



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİMDALI**

**İNSAN KALP KAPAKLARINDA OLUŞAN
KALSİFİKASYONDA SİTRİK ASİDİN
ETKİSİ**

**DR.NECMİ KÖSE
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. NEHİR SUCU**

MERSİN-2007

**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİMDALI**

**İNSAN KALP KAPAKLARINDA OLUŞAN
KALSİFİKASYONDA SİTRİK ASİDİN
ETKİSİ**

**DR.NECMİ KÖSE
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. NEHİR SUCU**

MERSİN-2007

TEŐEKKÜR

**Asistanlık eğitimim süresince bana emeği geçen
baŐta Sayın Prof. Dr. Murat Dikmengil olmak üzere hocalarım,
Doç. Dr. Nehir Sucu, Doç. Dr. Barlas Naim Aytaçoğlu ve Doç. Dr. Murat Özeren'e**

**Çalışma arkadaşlarım,
Op. Dr. Kerem Karaca, Dr. Özgür Bayrı, Dr. Orhan Güngör, Dr. Özden Vezir,
Dr. Özgür Őahin, Dr. Özlem Güleç, Dr. Berker Yılmaz, Dr. Bilal Yılmaz'a**

**Bu tezin oluŐturulmasında vermiŐ oldukları destekten dolayı
Doç. Dr. Ali Döndaş, Doç. Dr. Lülüfer Tamer, Yrd. Doç. Dr. Necat Yılmaz,
Doç Dr. Banu oŐkun Yılmaz ve
Yrd. Doç. Dr. Bahar TaŐdelen'e**

TeŐekkürlerimi sunarım

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO:

ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	8
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	11
2.GENEL BİLGİLER.....	14
2.1.Kalp Kapaklarının Kısa Anatomisi.....	14
2.2.Endotelyum ve Kalp Kapağı Hastalıkları.....	16
2.2.1.Kalp Kapakları.....	16
2.2.2.Endotel Hücre Fonksiyonu.....	17
2.2.3.Endotel Hücre Disfonksiyonu, Aktivasyonu.....	17
2.2.4.Non-Bakteriyel Endokardit.....	18
2.2.5.İnfektif Endokardit.....	18
2.2.6.Romatizmal Kalp Kapak Hastalıkları.....	19
2.2.7.Mikzomatoz Kalp Kapak Hastalıkları.....	19
2.2.8.Senil Kalp Kapak Hastalıkları.....	20
2.3.Kalsiyum İyonunun Biyokimyasal Rolü.....	22
2.4.Doku Dejenerasyonu, Kalsifikasyonu ve Mekanizması.....	23
2.4.1.Mekanizmalar.....	24
2.4.2.Düzenlenme.....	25
2.4.3.Kalp Kapakları Kalsifikasyonunda Biyokimyasal Olaylar.....	26
2.4.4.Elastin ve Kollajen Liflerin Kalsifikasyon Mekanizması.....	27
2.4.5.Non Kollajen İçeriğin Rolü.....	28
2.4.6.Glikozaminglikanlar ve Proteoglikanlar.....	28
2.5.Dejeneratif Kalsifikasyonun Önlenmesi.....	28
2.6.Sitrik Asit Yapısı ve Özellikleri.....	29
2.6.1.Özellikleri.....	30
2.6.2. Kullanımı	30
2.6.3.Etkileri.....	30
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	32
3.1.Deney Protokolü.....	32
3.2.Hasta Seçimi.....	32
3.3.Yöntem.....	32
3.4.Biyokimyasal Ölçümler.....	33

3.5.Histolojik İnceleme.....	35
3.6.İstatistiksel Analiz.....	39
4.BULGULAR.....	37
5.TARTIŞMA.....	43
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	47
7.KAYNAKLAR.....	48
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	
ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ	
TABLolar DİZİNİ	

ÖZET

Kalp kapaklarında oluşan yapısal bozulma ve kalsifik dejenerasyon, zaman içerisinde klinik yetmezliğe neden olan en önemli faktörlerden biridir. Kalp kapaklarında değişik etkenlere bağlı olarak gelişen patolojilerde cerrahi kaçınılmaz bir sondur. Özellikle tamirin ön planda olduğu mitral yetmezlik patolojilerinde bile %30 vakada kapak değişimi yapıldığı göz önünde bulundurulacak olursa, nativ kapaklardaki bozulmanın önlenmesinin önemi ortaya çıkmaktadır. Bizim amacımız, *in vitro* olarak gerçekleştirilen bu çalışmada hastalarımızdan çıkartılan nativ kapaklarda, sitrik asidin (CA) oluşmuş olan kalsifikasyona etkisini araştırmaktı. Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalarda, böbrek taşı olan hastalarda alkali sitratların yeni taş oluşumunu engellediği ve kemik deminerilizasyonunu azalttığı gösterilmiştir⁷. Alkali sitratlar polikistik böbrekli ratlarda interstistisyel fibrozisi ve inflamasyonu azaltarak yeni kistlerin oluşumunu durdurmuştur⁷. Diğer yandan ratlarda yapılan *ex vivo* bir çalışmada ise CA tuzlarının ratların batınına yerleştirilen rat aortalarında kalsifikasyona bağlı dejenerasyonu önlediği gösterilmiştir⁸. CA gibi bir şelat olan Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) de periferik arter hastalığı ve/veya koroner arter hastalığı olan hastaların yakınmalarında düzelleme sağlamış, yapılan bir diğer çalışmada ise koroner arterlerde kalsifikasyondaki gerileme net olarak ortaya konmuştur. Najjar ve arkadaşları da, korneasında kalsifik band gelişen hastalarda eksternal EDTA uygulamasını tedavi protokolüne almışlardır¹³⁹.

Günümüzde gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan CA'nın, yaptığımız *ex vivo* çalışma ile nativ kapaklardaki kalsifikasyonu azalttığını gösterdik. Kalsifikasyonu azaltıcı ve önleyici özelliğinden insanlarda yararlanılabileceğine, bu konuda daha ileri çalışmalar yapılması gerektiğine karar verdik

Çalışma 12 hasta üzerinde yapıldı. Çalışmaya alınan 12 hastanın 6'sı erkek 6'sı kadındı. 8 adet mitral kapak eksizyonu ve 6 adet aort kapak eksizyonu yapıldı. İki hastaya hem aort hem de mitral kapak replasmanı uygulandı. Bir hastaya aynı anda koroner by-pass cerrahisi yapıldı. Hastaların genel yaş dağılımı 21–65 (minimum-maksimum), ortalama yaş 44,41±7,16 (Ortalama±standart sapma) olarak bulundu.

Kapak replasmanı için operasyona alınan hastaların preoperatif ekokardiyografik sonuçları, elde edilen doku örneklerinin peroperatif makroskopik görüntüleri ve postoperatif doku biyokimyasal analizlerine göre hafif, orta ve ağır derecede kalsifikasyon olarak sınıflandırdık. Mitral kapak ve aort kapak değişimi

yapılan hastaların eksize edilen kapakları alındı. Her bir hastadan alınan kapak örnekleri fosfat tamponlu salin solüsyonu, %0,625' lik gluteraldehit (GA) (0,1 mol pH 7.4) içine konarak +4 °C de 48 saat bekletildi. Bu doku örnekleri serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile yıkandıktan sonra Kontrol ve Çalışma grubu olarak ikiye ayrıldı. Kontrol grubundaki kapak örnekleri tazelenmiş %0,625 lik GA (0,1 mol pH 7.4) solüsyonu içinde +4 °C de 5 gün daha bekletildi (toplam 7 gün). Çalışma grubundaki parçalar ise % 3,8 lik CA (pH 7.4) içine konulup 37 °C de 48 saat bekletildi. Bu doku örnekleri tekrar serum fizyolojikte yıkandıktan sonra aynı özellikleri taşıyan GA solüsyonuyla 3 gün 37 °C de muamele edildi (toplam 7 gün). Her iki gruptaki parçalar alınarak biyokimyasal inceleme için kuru tüplere, ışık mikroskopik inceleme için formaldehid solüsyonuna (%3,8) ve elektron mikroskopik inceleme için GA solüsyonuna (%0,625) konuldu.

Bu sonuçlara göre Kontrol grubunda 4 hafif, 5 orta ve 5 ağır kalsifikasyon olan kapak örneği saptadık. Ağır kalsifikasyon gösteren doku parçalarının yüksek oranda kalsifik görünüme sahip olduğu, aşırı kırılabilir ve ileri derecede dejeneratif olduğu saptandı. Çalışma grubunda ise; 6 hafif, 6 orta ve 2 ağır kalsifikasyon gösteren kapak patolojisi vardı. Kontrol grubunda 5 ağır kalsifikasyon gösteren kapak patolojisi saptanmışken, Çalışma grubunda ağır kalsifikasyon sınıfına giren kapak patolojisi sayısı 2 olarak bulunmuştur. Aynı şekilde Kontrol grubunda 5 kapak orta derecede kalsifikasyon gösterirken, Çalışma grubunda 6 kapak, Kontrol grubunda 4 hafif derecede kalsifikasyon gösteren kapak var iken, Çalışma grubunda 6 hafif kalsifikasyon gösteren kapak patolojisi görülmüştür. Çalışma grubundaki ağır kalsifikasyon gösteren kapak sayısı azalırken, orta ve hafif kalsifikasyon sınıfına giren kapak sayısının artması CA'in etkinliğini kanıtlamaktadır.

Total olarak bütün kalp kapaklarının (hem aort hem de mitral kapak) biyokimyasal sonuçları incelendiğinde Çalışma grubunda kalsiyum (p=0,007) ve fosfat (p=0,042) değerlerinde anlamlı bir düşüş olduğu görüldü. Kontrol grubu ile Çalışma grubu arasında Malondialdehit (MDA), ATPaz ve total protein miktarlarında çok az değişim saptanmış ve bu da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Doku ATPaz aktivitesinin ve total protein düzeylerinin azalmamış ve MDA düzeylerinin de yükselmemiş olması hücre bütünlüğünün korunduğuna yönelik bulgulardır.

Buna paralel olarak ışık mikroskopisi ile yapılan değerlendirmede Çalışma grubunda bağ dokusu bileşenlerinin bütünlüğünün daha az bozulduğu, Kontrol

grubunda kalsifikasyonun daha belirgin olduğu tanımlanmıştır. Kontrol grubunda kalsifik alanların belirgin olarak görüldüğü, Çalışma grubunda ise kalsifikasyon alanlarının gözle görülür biçimde azaldığı tespit edilmiştir.

Elektron mikroskopik incelemelerde Kontrol ve Çalışma grubu kapak örneklerinde normal yapısal bileşenler görülebilmektedir. Hem aort hem de mitral kapak yapılarında kollajen ve elastik liflerdeki artış dikkati çekmektedir. Kollajen lifler etrafında düzensiz ve fuziform görünümde kalsifik yapılar vardır. Bu kalsifik yapılar gerek Kontrol gerekse Çalışma grubunda görülmekle beraber Çalışma grubundaki bu kalsifik yapılar daha azdır. Kollajen lifler etrafındaki kalsifik yapıların Çalışma grubunda azaldığı ve kollajen liflerin özelliklerini kaybetmedikleri dikkati çekmiştir.

Bu bulgular ışığında bizim yaptığımız bu çalışmanın sonucunda CA'in (% 3,8 lik pH 7.4) içine konulup 37 °C de 48 saat bekletilerek yapılan uygulamada doku kalsifikasyonunu azaltması ve doku morfolojisinde etkin bir değişiklik yapmamış olması anlamlıdır. Şelatların sistemik ve lokal olarak uygulanabileceğinin ve hatta lokal uygulamalarda kalsifikasyonun çok daha kısa sürede ortadan kaldırılabilceğini farklı çalışmalardan anlamış bulunuyoruz. Gözden geçirdiğimiz çalışmalar ve bizim yürütmüş olduğumuz çalışmaların ışığı altında kapak etiyopatogenezi ne olursa olsun çoğunluk patolojilerin temeli oksidoinflamatuar hasara bağlıdır ve bu olayların temelinde kalsiyum vardır. Dolayısıyla sitratlarla lokal olarak kalp kapağı dokularındaki kalsifikasyonun azaltılabildiğinin gösterilmesi, kapaklarda geç dönemde oluşabilecek kalsifikasyonların önlenmesinde ve/veya geciktirilmesinde önemli bir yeri olabileceğini düşündürmekle birlikte erken dönemde artan hücre içi kalsiyumun da ortamdan uzaklaştırılması sonucunda oksidoinflamatuar hasarın da önlenebileceği fikri çalışma grubumuzca benimsenmiştir. Bundan sonraki aşamada yapacağımız çalışmalarda ilk planda CA'in oksidoinflamatuar yanıt ve kalsifikasyona olan etkisi *in vivo* olarak gösterilmeye çalışılacak, sonra da sitratların sistemik uygulamasının kalp kapaklarındaki değişime olan etkisi araştırılacaktır.

Anahtar kelimeler: Kalp kapak dejenerasyonu, kalsifikasyon, sitrik asit.

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

The Efficacy of Citric Acid on the Removal of the Calcification that Occures in Human Heart Valves

Structural impairment and calcific degeneration that occur in the cardiac valves are among the most important factors which lead to the clinical valve insufficiency. Surgery is the inevitable end point of the cardiac valve pathologies that occur as a result of various factors. Considering that 30% of the mitral insufficiency cases requiring repairment ends with a valve replacement, the importance of preventing nativ cardiac valve impairment is raised. In this in vitro Study, we aimed to investigate the effect of citric acid (CA) on the calcific degeneration in human cardiac valves obtained from our patients. Who underwent valve replacement recent clinical studies showed that alkali citrates prevent new urinary stone formation in the patients with urolithiasis and reduce the bone demineralization. In the rat models with polycystic kidney disease alkali citrates ceased new cyst formation by reducing interstitial fibrosis and inflammation. Nevertheless, in an *ex vivo* Study alkali citrates prevented calcific degeneration of the rat aortas embedded in the rats' abdomen. Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA), a chelating agent like CA, improves the symptoms of patients with peripheral arterial disease and/or coronary artery disease and in a Study its inhibitory effect on the coronary arterial calcification has been clearly demonstrated. Najjar et al used external EDTA application in patients with corneal calcific bands as a treatment protocol.

In our *ex vivo* Study, we have showed that CA, nowadays commonly used in food industry, reduces the calcification in native human cardiac valves. We believe that CA can be useful in humans with its property of reducing and preventing calcification, and suggest advanced studies to be performed in this aspect.

We have classified the valvular calcification of the patients who underwent valve replacement as mild, moderate and severe according to their macroscopic appearance, echocardiographic findings and tissue biochemical analyses. 12 patients participated in the Study. The excised valves from the patients who underwent mitral and aortic valve replacement were used. The excised valve specimens taken from each patient were treated for 48 hours in a solution composed of phosphate tamponized saline (0,09% NaCl), 0.625% gluteraldehyde (GA) (0.1 mol pH 7.4) at +4 °C. These tissue specimens were divided into two groups as the Study and Control groups after washing with saline solution. The valve specimens in the

Control group were retreated with fresh 0.625% GA solution (0.1 mol pH 7.4) at +4 °C for 5 days (in total 7 days). The specimens in the Study group were treated with 3.8% CA solution (pH 7.4) at +37 °C for 48 hours. After washing with saline solution these specimens, were retreated with the fresh 0.625% GA solution at 37 °C for 3 more days (totaly 7 days). Every specimen in each group was taken into an empty tube for biochemical analysis, into formaldehyde solution (3.8%) for light microscopy, and into GA (0.625%) solution for electron microscopy.

According to these results, in the Control group 4 of the patients have showed mild, 5 of them moderate and 5 of them severe valvular calcification. The specimens obtained from the patients having severe valvular calcification were highly calcific in appearance, excessively fragile and degenerative. In the Study group, 6 of the patients showed mild, 6 of them showed moderate, and 2 of them showed severe valvular calcification. We have detected 5 severe valvular calcification in the Control group, whereas the number of severe valvular calcification in the Study group was 2. The number of moderate valvular calcification was 5 in the Control group, whereas this number was 6 in the Study group and 6 mild valvular calcification were detected in the Study group whereas the number was 4 in the Control group. Both the decrease in the number of severe valvular calcification and increase in the number of mild and moderate valvular calcification in the Study group indicates a proof for the efficacy of CA.

When the biochemical results of all cardiac valves (mitral and aortic valves) were examined, a statistically significant decrease in the calcium ($P=0.007$) and phosphate ($P=0.042$) levels were detected in the Study group. The change in the amount of MDA, ATPase and total protein levels differed very little between the Study and Control group and were not found to be statistically significant. Tissue ATPase activity and total protein levels were not decreased and the Malondialdehite (MDA) level was not increased in the Study group. These findings indicates that the cellular integrity was preserved.

Evaluation of the results obtained by light microscopy revealed that, the integrity of connective tissue components in the Study group was less impaired, and the calcification was more evident in the Control group. We noticed that in the Control group the calcific areas were more evidently present, whereas in the Study group the calcific areas were markedly less.

Both in the Study and Control groups, normal structural components of the cardiac valves could be observed by the electron microscopy. Under electron microscopy the collagen and elastic fibrils were noticeable both in the aortic and mitral valve structures. Irregular and fusiform calcifications were observed around the collagen fibrils. These calcific structures were present both in the Control and Study group, but they were much more rare in the Study group. We noticed that the calcific structures around the collagen fibrils were reduced and the properties of the collagen fibers were preserved.

According to these findings of our Study it is clear that locally applied CA decreases the tissue calcification and does not give rise to significant changes in the tissue morphology. By the interpretation of many different studies, we found out that chelating agents can both be used locally and systemically and especially the local application is able to quickly remove the calcification. According to our present Study and other studies, we conclude that whatever the valvular etiopathogenesis is the basis of most of the valvular pathology is due to the oxidoinflammatory damage in which calcium plays a basic role. Consequently, our clinical Study group assumes that demonstrating the reduction in the valvular calcification with locally applied citrates proves their efficacy in the prevention of late calcification in valvular pathologies and they remove the intracellular calcium in the early stage by the way that they prevent the oxidoinflammatory damage. Our following studies will aim firstly to search for the effect of CA on the cellular morphology *in vivo*, and then to investigate the effect of systemically applied citrates on the heart valves.

Key Words: Calcification, Citric Acid, Heart Valve Degeneration

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kalp ve damar hastalıklarına bağlı mortalite ve morbidite ilk sıradaki yerini korumaktadır. Kalp kapak hastalıkları tüm kardiyovasküler rahatsızlıkların önemli bir bölümünü oluşturmakla birlikte bu hastalıkların ortaya çıkmasına neden olan mekanizmalar karmaşıktır. Kalp kapaklarındaki bu hastalık ne tür bir hastalık olursa olsun patolojik süreç oksidoinflamatuvar yanıtla başlamakta, kalsifik dejenerasyonla sonlanmaktadır. Kalsifik dejenerasyonun başlamasını ve/veya ilerlemesini önleyecek tedavi henüz yoktur. Kapak darlıklarında ve/veya yetmezliklerinde öncelikle tamir edici girişimler tercih edilmesine karşın birçok hastada kapak değişimi kaçınılmaz olmaktadır. Onarım yapılmış kapaklarda da bir süre sonra değişim gerekmektedir. Bu da mortaliteyi, morbiditeyi ve maliyeti arttırmaktadır. Başlangıçta kapak değişiminde mekanik kapaklar tercih edilirken 1970'li yıllardan itibaren biyoprostetik kalp kapaklarındaki gelişmelere paralel olarak günümüzde biyoprostetik kapaklar vakaların yarısından fazlasında kullanılır hale gelmiştir¹. Mekanik kalp kapakları uzun ömürlü olsalar da hastaların antikoagülan bir ilaca bağımlı hale gelmesi, tromboembolik komplikasyonlar ve kanama bu kapakların kullanımına kısıtlama getirmektedir. Biyoprostetik kapak olarak, otogreftler, homogreftler ve heterogreftler kullanılmaktadır. Otogreft kullanımının ameliyatı kompleks bir hale getirmesi, homogreftlerin zor elde edilebilmeleri ve korunmalarının problemlili olması sığır perikardından ve domuz aortundan elde edilen heterogreftleri ön plana çıkarmıştır. Hayvansal kökenli biyoprotezlerin akım ve hemodinamik özellikleri doğal kalp kapaklarıyla benzerlik göstermektedir. Antikoagülan gerektirmez, ancak dayanıklılığı, mekanik yetmezlik veya dejeneratif kalsifikasyon nedeniyle 15–20 yıl ile sınırlıdır².

Kapakların hemodinamik ve yapısal özelliklerinde ileri düzeyde iyileştirme yapılmasına karşın, halen mekanik veya biyoprostetik kalp kapaklarında hedeflenen ideal kapağa ulaşamamıştır. Bu koşullar altında nativ kapaklarda gelişen kalsifik dejenerasyonu azaltmak veya önlemek hastayı kapak değişiminden kurtarabilecek veya bu değişimi geciktirerek hastaya yapay kapakların getirebileceği mortalite ve morbidite açısından zaman kazandıracaktır.

Nativ kalp kapaklarında; hipoksi, mikrobiyolojik etkenler, immünolojik reaksiyonlar, kimyasal etkenler, ilaçlar, serbest radikal oluşumu ve yaşlanma gibi birçok nedene bağlı olarak dokunun, yapısı ve işlevi değişmekte, sonuçta hücrenin organellerinin yapısı bozulmakta ve kritik noktadan sonra öldürücü olan membran

zedelenmesi oluşmaktadır. Bütün bu olayların moleküler düzeyde potansiyel mediatörü kalsiyum iyonudur. Gerek membran bütünlüğünün bozulması gerekse hücre içi kalsiyum artışı, metalloproteinazların ve serbest radikallerin açığa çıkmasıyla sonuçlanmaktadır³⁻⁴. Artan kalsiyum, hücre organeli membranında bol miktarda bulunan fosfolipidlerin bünyesindeki fosfat ile etkileşerek kalsiyum fosfat kristalleri oluştururken, proteolitik aktiviteye bağlı matriksin yapı taşı olan, glikozaminglikanlar (GAG) ortadan kaybolmaktadır. Kapaklardaki kollajen lifler doku dayanıklılığını sağlarken, GAG dokunun viskoelastisitesini korumaktadır. Sonuç olarak, hücre içi organellerde kalsiyum birikmesi kalp kapağının dayanıklılığını ve viskoelastisitesini olumsuz etkilemekte ve zamanla fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Dolayısıyla açığa çıkan kalsiyumun başlangıçta bloke edilmesi kapak hasarlanmasının önlenmesinde çok etkili olacaktır.

Nativ kapaklarda oluşan kalsifikasyonun önlenmesinde kapaklardaki kalsifikasyonun derecesinin önemli olduğu; cerrahi ve medikal tedavinin de buna göre değerlendirilmesi gerektiği açıktır. Özellikle biyoprotez materyalleri üzerinde yapılan çalışmalarda, GA'in toksik etkileri giderilerek veya kapağın morfolojik ve organik yapısı değiştirilerek kalsifik dejenerasyonun azaltılabildiği gösterilmiştir⁵. Biz de Kalp ve Damar Cerrahisi kliniği olarak yaptığımız ve devam etmekte olan çalışmalarda EDTA, CA, Tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamin (TPEN) gibi bazı şelatlar kullanarak kalsifik dejenerasyonun biyoprostetik kapak materyali olan sıgır perikardında kalsifikasyonu inhibe edebileceğini gösterdik⁶. Bu şelatlardan EDTA, ABD'de arteriyosklerotik periferik damar hastalığı ve koroner arter hastalığında bir grup doktor tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalarda alkali sitratların böbrek taşı olan hastalarda yeni taş oluşumunu engellediği, kemik deminerilizasyonunu azalttığı gösterilmiştir⁷. Aynı zamanda alkali sitratlar polikistik böbrekli ratlarda interstistisyel fibrozisi ve inflamasyonu azaltarak yeni kistlerin oluşumunu durdurmuştur⁷. Ratlarda yapılan *ex vivo* bir çalışmada, ağızdan verilen sitrat tuzlarının ratların batınına yerleştirilen rat aortalarında kalsifik dejenerasyonu azalttığı belirtilmiştir⁸. Bu çalışmamızda ise daha önceden etkinliğini gösterdiğimiz limon asidi olarak bilinen, gıda endüstrisi gibi birçok alanda sık kullanılan ve kolay elde edilen CA'in kalp kapaklarındaki kalsifikasyonun ortadan kaldırılmasında ve/veya azaltılmasındaki rolü araştırıldı. Bazı hastaların cerrahi tedaviye gitmeden ve cerrahi tedavinin risklerini taşımadan ucuz ve kolay bir yolla

kalp kapaklarındaki dejeneratif kalsifikasyonlarının azaltılmasının da mümkün olabileceğine karar verdik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kalp Kapaklarının Kısa Anatomisi:

Kalbin dört kapağı kendi anuluslarına ya da kapak halkasına yapışıktır. Bunlar kalbin tabanında birleşerek kalbin fibröz iskeletini oluştururlar. Merkezde bulunan aort kapağı iskeletin en önemli yapısıdır ve üç kapakla bağlantısı vardır. Kalbin iskeletini membranöz septum, aortik intervalvüler sağ ve sol fibröz trigonlar oluşturur. Aort ve mitral kapak arasındaki bu devamlılık bu trigonlar ile sağlanır. Santral fibröz cisimcik olarak bilinen sağ fibröz trigon aort kapak, mitral kapak ve triküspit kapağı birbirine bağlar. Bu yakın anatomik ilişkiden dolayı bir kapağı etkileyen patoloji diğer kapağı da etkiler⁹⁻¹².

Mitral Kapak:

Mitral kapak anulus, ön ve arka lifletler, komissürler, korda tendinea ve papiller kaslardan oluşur. Mitral kapağın anulusu sol atrium ve ventrikülün fibröz ve müsküler dokusunun karışımı ile oluşmuş bir birleşim alanıdır. Bu yapı mitral kapağın anterior ve posterior lifletlerinin temelini oluşturur. Anülüste iki ana kollajen yapı vardır;

1-Sağ fibröz trigon: Santral fibröz yapının parçasıdır. Atrioventriküler septumun mitral ve triküspit kapakların ve aortik kökün kavşağında yer alır.

2-Sol fibröz trigon: Mitral kapağın ve aort kapağın sol koroner kapakçığının posterior birleşim noktasıdır.

Mitral anulus alanı erişkinde 4–6 cm² 'dir. Anterior kapakçığın çevresi, posterior kapakçığın çevresinin 1/2 'sidir. Posterior anulus mitral anulusunun 2/3 'ünü oluşturur. Anuler alan kardiyak siklus sırasında değişir. Direkt olarak sol atriumun ve sol ventrikülün çapından ve basıncından etkilenir. Kardiyak siklus sırasında posterior kapakçığa yakın olan anüler alanlar sistolde öne doğru, diastolde geriye doğru hareket ederken anterior anülüs nispeten hareketsizdir.

Sol ventrikül epikardiyal lifleri kalbin bazalinden aşağı iner ve apekte iki papiller kası oluştururlar. Bunlar vertikal yerleşimli miyokardiyal lifler ile karakterizedir. Anterolateral papiller kasın genellikle bir ana kafası vardır ve daha belirgin bir yapısıdır. Posteromedial papiller kasın iki veya daha fazla başı olabilir. Papiller kaslardan çıkan korda tendinealar mitral kapakçıklara doğru devam ederek fibröz anuler halkaya tutunurlar. Sol ventrikül hacim yüküne papiller kasların diastoldeki katkısı %5–8 iken, sistolde %15–30 düzeyindedir. Anterior ve posterior papiller kaslar birlikte kasılırlar ve her ikisinin de sempatik ve parasempatik sinir uyarısı vardır.

Aort Kapak:

Anulus, lifletler ve komissürlerden oluşur. Bu kapakları tutan korda veya papiller kasları yoktur. Aort kapağının üç lifleti vardır. Yapraklarla, aort duvarı arasındaki bölüm valsalva sinüsü adını alır. Nonkoroner ve sol koroner lifletlerin yarıları mitral kapağın anterior lifleti ile komşudur. Ayrıca membranöz septum ile komşulukları vardır. Normal kapak alanı 2,5–3 cm² dir. Her üç lifletin ortasında Arantius nodülü vardır⁹⁻¹². Her lifletin bitişiğindeki birleşme çizgisi (komissür) aort duvarına uzanır. Lifletler yarım aya benzer. Koroner arter ağızları sağ ve solda sinotübüler halkanın hemen altındadır.

Aort kapağı mitral kapaktan oldukça farklı pasif bir kapak mekanizmasına sahiptir. Aortik kapağın aktif bileşenleri (korda veya papiller adale) yoktur. Mitral kapağın aksine aortik kapağın gerçek bir anülüsü yoktur. Aortik kapağın cerrahi anülüsü aortik kapak lifletlerinin semilünar tutulumu ile ventriküler arteriyel kavşak olarak tanımlanmıştır. Yani ventriküler boşluk ile aorta arasındaki bağlantı yeri ventriküler arteriyel kavşak olarak belirtilmiştir.

Valsalva sinüsü aorta ile kapak açıldığında kapak lifletinin kenarı arasındaki alan olarak tanımlanabilir.

Kapak lifletleri kollajen, elastin ve GAG'ın bir kompozisyonudur. Bu bileşenler lifletlerin üç asıl tabakasını oluşturur. Her bir aortik kapak lifletinin ventriküler kenarı liflet serbest kenarına dik ve radyal yönde dizili elastinden zengin lifler içerir. Kapak lifletlerinin kenarında fibroza üzerinde endotelial hücreler vardır. Akım stresinin majör stres olması nedeniyle arterlerde endotelial hücreler kan akımı yönünde dizilmişlerdir. Ancak aortik kapak lifletleri üzerindeki endotelial hücreler çembersel düzende dizilmişlerdir.

Triküspit Kapak:

Anulus, lifletler, komissürler, korda tendinea ve papiller kaslardan oluşur. Anterior liflet en büyük ve en hareketli olanıdır. Posterior kapak küçüktür. Septal liflet ise en hareketsiz olanıdır. Septal lifletin önemi, septal ve anterior septal birleşme yerinin iletim sistemine yakın oluşudur. His demeti anteroseptal komissürün yaklaşık olarak 5 mm altındaki atrioventriküler septumun membranöz parçasının interventriküler bileşeninin altındaki sağ trigonun içine girer ve müküler septumun çıkıntısı boyunca müküler septuma doğru ilerler. Triküspit septal liflet kordalarının bulunduğu septal medial papiller kas kısmında ikiye ayrılır. Sol dal sol ventriküle

geçer ve ventrikül apeksine, sağ dalı ise krsta septomarginalis hizasından geçerek moderatör bant içinde ilerler ve sağ ventrikül apeksinde dağılır.

Pulmoner Kapak:

Aort kapak ile aynı yapıya sahiptir. Pulmoner kapakta tek anülüs yerine anatomik olarak çok belirgin olan üç tane halka bulunur. Triküs pit kapak ile Pulmoner kapağı birbirinden ayıran belirgin kas yatağı olan supraventriküler krest vardır. Buradan yapılan insizyonlarda insizyon hattının tranvers septumdan geçerek sağ koroner arteri yaralayabilmesi olasıdır.

2.2.Endotelyum ve Kalp Kapağı Hastalıkları:

Kalp kapağı hastalıkları, kapakların yapısal ve fonksiyonel bozukluklarına neden olarak yetmezlik ve darlıkla sonuçlanırlar. Son 50 yıl sonrasında ABD’de romatizmal kapak hastalıklarından nonromatizmal kapak hastalıklarına (miksomatöz patolojilere, senil dejenerasyona, infektif endokardite) doğru kayma olmuştur. 78000 üzerinde kapak ameliyatı her yıl ABD’de önemli bir mortalite ile sonuçlanmaktadır. Son zamanlarda kapak hastalıklarının birçok formunda Endotel hücresi (EH) disfonksiyonu gösterilmiştir. EH’leri tüm kardiyovasküler sistemi kaplar. EH’nin normal görevi kardiyovasküler sistemin dengesinin devamlılığını sağlamaktır. Vasküler hücrelerin metabolik ve sentezleyici özellikleri, inflamasyonda, vasküler remodelingde, vasküler tonda ve koagülasyonda yardımcıdır. EH disfonksiyonu ateroskleroz, strok, hipertansiyon ve trombozis ile ilişkilidir. Günümüze kadar EH disfonksiyonu ve ateroskleroz arasındaki ilişki çok net olarak bilinirken, EH ve kapak hastalığı arasındaki ilişki daha az bilinmektedir. Bununla beraber son zamanlarda genetik ve edinsel kapak hastalıklarında EH’nin önemi çok daha iyi tanımlanmıştır.

2.2.1.Kalp Kapakları:

Normal kalp kapaklarının yapısı ince, şeffaf ve üç katlıdır. Kalp duvarında kan akımı fizyolojik olacak şekilde yerleşim gösterir. Kalp kapakları fibroza, spongiosa, ventrikülaris olmak üzere 3 tabakadan oluşur ve tek tabakalı endotel hücreleri ile kaplıdır. Normal kalp kapağı hücreleri poligonal olup internal kollajen ile desteklenmiştir. Bu yapı akıma karşı koyan serbest kenarlarda daha belirgindir¹³. Kapağın mikrovasküler yapısı da endotelle döşelidir. Sağlıklı kapaklarda sadece proksimal bölümünde mikrovasküler yapı vardır¹⁴. Kapak endotel hücreleri ile kan arasında metabolik ve inflamatuvar olayları içeren bir etkileşim vardır. Bu olaylar endotel tarafından regüle edilir. Hasta kapaklar önemli vaskülerite artışı gösterir, bu kalınlaşmış ve hasta kapaklarda yetersiz oksijenlenme ile ilgilidir¹⁵⁻¹⁶. Kalp kapakları

değişik derecelerde uyarılır¹⁷. Sinir uçları endotele yakındır ve endotel fonksiyonu ile ilgilidir. Bundan dolayı nöromodülatörler EH'in vazoaktif faktörlerinin, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salınımında etkilidir¹⁸. Bu sistem geri bildirim Kontrol mekanizmasında da etkilidir. Tüm kalp kapakları kardiyak siklusta minimal direnç olacak şekilde çalışır. Hastalık ile interstisyel hücrelerde, EH'de ve kapak morfolojisinde kardiyak fonksiyonu etkileyecek değişiklikler olur.

2.2.2.Endotel Hücre Fonksiyonu:

Tüm damarların ve kalbin iç yüzünü örten endotel tek katlı olup mezoderm kökenlidir. Sadece nontrombojenik yüzey sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hemostaz ve sirkulatuar fonksiyonu sağlamaktadır. EH'ler metabolik ve sentez özellikleri dışında damar geçirgenliğinin düzenlenmesinde, vasküler tonda, koagülasyonda, fibrinoliziste, hormonlarda, lipoprotein mekanizmasında, diğer hücrelerin ortaya çıkışında ve inflamatuvar cevapta etkilidir. Buna ek olarak EH'ler interstisyel hücrelere dönüşebilir. Fonksiyon bozukluğu olan EH'i patojenik olup, birçok vasküler hastalıkla ilişkilidir¹⁹.

2.2.3.Endotel Hücre Disfonksiyonu, Aktivasyonu:

EH disfonksiyonu veya hasarı metabolik ve sentetik olayları aktive eder, bu süreç vasküler bozukluklarla beraberdir. Ateroskleroz, strok, hipertansiyon, hipotansiyon bilinen bozukluklardan birkaçıdır. Arteriyel endotelium bozukluğu trombosit ve lökosit agregasyonuna neden olmakta, bu olay da potent mitojen ve sitokinlerin salınımına yol açmaktadır. Endotel yüzeyinin bozulması trombozise ve makromolekül permeabilitesine neden olur²⁰. Endotelial ve interstisyel hücreler arasında sitokinler, matriks bileşenleri, büyüme faktörleriyle ilişkili olduğu gibi aynı zamanda mekanik bağlantıları da vardır. Bundan dolayı EH disfonksiyonu interstisyel hücre yapısında ve fonksiyonunda değişikliğe yol açar. Vazoaktif ajanların salınımı, endotel hücreleri ile vasküler değişim olması kardiyak ve vasküler kas kasılımını etkiler²¹⁻²³. Travma ve enfeksiyon da vasküler EH'ni tetikler. EH'ler şeklini ve fonksiyonunu değiştirerek bu travmalara adapte olur. EH'in hemodinamiye hassasiyeti aterosklerozun büyük damarların ayırım yerine yerleşmesinden bellidir²⁴⁻²⁸. Kalp kapağı hastalıkları EH'deki değişimle beraberdir. Hasta senil kapaklarda, romatizmal kapaklarda, infektif endokarditte kapak yüzeyinde trombüs olması bunun kanıtıdır. Elektron mikroskopik çalışmalarda EH devamlılığının bozulduğu, hücrelerin kaybolduğu, hücre şeklinin değiştiği, mirovillusların geliştiği gözlenmiştir²⁹⁻³¹. Bu olay trombüse yatkınlığı artırdığı gibi, intrasellüler geçirgenliği de artırmakta, endotelial

fonksiyonunun bozukluğuna yol açmaktadır. Endokardit, romatizmal ateş, miksomatöz dejenerasyon ve senil kapak hastalığı gibi özel kapak patolojileri üzerindeki araştırmalar, kapak endotelinin aktivasyonu/yanıtı arasındaki birçok benzerliği göstermiştir.

2.2.4.Non-Bakteriyel Endokardit (NBE):

NBE'de trombotik vejetasyonlar olup, mikroorganizmalar yoktur. Etiyolojide kapak patolojisi rol oynamaz. Atom bombası sonrası yaşayanlarda, şiddetli sistemik hastalıkla beraber özellikle yaşlı erkekler ve kadınlarda NBE görülmüřtür³². Endotelial hücrelerde ve kollajen yapıda değişiklik vardır. Trombüs oluşumu kalbin sol tarafında kapak yüzeyinin karşısında yer alır. NBE sıklıkla kapakların akım yüzeyinde, kapanma hattında görülür³². Özellikle mitral ve aort kapak gibi kuvvetli basınca maruz kalan kapaklarda görülmektedir. Benzer şekilde kateter travması da NBE'e yol açar. Bu mekanik güçlerle kapaktaki bazal membran açığa çıkmakta, endotelial değişime bağlı *Von Willibrand Faktör*, prostaglandin, nitrik oksit (NO) salınmakta fibrin birikimi ve trombüs oluşmaktadır. Koagülasyona yatkınlık ve malignensiler, NBE riskini artırır. Bu lezyonlar kapak kalınlaşmasına, darlığa, yetmezliğe veya tromboemboliye neden olur. NBE'li hastalarda emboli %14–90 arasındadır.

2.2.5.İnfektif Endokardit:

Akut infektif endokardit mikroorganizmaların neden olduğu inflamasyondur. Vakaların %15 inden Staphylococcus aureus sorumludur. Burada oluşan vejetasyonlar endotelialdaki eksudatif ve proliferatif değişiklikler sonucu meydana gelir. Kalp kapağı hasarı çok hızlı gelişir ve mortalite %40'tır³³. Subakut endokardite sıklıkla Streptococcus viridans ve enterekoklar neden olur. Diş girişimleri, uyuşturucu alışkanlığı, mitral kapak prolapsusu bakteriyel endokardit için zemin hazırlayan faktörlerdir³⁴. Mikroorganizmalar kapağa ve/veya vejetasyonlara yapışır, çoğalır ve sonuçta inflamasyona neden olurlar. NBE ve bakteriyel endokardit kesinlikle birbirinden ayrılmalıdır. Gram (+) ve (–) bakterilerin direkt olarak kalp kapaklarına invaze olduğu gösterilmiřtir³⁵. Staphylococcus aureus un bağlanması *teikoik asit* etkilidir, ancak fibronektinin adhezyonda daha etkili olduğu son zamanlarda gösterilmiş, biyoprostetik kapakların endokarditinde bunun etkili olduğu öne sürülmüştür.

Bakteriyel endokardit vejetasyonlar ve hasarlanmış kalp kapağı üzerinde gelişebildiği gibi, direkt olarak mikroorganizmaların kapağa infiltrasyonu söz konusu

olabilir. Bunun sonucunda yetmezlik veya darlık gelişebilir. Bakteriyel endokarditte kapaklarda sitokin ve adhezyon moleküllerinin ileri derecede salınımı vardır. Hücre içi adhezyon molekülleri ile monositler toplanır, monositler hücre içi adhezyon moleküllerinin üretimini artırır. Artmış olan hücre içi monositler interstisyel hücre organizasyonu ve fonksiyonunu bozar, bu da kapakta kalınlaşma ve fibrozise neden olur. E-selectin ve hücre içi adhezyon molekülleri salınımı da artarak inflamatuvar yanıtta ve ateroskleroza eşlik eder³⁶. Olayın kronikleşmesi kalp kapağında yetmezliğe ve/veya darlığa yol açacaktır.

2.2.6.Romatizmal Kalp Kapak Hastalıkları:

Romatizmal ateşin inflamatuvar hasarı sonucunda oluşur. Bu inflamatuvar olaylar kalp, eklemler ve cildi tutar. A grubu beta hemolitik streptokoklar bu cevabı başlatır. Kalp dokusu antijen olarak algılanır. Akut tutulumda kapak kalınlaşmasıyla beraber, NBE de olduğu gibi kapak kapanma hattında küçük vejetasyonlar vardır. Subvalvüler aparat ve endokard da etkilenmiştir. İnflamatuvar yanıt hücrelerin invazyonunu ve interstisyel sıvı artışını tetikler. Akut lezyonun gerilemesi ile skar dokusu oluşur. Dokudaki antikor ve kompleman immunopatolojik cevabın göstergesidir. Kapak antijen odağı olarak görev yapmaktadır. Antikorların yaptığı saldırı endotel hasarı ile birlikte oksidoinflamatuvar yanıtı başlatmaktadır. Romatizmal kalp kapak hastalıklarında CD4 ve CD8 T lenfositlerin kapak endotelyumuna yapışık olduğu görülmüştür. Bu invazyon ve ekstravazasyon hücre içi adhezyon moleküllerinin endotelde yaptığı hasara bağlıdır³⁷. Kapaklarda T lenfositlerin varlığı skar dokusu oluşumuna, yeni damarlanmaya ve daha fazla lenfosit infiltrasyonuna neden olmaktadır.

2.2.7.Miksomatöz Kalp Kapak Hastalıkları:

Normal popülasyonda erişkinlerin %5 inden fazlasında miksomatöz dejeneratif hastalık görülmektedir. Kapakta ki miksomatöz dejenerasyon kapağı zayıflatır ve prolapsusa yol açar³⁸. Kapağın ve kordanın gerilmesi ve anulusun desteğini yitirmesi Mitral Valve Prolapsusu (MVP) olarak isimlendirilmektedir. Miksomatöz dejenerasyon MVP nin en sık görülen nedenidir ve sıklıkla klinik olarak önemli bir problem yaratmaz. MVP, kapak yetmezliği, korda rüptürü, endokardit ve tromboz riski taşır³⁴. Endotel disfonksiyonun miksomatöz dejenerasyondaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Miksomatöz lezyon genetik olabilir veya bir patolojiye sekonder gelişebilir³⁸. Etiyolojide hemodinaminin önemi vurgulanmaktadır. İyileşme yerinde veya adaptif cevapta proteoglikan birikimi miksomatöz dejenerasyondan sorumludur.

Fibröz yapıda ve kordada kollajen kırılması ve kaybı olabilir. Kapakçıkların spongiosa tabakasında anormal kapanmadan dolayı fibrozis gelişir. Aynı şekilde artmış kapakçık hareketleri ve kordal mobilite sol ventrikülün posterior yüzünde sürtünme lezyonu oluşturur. Bu endokardiyal fibrozisle sonuçlanır. Pulmoner hipertansiyon, Eisenmenger sendromu ve anormal kordalar fokal miksomatöz değişikliklerle beraberdir³⁹. Miksomatöz kapağa yol açan olayların sıralamasını aydınlatmak çok zordur. Bazılarına göre kordal gerilmedeki değişme bunu yaratmak için yeterlidir. Bazılarına göre miksomatöz kapakta endotelial sınırda bozulma ve kaybolma vardır. Bu artmış hemodinami ve anormal kapanışla ilişkili olabilir. Endotelial hasarın nativ damarlarda subendotelial proliferasyonda ve migrasyonda etkili olduğu bilinmektedir. Miksomatöz köpek mitral kapaklarında Endotelin 1 (ET-1) reseptör artışı saptanmıştır. ET-1 fibroblastlarda, düz kas hücrelerinde artışa neden olmakta, bu kollajen sentezinde artışla sonlanmaktadır⁴⁰. Diğer büyüme faktörleri ve sitokinler miksomatöz kapak gelişiminde etkilidir, ancak yeterince araştırılmamıştır.

2.2.8.Senil Kalp Kapak Hastalıkları:

Arterlere benzer şekilde kapaklarda da fibrokalsifik değişiklik olabilir. Birçok araştırma endotelial yanıtın, aterosklerozdaki ve intimal hiperplazideki rolünü ortaya koymuştur. Nativ damarlarda aterosklerozun yerleşimi mekanik stresin aterosklerozdaki rolünü göstermektedir⁴¹. Bifurkasyonda ve kurvaturda ateroskleroz yerleşimi hemodinami ve ateroskleroz arasındaki ilişkiyi vurgulamaktadır. Hemodinamik güçler örneğin; *shear stress*, gerilme ve basınç, fibrokalsifik endotelial ve düz kas hücresi cevabını açıklamaktadır⁴¹. Ateroskleroz ve senil dejeneratif lezyonlar arasındaki benzerlik, birçok çalışmada gösterildiği gibi, valvüler endotelium ile senil kapak lezyonları arasındaki bağlantıda rapor edilmiştir⁴².

Senil dejeneratif valvüler stenozda artmış mekanik strese karşı gelen yerlerde kalsifikasyon görülmesi mekanik stresin önemini vurgulamaktadır. Üstelik bikuspid aorta gibi basıncın kapakçıklara daha çok yansıdığı durumlarda dejeneratif kalsifikasyon daha erken gelişmektedir. Ateroskleroz gibi, dejeneratif kapak hastalığı da yaşlılığın kaçınılmaz bir sonucudur. Lipid birikimi, kollajen düzensizliği, kalsifik nodüller kapak dejenerasyonu ile beraberdir³⁸. Aterosklerozda olduğu gibi senil lezyon fokaldır ve aortik taraftadır ve %54 oranında kapakçıkta görülür. Lezyon olan yerlerde kapağın endotelinde hasarlanmalar görülmüştür. Ayrıca bu lezyon inflamatuvar yanıtın sonucudur. Bu lezyonlar, lipid birikimi, makrofaj ve T hücre

infiltrasyonu ve endotel hasarı yönünden aterosklerozla benzerlik gösterirken, düz kas hücrelerinin az olması ve ön planda kalsifikasyon olması ile benzerlik göstermemektedir. Senil kapak hastalığının ilerlemiş döneminde kapak dokusunda nodüler fibrozis, kalsifik nodüller, makrofaj, lenfosit ve fibroblast infiltrasyonu görülürken, matriks metalloproteinaz üretimi kontrolsüzdür⁴³. T hücrelerinin olayın içinde olması hastalığın pasif olmasından ziyade aktif olmasının göstergesidir. Endotelyum adhezyon molekülü değişimi ile T hücresi ve makrofaj infiltrasyonunu tetikler.

Senil kapak hastalığının inflamatuvar özeliğinden dolayı C reaktif protein (CRP) ve adhezyon moleküllerinin serum düzeyleri kapak lezyonlarının erken tanısında yardımcı olabilir⁴⁴. Koroner arter hastalığının erken tanısında bu moleküllerin rolü gösterilmiştir. CRP, endotelyal nitrik NO düzeyinin azalması ile endotelyal disfonksiyon ile direkt ilişkili olabilir⁴⁵. NO damarda etkili bir ajan olup platelet fonksiyonunda, ET-1 üretiminde, adhezyon ve büyüme faktörlerinin inhibisyonunda etkilidir. Statinlerin endotel disfonksiyonunu düzelterek NO'ın biyoetkinliğini düzeltmesi kapak hastalıklarının tedavisinde etkinliğinin göstergesi olacaktır⁴⁶. İnflamatuvar cevap kapak dokusundaki kalsifikasyonu da tetiklemektedir. Hasta aort kapak dokusunda makrofajların subgrupları tarafından osteopontin sentezlendiği gösterilmiştir. İnsan koroner arterlerinde aterosklerotik plaklarda endotelyal hücrelerde ve düz kas hücrelerinde osteopontin görülmüştür. Diğer kemik matriks proteinleri stenotik aort kapaklarında görülmüştür⁴².

EH'in senil kapak kalınlaşmasında direkt rolü olabilir. Hücre kültüründe mezenşimal hücrelere farklılaşmış EH'i düz kas hücresi elemanı olan aktini üretmiştir. Bu farklılaşma beraberinde EH matriksi sentezini de farklılaştırır⁴⁷.

Senil kapak hatallığı, koroner arter hastalığında da olduğu gibi lipidlerin subendotelyal dokuda birikimi sonucu oluşacaktır⁴⁸. Koroner arter hastalığı olan hastaların aort kapakçıklarında da okside düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) birikimi gösterilmiştir. LDL'nin oksidasyonu ile endotel adhezyon molekülleri, şimik bağlayıcıları, büyüme faktörlerini ve sitokinleri, salgılar⁴⁸.

EH hemostazının bozulması valvüler hastalıkların patogeneğinde önemli bir adımdır. Kapak endotelinin inflamatuvar, sentetik, trombotik yanıtları kapakta darlık, yetmezlik ve/veya tromboemboliye neden olabilir. Sık görülen kapak hastalıkları ile endotel disfonksiyonu, birbirlerine bağımlı olaylardır.

2.3.Kalsiyum İyonunun Biyokimyasal Rolü

Normal hücreler değişen etkiler ve streslere göre durmaksızın yapı ve işlevini sürekli değiştiren bir mikro evrendir. Stresler çok ciddi oluncaya kadar hücre normal homeostazis olarak adlandırılacak göreceli dar sınırlar içinde yapı ve işlevini değiştirerek korumaya eğilimlidir. Tüm stres ve zararlı etkenler önce moleküler düzeyde etki gösterirler. Hücresel adaptasyon mekanizmasına bağlı olarak oluşan zedelenme sonucunda, zaman içinde, hücrede yapısal değişiklikler olmaktadır⁴⁹.

Hipoksi, mikrobiyolojik etkenler, immünolojik reaksiyonlar, kimyasal etkenler ve ilaçlar, serbest radikal oluşması ve yaşlanma gibi birçok nedene bağlı olarak hücre yapısı ve işlevi değişmektedir. Sonuçta hücre organellerinin yapısı bozulmakta ve kritik noktadan sonra öldürücü olan membran zedelenmesi gelişmektedir. Bütün bu olayların moleküler düzeyde potansiyel mediatörü kalsiyum iyonudur⁴⁹.

Membran zedelenmesinin mekanizması ne olursa olsun membran bütünlüğünün bozularak (moleküler transportta rolü olan birçok enzimin devre dışı kalması, proteinlerin denatürasyonu, lipidlerin oksidasyonu ve serbest radikallerin ortaya çıkması) hücreler arası aralıktan hücre içine doğru kalsiyum tutulumu yüksek konsantrasyona çıkar. Kalsiyum hücre içinde mitokondriler tarafından tutulur ve mitokondriyal enzimleri inhibe eder, proteinleri denatüre eder ve koagülasyon nekrozunun hücresel karakteristik değişikliklerine yol açar. İnsan vücudunda hücresel nekrozun oluşmaya başlaması ile nekrotik hücrelerin ve artıklarının büyük bir kısmı lökositler tarafından fagosite edilir, parçalanır ve enzimatik olarak sindirilir. Eğer nekrotik hücre ve artıkları tam olarak harab edilip absorbe edilmez ise kalsiyum iyonları ve diğer mineraller buralarda birikir ve bu olaya distrofik kalsifikasyon adı verilir⁴⁹. Bu değişiklik nekrotik dokularda uzun zaman sonra görülür, sıklıkla hasarlı kalp kapaklarında onların görevlerinin bozulmasına neden olacak şekilde yer alır. Kalsiyumun ve fosfatların fosfolipidlere afinitesi sonucu ve membrana bağlı fosfatların etkisi ile hücre zarında birikirler.

Hücre içi kalsifikasyonun başlangıcı ölü veya ölmekte olan hücrelerin mitokondriyonlarında kalsiyum birikimi ile başlar. Daha sonra kristal oluşumu hücre dışı mesafede kalsiyum ve fosfat konsantrasyonu, mineral inhibitörlerinin varlığı ve kollajenasyona bağlı olarak gerçekleşir. Kollajen kristal oluşum hızını arttırmaktadır. Kalsifik kalp kapağı hastalıkları ve ateroskleroz mekanizması bu şekilde açıklanabilir.

Hücre membranlarındaki lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyondur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehytler

üretmek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına neden olur. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA oluşur. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir.

Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle oluşur. Membran geçirgenliği ve viskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir.

Kalsiyumla ilişkili olaylar arasında apoptozis ve enflamasyon vücut savunma sistemi için önemli olaylardır⁵⁰. Mitokondriyal kalsiyum dengesinin bozulması apoptoziste temel bir basamaktır. Enflamatuvar yanıt mekanizmaları kalsiyumla birlikte reaktif oksijen türleri, histamin ve glutamat salgılamaktadır⁵¹. Hem apoptoziste hem de enflamasyonda ve prooksidan eylemler hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artışla ilişkilidir³. Hücre içinde reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasından önce kalsiyum akımı gerçekleşmektedir⁴. Kalsiyum iyonları oksidatif olaylara yol açan yolakta sinyalizasyon ajanı olarak görev almakta ve prooksidatif bir etki göstermektedir⁵¹.

2.4.Doku Dejenerasyonu ve Kalsifikasyonun Mekanizması:

Hücre metabolizmasının devamının sağlanması ve hücre bütünlüğünün korunması için hücre membranlarında aktif iyon transportunu sağlayan bir enzim sistemi olan Adenozin-5' Triptofaz (ATPaz)'a gerek vardır. Tek değerli katyonların (sodyum, potasyum) transportundan sorumlu ATPaz enzimine; sodyum-potasyum tarafından uyarılan ve aktivasyon için magnezyuma gerek duyan Sodyum-Potasyum ATPaz ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{/Mg}^{2+}$ ATPaz) enzimi adı verilir. Çift değerli katyonlardan Kalsiyum taşınmasında sorumlu olan ATPaz enzimine kalsiyum tarafından uyarılan ve aktivasyon için magnezyuma gerek duyan Kalsiyum ATPaz ($\text{Ca}^{2+}\text{/Mg}^{2+}$ ATPaz) enzimi adı verilir. Hücrelerin dejenerasyona bağlı olarak veya değişik etkenler sonucunda hasarlanması hücre membranındaki bu enzim sistemlerinin çalışmamasına neden olarak hücre içersinde sodyum ve kalsiyum birikmesi sonucu patolojik süreçler başlamış olur⁵².

Kalsifikasyon insan organizmasının tüm dokuları için normal fizyolojisini bozarak patolojik süreçlerini başlatan ve oksidatif reaksiyonlar aracılığı ile hücrelerin biyokimyasal dengesini değiştiren kronik bir olaydır. Kalsifikasyonun mekanizmasında, kalsiyum içeren ekstrasellüler sıvının membran ilişkili fosforla reaksiyona girerek kalsiyum fosfat mineral depozitlerinin oluşması görülmektedir.

Patolojik kalsifikasyon kemiğin fizyolojik mineralizasyonuna benzer olarak inhibe eden ve indükleyen faktörlerle regüle edilmektedir⁵³⁻⁵⁵. Ekstrasellüler matriks yapısal proteinleri olan kollajen ve elastin proteinlerinin kalsifikasyonu klinik ve deneysel olarak nativ dokularda, implante edilmiş biyoprotezlerde, homogreft vasküler dokularda gözlenmiştir. Hücresel içeriklerden farklı olarak kollajen ve elastin lifleri, kalsiyum fosfat mineralleri için çekirdek görevi görürler⁵⁶⁻⁶⁰. GA kollajen liflerindeki kalsifikasyonu hızlandırmakta⁶⁰ ancak elastinin kalsifikasyonu GA'le muamele edilmese de meydana gelmektedir. Kalp kapaklarının katlanma noktalarında yoğun mekanik strese bağlı olarak ve daha önceden geçirilmiş bir travma ve enfeksiyon nedeniyle, intrinsik ve ekstrinsik mineralizasyon hareketine geçer ve bu noktalarda kalsifikasyonu başlatır^{56-58,61}.

2.4.1.Mekanizmalar:

Kapakların yapraklarındaki mineralizasyon süreci, canlı olmayan ve hasara uğramış bağ doku hücreleri içinde başlamaktadır⁵⁶⁻⁶³. Bu distrofik kalsifikasyon mekanizması kalsiyum içeren ekstrasellüler sıvı ile membrana bağlı fosfor arasındaki reaksiyonu içermektedir ve hücrelerin kalsifiye olmasına yol açmaktadır. Normalde plazma ekstrasellüler kalsiyum konsantrasyonu 1 mg/ml (10^{-3} M) dır. Canlı hücrelerin zarları kalsiyumu dışarı attığından sitoplazmadaki kalsiyum konsantrasyonu normalde 1000-10.000 kat daha azdır (10^{-7}). Ne yazık ki kalp kapaklarında daha önce oluşmuş hasarlanmalar (örneğin Romatizmal kapak hastalıkları) veya GA'le önceden muamele yapılmış olması dolayısıyla yapay kalp kapaklarında fizyolojik kalsiyum eliminasyonu çalışmamaktadır. Hücre zarları ve diğer intersellüler yapılar fosfor açısından zengindir ve bu yapılar bir patolojik durumda hücre içinden atılmayan kalsiyumu bağlayarak hücre içinde bir kalsiyum çekirdeği oluşturur⁴⁹. İlk kalsifikasyon depoları zamanla genişler ve birleşir. Böylece büyük mineralleşmiş yapıları oluşturarak dokuyu sertleştirir ve zayıflatır. Sonuçta kalp kapaklarının fonksiyon bozukluğuna neden olur⁵⁶⁻⁶³.

2.4.2.Düzenlenme:

Patolojik kalsifikasyon tipik olarak pasif, düzenlenemeyen dejeneratif bir işlev olarak düşünülse de, son çalışmalar göstermiştir ki kemik ve diğer sert dokuların fizyolojik mineralizasyonunda olduğu gibi patolojik kalsifikasyonun mekanizması da regüle edilebilir⁵³⁻⁵⁵. Normal kan damarlarında ve kalp kapaklarında inhibitör mekanizmalar patolojik indükleyici mekanizmalardan daha etkilidir ve kalsifikasyon önlenir. Buna karşın kemikte ve patolojik dokularda indükleyici mekanizmalar baskındır. Normal kemik kalsifikasyonunda hidroksiapatit kristallerinin gelişimi bazı nonkollajen matriks proteinlerince düzenlenmektedir. Bunlar: Osteopontin (asidik bir kalsiyum bağlayıcı fosfoproteindir, distrofik kalsifikasyon alanlarındaki yoğun hidroksiapatit kristallerine yüksek afinitesi vardır), osteonektin, osteokalain ve diğer gamakarboksilglutamik asit (GLA) içeren matriks proteinleridir⁶⁴.

Doğal olarak dokularda bulunan inhibitörlerin kristal çekirdeklenmesini ve gelişiminin önlenmesi, kalp kapaklarındaki kalsifikasyonda ve damar duvarındaki ateroskleroz gelişiminde rol oynar⁶⁵⁻⁶⁶. Bu açıdan özel inhibitörler; inorganik fosfat⁶⁷, kemik morfogenetik protein⁶⁸, proinflamatuvar lipidler⁵³ gibi doğal olarak dokularda bulunan promineralizasyon kofaktörlerinin patolojik kalsifikasyondaki rolü ayrı bir araştırma alanıdır. Son bulgular hiperkolesteroleminin de klinik olarak kalp kapaklarının kalsifikasyonunda risk faktörü olabileceğini desteklemektedir⁶⁹⁻⁷⁰. Doğal kalp kapaklarının kalsifik dejenerasyonunu düzenleyen eden inhibitörler⁶⁵⁻⁶⁶ ve spesifik inhibitörlerden bazıları osteopontin⁷¹ ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesteroldür⁷². İnorganik fosfat⁶⁷, kemik morfogenetik protein⁶⁸, proinflamatuvar lipidler⁵³, sitokinler gibi doğal olarak bulunan promineralizan faktörlerle ve inhibitörlerin patolojik mineralizasyondaki rolü aktif olarak incelenmektedir. Yani kanıtlar normal kalp kapağının kalsifikasyonunda hiperkolesteroleminin bir risk oluşturabileceğini göstermektedir. Kardiyovasküler sistemin aktif düzenlenmesi ile ilgili kanıtlar vasküler hücrelerinin kalsifikasyonunun hücre kültür modellerinde de gösterildiği bildirilmiştir⁷². Osteopontin düz kas hücrelerin kültürlerinde mineralizasyonu inhibe ederken proinflamatuvar lipidler ve sitokinler bu olayı indüklerler. Transgenetik fare modellerinde matriks GLA protein geni inhibe edilirse veya osteopontin geni inaktive olursa⁷³⁻⁷⁴ damarlarda ciddi kalsifikasyon olur. Ayrıca subkutan elastin implante edilen farelerde⁷⁸ matriks ve metalloproteinlerin inhibisyonu kalsifikasyonu inhibe eder.

Nonkollajen proteinler olarak bilinen osteopontin, Tümör büyüme faktörü (TGF- α) ve tenascin-C gibi kemik matriks oluşumunda ve doku remodelingde rol alan proteinlerin klinikte kalsifiye olmuş nativ kalp kapaklarında ve aterosklerozda bulunduğu gözlenmiş ve insanlarda bu proteinlerin patolojik kalsifikasyonda düzenleyici bir role sahip olduğu düşünülmüştür⁷⁶⁻⁷⁸.

2.4.3.Kalp Kapakları Kalsifikasyonunda Biyokimyasal Olaylar:

Kapak kalsifikasyon süreç ateroskleroz ve kemik formasyonunda daha sık gözlenir⁷⁹⁻⁸¹. Genel popülasyondaki aort kapak hastalarındaki ilerleme aterosklerotik hastalık için bir çok geleneksel risk faktörü ile ilişkilidir. Bunlar arasında hipertansiyon, hiperlipidemi ve Diabetes Mellitus (DM) sayılabilir⁸²⁻⁸⁴. Bu kalsifikasyon süreci osteopontin, osteonektin, osteokalsin, kemik siyaloprotein ve kemik morfojenik protein gibi nonkollajen matriks proteinleri ile ilişkilidir. Bu kollajen ve nonkollajen matriks proteinlerinin artması kalp kapaklarında ve arterlerde gösterilmiştir⁷⁹⁻⁸⁶. Kalsifiye kapaklar histolojik olarak incelendiğinde bunlarda çeşitli derecede inflamasyon gözlenmiştir ve bu inflamasyonda makrofajlar, plazma hücreleri ve lenfositler rol oynar⁷⁹⁻⁸⁵. Bu hücreler osteopontin sentezleme yeteneğine sahiptir ve osteopontin etrafındaki hücreler kalsifiye depozitlere bağlı tutunmaktadır⁸⁷. Osteopontin kemotaksisi, hücrel çoğalmayı, inflamasyonu ve mineralizasyonu etkilemektedir. Osteopontin, makrofajlarla sıkı ilişki içindedir ve makrofaj invazyonu migrasyon ve fagositozu etkilemektedir⁸⁸. Kardiyak kapaklar içindeki T hücre birikimi daha fazla inflamatuvar hücrenin bu bölgeye gelmesine yol açan sitokinlerin olası kaynağı olarak görülmektedir⁸⁹. Tümör nekroz faktör (TNF- α) gibi sitokinlerin artışı stenotik kapaklarda gözlenmiştir¹¹⁸. Kapak matriksinde metalloproteinazlarda değişmiştir. İnflamatuvar hücreler, TNF- α 'e benzer şekilde büyüme faktörlerini aktive etmekte ve kapak miyofibroblastlarını uyararak profilerasyona neden olmaktadır. Kapak matriksinde remodeling yapacak matriks metalloproteinazlarını da güçlendirmektedir⁸⁹. Mast hücreleri matriks metalloproteinazlarını etkileyebilmekte, proanjiogenetik peptitler salgılayabilmekte ve sitokinlerle büyüme faktörlerini aktive edebilmektedir⁸¹. Lenfositler konjenital biküspit aortik kapaklarda ve dejeneratif triküspit kapaklarda bulunmuştur⁸⁰. Hasara uğramış kapaklar progressif olarak lipid birikimine neden olmaktadır. Bu durum ateroskleroz ile dejeneratif kapak hastalığı arasında ilişki olduğunu düşündürmektedir⁸². Stenotik aort kapakları nonstenotik olanlara kıyasla daha fazla lipid içeriğine sahiptir⁹⁰. Lipidler okside olarak inflamatuvar hücrelerin o bölgeye gelmesine neden olmaktadır. Bu inflamatuvar hücreler sitokin

salgılayarak neovaskülarizasyona neden olabilir ve kemik morfojenik protein mekanizmasına katılabilirler. Statinlerle lipid düşürücü tedavi verilmesinin arteriyel plakları stabilize ettiği düşünülmektedir⁹⁰⁻⁹³. Statinler makrofajların proteolitik aktivitesini azaltır, plaktaki kollajen içeriğini artırır, plaktaki lipid çekirdeğinin boyutunu küçültür, inflamasyonun şiddetini azaltır, endotelial fonksiyonu eski haline getirir, doku faktörü artışını önler, bu şekilde kapaktaki dejenerasyonda azalma olur⁹⁴⁻⁹⁵.

2.4.4.Elastin ve Kollajen Liflerinin Kalsifikasyon Mekanizması:

Kollajen ve elastin lifler insan vücudunun bütün dokularında bulunur, dokuların iskeletini oluşturur ve onların mekanik güçlere karşı fonksiyonlarını korur. Kalp kapaklarının ekstrasellüler matriksi içinde kollajen, elastin, nonkollajen proteinler, glikozaminoglikanlar (GAG) ve proteoglikanlar (PG) değişik oranlarda bulunur.

Kollajen lifleri içinde, kollajen moleküllerinden oluşmuş, *hole zone* adı verilen ve içinde PG'ların bulunduğu boş alanlar vardır. Bu alanların kollajenleri kalsifikasyondan koruduğu düşünülür⁹⁶. Buna benzer alanlar kemiğin kollajen fibrillerinde bulunur ve kalsiyum depolanmasının ilk alanları olarak gösterilmiştir⁹⁷⁻⁹⁸.

Matriks metalloproteinazlar ve GAG yıkan enzimler bu boş alanlardaki PG'ları eriterek kollajen liflerinde kalsifikasyona eğilimli alanlar oluştururlar⁹⁹⁻¹⁰⁰. Kollajen kalsifikasyonunun ilerlemesi sonucunda hidroksiapatit kristallerinin oluşumu artar ve sonuçta geniş depozitlerin büyümesine neden olur.

Elastik fibriller kalp kapaklarında ve damar duvarının yapısal proteinlerinde bol miktarda bulunur¹⁰¹. Patolojik vasküler kalsifikasyonda elastik fibrillerin ve kollajenlerin dejenerasyonu ve kalsifikasyonu açıkça gösterilmiştir¹⁰²⁻¹⁰⁶.

Elastik fibriller yapısal olarak çapraz yerleşmiş elastin moleküllerinden ve mikrofibriler komponentlerden oluşmuştur¹⁰⁷. Dış tarafı, asidik bileşenlerden zengin fibrillin ile kaplanmıştır ve elastini kalsifikasyondan koruduğuna inanılır¹⁰⁸⁻¹⁰⁹, ancak bu fibrillin ile olan kaplanma elastik fibrillerin yapısal olarak incelenmesinde, kalsifikasyonun başlamasında ve ilerlemesinde tam olarak etkili olamamıştır¹¹⁰. Elastine bağlı mikrofibriller içeren koruyucu tabakanın kalsiyumdan zengin ekstrasellüler matriksin etkisine maruz kalmaları sonucu elastin kalsifikasyonu olmaktadır. Buna bağlı olarak elastine bağlanmış ve çevrelenmiş kalsiyum iyonlarını inorganik fosfat iyonları takip eder ve daha sonra elastin fibrillerinin yüzeyindeki hidroksiapatit oluşumu artar¹¹¹. Sonuçta elastindeki ilerleyici harabiyet ve kalsifikasyonun artması kapakların mekanik özelliklerinin değişmesine neden olur.

Elastin harabiyeti sonucu oluşan ürünler proteazların salgılanmasına ve immün yanıtın oluşmasına neden olarak apoptozis ile sonuçlanır¹¹²⁻¹¹⁴.

2.4.5.Nonkollajen İçeriğın Rolü:

Nonkollajen bileşenlerin ekstrasellüler matriks içinde kalsiyum dengesinde önemli rol oynar. Kemik siyaloproteini, kemik morfojenik proteini 2 (TGF ailesinin üyesi) kemik büyüme gelişmesinde rol alır¹¹⁵. Bu proteinler kalsifiye olmuş kalp kapaklarında da bulunur¹¹⁶. Diğer kemikle ilgili proteinler (osteopontin, osteokalsin, osteonektin) kalsifiye aterom plakları ve deneysel olarak indüklenen arteriyel kalsifikasyonda da gösterilmiştir¹¹⁷.

2.4.6.Glikozaminglikanlar ve Proteoglikanlar:

GAG'lar asidik yapıda, dalsız polisakkaritlerden oluşurlar ve damarsal destek dokuda, kalp kapaklarında, aorta da ve perikard da bulunurlar⁹⁶. Bu polisakkaritler proteinlerden oluşmuş çekirdek yapıların etrafında bulunurlar ve böylece PG'lar şekillenir. GAG'lar kalp kapaklarının matriks alanları içinde dağılırlar ve yüzeyel elastin ve kollajen liflerine destek olurlar¹¹⁰. Kalp kapaklarının yapısındaki GAG'ların kaybı, konjenital kalp defekti olan hastalarda, romatizmal ateş geçirenlerde ve yaşlı insanlardaki kapak defektlerinde kapak yetmezliğini artırabilir¹¹⁸. Ayrıca GAG'ların kalsiyum depozitlerinde oluşan hidroksiapatit kristallerinin birikmesinin önlenmesinde koruyucu etkisi vardır¹¹⁹.

2.5.Dejeneratif Kalsifikasyonun Önlenmesi:

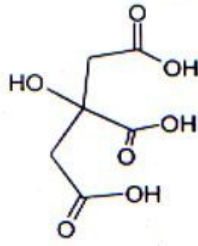
Sistemik kalsifikasyon önleyici ajanlarla tedavi etkin fakat güvenli değildir. Metabolik kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılan kalsiyum şelatörleri gibi sistemik ajanların etkin dozları subkutan olarak ratlara implante edilen biyoprotez dokuların kalsifikasyonunu önlemektedir¹²⁰, ancak fizyolojik kalsifikasyona olan etkilerinden dolayı şelatörlerin sistemik yoldan verilmesi kalsiyum metabolizmasında pek çok yan etkiye neden olmaktadır. Patolojik kalsifikasyonu engellemek için kullanılan sistemik ajanların en büyük olumsuz etkisi kemik oluşumunu inhibe etmeleridir¹²¹.

Geleneksel olarak dekalsifiye edici ajanlar, mineral asitler ve şelat oluşturucu ajanlar olmak üzere iki grupta toplanabilir. CA, asetik asit, pikrik asit zayıf asitlere örnek verilebilir. Bazen bu ajanlar belli fiksatif kimyasal formülasyonların içersinde yer alırlar. Bu nedenle fiksasyonda ve dekalsifikasyonda simültane etkileri vardır. Dekalsifiye edici ajanlardan zayıf asit olanların etkileri yavaş olmakla birlikte birçok diğer asidik ajana göre zarar verici etkileri daha azdır¹²².

Diğer dekalsifikasyon ajanları şelasyon yapıcı maddelerdir. Bir şelasyon ajanı metallere bir çift elektron transfer edebilecek en az iki fonksiyonel grup içerir. Bundan başka bu gruplar metallere halka oluşturabilecek şekilde yerleşirler. Çözünabilir metal kompleksler açığa çıkaran şelasyon ajanları aynı zamanda sekestrasyon ajanları olarak da bilinmektedir¹²². Şelasyon ajanları doğal yaşam sistemlerinde geniş bir oranda mevcuttur ve hücre metabolizmasında ve biyokimyasında önemli rollere sahiptirler¹²³⁻¹²⁴.

Nehir Sucu ve arkadaşlarının daha önce yaptığı çalışmada ratların sırtına implante edilmiş sığır perikardının kalsifikasyonunun inhibisyonunda CA bir kalsiyum şelasyon ajanı olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda sığır perikardı dokusunun dejeneratif mineralizasyonunun CA ile anlamlı derecede azaltıldığı gösterilmiştir⁶.

2.6.Sitrik Asit, Yapısı ve Özellikleri:



Şekil 1

8. yüzyılda kimyacı Jabir Ibn Hayyan (Geber) tarafından keşfedilen CA, ilk olarak 1784 yılında İsveçli kimyacı Carl Wilhelm Scheele tarafından limon suyunun kristalizasyonu sonucu elde etmiştir. 1917 yılında Amerikalı gıda kimyacı James Currie bazı *Aspergillus niger* türü mantarların CA oluşturabildiklerini keşfetmiş ve Pfizer iki yıl sonra bu teknolojiyi kullanarak endüstriyel düzeyde üretime geçmiştir.

CA'nin kimyasal formülü $C_6H_8O_7$ ve IUPAC a göre 2-hidroksipropan-1,2,3 trikarboksilik asit olarak adlandırılır. Şekil 1'de görüldüğü gibi formülüne edilir.

CA şelat oluşturucu özelliğinden dolayı bir dekalsifikasyon ajanı olarak kullanıldığı bilinmektedir. CA ve bazı tuzları birçok gıda ürünüde, konserve yiyeceklerde ve içeceklerde pH kontrolü için kullanılan bir tampondur. Sekestre edici bir ajan olarak kalsiyum, magnezyum ve ağır metaller gibi katyonlarla kompleksler oluşturur ve ortamdaki uzaklaştırır. Ayrıca antioksidanların etkinliğini destekler. Bununla birlikte kalsiyum sitrat kalsiyum kaynağı olarak özellikle asidik veya hafif asidik içeceklerde, meyve sularında, tabletlerde veya diğer gıda maddelerinde kullanılmaktadır. CA hoş ekşimsi tadı, kolay çözünürlüğü ve stabilitesi ile

bilinmektedir. Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration=FDA) (CFR 181–29) tarafından indirekt katkı maddesi olarak onaylanmıştır¹²⁵.

Kimyasal olarak CA'nın (şekil 1) 37 °C sudaki fosfatla tamponize salin solüsyonunda 48 saatlik periyod için kalsiyum bağlama karakteristiklerinin GA'e benzer olması oldukça önemlidir.

CA en fazla limonda ve ıhlamurda bulunur ve bu bitkilerin kuru ağırlıklarının yaklaşık %8 ini oluşturur. İyi ve doğal bir koruyucu olup biyokimyada sitrik asit döngüsünde de yer aldığı için önemlidir ve hemen hemen tüm canlıların metabolizmasında bulunur.

2.6.1.Özellikleri:

CA asiditesi solüsyona proton veren karboksil gruplarından kaynaklanmaktadır. CA'nın protonlarını vermesi sonucu oluşan sitrat iyonları pek çok metal iyonu ile sitrat tuzlarını oluşturur. Bunlardan önemli bir tanesi de kalsiyum sitrattır. Diğer adı ile limon tuzu dur ve besinlerin korunmasında kullanılır. Oda sıcaklığında CA beyaz kristal şeklindedir, anhidroz (susuz) biçimde bulunabileceği gibi monohidrat biçiminde de bulunabilir. Anhidroz formu sıcak suda kristalize olurken, hidrat formu soğuk suda kristalize olur. Hidrat formu 74 °C de hidrat suyunu kaybederek anhidroz forma dönüşür. 175 °C nin üzerinde ısıtıldığında karbondioksit ve su kaybederek yapısı bozulur¹²⁵.

2.6.2.Kullanımı:

Sitrik asit çoğunlukla gıdalarda tatlandırıcı ve koruyucu olarak kullanılır. Gıdalarda E330'da bilinen sitratların, tampon özelliğinden dolayı farmakolojik ajanların pH Kontrolünde kullanılır. Değişik metallerle oluşturulan sitrat tuzlarında birçok gıdanın biyolojik halinin korunmasında kullanılır. CA'nın metalleri şelat etme özelliği sabunlarda ve deterjanlarda kullanılmasına neden olmaktadır.

Biyoteknolojik ve farmokimyasal endüstride yüksek saflaştırma sürecini pasifleştirme amacıyla nitrik asit yerine kullanılabilir. Nitrik asid bu amaçla kullanıldığında zararlı bir maddedir¹²⁵.

2.6.3.Etkileri:

CA'nın dekalsifiye edici etkisi nötral pH 7.4 de olmaktadır. CA zayıf bir asit olması ve nötral pH da etki etmesinden dolayı avantajlıdır ve doku hasarı yapmaz^{126–131}.

Kimyasal olarak bir mol CA bir mol kalsiyum iyonunu bağlayabilir. Bu etkisini 37 °C de, fosfat tampon solüsyonunda (0,1 mol, pH 7.4) yaklaşık 48 saatlik zaman

diliminde gösterir. CA kalsiyumu hidroksiapatit kristalleri şeklinde bağlar ve dokulardaki kalsiyum kristallerinin boyutunu azaltarak demineralizasyonu sağlar¹²⁶⁻

131

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Deney Protokolü:

Bu deney T.C. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığının 12.08.2005 tarihli 11. toplantısında 02 karar sayısı ile etik kurul onayı alındıktan sonra yapılmıştır.

3.2.Hasta Seçimi:

Bu çalışma Ağustos 2005 ile Nisan 2006 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi servisine başvuran hastalardan aort ve mitral kapak hastalığı olan kişiler seçilerek yapılmıştır. Çalışmaya alınan hasta sayısı 12 kişiden oluşuyordu. Hastaların yapılan ekokardiyografik incelemeleri sonucunda mitral kapak, aort kapak, triküspit kapak ve pulmoner arter basınçları değerlendirilmiştir. Hastaların koroner anjiyografileride yapılmış ve koronerlerdeki darlıklarda tespit edilerek kaydedilmiştir.

Çalışmaya ciddi kalp dışı hastalığı olan (hipertroidi, hematolojik hastalıklar, kronik böbrek ve karaciğer hastalığı vb), konjenital kalp hastalığı olan, otoimmün hastalığı olan (sistemik lupus eritematozus, progresif sistemik skleroz, romatoid artrit vb), hamile olan ve başvuru anında akut viral veya bakteriyel enfeksiyonu olan hastalar alınmamıştır.

3.3.Yöntem:

Çalışma 12 hasta üzerinde yapıldı. Mitral kapak ve aort kapak değişimi yapılan hastaların eksize edilen kapakları alındı. Her bir hastadan alınan kapak örnekleri fosfat tamponlu salin solüsyonu, %0,625 lik GA (0,1 mol pH 7.4) içine konarak +4 °C de 48 saat bekletildi. Bu doku örnekleri serum fizyolojik (% 0,9 NaCl) ile yıkandıktan sonra Kontrol ve Çalışma grubu olarak ikiye ayrıldı. Kontrol grubundaki kapak örnekleri tazelenmiş %0,625 lik GA (0,1 mol pH 7.4) solüsyonu içinde +4 °C de 5 gün daha bekletildi (toplam 7 gün). Çalışma grubundaki parçalar ise % 3,8 lik CA (pH 7.4) içine konulup 37 °C de 48 saat bekletildi. Bu doku örnekleri tekrar serum fizyolojikte yıkandıktan sonra aynı özellikleri taşıyan GA solüsyonuyla 3 gün 37 °C de muamele edildi (toplam 7 gün). Her iki gruptaki parçalar alınarak biyokimyasal inceleme için kuru tüplere, ışık mikroskopik inceleme için formaldehid solüsyonuna (%3,8) ve elektron mikroskopik inceleme için GA solüsyonuna (%0,625) konuldu.

Kapak replasmanı için ameliyata alınan hastaların preoperatif ekokardiyografik sonuçları, elde edilen doku örneklerinin peroperatif makroskopik görüntüleri ve

postoperatif doku biyokimyasal analizlerine göre hafif, orta ve ağır derecede kalsifikasyon olarak sınıflandırdık (Tablo1). Biyokimyasal sonuçlarına göre incelenen örneklerdeki kalsiyum değeri 150 µg/grdoku'nun altındakileri hafif, 150–1000 µg/grdoku arasındakileri orta, 1000 µg/grdoku'nun üstündeki değerleri ağır kalsifikasyon olarak derecelendirdik (Tablo2). Bu sonuca göre Kontrol grubunda 4 hafif, 5 orta ve 5 ağır kalsifikasyon grubuna giren örnekleri belirledik. Ağır kalsifikasyon gösteren örneklerde yüksek oranda kalsifik görünüm, aşırı kırılğan ve ileri derecede dejenerasyon saptandı. Çalışma grubunda ise; 6 hafif, 6 orta ve 2 ağır kalsifikasyon saptandı. Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalaması 44,1± 7,16 (ortalama±standart sapma) olarak belirlendi.

Gluteraldehit Solüsyonunun Hazırlanması:

%25 lik GA stok çözeltisinden 24 ml alınıp 0,1 molar pH 7.4 da PBS ile 1 litreye tamamlanarak %0,6 ve %0,2 'lik GA hazırlandı. Hazırlanan %0,6 ve %0,2'lik GA çözeltilerinden 30ml/gr doku olacak şekilde kullanıldı.

Sitrik Asit Solüsyonunun Hazırlanması:

pH sı 7,4 ayarlanmış % 3,8 lik CA çözeltisinin hazırlanışı: 1 Litrelik *balon jojeye* 38 gram CA eklenerek 500 ml de çözüldü. Daha sonra hazırlanan 1 Molar'lık NaOH çözeltisi ile pH 7.4 de getirildi. Sonra deiyonize su ile toplam çözelti hacmi 1 L ye tamamlandı (pH yeniden Kontrol edildi).

3.4.Biyokimyasal Ölçümler:

Kullanılan Kimyasal Maddeler:

Asetik asit (Sigma-Aldrich)
Askorbik asit (Sigma-Aldrich)
Bakırsülfatpentahidrat (Sigma-Aldrich)
Butanol (Merck)
Etanol (Riedel da Haen)
Etilendiamintetraasetikasit (Sigma-Aldrich)
Folin-Ciocalteu (Merck)
Hidroklorik asit (Merck)
Magnezyum klorür (Sigma-Aldrich)
Molibdik asit (Sigma-Aldrich)
Piridin (Merck)
Potasyum klorür (Riedel da Haen)
Sodyum dodesil sülfat (Merck)

Sodyum hidroksit (Riedel da Haen)
Sodyum klorür (Sigma-Aldrich)
Sodyum potasyum tartarat (Sigma-Aldrich)
Tiyobarbütirik asit (Merck)
Hidroksimetil aminometen (TRIS) (Sigma-Aldrich)

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler:

Atomik Absorbsiyon spektrofotometri (AAS)
Santrifüjler; Soğutmalı santrifüj (Sigma 3K30,), Normal santrifüj (Labofuge 200)
Etüv (Nüve EN 500)
Su arıtma cihazı (Mini pure)
Otomatik pipetler (MediSis)
Hassas terazi (SHIMADU)
Derin dondurucu (Jouan)
Buzdolabı (Bosch, Arçelik)
Homojenizatör (Heidolph SilentCrusher S)
Spektrofotometre (Varian Carry Win UV)
Su banyosu (Memmert)
Vorteks (Velp Scientifical)

Malondialdehid (MDA) ölçümü:

10 gr doku için 100 mikrolitre %1,5'luk potasyum klorür çözeltisi kullanılarak homojenizasyon yapılır. 3000 devir/dakika da 10 dakika santrifüj edilerek çöken bölüm çalışılır. Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın tiyobarbütirik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe rengin 553 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçülmesi prensibine dayanmaktadır¹³².

Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesinin ölçümü:

10 gr doku için 100 mikrolitre 0,02 gr magnezyum klorür içeren %10'luk sükröz çözeltisi kullanılarak homojenizasyon yapılır. 3000 devir/dakika da 10 dakika santrifüj edilerek çöken kısım çalışılır. Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesi ölçümü, inkübasyon ortamına eklenen 3mM disodyum ATP varlığında 1 saatte protein başına açığa çıkan inorganik fosfatın ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. İnorganik fosfat ölçümü Reading ve İsbir¹³³⁻¹³⁴ tarafından önerilen yöntemle göre çalışılmıştır.

Kalsiyum ve Fosfor ölçümü:

Kalsiyum ve fosfor AAS cihazı ile çalışılmıştır.

Total protein ölçümü:

10 gr doku için 100 mikrolitre 0,02 gr magnezyum klorür içeren %10'luk sukroz çözeltisi kullanılarak homojenizasyon yapılır. 3000 devir/dakika da 10 dakika santrifüj edilerek çöken kısım çalışılır. Total protein lowry yöntemi¹³⁵ ile çalışılmıştır. Proteinler öncelikle alkali ortamda bakır iyonları ile muamele edilerek bakır-peptid bağı-protein kompleksi oluştururlar. Folin-Ciocalteu ayırıcı eklendiğinde bakır-protein kompleksleri redüksiyon esasıyla triptofan ve tirozin residüleriyle birleşirler. Oluşan rengin %75'i bakır kompleksine bağlıdır. 650–750 nm dalga boyu arasında absorbans şiddeti ölçülür.

3.5.Histolojik inceleme:

Işık mikroskobu ile inceleme:

Doku örnekleri %10'luk formolinde tespit edilerek parafin bloklara gömüldü. Daha sonra 4mikrometrelik kesitler alınarak parafinden kurtarıldı. %5'lik gümüş nitrat çözeltisi içinde 30–60 dk güneş ışığında ve 100 voltluk masa lambası altında bırakıldı. Distile su ile yıkanarak %5'lik sodyum tiyosülfat solüsyonunda 2–3 dk tutuldu. Tekrar distile su ile yıkandı. *5' nükleer fast red* solüsyonunda bekletilerek distile su ile yıkandı. %55'lik alkol ve absolu alkolde iki kez yıkanarak kurutuldu. Ksilen de bekletilerek lamelle kapatılıp ışık mikroskobu altında incelendi.

Elektron Mikroskobu ile İnceleme:

Eksize edilen kalp kapağı dokusu örnekleri %2,5'luk GA'de bir gece boyunca tespit edildi. Tampon solüsyonuyla yıkanan dokular osmiyum tetroksit ile postfikse edildi. Alkol serilerinden sonra şeffaflandırma için propilen oksitten geçirilerek düşük viskoziteli gömme ortamına (katalog no: 14300, EMS, USA) alındı. Hazırlanan bloklardan 1 mikrometre kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Toluidine mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskopuyla bakılarak uygun bölge seçildi ve ultramikrotomda 50–70 nm kalınlıkta ince kesitler alındı. Formvar kaplı bakır gridlere alınan dokulara uranil asetat ve kurşun-sitrat ile kontrastlandı. Boyanan gridler JEOL JEM–1011 Transmission elektron mikroskobunda incelenerek fotoğraflandı.

3.6.İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel analizler SPSS 11,5 paket programında yapıldı. Yapılan biyokimyasal çalışmalar sonucunda normal dağılıma uyan değerler için (MDA ve Total Protein) Paired T testi kullanılmıştır. Normal dağılım ön koşuluna uymayan diğer değerler için ise Paired T testinin non parametrik karşılığı olan Wilcoxon Signed

Ranks testi kullanılmıştır. Değerler %95 güven aralığında değerlendirildi. P değeri $P \leq 0,05$ olması anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4.BULGULAR:

Çalışmaya alınan 12 hastanın 6'sı erkek 6'sı kadındı. 8 adet mitral kapak eksizyonu ve 6 adet aort kapak replasmanı yapıldı. İki hastaya hem aort hemde mitral kapak replasmanı uygulandı. Bir hastaya aynı anda koroner by-pass cerrahisi yapıldı. Hastaların genel yaş dağılımı 21–65 (minimum-maksimum), ortalama yaş $44,41 \pm 7,16$ (ortalama \pm standart sapma) bulundu.

Hastaların ameliyat öncesi yapılan ekokardiyografik incelemeleri sonucunda; 2 hastada hem mitral hem de aort kapakta yaklaşık 10mm lik vejetatif görünüm ve mitral kapak anülüsünde kalsifik nodül bildirildi. 4 hastada romatizmal kalp hastalığına bağlı mitral kapakta kalsifikasyon, fibrozis ve kommisürel yapışıklık bildirildi. 4 hastada miksomatöz değişikliğe bağlı kalsifikasyonlar ve fibrozis, 2 hastada senil değişiklikler sonucu gelişmiş anüler kalsifikasyon, fibrozis ve ileri derecede stenoz vardı.

Ameliyat sonrası çıkartılan kalp kapaklarının makroskopik görüntülerindeki frajilite, fibrozis, kalsifikasyon, kalınlaşma ve anüler dilatasyonu değerlendirildi. Buna göre 2 hastada her iki kalp kapağında ileri derecede kalınlaşma ve kalsifikasyon, kapak üzerinde vejetasyonlar, 4 hastada mitral kalp kapağında kommisürel yapışma, kalsifikasyon ve anüler dilatasyon, 4 hastada her iki kalp kapağında aşırı frajilite, fibrokalsifikasyon, 2 hastada ise aort kalp kapağında lifletlerde fibrozis ve kalınlaşma saptandı.

Biyokimyasal Sonuçlar:

Doku biyokimyasal incelemelerinden elde edilen sonuçlara göre çıkartılan kalp kapaklarının Kontrol grubunda kalsiyum miktarları ortalama $852,5 \mu\text{gr}/\text{gr}$ doku $\pm 913,4$, fosfat miktarı ise $207,6 \mu\text{gr}/\text{gr}$ doku $\pm 321,8$ bulundu. Çalışma grubunda ise kalsiyum miktarı ortalama $413,05 \mu\text{gr}/\text{gr}$ doku $\pm 519,5$, fosfat miktarı ise $124,4 \mu\text{gr}/\text{gr}$ doku $\pm 289,4$ bulundu. Bu verilere göre yapılan istatistik analizler sonucunda Çalışma grubundaki kalsiyumun ($P=0,007$) ve fosfatın ($P=0,041$) azalması anlamlı bulunmuştur (Tablo 3). Kontrol grubunda MDA $0,133 \pm 0,0069$ mg/gr doku, Çalışma grubunda $0,18614 \pm 0,009$ mg/gr doku olarak ölçüldü. Bu da anlamlı bir artışı ifade etmemektedir. Aynı şekilde Kontrol grubunda ATPaz $118,0307 \pm 100,7$ nmol Pi/mgr protein/saat ve Çalışma grubunda $103,8757 \pm 99,7$ nmol Pi/mgr protein/saat olarak ölçülmüştür. Bu da anlamlı bir değişiklik değildir. Yine doku ve hücre bütünlüğünün korunduğunu gösteren diğer bir sonuç ise total protein değerlerinin Kontrol

grubundaki $0,380 \pm 0,049$ mg/gr doku ve Çalışma grubundaki $0,365214 \pm 0,443$ mg/gr doku değerleridir. Bu değerlerde anlamlı bir değişiklik yoktur.

Tablo 1: Kontrol grubundaki doku biyokimyasal sonuçları ve kalsifikasyon derecelendirmesi.

Hastalar	Kapak	Grup	MDA (mg/gr doku)	ATPaz nmol Pi/mgr protein/saat	Total protein mg/gr doku	Ca ²⁺ µ/gr doku	Fosfat µ/gr doku	Derece
1	AK	K	0,005	138	0,38	58,00	6,90	hafif
2	MK	K	0,0074	222,26	0,315	1420,00	678,00	ağır
3	AK	K	0,0123	156,21	0,338	400,00	9,70	orta
4	MK	K	0,014	62,62	0,379	118,00	2,80	hafif
5	MK	K	0,0128	396	0,331	620,00	14,40	orta
6	MK	K	0,0089	58,9	0,373	179,00	347,00	orta
7	AK	K	0,017	20	0,402	410,00	640,00	orta
8	MK	K	0,012	46,79	0,51	140,00	1,20	hafif
9	MK	K	0,0063	77,6	0,388	60,00	2,90	hafif
10	MK	K	0,023	67,65	0,406	1700,00	130,00	ağır
11	AK	K	0,012	203,41	0,32	1790,00	967,00	ağır
12	MK	K	0,0066	57,49	0,362	1930,00	15,00	ağır
13	MK	K	0,029	46,55	0,407	220,00	1,50	orta
14	AK	K	0,02	98,95	0,413	2890,00	91,00	ağır

Kontrol grubundaki doku biyokimyasal analizleri sonucunda ortaya çıkan değerlerle birlikte derecelendirme tablosu (AK=Aort Kapak, MK= Mitral Kapak, K=Kontrol Grubu).

Tablo 2 Çalışma grubundaki doku biyokimyasal sonuçları ve kalsifikasyon derecelendirmesi.

Hastalar	Kapak	Grup	MDA (mg/gr doku)	ATPaz (nmol Pi/mgr protein/saat)	Total protein (mg/gr doku)	Ca ²⁺ (µ/gr doku)	Fosfat (µ/gr doku)	Derece
1	AK	Ç	0,0088	76,28	0,323	14,40	1,25	hafif
2	MK	Ç	0,016	87,31	0,319	250,00	5,30	orta
3	AK	Ç	0,024	136,12	0,306	380,00	4,80	orta
4	MK	Ç	0,0074	94,72	0,384	46,00	1,68	hafif
5	MK	Ç	0,03	433,78	0,326	640,00	20,00	orta
6	MK	Ç	0,013	72,45	0,387	6,30	1,20	hafif
7	AK	Ç	0,034	14,94	0,38	280,00	840,00	orta
8	MK	Ç	0,016	51,74	0,36	9,00	1,10	hafif
9	MK	Ç	0,0064	67,24	0,39	23,00	1,78	hafif
10	MK	Ç	0,031	106,35	0,38	760,00	3,50	orta
11	AK	Ç	0,03	69,55	0,48	1160,00	770,00	ağır
12	MK	Ç	0,016	40,95	0,39	300,00	3,60	orta
13	MK	Ç	0,013	92,72	0,348	134,00	2,70	hafif
14	AK	Ç	0,015	110,11	0,34	1780,00	86,00	ağır

Çalışma grubundaki doku biyokimyasal analizleri sonucunda ortaya çıkan değerlerle birlikte derecelendirme tablosu (AK=Aort Kapak, MK= Mitral Kapak, Ç=Çalışma Grubu).

Kontrol grubu ile Çalışma grubu arasında MDA, ATPaz ve total protein miktarlarında çok az değişim saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Doku ATPaz aktivitesinin ve total protein düzeylerinin azalmamış ve MDA düzeylerinin de yükselmemiş olması hücre bütünlüğünün korunduğuna yönelik bulgular olarak değerlendirilebilir.

Tablo 3: Kontrol ve Çalışma grubundaki doku biyokimyasal değerleri

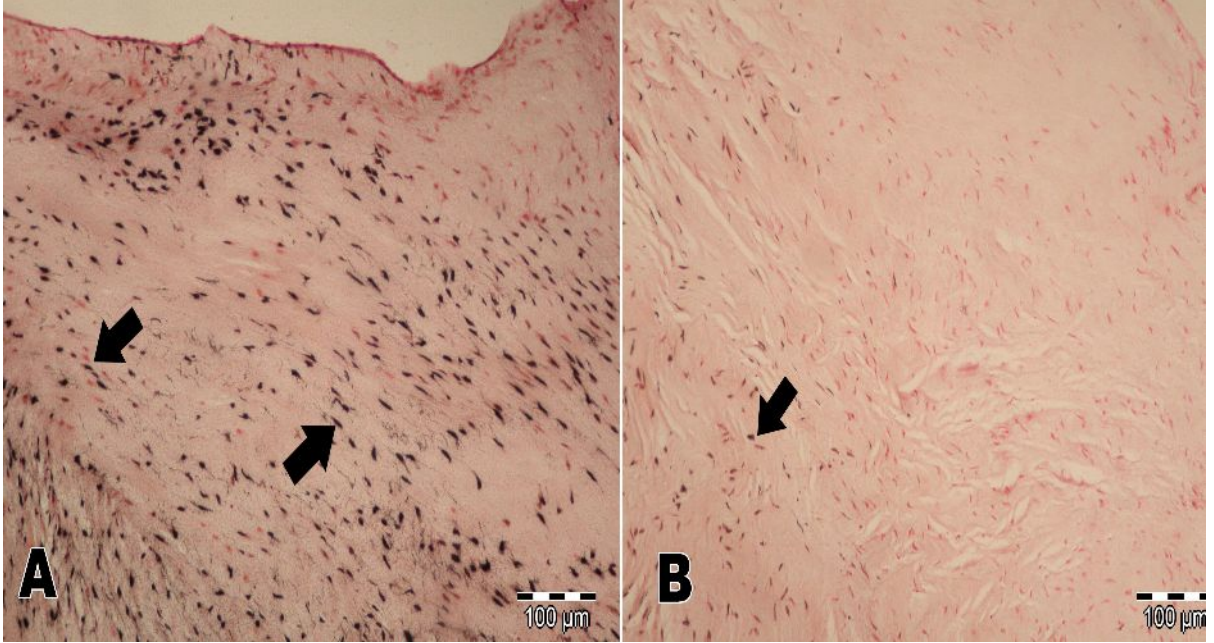
GRUP	SAYI	MINİMUM	MAKSİMUM	ORTALAMA	STANDART SAPMA
KONTROL MDA	14	0,005	0,29	0,13307	0,0069128
ATPaz	14	20	369	118,0307	100,705348
Total Protein	14	0,315	0,51	0,380286	0,0498497
Ca²⁺	14	58	2890	852,5	913,4188
Fosfat	14	1,2	967	207,671	321,8663
ÇALIŞMA MDA	14	0,0064	0,034	0,18614	0,0093902
ATPaz	14	14,94	433,78	103,8757	99,7153984
Total Protein	14	0,306	0,48	0,365214	0,443677
Ca²⁺	14	6,30	1780	413,05	519,5327
Fosfat	14	1,10	840	124,493	289,4837

Histolojik Sonuçlar:

Tüm örnekler histologlar tarafından kalsiyum birikintileri ve kollajen fibrillerin yapıları değerlendirilerek incelendi. Çıkarılan kalp kapaklarının histolojik incelemesi hem ışık hem de elektron mikroskopunda yapıldı. Işık mikroskopisi sonucunda; Kontrol grubundaki yaygın kalsifikasyon noktalarının, Çalışma grubunda büyük oranda azaldığı görülmektedir. Kalsifikasyonun belirgin olarak azalmasının yanında doku morfolojisinin değişmediği dikkati çekmektedir (Resim 1).

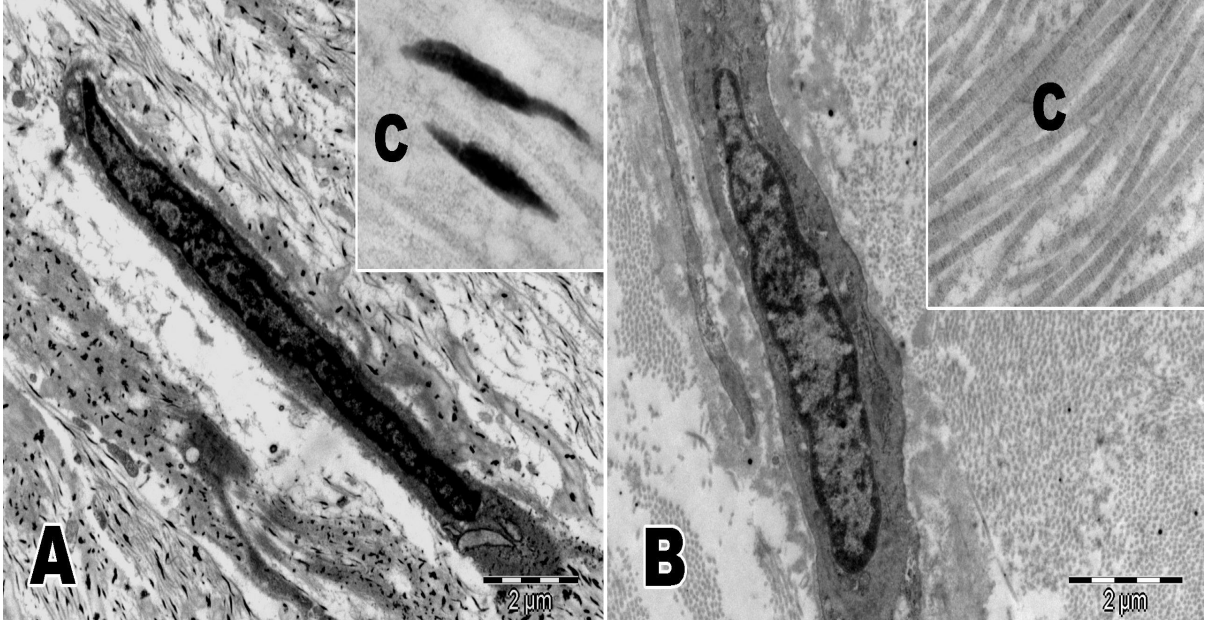
Elektron mikroskopik incelemede ise Kontrol grubundaki kollajen ve elastik lifler üzerindeki kalsifikasyon alanları ve kalsiyum depozitleri belirgin olarak görülmekte, ancak Çalışma grubunda kalsifikasyonun azaldığı ve kollajen liflerinin özelliklerini kaybetmediği dikkati çekmektedir. Kontrol grubunda organizasyonu ve ince yapısı bozulmuş, enine çizgilenmeleri silinmiş düzensiz dizilim gösteren kollajen liflerin varlığı ve kollajen liflerin yüzeyine tutunmuş granüler kalsifikasyon görülmektedir (Resim 2 A). Çalışma grubunda ise kollajen liflerin üzerindeki kalsifik granüllerin azaldığı, yapısının ve düzeninin korunduğu görülmektedir (Resim 3 B).

Resim1: Kontrol Grubu (A), Çalışma Grubu (B) Aort Kapak. Işık mikroskobu ile inceleme.



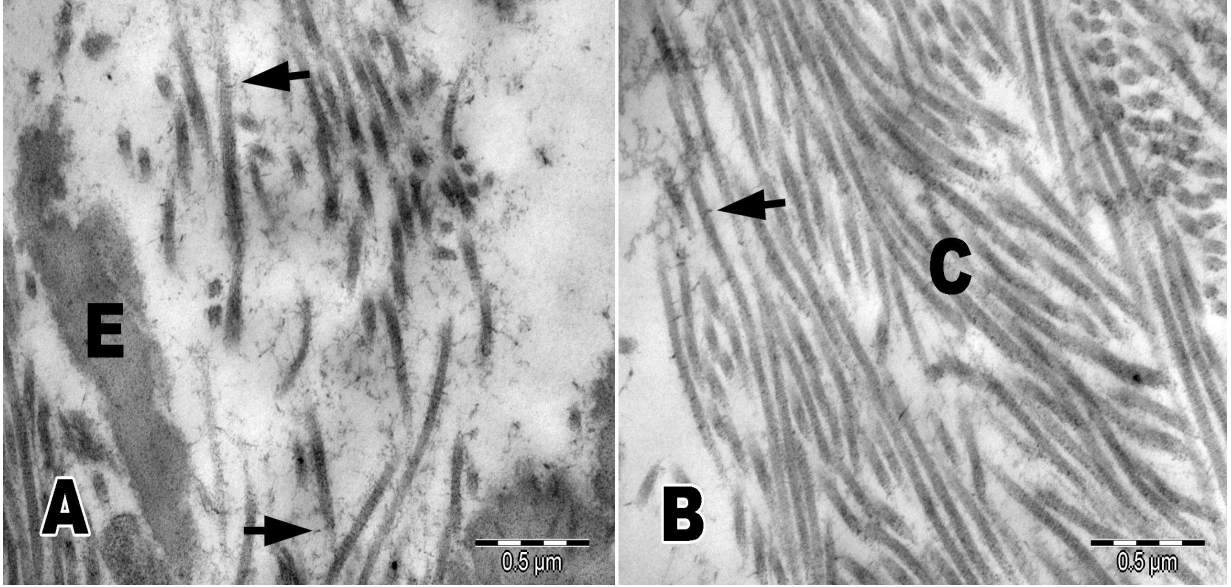
Kontrol grubundaki yaygın kalsifikasyon noktaları okla işaretlenmiştir (Resim A). Çalışma grubundaki kalsifikasyonun azaldığını gösteren histolojik kesitte okla işaretli noktalarda minimal kalsifik depozitler görülmektedir. Kalsifikasyonun belirgin olarak azalmasının yanında doku morfolojisinin değişmediği dikkati çekmektedir (Resim B).

Resim2: Kontrol Grubu (A), Çalışma Grubu (B) Aort Kapak. (Inset X 100000) (Uranyl acetate X Lead citrate) (Elektron mikroskobu ile inceleme).



Organizasyonu ve ince yapısı bozulmuş, enine çizgilenmeleri silinmiş gelişigüzel düzenlenme gösteren kollajen lifler. Kollajen liflerin (C) yüzeyine tutunmuş granüler kalsifikasyon (Resim A). Kollajen liflerin yapısının korunduğu ve kalsifik noktaların azaldığının görülmesi (Resim B).

Resim3: Kontrol Grubu (A), Çalışma Grubu (B) Mitral Kapak (Inset X 100000) (Uranyl acetate X Lead citrate) (Elektron mikroskopu ile inceleme).

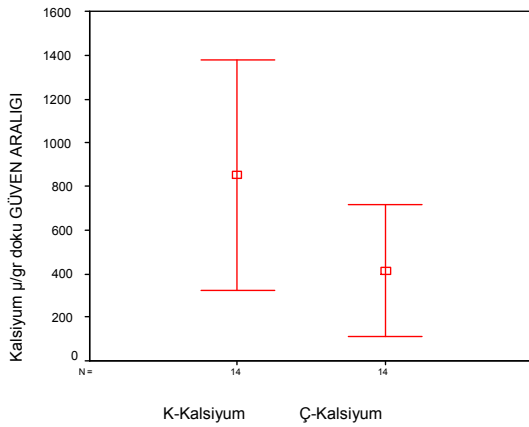


Organizasyonu ve ince yapısı bozulmuş, enine çizgilenmeleri silinmiş gelişigüzel düzenlenme gösteren kollajen lifler. Kollajen liflerin yüzeyine tutunmuş granüler kalsifikasyon (Resim A). Kollajen liflerin (C) yapısının korunduğu ve kalsifik noktaların azaldığı görülmektedir (Resim B).

İstatistiksel Sonuçlar:

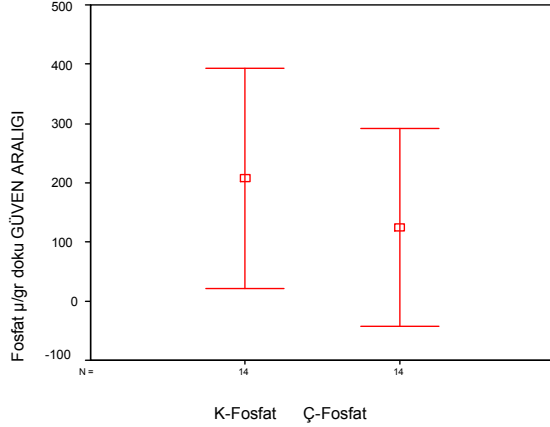
Kontrol ve Çalışma grupları arasında doku kalsiyum düzeyleri, %95 güven aralığında Grafik 1'de gösterilmektedir. Çalışma grubundaki kalsiyum ortalamasının Kontrol grubuna göre azaldığını görmekteyiz ($P=0,007$). Kontrol ve Çalışma grupları arasında fosfat düzeyleri %95 güven aralığında Grafik 2'de gösterilmiştir. Çalışma grubundaki fosfat ortalamasının Kontrol grubuna göre azaldığını görülmektedir ($P=0,041$).

Grafik1: Kontrol ve Çalışma grubundaki kalsiyum değerindeki karşılaştırma grafisi.



K-Kalsiyum=Kontrol grubu kalsiyum değerleri.
Ç-Kalsiyum=Çalışma grubu kalsiyum değerleri

Grafik2: Kontrol ve Çalışma grubundaki fosfat değerindeki karşılaştırma grafisi.



K-Fosfat=Kontrol grubu fosfat değerleri.
Ç-Fosfat=Çalışma grubu fosfat değerleri

Total olarak bütün kalp kapaklarının (hem aort hem de mitral kapak) biyokimyasal sonuçları incelendiğinde Çalışma grubunda kalsiyum ve fosfat değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptandı. Diğer biyokimyasal değerlerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Tablo 4 incelendiğinde kalsiyum ve fosfat değerlerinin Kontrol ve Çalışma grubu arasındaki farkı açık bir şekilde görmekteyiz.

Tablo 4: Kontrol ve Çalışma grubundaki doku biyokimyasal değerlerine göre istatistiksel sonuçlar.

	GRUP	ORTALAMA	STANDART SAPMA
KONTROL	MDA (mg/gr doku)	0,13307	0,0069128
	ATPaz (nmol Pi/mgr protein/saat)	118,0307	100,7053481
	Total Protein (mg/gr doku)	0,380286	0,0498497
	Ca ²⁺ (µ/gr doku)	852,5	913,4188
	Fosfat (µ/gr doku)	207,671	321,8663
ÇALIŞMA	MDA (mg/gr doku)	0,18614	0,0093902
	ATPaz (nmol Pi/mgr protein/saat)	103,8757	99,7153984
	Total Protein (mg/gr doku)	0,365214	0,443677
	Ca ²⁺ (µ/gr doku)	413,05	519,5327
	Fosfat (µ/gr doku)	124,493	289,4837

5.TARTIŞMA

Yapılan birçok çalışmada kalsiyum iyonunun apopitozis ve inflamasyondaki rolü gösterilmiştir⁵⁰. Kalsiyum dengesinin mitokondriler içinde bozulması apopitozis için çok önemli bir adımdır. İnflamasyon ve apopitozis gibi serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olan olaylar hücre içi kalsiyum artışı ile birliktedir. Serbest oksijen radikalleri hücrenin lipid, protein, karbonhidrat gibi tüm önemli bileşenlerinin yapı taşlarını etkiler. Sitoplazma, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en duyarlı olan biyomoleküllerdir. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu sonucunda MDA oluşur ve bu olay çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. MDA, membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Devam eden peroksidasyon, devam eden doku hasarı ve artan fonksiyonel bozulma demektir. Kalsiyumun hücre dışı konsantrasyonu 10^{-3} M, hücre içi konsantrasyonu ise 10^{-7} M kadardır. Hücre içindeki konsantrasyonun daha düşük olması hücre membranındaki düzenleyici mekanizmalarla sağlanmaktadır⁵². Hücre membranına yerleşmiş olan sodyum, potasyum ve kalsiyum iyonlarının aktif taşınmasından sorumlu olan proteinlerin ve ATPaz'ların sayesinde hücre bütünlüğü korunmakta ve hücrenin ozmotik dengesi sağlanmaktadır⁵². Na^+-K^+ ATPaz enzimi hücre içine sodyum girişini azaltır, potasyum depolanmasını artırır. Aynı zamanda hücre membranından geçen kalsiyum akımını düzenler. Hücre membranının hasarlanması membranın iyonik ATPaz pompalarını bozarak hücre içinde kalsiyum, sodyum ve su miktarının artmasına, hücrenin 'şişmesine' neden olur. Bu olay bitki ve hayvan hücrelerinde gösterilmiştir⁴⁹. Kalsiyum artışının, inflamasyonun ve oksidasyonun yarattığı hasar sonucunda mı oluştuğu yoksa hücre içi kalsiyum artışı reaktif oksijen radikallerinin varlığının mı tetiklediği sorusu akla gelmektedir. Bobier ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada⁵¹ kalsiyum iyonlarının oksidatif olayları tetikleyebileceği gösterilmiştir. Rat ve domuz kalplerinde yapılan iskemi ve reperfüzyon hasarı çalışmalarında, oluşan hasarın hücre içi kalsiyum artışına bağlı olduğu saptanmıştır. Kalp kapaklarında yapılan çalışmalarda ise yaşlanma, romatizmal ateş, miksomatöz dejenerasyon, enfeksiyon ve inflamasyon gibi etkenlerle öncelikle EH bütünlüğünün bozulduğu ve beraberinde NO sentezinin bozularak hücre hasarının oluştuğunu görmekteyiz⁴⁵. NO, damar tonusun düzenlenmesi, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, lökositlerin EH'e yapışmasının

engellenmesi, oksijen türevli serbest radikallerin düzenlenmesi, normal damar geçirgenliğinin sağlanması, düz kas çoğalmasının inhibisyonu, immün savunmanın düzenlenmesi ve EH rejenerasyonunun uyarılması ile doku bütünlüğünün korunmasında etkin bir rol oynar. EH hasarlanması, beraberinde makrofajların, lökositlerin ve T lenfositlerin bu bölgede aktive olmasına neden olmakta, hücre içi ve dışı adhezyon moleküllerinin bölgede toplanmasıyla sonuçlanmaktadır³⁷. Salgılanan şimik faktörlerle de matriks metalloproteinazlar aktive olmakta ve oksidoinflamatuar süreç başlamaktadır. Bir yandan kalsiyum iyonunun oksidoinflamatuar olayları tetiklediği saptanırken⁵¹ diğer yandan kalsiyum metabolizmasında etkili olan osteopontin, osteonektin, osteokalsin gibi nonkollajenöz proteinlerin de makrofajların altgrupları tarafından salındığı ve doku kalsifikasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir⁶⁴.

Nehir Sucu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma sonucunda CA ve EDTA ile sığır perikardında kalsiyum düzeyi azaltılmış, kalsifik dejenerasyon belli oranda önlenebilmiştir⁶. Özellikle ABD’de 1950’li yıllardan itibaren yapılan çalışmalarda, kalsiyum bağlayıcı şelat olan EDTA ateroskleroza bağlı periferik damar hastalıklarında ve koroner arter hastalıklarında kullanılmaya başlanmış ve olumlu sonuçların alındığı bildirilmiştir¹³⁶⁻¹³⁸. 2004 yılında ABD de Maniscalco ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada EDTA’nın koroner arter kalsiyum skorunu azalttığını, kalsifiye koroner arter plak volümünü geriletmediğini *elektron beam tomografi* ile göstermişlerdir. EDTA, şelasyon olarak kalsifik band keratopatide ABD’de Wills Eye Hospital’da (Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania) tedavi protokolünde yerini almıştır¹³⁹. Rat ve domuz kalplerinde yapılan bir çalışmada ise 2piridilmetiletilediamin’in hücre içi kalsiyum dengesini düzenleyerek iskemiye karşı miyokardiyal korunmayı sağladığı gösterilmiştir⁹². CA tuzlarının ise günümüzde özellikle böbrek taşı olan hastalarda nüksü önlemek amacıyla ve özellikle idiyopatik böbrek taşı olan hastalarda kemik yapıyı korumak amacıyla yaygın olarak kullanıldığını bilmekteyiz⁷. Yapılan klinik çalışmalar sonucunda sitratlar gastrointestinal sistemden kalsiyum emilimini artırırken böbreklerden kalsiyum-fosfat kristallerini çözünür hale getirip atılımını artırarak vücudun kalsiyum dengesini sağlamaktadır. Ratlarda, *ex vivo* olarak yapılan bir çalışmada ise sistemik verilen alkali sitratların, rat karnına yerleştirilen aortik damarda media tabakasındaki kalsifikasyonu azalttığı ve hidroksiapatit artışını önlediği gösterilmiştir⁸.

Yaptığımız bu *ex vivo* çalışmada insan kalp kapaklarındaki doku kalsiyum ve fosfat düzeylerinin CA uygulanan Çalışma grubunda anlamlı olarak azaldığını

gösterirken, doku ATPaz, MDA ve total protein düzeylerinde Çalışma ve Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığını saptadık. Işık ve elektron mikroskopik inceleme ile yaptığımız histopatolojik değerlendirmede ise Kontrol ve Çalışma grupları arasında histolojik olarak hücre bütünlüğünde belirgin bir değişiklik olmamasına karşın kalsifik çöküntülerin Çalışma grubunda azaldığını gördük. Uyguladığımız CA'in doku kalsiyum düzeyinde etkili olmasına karşın hücre bütünlüğünü ilgilendiren parametrelerde anlamlı bir değişiklik yapmadığını söyleyebiliriz. GA ile muamele edilerek yapılan çalışmalarda, GA'in tetiklediği hücre ölümünün başlaması, hücre organellerinde kalsiyum fosfat kristallerinin birikimi ve kollajen bandlarının düzenini kaybettiği görülmektedir. Özellikle GA ile *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda, toksik etkinin ortaya çıkması için gerekli süre en az 21 gün kadardır. CA'in lokal olarak uygulanmasının 48 saatlik süre içinde olması nedeniyle hücre bütünlüğünde değişiklik yapmadığını düşünmekteyiz. Bizim bir sonraki aşamada gerçekleştireceğimiz çalışma CA'in hücre ve hücre organellerinin bütünlüğünü ve düzeninin korunması üzerine planlanmıştır.

Yukarda sözü edilen bu çalışmalara göre CA'in kalsiyum iyonuna bağlı oksidoinflamatuar hasarı ve sonrasında gelişecek kalsifik dejenerasyonu önlediğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda ortaya koyduğumuz sonuç ise CA'in mevcut kalsifik nodülleri azaltması ve kalsiyum düzeyini düşürmesidir. Kontrol grubundaki 5 ağır kalsifikasyon gösteren kapak patolojisi saptanmışken, Çalışma grubunda ağır kalsifikasyon sınıfına giren kapak patolojisi sayısı 2 olarak bulunmuştur. Aynı şekilde Kontrol grubunda 5 orta kalsifikasyon gösteren kapak patolojisi varken, Çalışma grubunda 6 orta kalsifikasyon gösteren kapak patolojisi ve Kontrol grubunda 4 hafif kalsifikasyon gösteren kapak patolojisi görülmüşken, Çalışma grubunda 6 hafif kalsifikasyon gösteren kapak patolojisi saptanmıştır. Çalışma grubundaki ağır kalsifikasyon sayısının azalması, orta ve hafif kalsifikasyon sınıfına giren kapak patolojilerinin sayısının artmasıyla görüldüğü gibi CA'in kalsifikasyonu azalttığı çok net bir şekilde ortadadır. Zayıf ve dokular için zararsız olan CA'in pH 7.4 de kalsiyum iyonlarını bire bir bağlayarak kapak dokusunu dekalsifiye ettiğini ve kalsiyum fosfat kristallerini çözünür hale getirdiğini bu şekilde ortamdaki uzaklaştırdığını söyleyebiliriz. CA, zayıf bir asit olması ve nötral pH da etkili olmasından dolayı doku hasarı yapmaz ve hücre ve doku morfolojisini de etkilemez. Kontrol ve Çalışma grubunda MDA, Na⁺-K⁺ ATPaz ve total protein düzeylerinin birbirine yakın olması ve histopatolojik

incelemede Kontrol grubunda klasifikasyonun ciddi oranda azalırken sadece kollajen liflerde düzensizlik olması bunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Bununla beraber doku bütünlüğünün korunmasında kalsiyumun bağlanması ve oksidoinflamatuar yanıtın bloke edilmesinin etkisi göz ardı edilmemelidir.

6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER:

Bu bulgular ışığında yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda CA'in lokal uygulanmasının doku kalsifikasyonunu azaltması ve doku morfolojisinde etkin bir değişiklik yapmamış olması anlamlıdır. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda şelatların sistemik ve lokal olarak uygulanabileceğinin ve hatta lokal olarak uygulamada kalsifikasyonun çok daha kısa sürede ortadan kaldırılabilceğini anlamış bulunuyoruz.

Taradığımız çalışmalar ve bizim yaptığımız çalışmaların sonucunda kapak etiopatogenezi ne olursa olsun çoğunluk patolojilerin temeli oksidoinflamatuar hasara bağlıdır ve bu olayların zemininde de kalsiyum vardır. Dolayısıyla sitratlarla lokal olarak kalp kapağı dokularındaki kalsifikasyonun azaltıldığının gösterilmesi sitratların kapak patolojilerinde geç dönemde oluşabilecek kalsifikasyonda etkili olduğunu göstermekle beraber, erken dönemde artan hücre içi kalsiyumun da ortamdaki uzaklaştırılarak oksidoinflamatuar hasarın önlenebileceği kliniğimiz çalışma grubunca benimsenmiştir. Bundan sonraki aşamada yapacağımız çalışmalarda ilk planda CA'in hücre morfolojisine olan etkisi *in vivo* olarak gösterilmeye çalışılacak, sonra da sitratların sistemik uygulamasının kalp kapaklarındaki değişime olan etkisi araştırılacaktır.

7.KAYNAKLAR

1. Gudbjartsson T AS, Cohn LH. Mechanical/bioprosthetic mitral valve replacement. In: Cardiac Surgery in the Adult. Cohn LH, Edmunds LH Jr(Eds), McGraw-Hill, New York, USA 2003: 951–986
2. Dan T Simionescu. Prevention of calcification in bioprosthetic hear valves challenges and perspectives. Expert Opin. Biol.Ther. 2004; 4(12): 1971-1985
3. Lee CC, Kang JJ. Extract of motorcycle exhaust particles induced macrophages appptosis by calcium dependent manner. Chem. Res. Toxicol. 2002;15:1534-1542.
4. Atlante A, Calissano C, et al. Glutamate Neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. FEBS Letters 2001;497:1-5.
5. Simionescu D, Simionescu A, Deac R: Detection of remnant proteolytic activities in unimplanted glutaraldehyde-treated bovine pericardium and explanted cardiac bioprostheses. J. Biomed. Mater Res. 1993;27:821-29.
6. Sucu N, Tamer L, Aytaçoğlu B, Polat A, Döndaş HA, Gül A, Dikmengil M, Atik U. Inhibition of calcification with citric acid in pericardial bioprosthetic heart Valve material: a preliminary report. The Journal of Heart Valve Disease 2004;13:697–700.
7. Taner GA, Taner JA: Dietary citrate treatment of polycystic kidney disease in rats. Nephron physiol. 2003;93:p14-p20.
8. Schick CH, Schwille PO et al. Studies on the reduction of aortic caicification by alkali citrates in an ex vivo tissue preparation in the rat.
9. Carpentier A, Chanard J, Briotet JM, Harada S, Archundia H, Salamagne JC, Vigano M, Laurens P, Laurent D, Dubost C. (Replacement of the mitral valve with heterotopic heterografts). Presse Med. 75: 1603-6, 1967.
10. Carpentier A, Blondeau P, Laurens P, Mancel P, Laurent D, Dubost C. (Replacement of the mitral and tricuspid valves by heterografts). Ann. Chir Thorac. Cardiovasc. 7:33–8,1968.
11. Carpentier A: From valvular xenograft and valvuler to valvular bioprosthesis (1965–1977). Med. Instrum. 11: 98-101, 1977.
12. Carpentier A Valvular xenograft and vavular xenobioprosthesis: past, present, future. Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi 27: 397–404, 1979.
13. Deck JD. 1986. Endothelial cell orientation on aortic valve leaflets. Cardivasc. Res. 20:760-767.

14. Ferrans VJ, Butany J. 1983. Ultrastructural pathology of the heart. In: Trump BF, Jones RT, editors. Diagnostic electron microscopy. Toronto: John Wiley&Sons;319-474.
15. Weind KL, Ellis CG, Boughner DR. 2000. The aortic valve blood supply. *J. Heart valve Dis.* 9:1-7.
16. Weind KL, Boughner DR, Rigutto L, Ellis CG. 2001. Oxygen diffusion and consumption of aortic valve cusps. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 281:H2604-H2611.
17. Jew JY, Williams TH. 1999. Innervation of the mitral valve is strikingly depleted with age. *Anat. Rec.* 255:252-260.
18. Maron K, Yacoub MH, Polak JM, Sheppard MN, Fagan D, Whitehead BF, de Leval MR, Anderson RH, Wharton J. 1996. Innervation of human atrioventricular and arterial valves. *Circulation* 94:368-375.
19. Arciniegas E, Ponce L, Hart Y, Graterol A, Carlini RG. 2000. Intimal Thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells. *Anat. Rec.* 258:47-57.
20. DePaola N, Phelps, Me. 2000. Shear stress gradients (SSG) regulate endothelial permeability to macromolecules in vitro. *Ann. Of Biomed. Eng.* 28(Supp 1):S69.
21. Keulenaer GW, Brutsaert DL. 1999. Dilated cardiomyopathy: Changing pathophysiological concepts and mechanisms of dysfunction. *J. Cardiol. Surg.* 14:64-74.
22. Langille BL, Bendeck MP, Keeley FW. 1989. Adaptations of carotid arteries of young and mature rabbits to reduced carotid blood flow. *Am. J. Physiol* 25:H931-H939.
23. Shepherd JT. 1995. Interactions of neurotransmitters and endothelial cell in determining vascular tone. *Adv. Exp. Med. Biol.* 381:1-13.
24. Hishikawa K, Luscher TF. 1997. Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation* 96:3610-3616.
25. Kinlay S, Libby P, Ganz P. 2001. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr. Opin. Lipidol* 12:383-389.
26. Nerem RM. 1992. Vascular fluid mechanics, the arterial, wall, and atherosclerosis. *J. Biomech. Eng.* 114:274-282.
27. Peng X, Recchia FA, Byrne BJ, Wittstein IS, Ziegelstein RC, Kass DA. 2000. In vitro system to Study realistic pulsatile flow and stretch signaling in cultured vascular cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 279:C797-C805.

28. Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, Hayoz D. 1998. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to Mechanical forces. *Hypertension* 32:351-355.
29. Riddle JM, Wang CH, Magillan DJ Jr, Stein PD. 1989. Scanning electron microscopy of surgically excised human mitral valves in patients over 45 years of age. *Am. J. Cardiol.* 63:471-477.
30. Riddle JM, Magillan DJ Jr, Stein PD. 1980. Surface topography of stenotic aortic valves by scanning electron microscopy. *Circulation* 61:496-502.
31. Stein PD, Wang CH, Riddle JM, Sabah HN, Magillan DJ Jr, Hawkins ET. 1989. Scanning electron microscopy of operatively excised severely regurgitant floppy mitral valves. *Am. J. Cardiol.* 64:392-394.
32. Chino F, Kodama A, et al. Nonbacterial thrombotic endocarditis in a Japanese autopsy sample. A review of eighty cases. *Am. Heart J.* 1975;90:190-198.
33. Thomson RL. Staphylococcal infective endocarditis. *Mayo Clin. Proc.* 1982;57:106-114.
34. Clemens JD, Horwitz, et al. A Controlled evaluation of the risk of bacterial endocarditis in persons with mitral Valve prolapse. *N. Engl. J. Med.* 1982;307:776-781.
35. Gould K, Ramirez-Ronda Ch, et al. Adherence of bacteria to heart valves in vitro. *J. Clin. Invest.* 1975;56:1364-1370.
36. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-791
37. Galvine JE, Hemric ME, et al. Cytotoxic mAb from rheumatic carditis recognizes heart valves and laminin. *J. Clin. Invest.* 2000;106:217-224.
38. Silver MD, Gotlieb AI, et al. 2001. *Cardiovascular pathology*, 3 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone.
39. Bel-Kahn J, Duren DR, et al. Isolated mitral Valve prolapse: chordal architecture as an anatomic basis in older patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1985;5: 1335-1340.
40. Wang X, Douglas SA, et al. Expression of ET-1, ET-3, endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat. *Circ. Res.* 1996;78:322-328.
41. Gibson CM, Diaz L, et al. Relation of vessel wall shear stress to atherosclerosis progression in human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb* 1993;13:310-315.

42. Mohler ER III. Are atherosclerotic processes involved in aortic Valve calcification? *Lancet* 2000;356:524-525.
43. Otto CM, Kuusisto J, et al. Characterization of the early lesion of degenerative valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994;90:844-853.
44. Galante A, Pietroiusti A, et al. CRP is increased in patients with degenerative aortic valvular stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001;38:1078-1082.
45. Blankenberg S, Rupprech HJ, et al. Circulation cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:1336-1342.
46. Novaro GM, Tiong IY, et al. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation* 2001;104:2205-2209.
47. Paranya G, Vineberg S, et al. Aortic Valve endothelial cells undergo transforming growth factor beta mediated and non-transforming growth factor beta mediated transdifferentiation in vitro. *Am. J. Pathol.* 2001;159:1335-1343.
48. Mehrabi MR, Sinzinger H, et al. Accumulation of oxidized LDL in human semilunar valves correlates with coronary atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 2000;45:874-882.
49. Robbins SL, Kumar v, Cotran RS. *Basic pathology.* 1995
50. Krebs J. The Role of Calcium in Apoptosis. *Biometals* 1998;11:375-382.
51. Bobier RT, Engelman MD, et al. Variability of the Fenton Reaction Characteristics of the EDTA, DTPA, and Citrate Complexes of Iron *Biometals* 2003;16:519-527.
52. Skou. J.C. : The enzymatic basis for the Active Transport of sodium and potassium. *Protopl.* 1967; 63:303.
53. Demer LL. Vasculer calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids. *Intl. J. Epidemiol.* 2002;31:737-41.
54. Giachelli CM. Ectopic calcification:gatherin hard facts abouth soft tissue mineralization. *Am. J. Pathol.* 1999;154:671-5.
55. Speer MY, Giachelli CM. Regulation of vasculer calcification. *Cardiovasc. Pathol.* 2004;13:63-70.
56. Schoen FJ, Levy RJ. Tissue heart valves:current challenges and future research perspectives. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999;47:439-65.

57. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, et al. Onset and progression of experimental bioprosthetic heart valve calcification. *Lab. Invest.* 1985;52:523-32.
58. Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. *Am. J. Pathol.* 1986;23:143-54.
59. Bailey MT, Pillarisetti S, Xiao H, Vyavahare NR. Role of elastin in Pathologic calcification of xenograft heart valves. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003;66:93-102.
60. Levy RJ, Schoen FJ, Sherman FS, Nichols J, Hawley MA, Lund SA. Calcification of subcutaneously implanted type 1 collagen sponges: effects of glutaraldehyde and formaldehyde pretreatment. *Am. J. Pathol.* 1986;122:71-82.
61. Thubrikar MJ, Deck JD, Aouad J, Nolan SP. Role of Mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1983;86:115-25.
62. Valante M, Bortolotti U, Thiene G. Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure. *Am. J. Pathol.* 1985;119:12.
63. Schoen FJ. Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology. *J. Heart Valve Dis.* 1999;8:350-8.
64. Levy RJ, Gunberg CM, Scheinman R. The identification of the vitamin K-dependent bone protein osteocalcin as one of the carboxyglutamic acid containing proteins present in calcified atherosclerotic plaque and mineralized heart valves. *Atherosclerosis* 1983;46:49-56.
65. Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix calcification: where is the action? *Nature Genetics* 1999;21:150-1.
66. Bini A, Mann KG, Kudryk BJ, Schoen FJ. Non-kollagenous bone proteins, calcification and thrombosis in coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19:1852-61.
67. Jono S, McKee MD, Murry C, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ. Res.* 2000;87:e10-e17.
68. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesion. *J. Clin. Invest.* 1993;91:1800-9.

69. Farivar RS, Cohn LH. Hypercholesterolemia is a risk factor for bioprosthetic valve calcification and explantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003;126:969-76.
70. David TE, Ivanov J. Is degenerative calcification of the native aortic valve similar to calcification of bioprosthetic heart valves? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003;126:939-41.
71. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am. J. Pathol.* 2002;161:2035-46.
72. Parhami F, Basseri B, Hwang J, Tintut Y, Demer LL. High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. *Circ. Res.* 2002;91:570-6.
73. Luo G, Duy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.
74. Speer MY, McKee MD, Gulberg RE, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix GLA protein-deficient mice: evidence for Osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J. Exp. Med.* 2002;196:1047-55.
75. Vyavahare N, Jones PL, Tallapragada S, Levy RJ. Inhibition of matrix metalloproteinase activity attenuates tenascin-C production and calcification of implanted purified elastin in rats. *Am. J. Pathol.* 2000;157:885-93.
76. Srivasta SS, Maercklein PB, Veinot J, Edwards WD, Johnson CM, Fitzpatrick LA. Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J. Clin. Invest.* 1997;5:996-1009.
77. Jian B, Jones PL, Li QY, Mohler ER III, Scohen FJ, Levy RJ. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am. J. Pathol.* 2001;159:321-7.
78. Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER III, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta 1 is present in calcific aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann. Thorac. Surg.* 2003;75:457-65.
79. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, et al. Human Aortic Valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 2003;107:2181-4.

80. Wallby L, Janerot-Sjoberg B, Steffensen T, et al. T lymphocyte infiltration in non-rheumatic aortic stenosis: a comparative descriptive Study between tricuspid and bicuspid aortic valves. *Heart* 2002;88:348-51.
81. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, et al. Bone formation and inflammation in cardiac Valve. *Circulation* 2001;103:1522-8.
82. Wierzbicki A, Shetty C. Aortic stenosis: an atherosclerotic disease? *J. Heart Valve Dis.* 1999;8:416-23.
83. Palta S, Pai AM, Gill KS, et al. New insights into the progression of aortic stenosis: implications for secondary prevention. *Circulation* 2000;101:2497-502.
84. Aronow WS, Ahn C, Kronzon I, et al. Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons. *Am. J. Cardiol.* 2001;88:693-5.
85. Srivatsa SS, Harrity PJ, Maercklein PB, et al. Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart Valve. *J. Clin. Invest.* 1997;99:996-1009.
86. Bostrom K, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.* 2000;10:151-8.
87. Davies MR, Davies KA. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2001;60:472-9.
88. Cimini M, Bougher DR, Ronald JA, et al. Development of aortic Valve sclerosis in a rabbit model of atherosclerosis: an immunohistochemical and histological Study. *J. Heart Valve Dis.* 2005;14:365-75.
89. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, et al. Inflammatory Regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc. Pathol.* 2005;14:80-7.
90. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005;352:29-38.
91. McKenney JM. Pharmacologic options for aggressive low-density lipoprotein cholesterol lowering: benefits versus risks. *Am. J. Cardiol.* 2005;96:60E-6E.
92. Farmer JA, Gotto AM. The heart protection Study: expanding the boundaries for high-risk coronary disease prevention. *Am. J. Cardiol.* 2003;92:3i-9i.

93. Ong HT. Protecting the heart: a practical review of the statin studies. *Med. Gen. Med.* 2002;4:1.
94. Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, et al. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart* 2003; 89:993-7.
95. Kullo IJ, Edwards Wd, Schwartz RS. Vulnerable plaque: pathobiology and clinical implications. *Ann. Inter. Med.* 1998;129:1050-60.
96. Simionescu D, Iozzo RV, Kefalides NA. Bovine pericardial proteoglycan: biochemical, immunochemical and ultra structural studies. *Matrix* (1989)9(4):301-310.
97. Scott JE, Haigh M: Proteoglycan type 1 collagen fibril interactions in bone and non-calcifying connective tissues. *Biosci. Rep.* (1985) 5(1):71-81.
98. Hoshi K, Kemmotsu S, Takeuchi Y, Amizuka N, Ozawa H: The primary calcification in bones follows removal of decoring and fusion of collagen fibrils. *J. Bone Miner. Res.* (1999) 14(2):273-280.
99. Simionescu DT, Lovecamp JJ, Vyavahare NR: Extracellüler matrix degrading enzymes are active in porcine stentless aortic bioprosthetic heart valves. *J. Biomed. Mater. Res.* (2003) 66A(4):755-763.
100. Simionescu DT, Lovecamp JJ, Vyavahare NR: Glycosaminoglycan degrading enzymes in porcine aortic heart valves: implications for bioprosthetic heart valve degeneration. *J. Heart Valve Dis.* (2003) 12(2):217-225.
101. Adamczyk MM, Lee TC, Vesely I. Biaxial strain properties of elastase-digested porcine aortic valves. *J. Heart Valve Dis.* (2000) 9(3):445-453.
102. Proudfoot D, Shanahan CM: Biology of calcification in vascular cells intima versus media. *Herz* (2001) 26(4):245-251.
103. Bailey M, Pillarisetti S, Jones P et al: Involvement of matrix metalloproteinase and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc. Pathol.* (2004) 13(3):146-155.
104. Bailey MT, Pillarisetti S, Xiao H, Vyavahare NR: Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves. *J. Biomed. Mater. Res.* (2003) 66A(1):93-102.
105. Singla A, Lee CH: Effect of elastin on the calcification rate of collagen-elastin matrix systems. *J. Biomed. Mater. Res.* (2002) 60(3):368-374.
106. Schoen FJ, Levy RJ: Tissue Heart Valves: Current Challenges and future research perspectives. *J. Biomed. Mater. Res.* (1999) 47(4):439-465.

107. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA: Elastic fibres. *J. Cell Sci.* (2002) 115(Pt 14):2817-2828.
108. Pereira L, Lee SY, Gayraud B et al: pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96(7):3819-3823.
109. Bunton TE, Biery NJ, Myers L et al: Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a Mouse model of Marfan Syndrom. *Circ. Res.* (2001) 88(1):37-43.
110. Simionescu DT, Lovecamp JJ, Vyavahare NR: Degeneration of bioprothetic heart valve cusp and wall tissues is initiated during tissue preparation: an ultrastructural Study. *J. Heart Valve Dis.* (2003) 12(2):226-234.
111. Urry DW: Molecular perspectives of vascular wall structure and disease: the elastic component. *Percept. Biol. Med.* (1978) 21(2):265-295.
112. Hinek A: Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor. *Biol. Chem.* (1996) 377:471-480.
113. Mochizuki S, Brassart B, Hinek A: Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* (2002) 277(47):44854-44863.
114. Hance K, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK, Thompson RW: Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J. Vasc. Surg.* (2002) 35(2):254-261.
115. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL et al: Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z. Kardiol.* (2000) 89(suppl. 2): 63-68.
116. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R et al: Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis. *J. Heart Valve Dis.* (2004) 13(4):560-566.
117. Gadeau AP, Chaulet H, Daret D et al: Time course of Osteopontin, osteocalcin and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. *J. Histochem. Cytochem.* (2001) 49(1):79-86.
118. Baig MM, Daicoff GR, Ayoub EM: Comparative studies of the acid mucopolysaccharide composition of rheumatic and normal heart valves in man. *Circ. Res.* (1978) 42(2):271-275.

119. Hunter GK: Role of proteoglycan in the provisional calcification of cartilage. A review and reinter pretation. Clin. Orthop. (1991) (262):256-280.
120. Levy RJ, Schoen FJ, Lund SA, Smith MS.Prevention of leaflet calcification of bioprosthetic heart valves with diphosphonate injection therapy. Experimental studies of optimal dosages and therapeutic duration. J. Thorac. CArdiovasc. Surg. 1987;94:551-7.
121. Levy RJ, Wolfrum J, Schoen FJ, Hawley MA, Lund SA, Langer R. Inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by local Controlled release diphosphonate. Science 1985;71:349-56.
122. Cheng KL, Ueno K, Imamuro T. CRC Handbook of Organic Analytical Reagents. CRC Pres, Boca Raton 1982
123. McGee-Russel SM. Histochemical methods for calcium. J. Histochem. 1958;6:22-42.
124. Kratzer FH, Vohra et al. Chelates in Nutrition. CRC Pres, Boca Raton. 1986.
125. Garden J, Roberts K, Taylor A, Robinson D. Evalution of the provision of single use citric acid sachets to injecting drug users. Scuttish center for infection and environmenthal health 2003.
126. Chaberk S, Martell AE. Organic sequestering Agents. Wiley, New York, 1959.
127. Cheng KL, Ueno K, Imamura T. CRC Handbook of Organic Analytical Reagents. CRC Pres, Boca Raton, 1982.
128. -Russel SM. Histochemical methods for calcium. J. Histochem. Cytochem. 1958;6:22-42.
129. Kratzer-Vohra FH (ed.), Chelates in nutrition. CRC Pres, Boca Raton, 1986.
130. Arslan P, Di Virgilio F, Beltrame M, Tsien RY, Pozzan T. Cytosolic calcium homeostasis in Ehrlich and Yoshida cacinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free calcium. J. Biol. Chem. 1985;260:2719-2727.
131. Smith CE. Effect of GA and decalcifying agents on acid phosphomonoester hydrolase activity in the enamel organ of the rat incisor: A biochemical Study comparing enamel organ with liver. J. Histochem. Cytochem. 1980;28:689-699.
132. Yagi K.Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine.Edited by D.Armstrong.Free Radicals in Diagnostic Medicine.Plenum Press,New York,1994 :1-15

133. Reading HW, Ísbir T: Action of lithium on ATPase in transmitter release from rat Iris. *Biochem. Pharmacol.* 28:3471-3474, 1979
134. Reading HW, Ísbir T: The role of Cation-Activated ATPases in transmitter release from rat Iris. *Quart J.Expr. Physiol.* 65:105-116, 1980
135. Lowry OH, Roscbrough NJ, Randat RJ: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent *J of Biol. Chem.* 193: 265-275, 1954
136. Todd J. Anderson MD, George Wyse, MD. Effect of chelation therapy on endothelial function in patient with coronary artery disease: PATCH subStudy. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 41:420-425
137. Merril L. Knudtson, MD; D. George Wyse, MD. Chelation Therapy for Ischemic Heart Disease. *JAMA.* 2002;287:481-486.
138. Michael C. Kim, MD, Annapoorna Kini, MD. Refractory angina pectoris; Mechanism and therapeutic options. *J Am Coll Cardiol*, 2002; 39:923-934
139. Najjar DM, Cohen EJ, et al. EDTA chelation for calcific band keratopathy: results and long-term follow-up. *Am. J. Ophthalmol.* 2004;137:1056–1064.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ:

ATPaz	Adenozin-5' Triptofaz
CA	Sitrik asit
CRP	C reaktif protein
EDTA	Etilendaimintetraasetikasit
EH	Endotel hücresi
ET-1	Endotelin-1
GA	Gluteraldehit
GAG	Glikozaminoglikan
GLA	Gama karboksil glutamik asit
MDA	Malondialdehit
MVP	Mitral kapak prolapsusu
NO	Nitrik oksit
PG	Proteoglikanlar
TGF α	Tümör büyüme faktörü
TNF α	Tümör nekrotizan faktör

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ:

Sayfa NO:

Şekil1: (Sitrik Asidin Yapısal Formülü).....	29
Resim1: (Grubu (A), Çalışma grubu (B) Aort Kapak. Işık mikroskopisi.....	40
Resim2: Kontrol grubu (A), Çalışma grubu (B) Aort Kapak. (Inset X 100000) (Uranyl acetate X Lead citrate) Elektron Mikroskopisi.....	40
Resim3: Kontrol grubu (A), Çalışma grubu (B) Aort Kapak. (Inset X 100000) (Uranyl acetate X Lead citrate) Elektron Mikroskopisi	41

TABLolar ve GRAFİKLER DİZİNİ:

Sayfa NO:

Tablo1: Kontrol grubundaki doku biyokimyasal sonuçları ve kalsifikasyon derecelendirmesi.....	38
Tablo2: Çalışma grubundaki doku biyokimyasal sonuçları ve kalsifikasyon derecelendirmesi.....	38
Tablo3: Kontrol ve Çalışma grubundaki doku biyokimyasal değerleri.....	39
Tablo4: Kontrol ve Çalışma grubundaki doku biyokimyasal değerlerine göre istatistiksel sonuçlar.....	42
Grafik1: Kontrol ve Çalışma grubundaki kalsiyum değerindeki karşılaştırma grafisi.....	41
Grafik2: Kontrol ve Çalışma grubundaki fosfat değerindeki karşılaştırma grafisi.....	42