yapılan çalışmalar kardiyomiyositlerin apoptoz yolağında kaspaz3 ile birlikte BAX ve Bcl2'nin fonksiyonel rolleri iyi bilinmektedir (Nakamura ve ark., 2000). MI'da iskemi reperfüzyondan sonraki birkaç saat içinde infarkt bölgesinde apoptoz tespit edilebilir. Kaspaz3'ün aktivasyonunda veya ekspresyon seviyesinde artış kardiyomiyosit ölümüne neden olarak sol ventrikül disfonksiyonuna yol açar (Philipp ve ark., 2004). İmmünolojik çalışmalar, MI'da kardiyomiyositlerin ciddi şekilde hasar gördüğünü, şiddetli apoptoz görüldüğünü, BAX ve kaspaz3 gen ifadelerinin önemli ölçüde arttığını, Bcl2 ekspresyonunun ise azaldığını göstermektedir (Jin ve ark., 2018). Bu bilgilere dayanarak MI sonrası apoptozun azaltılması ve bu sayede hücre sağ kalımının arttırılması bir tedavi seçeneği olarak düşünülebilir. Melatonin uygulamasının MI sonrası artan kaspaz3 ekspresyonunu azalttığını belirten literatür bildirimleri vardır. Bunlardan bir tanesinde, melatoninin kalp dokusunda Bcl2 ekspresyonunu artırırken, BAX ve kaspaz3 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Zhai ve ark., 2017).

Bizim çalışmamızda da İZO ile indüklenen MI sonrası oluşan apoptozu incelemek ve melatoninin etkilerini araştırmak için sol ventrikül dokusunda kaspaz3 Bcl2 ve BAX gen ekspresyon seviyelerini değerlendirdik. Literatürdeki bilgilere uyumlu olarak İZO ile indüklenen MI sonrası oluşan apoptoza bağlı olarak kaspaz3 gen ekspresyon seviyesinde artış gözlemledik ($p<0,05$). Melatonin uygulaması ile

artan kaspaz3 ekspresyon seviyesinde azalma tespit etmemize rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( p>0,05, Şekil 24). Apoptoz belirteci olarak diğer önemli moleküller olan Bcl2 ve BAX gen ekspresyon seviyelerini de değerlendirdik. İZO ile indüklenen MI oluşturduğumuz grupta Bcl2 ve BAX gen ekspresyon seviyesinde anlamlı düzeyde artış tespit ettik (p<0,01). Melatoninin koruyucu etkilerini doğrulamak amacıyla İZO uygulaması ile birlikte melatonin verdiğimiz grupta MI sonrası artmış Bcl2 ve BAX gen ekspresyonlarında anlamlı düzeyde azalma gözlemledik (p<0,05, Şekil 26 ve Şekil 28). Elde ettiğimiz biyokimyasal, histopatolojik veriler ile moleküler ve genetik sonuçlar, İZO indüklenen MI sonrası miyokardiyal ödeme bağlı apoptozun önlenmesinde melatoninin önemli bir teröpatik bir hedef olduğunu göstermektedir. AQP kanallarının ekspresyon seviyelerinde gördüğümüz değişikliklerle uyumlu olan bu sonucumuz melatoninin apoptozu önlemesinde AQP kanallarının etkili bir yolak olabileceği hipotezimizi doğrular niteliktedir.

Kardiyak AQP kanallarının önemi, kardiyak ödemin kalp işlevlerini önemli oranda azalttığının belirlenmesi ile artmıştır. Kalp kasının iskemi ve reperfüzyona maruz kalması hem interstisyel alanda hem de hücre içinde sıvı birikimini arttırarak ödeme yol açar (Butler ve ark., 2006). Kardiyak ödem ise öncelikli olarak diyastolik işlevler başta olmak üzere kalp kasının etkin pompalama yeteneğini önemli oranda azaltır (Egan ve ark., 2006). Kardiyak AQP kanalları bir çok dokuda olduğu gibi kalp kasında da su transportundan sorumludurlar ve fizyolojik şartlarda kardiyomyositlerde su transportunun % 30'unu AQP kanalları gerçekleştirir (Rutkovskiy ve ark., 2012). Patolojik durumlarda ise sıvı transportu büyük oranda AQP'ler tarafından gerçekleştirilir (Rutkovskiy ve ark., 2012). İnsan ve hayvanlarda günümüze kadar 13 farklı transmembran AQP kanalının (AQP0-AQP12) varlığı gösterilmiştir. Bu kanalların insan ve hayvan kalplerinde bulunma oranları ve bulunduğu yerler türe, yaşa ve cinsiyete göre farklılık göstermektedir (Verkerk ve ark., 2019). AQP'lerin insan ve hayvan kalplerindeki önemi ve işlevleri günümüzde tam olarak aydınlatılmamıştır. AQP kanallarının çoğu suyu osmotik gradiyent farkına göre geçiren transmembran proteini iken, bazıları (AQP3, AQP7, AQP9 ve AQP10) aynı zamanda başta gliserol olmak üzere bazı solütlerin de geçişini sağlayan kanallar olarak bilinmektedir (Egan ve ark., 2006).

AQP kanalları böbrek, akciğer ve beyin dokusunda yaygın olarak incelenmiş olmasına rağmen kalpteki AQP kanalları konusunda çalışmalar oldukça sınırlıdır. Miyokardiyal ödemin yaşamı tehdit eden bir olgu olması, MI sonrası miyokardiyal ödem ortaya çıkması, AQP kanallarının sıvı ve solüt transportunu düzenleyen ajanlar olması çalışmamızı önemli hale getirmektedir. Çalışmamızda ayrıca hem sıvı hem solüt transportundan sorumlu AQP kanallarındaki değişim birlikte değerlendirilmiştir. Bu yönü ile çalışmamız AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7 kanallarını MI sonrası sıçan kalbinde birlikte değerlendiren ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Ayrıca yaptığımız literatür taramasında MI sonrası kalp dokusunda AQP kanalları ve melatonin arasındaki ilişkinin incelenmesi yönünde yapılmış çalışmalara rastlamadık. Bu yönü ile de çalışmamız literatürde bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

AQP1 ile ilgili ilk bulgular Preston ve ark (1993) tarafından ortaya konulmuştur. AQP1 birçok organda su transportundan sorumlu bir aquaporin kanalıdır. Bu özellikleri sayesinde böbreklerde idrarın oluşması ve gözde aguoz sıvısının oluşmasına katkı sağlar (Zhang ve ark., 2002; Umenishi ve Schrier, 2003). AQP1 beyinde serebrospinal sıvının da oluşmasını sağlayan kanallardan bir tanesidir (Nesic ve ark., 2008). AQP1'in sıvı tarnsportunun yanı sıra $CO_2$ için de bir taşıyıcı kanal işlevi gördüğü bildirilmiştir (Endeward ve ark., 2008). Diğer taraftan AQP1'in $NH_3$, hidrojen peroksit, nitrik oksid ve oksijen için de taşıyıcı işlev gördüğü belirtilmiştir (Musa-Aziz ve ark., 2009; Almasalmeh ve ark., 2014).

AQP1, en çok damar endotelinde bulunur. AQP1 yukarıda belirtildiği gibi birçok farklı dokuda suyun yanı sıra farklı moleküllerin geçişine de aracılık eder. AQP1'in sıçan kalp dokusunda bulunup bulunmadığına ilişkin bilgiler sınırlı olmasının yanı sıra, kalp dokusundaki işlevlerine ilişkin yeterli sayıda araştırma da bulunmamaktadır. Bu nedenle AQP1 ile kalp işlevleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar önem arz etmektedir. AQP1 gen ekspresyonlarının yaşlı sıçanlarda da bulunduğu ve sarkolemmal yerleşim gösterdiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise kardiyak AQP1 için tatmin edici düzeyde Western Blot bulgusu elde edilmiş ve gruplarda gen ekspresyonu düzeyinde belirlenen farklılıklar protein düzeyinde de gözlemlenmiştir. Sıçan kalbinde AQP1'in bulunduğunu belirten başka çalışmalar da

vardır (Butler ve ark., 2006). Butler ve ark (2006) AQP'ler için aynı zamanda kalpte bulundukları yerleri de araştırmışlardır. İnsanlarda ve farelerde AQP1'i daha çok damar endotelinde belirlemişlerken, sıçanlarda AQP1'in kardiyomiyositlerde bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızda ise sol ventrikül dokusu total olarak çıkarılmış ve homojenize edilmiştir. Elde ettiğimiz AQP1 gen ekspresyon değerleri sol ventrikül dokusunun tüm bölümlerine aittir. Çalışmamızın sol ventrikülde AQP1'in nerede eksprese olduğuna dair bir amacı olmadığından bölgesel inceleme ve değerlendirme yapılmamıştır.

Çalışmamızda AQP1'in diğer belirlenen üç AQP kanalında olduğu gibi MI sonrası gelişen miyokardiyal ödem ile ilişkisini incelemeyi hedefledik. İZO uygulayarak oluşturduğumuz MI modelinde, sol ventrikül dokusunda AQP1 gen ekspresyonu düzeylerinin arttığını belirledik (Şekil 16). Melatonin verilmesi bu artışı anlamlı düzeyde azalttı. İZO uygulanan grupta aynı zamanda miyokardiyal ödemin de ortaya çıktığını ve melatonin uygulamasının ödemi de anlamlı düzeyde azalttığını belirledik (Resim 16). Miyokardiyal ödem ve AQP1 kanalları ilişkisini inceleyen bazı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan iki tanesi deneysel kardiyopulmoner bypass çalışmasıdır. Yan ve ark (2012) keçilerde kardiyopulmoner bypass yaparak miyokardiyal ödem ve AQP1 ilişkisini ve kardiyopulmoner bypass sonrasında artmış miyokardiyal ödem ile artmış AQP1 gen ekspresyonu düzeyi belirlemişlerdir. Çalışmalarında kardiyopulmoner bypassta ortaya çıkan ozmotik stresde AQP1 kanallarının önemli rol oynadığını bunun kardiyak ödemle ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ding ve ark (2013) ise benzer bir çalışmayı koyunlarda yapmışlar ve operasyon sonrası 6. saatte başlayan ve 48. saatte en yüksek düzeye ulaşan miyokardiyal ödem ve AQP1 gen ekspresyonu artışı gözlemlemişlerdir. AQP1 gen ekspresyonlarındaki bu artış cGMP artışı ile ilişkilendirilmiştir. Nitekim bir sGC inhibitörü olan ODQ uyguladıklarında hem miyokardiyal ödemin hem de AQP1'deki artışın azaldığını belirlemişlerdir. AQP1 aynı zamanda miyokardiyal iskemi/reperfüzyona bağlı ödemin ortaya çıkmasında da rol oynar. Yüksek AQP ekspresyonları yüksek su geçirgenliği ile ilişkilidir ve sonuç miyokardiyal ödemde artışıdır (Lin ve ark., 2015). Lin ve ark (2015), AQP1 gen ekspresyonlarındaki artışa sol ventrikül toplam sıvı miktarındaki artışın da eşlik ettiğini ortaya koymuşlardır. Benzer bir sonuç bizim çalışmamızda da elde edilmiş ve en yüksek AQP1 gen

ekspresyonu belirlediğimiz İZO grubu aynı zamanda % 70 ile kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bir ödem oranı göstermiştir ($p<0.01$, Şekil 12). Çalışmamızda melatonin uygulaması AQP1 gen ekspresyon düzeyini anlamlı bir şekilde azaltmışken, sol ventrikül doku su miktarını aynı oranda etkilememiştir. Bu sonuçlar meletoninin sol ventrikül AQP1 düzeylerini güçlü bir şekilde etkilediğini ancak doku ödemi üzerine fiziksel düzeyde aynı güçlü etkiyi göstermediğini düşündürebilir. Bununla birlikte histopatolojik düzeyde melatonin miyokardiyal ödemi güçlü bir şekilde azaltmıştır (Şekil 31).

Yaptığımız literatür taramasına göre melatoninin kalpte AQP1 üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bulgularımız melatonin ve sol ventrikül AQP1 ilişkisini ortaya koyan ilk sonuçlardır. Melatonin AQP1 ilişkisi kalpte incelenmemiş olmasına rağmen, böbrekte ve omurilikte yapılan araştırmalar mevcuttur (Nesic ve ark., 2008; Li ve ark., 2019). Li ve ark (2019), bilateral üretral tıkanma ile oluşturdukları böbrek hasarında melatoninin artan AQP1 gen ekspresyonu seviyelerini azaltıcı etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Melatonin bu azaltıcı etkisinin antiinflamatuar özelliklerine bağlı olduğu ileri sürülmüş ve melatonin uygulamasının güçlü bir şekilde TNFα düzeylerini azalttığı belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda da inflamasyon belirteci olarak sol ventrikül dokusunda TNFα belirlendi ve melatonin uygulamasının TNFα gen ekspresyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlendi (Şekil 30). Bu sonuç, melatoninin AQP1 düzeylerini azaltıcı etkisinin inflamasyon yolağı üzerinden olabileceğini düşündürmüştür. Başka bir çalışmada ise medulla spinalis hasarı oluşturulan sıçanlarda AQP1 gen ekspresyon düzeylerinin arttığı ve melatoninin bu artışı normale döndürdüğü belirlenmiştir (Nesic ve ark., 2008). Melatoninin AQP1 üzerine olan etkisi antioksidan özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızda antioksidan belirteçler incelenmedi ancak melatonin antioksidan etkileri çok iyi bilinmektedir (Petit ve ark., 1999; Tengattini ve ark., 2008; Veneroso ve ark., 2009). Dolayısı ile çalışmamızda elde ettiğimiz ve yukarıda böbrek ve medulla spinaliste gözlemlenen melatoninin AQP1 gen ekspresyonunu azaltıcı özelliğinin melatoninin antiinflamatuar ve antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda İZO uygulaması sonrası sol ventrikül dokusunda değişimini incelediğimiz bir diğer AQP kanalı AQP3'dür. AQP3 bir AQP kanalı olmasına rağmen, sadece suyu değil aynı zamanda gliserol ve $H_2O_2$'yi de transfer eden bir kanaldır (Verkman ve ark., 2014). Kalp dışında diğer birçok doku ve organ sisteminde AQP3 kanalları konusunda güncel çalışmalar bulunmaktadır. Sıçanların sindirim kanalında, böbreklerinde, derilerinde ve tükrük bezlerinde AQP3'ün eksprese olduğu bilinmektedir (Gouda ve ark., 2018; Camilleri ve ark., 2019; Chung ve ark., 2019; Kamar ve ark., 2019). Ancak, sıçan kalbinde AQP3'ün bulunup bulunmadığı konusunda birbiri ile çelişen veriler vardır (Egan ve ark., 2006). Bu nedenle kalp kasında yapılacak AQP3 çalışmaları önem arz etmektedir. Ayrıca, yapmış olduğumuz literatür taramasında, kardiyovasküler sistem hastalıkları ve miyokardiyal ödem, apoptoz ve inflamasyon ile AQP3 ilişkisini ortaya koyan bir çalışmaya rastlamadık. Çalışma sonuçlarımız bu ilişkiyi ortaya koyan ilk veriler olmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar, aynı zamanda kalp kasında melatonin ve AQP3 ilişkisini inceleyen ilk verilerdir.

AQP3 bir su kanalı olmasına rağmen birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. AQP3 tarafından taşınan $H_2O_2$ hücre içi bir haberci gibi davranarak inflamasyon, hücre gelişimi ve hücre göçünde görev alan bir çok işlevi etkileyebilir (Miller et ve ark., 2010; Hara-Chikuma ve ark., 2020). AQP3 ekspresyonlarındaki artış hücre içine daha fazla $H_2O_2$ girmesine yol açarak hücreleri hasara götürebilir (Thiagarajah ve ark., 2007). Nitekim, Dong ve ark (2020) güçlü bir antioksian olan kuersetinin AQP3 gen ekspresyonlarını azaltarak hücreleri $H_2O_2$'nin toksik etkisine karşı koruduğunu ortaya koymuşlardır. Bir başka çalışmada ise fruktoz uygulanarak oluşturulan metabolik sendromda böbrekte AQP3 gen ekspresyonu düzeylerinin arttığı belirlenmiş ve bu artış fruktozun oksidatif stresi artırıcı özelliğine bağlanmıştır (Ewida ve Al-Sharaky, 2016).

Çalışmamızda İZO uygulanan grupta AQP3 gen ekspresyonu düzeyleri tüm gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.01$). Bu grupta aynı zamanda miyokardiyal ödem ve kaspaz düzeylerinde de anlamlı artışlar belirlendi. Melatonin uygulaması İZO tarafından arttırılan AQP3 gen ekspresyon düzeylerini kontrol grubu değerlerinin bile altına kadar düşürdü ($p<0.0$, Şekil 18). Melatonin İZO sonrası artan

kaspaz3 düzeylerini de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşürdü. Melatonin İZO sonrası artan TNFα seviyelerini ise anlamlı düzeyde azalttığı görüldü ($p<0.01$, Şekil 24 ve Şekil 30). Tüm bu bulgular melatonin yangı ve apoptoz üzerinden AQP3 kanallarını etkileyebileceğini düşündürse de, AQP3 üzerine ortaya çıkan güçlü etki melatonin için başka mekanizmaları da akla getirmektedir. Kuersetin yukarıda belirtilen etkisi dikkate alındığında melatoninin AQP3 üzerine etkisinin bir diğer mekanizmasının antioksidan yol üzerinden olacağı söylenebilir (Dong ve ark., 2020). Melatonin ve AQP3 ilişkisini inceleyen sınırlı sayıda makale mevcuttur. Bunlardan birinde melatoninin böbreklerde AQP3 gen ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiş ve bu etki melatoninin dolaşımdaki gliserit artışını engelleyici ve yağ birikimini azaltıcı özelliği ile ilişkilendirilmiştir (Ewida ve Al-Sharaky, 2016). Yukarıda verilen literatür bilgisindeki bulgular incelendiğinde, melatoninin AQP3 gen ekspresyonunu azaltıcı etkisinin aynı zamanda apoptoz üzerine baskılayıcı bir sonucun ortaya çıkmasına yol açtığı da söylenebilir. Çalışmamızda AQP3 gen ekspresyonu seviyelerinde değişimler belirlemiş olmamıza rağmen Western blot analizlerinde yaorum yapabilecek düzeyde bant görüntüsü elde edemedik.

Kalp kasında ve MI'da, AQP1 ve AQP3 kanalları ile kıyaslandığında AQP4 kanalına ait daha fazla sayıda bildirim bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesinde, MI sonrası AQP4 gen ekspresyonlarında 1 hafta içerisinde artış gözlendiği belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2013). Bir başka çalışmada ise MI sonrası AQP4 kanalları gen ekspresyon seviyeleri akut dönemde incelenmiştir. Bu çalışmada MI sonrası 15. dakikada AQP4 gen ekspresyonlarında artış olduğu ve 45. dakikada en yüksek seviyeye ulaştığı anlaşılmıştır. Bu sonuçlar AQP4'ün miyokardiyal ödemin çok önemli bir bileşeni olduğunu göstermektedir (Warth ve ark., 2007). AQP4 kalp için önemli bir AQP kanalı olup kalp kasında interkale disk, endotel hücreleri, sarkolemma ve serozada yaygın olarak bulunur (Tie ve ark., 2017). Warth ve ark (2007) çalışmalarında aynı zamanda AQP4 gen ekspresyonları ile infarkt büyüklüğü arasında da bir ilişki olduğunu ve gen ekspresyonu arttıkça infarkt alanlarının da arttığını belirlemişlerdir. Yukarıda bahsedilen her iki çalışma da fareler üzerinde yürütülmüştür. Sıçanlarda miyokardiyal AQP4 konulu çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalardan bir tanesinde Song ve ark (2018) kardiyopulmoner resustasyon modeli uyguladıkları sıçanlarda AQP4 ekspresyonlarının artığını

belirlemişlerdir. Çalışmalarında PI3K/Akt yolağı ile AQP4 arasında bir ilişki olduğunu ve miyokardiyal hasarın azaltılmasında bu yolağın etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Kardiyopulmoner resustasyonda AQP4 ekspresyonlarının belirlenmesinin aynı zamanda miyokardiyal hasar için önemli bir kriter olduğunu belirten başka bir çalışma ise He ve ark (2015) tarafından yapılmıştır. Bizim çalışmamızda İZO uygulaması AQP4 gen ekspresyonlarını anlamlı düzeyde artırmıştır. Melatonin uygulaması ise artan bu ekspresyonları normal değerlere döndürmüştür.

Kalp kasında AQP4 kanallarının etkisi AQP1 ve AQP3'e göre daha iyi ortaya konulmuş olsa da, melatonin ve AQP4 ilişkisini miyokardiyumda belirleyen çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte diğer doku ve organlarda melatonin ile AQP4 ilişkisini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Nitekim, melatoninin medulla spinalis hasarlarında artan AQP4 gen ekspresyonlarını azaltarak ödeme karşı koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Liu ve ark., 2016). Benzer bir etki Li ve ark. (2014) tarafından da belirlenmiştir. Melatonin antagonistleri verilmesi travmatik beyin hasarında ödemi ve AQP4 ekspresyonlarını artırıcı etki göstermiştir (Shahrokhi ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda melatonin kalp kasında İZO uygulamasının oluşturduğu ödemi azaltmış ve AQP4 gen ekspresyon düzeylerini düşürmüştür ($p<0,01$, Şekil20). Bu bulgular İZO ile oluşturulan miyokard ödeminde, AQP4 üzerine melatoninin etkilerini ortaya koyan ilk verilerdir.

Çalışmamızda İZO uygulaması sonrası miyokardiyumda değişimini incelediğimiz bir diğer AQP kanalı AQP7'dir. Çalışmamızda İZO uygulaması sonucunda AQP7 kanallarının gen ekspresyon seviyesinde anlamlı düzeyde artış tespit ettik ($p<0,01$). Melatonin uygulaması ile artan AQP7 gen ekspresyon seviyesinde azalma gözlemledik ($p<0,01$, şekil 22). Kalp kasında AQP1, AQP3 ve AQP4'e göre AQP7 konusunda daha fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. AQP7 suyun yanı sıra gliserolü de geçirdiğinden aquagliseroporin grubunun bir üyesi olarak bilinir. Beyaz ve kahverengi yağ dokusu ile testislerde yüksek oranda eksprese edildiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra, kalp, iskelet kası ve böbrekte de belirlenmiştir (Skowronski ve ark., 2007; Fuji ve ark., 2019). Gliserolü taşıması nedeni ile yağ dokudaki işlevleri konusunda bilgiler mevcuttur. Bu özelliği nedeni ile

kalp kasının enerji ihtiyacının karşılanmasındaki rolü de araştırılmıştır. AQP7'den yoksun farelerde kalp kası gliserol içeriğinin daha düşük olduğu ve buna bağlı olarak ATP seviyelerinin de azaldığı bildirilmiştir (Hibuse ve ark., 2009). Bu nedenle AQP7 ile kalp kası enerji ihtiyacının karşılanması arsında bir ilişki olduğu bilinmektedir. AQP7 kanalının kalp kası enerji ihtiyacının karşılanmasında rolü biliniyor olmasına rağmen miyokardiyal ödem üzerine etkisi olmadığı belirtilmektedir. Hibuse ve ark., (2009), yaptıkları çalışmada AQP7 ile miyokardiyal ödem arasında bir ilişki olmadığını belirlemişler ve ödemin AQP1 ile bağlantılı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. AQP7 kalp kasında yüksek protein diyeti ve GLUT4 kanalları ile de ilişkilendirilmiştir. Sıçanlara yüksek protein diyeti verilmesi AQP7 kanalı ekspresyonunu artırmıştır (Palabıyık ve ark., 2016). Bu sonuçlar AQP7'nin kardiyak ödemden ziyade kalbin metabolik adaptasyonu için daha önemli olduğunu ve kalp kasına gliserol taşınmasının enerji düzenlenmesine katkı sağladığını göstermektedir. Kalp kası içinde bulunduğu duruma göre değişmekle birlikte farklı kaynaklardan enerji elde edebilir. Bu enerji kaynaklarından bir tanesi de gliseroldür ve kalp kası hücresine AQP7 ile taşınır (Gladka ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda kalp kasında metabolik değişimlerin incelenmesi hedeflenmemiştir. Bu nedenle AQP7 kanalındaki artışların metabolik değişimlere bağlı olup olmadığını söyleyecek veriler elimizde bulunmamaktadır. Bununla birlikte, çalışmamızda melatoninin Bcl2, BAX ve kaspaz3 ve TNFα gen ekspresyon seviyelerini de azalttığını belirledik. Melatonin bu etkileri AQP7 üzerinden gerçekleştirmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

# 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak,

- Elde edilen kalp kası su içeriği sonuçları ile elektrokardiyografik, biyokimyasal, histopatolojik ve gen analizi sonuçlarına göre izoproterenol uygulanan sıçanlarda MI modelinin şekillendiği,

- MI oluşan kalp kasından alınan sol ventrikül dokusu örneklerinde ödem oluşumunun gözlendiği anlaşılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yapılan bu çalışma ile;

a) Deneysel miyokard enfarktüsü AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7 kanallarının gen ekspresyonlarının değiştiği,

b) Melatonin uygulamasının AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7 kanallarındaki artışa karşı koruyucu etki gösterdiği,

c) Melatonin uygulamasının aynı zamanda miyokardiyal ödeme karşı koruyucu etkiye de sahip olduğu,

d) Çalışma sonuçlarının miyokardiyal ödem ve AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7 arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk bulgular olduğu,

e) Melatoninin miyokardiyal ödem ve AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7 üzerine koruyucu etki gösterdiğinin ilk kez ortaya konulduğu,

f) Melatoninin diğer kardiyak koruyucu etkilerinin yanı sıra miyokardiyal ödem için de koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceği,

g) Miyokard enfarktüsü, miyokardiyal ödem ve AQP kanalları ilişkisini inceleyen başka çalışmalara da ihtiyaç olduğu,

h) Melatoninin miyokard enfarktüsü, miyokardiyal ödem ve AQP kanalları üzerine olan etkilerinin AQP kanal inhibitörleri kullanılarak daha ileri çalışmalarla test edilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

## 7. KAYNAKLAR


Acikel M, Buyukokuroglu ME, Aksoy H, Erdogan F, Erol MK. Protective effects of melatonin against myocardial injury induced by isoproterenol in rats. J Pineal Res. 2003; 35(2): 75-79.

Agre P, Kozono D. Aquaporin Water Channels: molecular mechanisms for human diseases. FEBS Lett. 2003; 555(1): 72-78.

Almasalmeh A, Krenc D, Wu B, Beitz E. Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. The FEBS J.2014;281(3): 647-656.

Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, AL-Rabeeah DA, AL-Barrak HS, AL-Salman SA, Ibrahim SA, AL-Hassab SA, Al-Amin MA, Hasan IM, Al-Ajmi HN, AL-Shammari TK. Possible protective mechanisms exerted by metformin or metformin and vitamin e in ısoproterenol-induced cardiac injury. J Cell Biochem. 2018; 119(5): 3903-3912.

Amaral FGD, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. Arch Endocrinol Metab. 2018; 62(4): 472-479.

Ambrose JA, Singh M. Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes. F1000 Prime Rep. 2015; 7: 08.

Aygun H, Gul SS. Cardioprotective effect of melatonin and agomelatine on doxorubicin-induced cardiotoxicity in a rat model: an electrocardiographic, scintigraphic and biochemical study. Bratislavske Lekarske Listy. 2019; 120(4): 249-255.

Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. Nat Rev Cancer. 2009; 9(5): 361-371.

Barati S, Jahangirifard A, Ahmadi ZH, Tavakoli-Ardakani M, Dastan F. The effects of melatonin on the oxidative stress and duration of atrial fibrillation after coronary artery bypass graft surgery: a randomized controlled trial. Endocr Metab İmmune Disord Drug Targets. 2020.

Bayat H, Swaney JS, Ander AN, Dalton N, Kennedy BP, Hammond HK, Roth DM. Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. Basic Res Cardiol. 2002; 97(3): 206-213.

Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JHY, Alger HM, Wong SS, Muntner P. Heart disease and stroke statistics – 2017 update: a report from the american heart association. Circulation. 2017; 135: 46-603.

Bertinchant JP, Robert E, Polge A, Marty-Double C, Fabbro-Peray P, Poirey S, Aya G, Juan JM, Ledermann JE, De La Coussaye JE, Dauzat M. Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats. Clin Chim Acta.2000; 298(1-2): 13-28.

Bilginoğlu A, Aydın D, Özsoy Ş, Aygün H. Protective effect of melatonin on adriamycin-induced cardiotoxicity in rats. Turk Kardiyol Dern Ars. 2014; 42(3): 265-273.

Boateng S, Sanborn T. Acute myocardial infarction. Dis Mon. 2013; 59(3): 83-96.

Bruckheimer EM, Cho SH, Sarkiss M, Herrmann J, McDonnell TJ. The Bcl2 gene family and apoptosis. Adv Biochem Eng Biotechnol. 1998; 75-105.

Burke AP, Virmani R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. Med Clin North Am.2007; 91(4): 553-572.

Butler TL, Au CG, Yang B, Egan JR, Tan YM, Hardeman EC, North KN, Verkman AS, Winlaw DS. Cardiac aquaporin expression in humans, rats, and mice. Am J PhysiolHeart Circ Physiol. 2006; 291(2): 705-713.

Capewell S, Ford ES, Croft JB, Critchley JA, Greenlund KJ, Labarthe DR. Cardiovascular risk factor trends and potential for reducing coronary heart disease mortality in the united states of America. Bull World Health Organ. 2010; 88: 120-130.

Carocci A, Catalano A, Sinicropi MS. Melatonergic drugs in development. Clin Pharmacol. 2014; 18(6): 127-137.

Chandrashekhar Y, Sen S, Anway R, Shuros A, Anand I. Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-I cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2004; 43(2): 295-301.

Chen S, Shan T, Wang L, Chen X, Cui XJ, Gao XN. Role of aquaporin-5 in regulating colorectal cancer cell growth in vitro. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2017; 37(10): 1330-1336.

Chu WM. Tumor necrosis factor. Cancer Lett. 2013; 328(2): 222-225.

Chung S, Kim S, Son M, Kim M, Koh ES, Shin SJ, Kim HS. Empagliflozin contributes to polyuria via regulation of sodium transporters and water channels in diabeticrat kidneys. Front Physiol. 2019;10: 271.

Claustrat B, Leston J. Melatonin: physiological effects in humans. Neurochirurgie. 2015; 61(2-3): 77-84.

D'Arcy MS. Cell Death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biol Int. 2019; 43(6): 582-592.

Dangas GD, Schoos MM, Steg PG, Mehran R, Clemmensen P, van 't Hof A, Prats J, Bernstein D, N Deliargyris E, Stone GW. Early stent thrombosis and mortality after primary percutaneous coronary intervention in ST-segment–elevation myocardial infarction: a patient-level analysis of 2 randomized trials. Circ Cardiovasc Interv.2016; 9(5): e003272.

Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC, Bill RM, Conner MT. Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. Biochim Biophys Acta. 2014; 1840(5): 1492-1506.

De Villiers C, Riley PR. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. Dis ModelMech. 2020; 13(11).

Ding FB, Yan YM, Bao CR, Huang JB, Mei J, Liu H, Zhang JW. The role of aquaporin 1 activatedbycGMP in myocardialedemacausedbycardiopulmonary bypass in sheep. Cell PhysiolBiochem.2013;32(5): 1320-1330.

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Cardioprotection and pharmacological therapies in acute myocardial infarction: challenges in the current era. World J Cardiol 2014; 6(3): 100-106.

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Clinical aspects of melatonin in the acute coronary syndrome. Curr Vasc Pharmacol. 2009; 7(3): 367-373.

Dominguez-Rodriguez A, Baez-Ferrer N, Abreu-Gonzalez P.Melatonin and ST segment elevation acute myocardial infarction—the "forgotten cardioprotective therapy" strikes again. J Cardiovasc Transl Res.2018; 11(4): 308-309.

Dong Y, Hou Q, Lei J, Wolf PG, Ayansola H, Zhang B. Quercetin alleviates intestinal oxidative damage induced by h2o2 viamodulation of GSH: invitro screening and in vivo evaluation in a colitis model of mice. ACS Omega.2020;5(14): 8334-8346.

Du H, Hao J, Liu F, Lu J, Yang X. Apigenin attenuates acute myocardial infarction of rats via the inhibitions of matrix metalloprotease-9 and inflammatory reactions. IntJ Exp Med. 2015; 8(6): 8854.

Edlich F. Bcl2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns. Biochem Biophys Res Commun. 2018; 500(1): 26-34.

Egan JR, Butler TL, Au CG, Tan YM, North KN, Winlaw DS. Myocardial water handling and the role of aquaporins. Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes. 2006; 1758(8): 1043-1052.

Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, Mehrabi MR, Glogar HD, Hölzenbein T, Markovic O, Leibetseder VJ, Strauss-Blasche G, Marktl W. The melatonin receptorsubtype MT2 is present in the human cardiovascular system. J Pineal Res. 2003; 35:1:40-44.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. ToxicolPathol. 2007; 35(4): 495-516.

Emet M, Ozcan H, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A, Ozel L. A review of melatonin, its receptors and drugs. Eurasian J Med. 2016; 48(2): 135.

Endeward V, Musa-Aziz R, Cooper GJ, Chen LM, Pelletier MF, Virkki LV, Supuran CT, King LS, Gros G. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO2 transport across the human erythrocyte membrane. FASEB J. 2006; 20(12): 1974-1981.

Ewida SF, Al-Sharaky DR. Implication of renal aquaporin-3 in fructose-induced metabolic syndrome and melatonin protection. JClin Diagn Res: JCDR. 2016; 10(4): CF06.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. Acta biochim Biophys Sin (Shanghai). 2005; 37(11): 719-727.

Farah CS ve Reinach FC. The troponin complex and regulation of muscle contraction. FASEB J. 1995; 9(9): 755-767.

French JK, White HD. Clinical implications of the new definition of myocardial infarction. Heart. 2004; 90(1): 99-106.

Fujii M, Ota K, Bessho R. Cardioprotective effect of hyperkalemic cardioplegia in an aquaporin 7 deficient murine heart. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2019; 1-7.

Galzin AM, Eon MT, Esnaud H, Lee CR, Pévet P, Langer SZ. Day–night rhythm of 5-methoxytryptamine biosynthesis in the pineal gland of the golden hamster (mesocricetus auratus). J Endocrinol. 1988; 118(3): 389-397.

Ganguly S, Coon SL, Klein DC. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. Cell tissue res. 2002; 309(1): 127-137.

Garg M, Khanna D. Exploration of pharmacological interventions to prevent isoproterenol-induced myocardial infarction in experimental models. Ther Adv Cardiovasc Dis. 2014; 8(4): 155-169.

Gaze DC, Collinson PO. Multiple molecular forms of circulating cardiac troponin: analytical and clinical significance. Ann Clin Biochem. 2008; 45(4): 349-355.

Gladka M, El Azzouzi H, De Windt LJ, da Costa Martins PA. Aquaporin 7: the glycerol aquaeductus in the heart. Cardivasc Res. 2009.

Gligić B, Romanović R, Rađen GS, Tavčiovski D, Đuran P, Obradović S. Relationship between QT dispersion and reperfusion in the acute myocardial infarction. Vojnosanit Pregl.2003;60(1): 19-27.

Gouda ZA, Khalifa MEA, Shalaby SM, Hussein S. Mechanistic effect of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells on the submandibular salivary gland in ovariectomized rats. Biochem Cell Biol. 2018;96(1): 57-67.

Govindasami S, Uddandrao VV, Raveendran N, Sasikumar V. Therapeutic potential of biochanin-a against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2020; 18(1): 31-36.

Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. Cardiology. 2012; 122(1): 23-35.

Haj-Yasein NN, Vindedal GF, Eilert-Olsen M, Gundersen GA, Skare Ø, Laake P, Nagelhus EA. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (AQP4) reduces blood–brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. Proce Nati Acad Sci U S A. 2011; 108(43): 17815-17820.

Hara-Chikuma M, Tanaka M, Verkman AS, Yasui M. Inhibition of aquaporin-3 in macrophages by a monoclonal antibody as potential therapy for liver injury. Nat Commun.2020; 11(1): 1-14.

Harada K, Grossman W, Friedman M, Edelman ER, Prasad PV, Keighley CS, Manning WJ, Sellke FW, Simons M. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. J Clin İnvest. 1994; 94(2): 623-630.

Hardeland R. Taxon-and site-specific melatonin catabolism. Molecules. 2017; 22(11): 2015.

Hartshorne DJ, Mueller H. Fractionation of troponin into two distinct proteins. Biochem Biophys Rese Commun. 1968; 31(5): 647-653.

He W, Liu Y, Geng H, Li Y. The regulation effect of ulinastatin on the expression of SSAT2 and AQP4 in myocardial tissue of rats after cardiopulmonary resuscitation. Int J Clin Exp Pathol.2015;8(9): 10792.

Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, Yamamoto K, Nagasawa A, Mizunoya W, Kishida K, Inoue K, Kuriyama H, Nakamura T, Fushiki T, Kihara S, Shimomura I. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(31): 10993-10998.

Hibuse T, Maeda N, Nakatsuji H, Tochino Y, Fujita K, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I. The heart requires glycerol as an energy substrate through aquaporin 7, a glycerol facilitator. Cardiovasc Res. 2009; 83(1): 34-41.

Hu Y, Dong X, Zhang T, Ma H, Yang W, Wang Y, Liu P, Chen, Y. Kai-Xin-San suppresses matrix metalloproteinases and myocardial apoptosis in rats with myocardial infarction and depression. Mol Med Rep.2020;21(1): 508-516.

Huang X, Yu X, Li H, Han L, Yang X. Regulation mechanism of aquaporin 9 gene on inflammatory response and cardiac function in rats with myocardial infarction through extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway. Heart Vessels.2019; 34(12): 2041-2051.

Hung MJ, Hu P, Hung MY. Coronary artery spasm: review and update. Int J Med Sci. 2014; 11(11): 1161-1171.

Idriss HT, Naismith JH. Tnfα and the tnf receptor superfamily: structure-function relationship(s). Microsc Res Tech.2000; 50(3): 184-195.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer. 2002; 2(4): 277-288.

Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals. Clin Exp Nephrol. 2009; 13(2): 107-117.

Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi, K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(14): 6269-6273.

Ithayarasi AP, Devi CSS. Effect of alpha-tocopherol on mitochondrial lipids in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Med Sci Res. 1996; 24: 477-479.

Jacobs M, Staufenberger S, Gergs U, Meuter K, Brandstätter K, Hafner M, Schorb W. Tumor necrosis factor-α at acute myocardial infarction in rats and effects on cardiac fibroblasts. J Mol Cell Cardiol. 1999; 31(11): 1949-1959.

Jiang T, Han F, Gao G, Liu M. Mangiferin exert cardioprotective and anti-apoptotic effects in heart failure induced rats. Life Sci. 2020; 117476.

Jiang T, Zhang L, Ding M, Li M. Protective effect f vasicine against myocardial infarction in rats via modulation of oxidative stress, inflammation, and the PI3K/AKT pathway. Drug Des Devel Ther. 2019; 13: 3773.

Jin Q, Li R, Hu N, Xin T, Zhu P, Hu S, Ma S, Zhu H, Ren J, Zhou H. Dusp1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the mff-required mitochondrial fission and bnip3-related mitophagy via the jnk pathways. Redox Biol. 2018; 14: 576-587.

Kamar SS, Abdel-Kader DH, Rashed LA. Beneficialeffect of curcuminnanoparticles-hydrogel on excisional skin woundhealing in type-i diabeticrat: histologicalandimmunohistochemicalstudies. Ann Anat.2019; 222: 94-102.

Kannan MM, Quine SD. Ellagic acid ameliorates isoproterenol induced oxidative stress: evidence from electrocardiological, biochemical and histological study. Eur J Pharmacol. 2011; 659(1): 45-52.

Karasek M, Winczyk K. Melatonin in humans. J Physiol Pharmacol. 2006; 57: 19.

Karımkhanı H. Deneysel akut miyokard infarktüsü modelinde borik asit kullanımı ve omega-3 yağ asidi tüketiminin miyokard dokusu üzerine olan etkilerinin araştırılması. 2016.

Kim NH, Kang PM. Apoptosis in cardiovascular diseases: mechanism and clinical implications. Korean Circ J.2010; 40(7): 299-305.

Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. Cardiovasc Res. 2007; 74(1): 29-38.

Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl2/BAX: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. Semin Cancer Biol. 1993 December; 4(6): 327-332.

Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. Cancer Res. 1999; 59(7 Supplement): 1693s-1700s.

Kreida S, Törnroth-Horsefield S. Structural insights into aquaporin selectivity and regulation. Curr Opin Struct Biol. 2015; 33: 126-134.

Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N,Entman ML,Mann DL. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(10): 5456-5461.

Laine GA, Allen SJ. Left ventricular myocardial edema. Lymph flow, interstitial fibrosis, and cardiac function. Circ Res. 1991; 68(6): 1713-1721.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee Y, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J Am Chem Soc. 1958; 80:2587.

Li C, Chen X, Qiao S, Liu X, Liu C, Zhu D, Su J, Wang Z. Melatonin lowers edema after spinal cord injury. Neural Regen Res. 2014 Dec 15;9(24):2205-10.

Li J, Hu HP, Li Y, Shao W, Zhang JZ, Wang LM. Influences of remifentanil on myocardial ischemia-reperfusion injury and the expressions of BAX and Bcl2 in rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018; 22(24): 8951-8960.

Li Z,Wang Y, Sun N, Liu X, Song E, Zhang Z, Wen J,Zheng T. Melatonin therapy protects against renal injury before and after release of bilateral ureteral obstruction in rats. Life Sci.2019;229: 104-115.

Lin PT, Chen WH, Zheng H, Lai ZM, Zhang LC. Involvement of AQP 1 in thecardio-protective effect of remifentanil post-conditioning in ischemia/reperfusionrats. Int JClin Exp Med.2015;8(8): 12736.

Lin X, Zhao T, Lin CH, Zuo D, Ye Z, Lin S,Wen S, Liu L, Lin MT, Chang CP,Chao CM. Melatonin provides protection against heat stroke-induced myocardial injury in male rats. J Pharm Pharmacol. 2018; 70(6): 760-767.

Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA,Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, Macgregor GR,Thompson CB. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members BAK and BAX are essential for normal development of multiple tissues. Mol Cell. 2000; 6(6): 1389-1399.

Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2016; 56: 361-383.

Liu X, Wang Y, Yang J, Liu Y, Zhou D, Hou M, Xiang L. Anti-edema effect of melatonin on spinal cord injury in rats. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2015 Jun;159(2):220-6.

Liu YT, Jia HM, Chang X, Ding G, Zhang HW, Zou ZM. The metabolic disturbances of isoproterenol induced myocardial infarction in rats based on a tissue targeted metabonomics. Mol Biosyst. 2013; 9(11): 2823-2834.

Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. Front Neuroendocrinol. 2004; 25(3-4): 177-195.

Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. Nat Med. 2000; 6(2): 159-163.

Marlar S, Jensen HH, Login FH, Nejsum LN. Aquaporin-3 in cancer. Int JMol Sci. 2017; 18(10): 2106.

Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. Immunity. 2005; 22(3): 355-370.

Meeran MN, Azimullah S, Laham F, Tariq S, Goyal SN, Adeghate E, Ojha S. α-Bisabolol protects against β-adrenergic agonist-induced myocardial infarction in rats by attenuating inflammation, lysosomal dysfunction, NLRP3 inflammasome activation and modulating autophagic flux. Food Funct. 2020; 11(1): 965-976.

Meng C, Guo Z, Li D, Li H, He J, Wen D, Luo B. Preventive effect of hesperidin modulates inflammatory responses and antioxidant status following acute myocardial infarction through the expression of PPAR-γ and Bcl-2 in model mice. Mol Med Rep. 2018; 17(1): 1261-1268.

Mızrak B, Parlakpinar H, Acet A, Turkoz Y. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on rat hearts. Acta Histochem. 2004; 106(1): 29-36.

Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor imediated apoptosis via two sequential signalin complexes. Cell. 2003; 114:181-190.

Mobasheri A, Wray S ve Marples D. Distribution of aqp2 and aqp3 water channels in human tissue microarrays. JMol Histol, 2005; 36(1-2): 1.

Moradi-Arzeloo M, Farshid AA, Tamaddonfard E, Asri-Rezaei S. Effects of histidineand vitamin C on isoproterenol-inducedacutemyocardialinfarction in rats. VetRes Forum. Faculty of VeterinaryMedicine, UrmiaUniversity, Urmia, Iran.2016;Vol. 7, No. 1, p. 47.

Mukherjee D, Roy SG, Bandyopadhyay A, Chattopadhyay A, Basu A, Mitra E,Ghosh AK, Reiter RJ, Bandyopadhyay D. Melatonin protects against isoproterenol-induced myocardial injury in the rat: antioxidative mechanisms. JPineal Resh. 2010; 48(3): 251-262.

Murugesan M, Revathi R, Manju V. Cardioprotective effect of fenugreek on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Indian J Pharmacol, 2011; 43(5): 516.

Musa-Aziz R, Chen LM, Pelletier MF, Boron WF. Relative co2/nh3 selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AMTB, and RHAG. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009; 106(13): 5406-5411.

Müller-Werdan U, Schumann H, Fuchs R, Reithmann C, Loppnow H, Koch S, Zimny-Arndt U, He C, Darmer D, Jungblut P, Stadler J, Holtz J, Werdan K. Tumor necrosis factorα (TNFα) is cardiodepressant in pathophysiologically relevant concentrations without inducing inducible nitric oxide-(NO)-synthase (İNOS) or triggering serious cytotoxicity. J Mol Cell Cardiol. 1997; 29(11): 2915-2923.

Naaz S, Mishra S, Pal PK, Chattopadhyay A, Das AR, Bandyopadhyay D. Activation of SIRT1/PGC 1α/SIRT3 pathway by melatonin provides protection against mitochondrial dysfunction in isoproterenol induced myocardial injury. Heliyon. 2020; 6(10): e05159.

Nairooz R, Sardar P, Amin H, Swaminathan RV, Kim LK, Chatterjee S, Feldman DN. Meta-analysis of randomized clinical trials comparing bivalirudin versus heparin plus glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients undergoing percutaneous coronary intervention and in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. Am J Cardiol. 2014; 114(2): 250-259.

Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: in vivo study. Circulation. 2000; 102(5): 572-578.

Namiduru ES, Meram İ, Tarakcioglu M. Melatonin. Kocatepe Tıp Dergisi. 2001; 2(2):

Nandave M, Mohanty I, Nag TC, Ojha SK, Mittal R, Kumari S, Arya DS. Cardioprotective response to chronic administration of vitamin E in isoproterenol induced myocardial necrosis: hemodynamic, biochemical and ultrastructural studies. Indian J Clin Biochem. 2007; 22(1): 22-28.

Neri M, Fineschi V, Di Paolo M, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Cerretani D. Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction. Curr Vasc Pharmacol 2015; 13(1): 26-36.

Nesic O, Lee J, Unabia GC, Johnson K, Ye Z, Vergara L, Hulsebosch CE, Perez-Polo JR. Aquaporin 1–a novelplayer in spinalcordinjury. J Neurochem. 2008;105(3): 628-640.

Neumann JT, Twerenbold R, Ojeda F, Sörensen NA, Chapman AR, Shah ASV,Anand A, Boeddinghaus J, Nestelberger T, Badertscher P, Mokhtari A, Pickering JW, Troughton RW, Greenslade J, Parsonage W, Muller-Hennessen M, Gori T, Jernberg T, Morris N, Liebetrau C, Hamm C, Katus HA, Münzel T, Landmesser U, Salomaa V, Lcoviello L, Ferrario MM, Giampoli S, Kee F, Thorand B, Peters A, Borchini R, Jørgensen T, Söderberg S, Sans S, Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Renné T, Lackner KJ, Worster A, Body R, Ekelund U, Kavsak PA, Keller T, Lindahl B, Wild P, Giannitsis E, Than M, Cullen LA, Mills NL, Mueller C, Zeller T, Westermann D, Blankenberg S. Application of high-sensitivitytroponin in suspectedmyocardial infarction. N Engl J Med. 2019; 380(26): 2529-2540.

Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. J Neuroscience. 1997; 17(1): 171-180.

Nishikawa Y, Oku H, Morishita S, Horie T, Kida T, Mimura M, Fukumoto M, Kojima S, Ikeda T. Negative impact of AQP-4 channel inhibition on survival of retinal ganglion cells and glutamate metabolism after crushing optic nerve. Exp Eye Res. 2016; 146, 118-127.

Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to dna damage. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001; 41(1): 367-401.

O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE, Chung MK, Ettinger SM, Fang JC, Fesmire FM, Barry AF, Granger CB, Krumholz HM, Linderbaum JA, Morrow DA, Newby LK, Ornato JP, Ou N, Radford MJ, Tamis-Holland JE, Tommaso CL, Tracy CM, Woo YJ, De Lemos JA, Zhao DX. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Am CollCardiol. 2013; 61(4): e78-e140.

Ogura T, Matsuda H, Imanishi S, Shibamoto T. Sarcolemmal hydraulic conductivity of guinea-pig and rat ventricular myocytes. Cardiovasc Res. 2002; 54(3): 590-600.

Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. Circulation. 1998; 98(2): 149-156.

Ovali MA, Uzun M. The effects of melatonin administration on kcnq and KCNH2 gene expressions and QTc interval in pinealectomised rats. Cell Mol Biol (Noisy-le- grand). 2016; 63(3): 45-50.

Palabiyik O, Karaca A, Taştekin E, Yamasan BE, Tokuç B, Sipahi T, Vardar SA. Theeffect of a high-protein dietandexercise on cardiac AQP7 and GLUT4 gene expression. Biochem Genet.2016;54(5): 731-745.

Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. Prog Neurobiol. 2008; 85(3): 335-353.

Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 ve beyin ödemi. Pediatr Nephrol. 2007; 22: 778–84.

Parveen A, Babbar R, Agarwal S, Kotwani A, Fahim M. Mechanistic clues in the cardioprotective effect of Terminalia arjuna bark extract in isoproterenol-induced chronic heart failure in rats. Cardiovasc Toxicol.2011;11(1): 48-57.

Patel V, Upaganlawar A, Zalawadia R, Balaraman R. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: a biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. Eur J Pharmacol. 2010; 644(1-3): 160-168.

Petit L, Lacroix I, deCoppetP, Strosberg AD, Jockers R. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3′-5′-monophosphatepathway. BiochemPharmacol. 1999; 58:4:633-639.

Philipp S, Pagel I, Höhnel K, Lutz J, Buttgereit J, Langenickel T, Hamet P, Dietz R,Willenbrock R. Regulation of caspase 3 and Fas in pressure overload-induced left ventricular dysfunction. Eur J Heart Fail. 2004; 6:7:845-851.

Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. Nat Rev Immunol. 2014; 14(3): 166-180.

Pourhanifeh MH, Dehdashtian E, Hosseinzadeh A, Sezavar SH, Mehrzadi S. Clinical application of melatonin in the treatment of cardiovascular diseases: current evidence and new insights into the cardioprotective and cardiotherapeutic properties. Cardiovasc Drugs Ther.2020; 1-25.

Prabhu S, Jainu M, Sabitha KE, Devi CS. Cardioprotective effect of mangiferin on isoproterenol induced myocardial infarction in rats. Indian J Exp Biol. 2006.

Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHİP28 water channel. J Biol Chem. 1993; 268(1): 17-20.

Prince PSM. A biochemical, electrocardiographic, electrophoretic, histopathological and in vitro study on the protective effects of (−) epicatechin in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. Eur J Pharmacol. 2011; 671(1-3): 95-101.

Rajadurai M, Prince PSM. Preventive effect of naringin on cardiac markers, electrocardiographic patterns and lysosomal hydrolases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. Toxicol. 2007; 230(2-3): 178-188.

Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. Nature. 1997, 387:773-776

Reed JC. Mechanisms of apoptosis. Am J Pathol. 2000; 157(5): 1415-1430.

Reed JC. Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. Behring Inst Mitt. 1996; (97): 72-100.

Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experientia. 1993; 49(8): 654-664.

Roche JV, Törnroth-Horsefield S. Aquaporin protein-protein interactions. Int J Mol Sci. 2017; 18(11): 2255.

Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. J Mol Cell Cardiol. 1985; 17(4): 291-306.

Roth DM, White FC, Mathieu Costello O, Guth BD, Heusch G, Bloor CM, Longhurst JC. Effects of left circumflex ameroid constrictor placement on adrenergic innervation of myocardium. Am J PhysiolHeart Circ Physiol. 1987; 253(6): H1425-H1434.

Roudier N, Ripoche P, Gane P, Le Pennec PY, Daniels G, Cartron JP, Bailly P. AQP3 deficiency in humans and the molecular basis of a novel blood group system, GIL. J Biol Chem. 2002; 277(48): 45854-45859.

Rutkovskiy A, Mariero LH, Nygård S, Stensløkken KO, Valen G, Vaage J. Transient hyperosmolality modulates expression of cardiac aquaporins. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 425(1): 70-75.

Sabbah HN, Stein PD, Kono T, Gheorghiade M, Levine TB, Jafri S, Hawkins ET, Goldstein S. A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1991; 260(4): H1379-H1384.

Sapède D, Cau E. The pineal gland from development to function. Curr Top Dev Biol. 2013; (Vol. 106, pp. 171-215).

Shahrokhi N, Khaksari M, AsadiKaram G, Soltani Z, Shahrokhi N. Role of melatonin receptors in the effect of estrogen on brain edema, intracranial pressure and expression of aquaporin 4 after traumatic brain injury. Iran J Basic Med Sci.2018;21(3): 301.

Shukla SK, Sharma SB. β-Adrenoreceptor agonist isoproterenol alters oxidative status, inflammatory signaling, injury markers and apoptotic cell death in myocardium of rats. Indian J Clin Biochem. 2015;30(1): 27-34.

Shukla SK, Sharma SB, Singh UR, Ahmad S, Maheshwari A, Misro M, Dwivedi S. Eugenia jambolana pretreatment prevents isoproterenol-induced myocardial damage in rats: evidence from biochemical, molecular, and histopathological studies. J Med Food.2014; 17(2): 244-253.

Silva KAS, Emter CA. Large animal models of heart failure: a translational bridge to clinical success. JACC Basic Transl Sci. 2020; 5(8): 840-856.

Simko F, Bednarova KR, Krajcirovicova K, Hrenak J, Celec P, Kamodyova N, Gajdosechova L, Zorad S, Adamcova M. Melatonin reduces cardiac remodeling and improves survival in rats with isoproterenol-induced heart failure. J Pineal Res.2014; 57(2): 177-184.

Skowronski MT, Lebeck J, Rojek A, Praetorius J, Fuchtbauer EM, Frøkiær J, Nielsen S. Aqp7 is localized in capillaries of adipose tissue, cardiac and striated muscle:

implications in glycerol metabolism. Am J Physiol Renal Physiol. 2007; 292(3): F956-F965.

Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. Mol Cell Endocrinol. 2012; 351(2): 152-166.

Sokullu O, Sanioglu S, Kurc E, Sargin M, Deniz H, Tartan Z, SA Aka, Bilgen F. Does the circadian rhythm of melatonin affect ischemia-reperfusion injury after coronary artery bypass grafting? Heart Surg Forum. 2009, April; (Vol. 12, No. 2, p. E95).

Song D, Liu X, Diao Y, Sun Y, Gao G, Zhang T,Chen K,Pei L. Hydrogen-rich solution against myocardial injury and aquaporin expression via the PI3K/Akt signaling pathway during cardiopulmonary bypass in rats. Mol Med Rep.2018;18(2): 1925-1938.

Sui X, Gao C. Huperzine A ameliorates damage induced by acute myocardial infarction in rats through antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory mechanisms. Int J Mol M. 2014; 33(1): 227-233.

Sun MC, Honey CR, Berk C, Wong NLM, Tsui JKC. Regulation of aquaporin-4 in a traumatic brain injury model in rats. J Neurosurg. 2003; 98(3): 565-569.

Takagi Y, Yasuhara T, Gomi K. Creatine kinase and its isozymes. Rinsho Byori. 2001; 52-61.

Tang D, Li ZY, Gijsen F, Giddens DP. Cardiovascular diseases and vulnerable plaques: data, modeling, predictions and clinical applications. Biomed Eng Online. 2015; 14(1): 1-7.

Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF,Rezzani R. Cardiovasculardiseases: protective effects of melatonin. J Pineal Res.2008; 44(1): 16-25.

Thiagarajah JR, Zhao D, Verkman AS. Impaired enterocyte proliferation in aquaporin-3 deficiency in mouse models of colitis. Gut. 2007;56(11): 1529-1535.

Thuny F, Lairez O, Roubille F, Mewton N, Rioufol G, Sportouch C, Sanchez I, Bergerot C, Thibault H, Cung TT, Argaud L, Revel D, Derumeaux EBC, Elbaz M, Piot C, Ovize M, Croisille P, Finet, G. Post-conditioning reduces infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. JAmColl Cardiol. 2012; 59(24): 2175-2181.

Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint E.S. C., ACCF/AHA/WHF task force for the redefinition of myocardial infarction. Universal definition of the myocardial infarction. Kardiol Pol. 2008; 66(1): 47.

Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P, Lindahl B, Giannitsis E, Hasin Y, Galvani M, Tubaro M, Alpert JS, Biasucci LM, Koenig W, Mueller C, Huber K, Hamm C, Jaffe AS. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. Eur Heart J. 2010; 31(18): 2197-2204.

Tie L, Wang D, Shi Y, Li X. Aquaporins in cardiovascular system. In aquaporins.Springer Dordrecht. 2017;105-113.

Tomita Y, Dorward H, Yool AJ, Smith E, Townsend AR, Price TJ, Hardingham JE. Role of aquaporin 1 signalling in cancer development and progression. Int J Mol Sci. 2017; 18(2): 299.

Turgut M, Uysal A, Yurtseven M. Epifiz bezinin morfolojik özellikleri, embriyolojik gelişimi ve deneysel greftleme işlemleri. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 12(1).

Umenishi F, Schrier RW. Hypertonicity-induced aquaporin-1 (AQP1) expression is mediated by the activation of MAPK pathways and hypertonicity-responsive element in the AQP1 gene. J Biol Chem.2003;278(18): 15765-15770.

Upaganlawar A, Gandhi H, Balaraman R. Isoproterenol induced myocardial infarction: protective role of natural products. J Pharmacol Toxicol. 2011; 6(1): 1-17.

Vajreswari A, Narayanareddy K. Effect of dietary fats on some membrane-bound enzyme-activities, membrane lipid-composition and fatty-acid profiles of rat-heart sarcolemma. Lipids. 1992; 27: 339-343.

Van Camp G. Cardiovascular disease prevention. Acta Clin Belg. 2014; 69(6): 407-411.

Veneroso C, Tuñón MJ, González-Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. J Pineal Res. 2009; 47(2): 184-191.

Verkerk AO, Lodder EM, Wilders R. Aquaporin channels in the heart—physiology and pathophysiology. Int J Mol Sci. 2019; 20(8): 2039.

Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC. Aquaporins: important but elusive drug targets. Nat Rev Drug Discov. 2014; 13(4): 259-277.

Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. Am J Physiol Renal Physiol. 2000; 278(1): F13-F28.

Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. J Cell Sci. 2005; 118(15): 3225-3232.

Vollrath L. The pineal organ. Handbuch Der Mikroskopischen Anatomie Des Menschen. 1981; 7: 288-304.

Wang H, Eitzman DT. Acute myocardial infarction leads to acceleration of atherosclerosis. Atherosclerosis. 2013; 229(1): 18-22.

Wang N, Liu C, Wang X, He T, Li L, Liang X, Wang L, Song L, Wei Y, Wu Q, Gong C. Hyaluronic acid oligosaccharides improve myocardial function reconstruction and angiogenesis against myocardial infarction by regulation of macrophages. Theranostics.2019; 9(7): 1980.

Wang Y, Wang Q, Yu W, Du H. Crocin attenuates oxidative stress and myocardial infarction injury in rats. Int Heart J.2018; 59(2): 387-393.

Warth A, Simon P, Capper D, Goeppert B, Tabatabai G, Herzog H,Dietz K, Stubenvoll F, Ajaaj R, Becker R, Weller M, Meyermann R, Wolburg H,MittelbronnM. Expression pattern of the water channel aquaporin-4 in human gliomas is associated with blood–brain barrier disturbance but not with patient survival. J n Neurosci Res.2007;85(6): 1336-1346.

Weis S, Shintani S, Weber A, Kirchmair R, Wood M, Cravens A, McSharry H, Iwakura A, Yoon Y, Himes N, Burstein D, Doukas J, Soll R, Losordo D, Cheresh D. Src blockade stabilizes a FLK/CADHERİN complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. J Clin İnvest. 2004; 113(6): 885-894.

Wong WWL, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. IUBMB Life. 2008; 60(6): 390-397.

Wong ZW, Thanikachalam PV, Ramamurthy S. Molecular understanding of the protective role of natural products on isoproterenol-induced myocardial infarction: a review. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017; 94: 1145-1166.

Wu B, Beitz E. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. Cell Mol Life Sci. 2007; 64(18): 2413-2421.

Yeager AS, Grumet FC, Hafleigh EB, Arvin AM, Bradley JS, Prober CG. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. J Pediatr.1981; 98(2): 281-287.

Yu B, Wang W. Cardioprotective effects of morroniside in rats following acute myocardial infarction. Inflammation. 2018; 41(2): 432-436.

Yuan H, Yang GH, Li S, Li L, Song GC, Xu CQ, Sun J. The expression of calcium-sensing receptor in rats with acute myocardial infarction and its effect on cells apoptosis. Chinese J Applied Physiol.2019; 35(3): 268-272.

Zhai M, Li B, Duan W, Jing L, Zhang B, Zhang M, Yu S, Yu L, Liu Z, Yu B, Ren K, Gao E, Yang Y, Liang H, Jin Z. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT 3-dependent regulation of oxidative stres andapoptosis. J Pineal Res.2017;63(2): e12419.

Zhang BF, Jiang H, Chen J, Hu Q, Yang S, Liu XP, Liu G. Lncrna h19 ameliorates myocardial infarction-induced myocardial injury and maladaptive cardiac remodelling by regulating kdm3a. J Cell Mol Med. 2020; 24(1): 1099-1115.

Zhang D, Vetrivel L, Verkman AS. Aquaporin deletion in mice reduces intraocular pressure and aqueous fluid production. J Gen Physiol. 2002; 119(6): 561-569.

Zhang HZ, Kim MH, Lim JH, Bae HR. Time-dependent expression patterns of cardiac aquaporins following myocardial infarction. J Korean Med Sci. 2013; 28(3): 402-408.

Zhang Z, Chen Z, Song Y, Zhang P, Hu J, Bai C. Expression of aquaporin 5 increases proliferation and metastasis potential of lung cancer. J Pathol. 2010; 221(2): 210-220.

Zhou R, Xu Q, Zheng P, Yan L, Zheng J, Dai G. Cardioprotective effect of fluvastatin on isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. Eur J Pharmacol. 2008; 586(1-3): 244-250.

Zidar N, Dolenc-Stražar Z, Jeruc J, Štajer D. Immunohistochemical expression of activated caspase-3 in human myocardial infarction. Virchows Arch. 2006; 448(1): 75-79.

# EKLER

## Ek-1 Etik Kurul Onayı

**T.C.**
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI**

| | |
|---|---|
| TOPLANTI TARİHİ | :25.09.2019 |
| TOPLANTI SAYISI | :2019/07 |
| DOSYA KAYIT NUMARASI | :2019-1900136263 |
| KARAR NUMARASI | :2019/07-04 |
| YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR | : Nezahat Kübra Tüfekçioğlu |
| HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI | : 28+16* adet Wistar Cinsi Sıçan |

Proje yürütücüsü Prof. Dr. Metehan UZUN, tarafından Etik Kurulumuza sunulan "İzoproterenol ile Oluşturulan Miyokart Enfarktüsü Modelinde Melatoninin Aquaporin Kanalları Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı proje Hayvan Deneylerine ilişkin ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna; oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Ali İŞMEN
Üye
(Başkan)

Prof. Dr. Yonca YÜCEER
Üye

Prof. Dr. Murat TOSUNOĞLU
Üye

Prof. Dr. Tevfik Murat KOŞAN
Üye

Doç. Dr. Cemil TÖLÜ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Canan AKMAN
Üye

Vet. Hek. Sait ELMAS
Üye

Tayfun TAŞBİLEK
Sivil Üye
(Katılmadı)

Erdoğan GÜRSEL
Sivil Üye

**Ek-2**

**SPİRALLİ TEZ KONTROL FORMU**

| | **Evet** | **Hayır** |
|---|---|---|
| 1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır. | | |
| 2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ven12 punto yazılmalıdır. | | |
| 3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır. | | |
| 4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır. | | |
| 5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır. | | |
| 6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa) | | |
| 7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır. | | |
| 8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır. | | |
| 9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır. | | |
| 10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman" kullanılmalıdır. | | |
| 11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlenin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir. | | |
| 12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır. | | |

| | |
|---|---|
| Tarih: 28/ 01/ 2021<br><br>Öğrenci<br>Nezahat Kübra TÜFEKÇİOĞLU<br><br>İmza | Tarih: 28/ 01/ 2021<br><br>Danışmanın<br>Prof. Dr. Metehan UZUN<br><br>İmza |

**Ek-3**

## ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SPİRALLİ/CİLTLİ TEZ YAZIM KONTROL LİSTESİ

| KONTROL BAŞLIĞI | ÖĞRENCİ | DANIŞMAN |
|---|---|---|
| Tez yazımında kullanılan yazı tipi | □UYGUN | □UYGUN |
| Sayfa kenar boşlukları | □UYGUN | □UYGUN |
| Kapak sayfası düzeni | □UYGUN | □UYGUN |
| İç kapak sayfası düzeni | □UYGUN | □UYGUN |
| Onay sayfası düzeni | □UYGUN | □UYGUN |
| Beyan sayfası içeriği ve düzeni | □UYGUN | □UYGUN |
| İçindekiler sayfası düzeni | □UYGUN | □UYGUN |
| Teşekkür sayfası | □UYGUN | □UYGUN |
| Türkçe özet | □UYGUN | □UYGUN |
| İngilizce özet | □UYGUN | □UYGUN |
| Simgeler ve kısaltmalar dizini | □UYGUN | □UYGUN |
| Şekiller dizini | □UYGUN | □UYGUN |
| Tablolar dizini | □UYGUN | □UYGUN |
| Tezin ön sayfalarının sıralaması | □UYGUN | □UYGUN |
| Ön sayfaların numaralandırılması | □UYGUN | □UYGUN |
| Sayfalarının numaralandırılması | □UYGUN | □UYGUN |
| Başlıklarının numaralandırılması | □UYGUN | □UYGUN |
| Şekil, resim ve tablo numaralandırması | □UYGUN | □UYGUN |
| Yöntem ve Gereç | □UYGUN | □UYGUN |
| Bulgular | □UYGUN | □UYGUN |
| Tartışma | □UYGUN | □UYGUN |
| Sonuç ve Öneriler | □UYGUN | □UYGUN |
| Kaynaklar | □UYGUN | □UYGUN |
| Atıflar (alıntı ve göndermeler) | □UYGUN | □UYGUN |
| Ekler (etik kurul onayı, vs) | □UYGUN | □UYGUN |
| Tez planı | □UYGUN | □UYGUN |
| Dil (anlatım, yazım –imla) | □UYGUN | □UYGUN |
| Kâğıt ve baskı özelliği | □UYGUN | □UYGUN |
| Tezin son şeklinin elektronik kopyası | □UYGUN | □UYGUN |
| Tarih: 28/ 01/ 2021<br><br>Öğrenci<br>Nezahat Kübra TÜFEKÇİOĞLU | Tarih: 28/ 01/ 2021<br><br>Danışmanın<br>Metehan UZUN | |

## Ek-4 ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Adı** | Nezahat Kübra | | | **Soyadı** | TÜFEKÇİOĞLU |
| **Doğum Yeri** | Antakya/ Hatay | **Uyruğu** | T.C. | **Doğum Tarihi** | 28.05.1995 |
| **E-mail** | nezahat.k.tufekcioglu@gmail.com | | | **Tel** | 05511197960 |

### Eğitim Düzeyi

| | **Mezun Olduğu Kurumun Adı** | **Mezuniyet Yılı** |
|---|---|---|
| **Yüksek Lisans** | Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Fizyoloji (YL) | 2018-Devam ediyor |
| **Lisans** | Selçuk Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü | 2014-2018 |

### İş Deneyimi

| | **Görevi** | **Kurum** | **Süre (Yıl - Yıl)** |
|---|---|---|---|
| **1.** | Diyetisyen | Berk Gıda LTD. ŞTİ. | 2020- Devam Ediyor |

### Yabancı Dil Sınav Notu[#]

| KPDS | ÜDS | YDS | YÖKDİL | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 71,25 | | | | | | |

[] Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır[] KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

**A-Katıldığı Uluslararası ve ulusal konferans ve kongreler:**

Union of Thrace Universities 3. International Health Sciences Congress, 24-26 Ekim 2019, Çanakkale.

**B-Sertifikalar:**

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu

**ORCID No:**0000-0003-4302-2157