

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



**MİYOKARDİYAL İSKEMİK**  
**ARDKOŞULLANMANIN APOPTOTİK**  
**GENLER FAS, FASLG, KASPAZ 2 VE**  
**MİKRORNA-139-3P DÜZEYLERİ İLE**  
**REPERFÜZYON ARİTMİLERİ ÜZERİNE**  
**ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**Büşra TOPALOĞLU DEMİR**

**2019**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Engin ŞAHNA

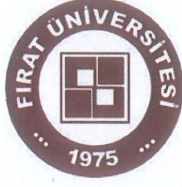
Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Kadir SERVİ

Prof. Dr. Hakan PARLAK PINAR

Prof. Dr. Engin ŞAHNA



## ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı

Büşra TOPALOĞLU DEMİR

Tarih

İmza

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Büşra', written over a horizontal line.

Danışman

Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

ELAZIĞ

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikiminden faydalandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Engin ŞAHNA' ya ve çalışmamızın biyokimyasal analizlerini yapan Tıbbi Biyoloji A.D Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ebru ÖNALAN' a teşekkür ederim.

Bu süre zarfında desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Ecz. Gülnur ASLAN' a ve Ecz. Dilan AŞKIN ÖZEK' e teşekkür ederim.

Benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili aileme ve her zaman yanımda olan değerli eşim Ecz. Özkan DEMİR' e teşekkür ederim. Ayrıca çalışmamızın gerçekleşmesine olanak tanıyan TÜBİTAK (115S323)' a teşekkür ederim.

Ecz. Büşra TOPALOĞLU DEMİR

## İÇİNDEKİLER

<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>ETİK BEYAN</b>	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iv</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>vii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>viii</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>ix</b>
<b>1. ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>3. GİRİŞ</b>	<b>5</b>
3.1. İskemik kalp hastalıkları	5
3.2. Miyokard infarktüsü	5
3.2.1. Miyokardiyal İskemi – Reperfüzyon Hasarı	6
3.2.2. Miyokardiyal I/R hasarı ve malondialdehit	7
3.3. Kardiyak aritmiler	8
3.3.1. Reperfüzyon aritmileri	8
3.3.2. Reperfüzyon aritmilerinin patofizyolojisi	10
3.4. Miyokardiyal I/R hasarı ve apoptoz	11
3.4.1. Miyokardiyal I/R hasarı ve apoptozda Fas ve Faslg	11
3.4.2. Miyokardiyal I/R hasarı ve apoptozda Gadd45a geni	12
3.5. I/R hasarı tedavi yöntemleri	13
3.5.1. Farmakolojik tedavi	13
3.5.2. Mekanik tedavi	14
3.5.2.1. Miyokardiyal İskemik Koşullanma	15
3.5.2.1.1. İskemik önkoşullanma	16
3.5.2.1.2. İskemik ardkoşullanma	17
3.5.2.1.3. Uzaktan iskemik koşullanma	17
3.5.2.1.4. Farmakolojik koşullanma	18

3.6. MikroRNAlar	19
3.6.1. Miyokardiyal I/R ve Hücre Ölümünde MikroRNAlar	20
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>23</b>
4.1. Deney hayvanları	23
4.2. Deney planı	23
4.3. Cerrahi uygulamalar	24
4.3.1. I/R uygulama	24
4.4. Biyokimyasal parametreler	25
4.5. İstatistik	26
<b>5. BULGULAR</b>	<b>28</b>
5.1. I/R ve IPostC' nin MDA üzerine etkisi	28
5.2. I/R ve IPostC' nin apoptoz genleri Fas, Faslg, Gadd45a ve kaspaz 2 mRNA ekspresyonlarına etkisi	29
5.3. I/R ve IPostC' nin miRNA-139-3p mRNA ekspresyonuna etkisi	33
5.4. I/R ile görülen aritmi değerlendirmesi	34
<b>6. TARTIŞMA</b>	<b>35</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>39</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>46</b>

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1: I/R sırasında gözlemlenen ventriküler atım sayıları ve taşikardi insidansları	34
--	----



## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1:</b> I/R ve IPost C' nin MDA üzerine etkisi	28
<b>Şekil 2:</b> I/R ve IPostC' nin Fas mRNA ekspresyonuna etkisi	33
<b>Şekil 3:</b> I/R ve IPostC' nin Faslg mRNA ekspresyonuna etkisi	29
<b>Şekil 4:</b> I/R ve IPostC' nin Gadd45a mRNA ekspresyonuna etkisi	30
<b>Şekil 5:</b> I/R ve IPostC' nin kaspaz 2 mRNA ekspresyonuna etkisi	31
<b>Şekil 6:</b> I/R ve IPostC' nin miRNA-139-3p mRNA ekspresyonuna etkisi	32





## KISALTMALAR LİSTESİ

I/R	: İskemi/Reperfüzyon
IPostC	: İskemik ardkoşullanma
Cybb	: Sitokrom b-245 beta zinciri
MiR-, miRNA	: MikroRNA
MiRNA-139-3p	: MikroRNA-139-3p
MDA	: Malondialdehit
KAH	: Koroner arter hastalığı
AKS	: Akut koroner sendrom
STEMI	: ST-segment elevasyonlu miyokardiyal infarktüs
NSTEMI	: Non ST-segment elevasyonlu miyokardiyal infarktüs
UA	: Unstabil angina pectoris
MI	: Miyokard infarktüsü
NOX	: NADPH oksidaz
Enos	: Endotelial nitrik oksit sentaz
O <sup>2-</sup>	: Süperkoksit anyon radikali
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipokloröz asit
OH <sup>-</sup>	: Hidroksil anyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
Ca <sup>2+</sup>	: Kalsiyum
MPTP	: Mitokondriyal permeabilite transizyon poru
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
Mg <sup>2+</sup>	: Magnezyum
Na <sup>+</sup>	: Sodyum

Faslg	: Fas ligandı
FoxO	: Forkhead box O
RISK	: Reperfüzyon hasarı kurtarma kinaz
EDTA	: Disodyum etilen diamin tetraasetik asit
IPC	: İskemik ön koşullanma
RIC	: Uzaktan iskemik koşullanma
SAFE	: Sağ kalımı aktive edici faktör artırma
PI3K	: Fosfoinositol-3 kinaz
ERK	: Hücre dışı sinyal ayarlı kinaz <sup>1/2</sup>
mK-ATP	: Mitokondriyal potasyum-ATP kanalı
NO	: Nitrik oksit
GLP-1	: Glukagon benzeri peptit-1
TRBP	: Transaktivasyon RNA - bağlayıcı protein
mRNA	: Mesajcı RNA
PDCD4	: Programlanmış hücre ölümü 4
AP1	: Aktive edici protein 1

## 1. ÖZET

İskemik ardkoşullanma (IPostC), uzun süreli iskemiden hemen sonra uygulanan kısa iskemi/reperfüzyon (I/R) bölümleri olup, miyokard enfarktüsünün boyutunu kısıtlayan ve I/R hasarını azaltan en güçlü mekanizmalardan biri olarak kabul edilir.

Bu çalışmada, proapoptotik genler Fas, Faslg, büyüme durması ve DNA hasarına neden olan 45 alfa (Gadd45a), antiapoptotik gen kaspaz 2 ve mikroRNA-139-3p (miRNA-139-3p)' nin I/R hasarındaki rolleri ve IPostC' nin bu genler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca IPostC' nin oksidatif stresle ilişkili malondialdehit (MDA) düzeylerine, reperfüzyondaki ventriküler ekstrasistol sayıları ve ventriküler taşikardi insidanslarına etkileri incelendi.

Sprague Dawley cinsi 300±50 g ağırlığında 66 adet yetişkin erkek sıçan kullanıldı. Aritmiler ve MDA düzeylerinin değerlendirilmesi için 7 dakika iskemi, 7 dakika reperfüzyon uygulandı. Apoptotik yolakla ilişkili moleküler parametrelerin değerlendirilmesi için 30 dk iskemi, 120 dk reperfüzyon uygulandı. IPostC ise 10 saniye iskemi, 10 saniye reperfüzyon üç kür şeklinde uygulandı. Deney boyunca EKG, kan basıncı ve kalp hızı kaydedildi. MDA düzeyleri spektrofotometre, gen seviyeleri ve miRNA-139-3p ise qRT-PCR ile ölçüldü.

I/R ile MDA, Fas ve Faslg genleri kontrol grubuna göre anlamlı arttı. IPostC tedavisiyle Fas, Faslg, Gadd45a anlamlı azaldı, miRNA-139-3p anlamlı arttı. Kaspaz 2 geni I/R grubunda (0,19±0,05) kontrol grubuna (1,00±0,09) göre anlamlı azalırken, IPostC uygulaması ile (0,36±0,05) anlamlı arttı. I/R+IPostC grubunda reperfüzyondaki ventriküler ekstrasistol sayıları (3,86±1,23) ve

ventriküler taşikardi insidansı (% 14,3), I/R grubuna (25,29±8,65, % 51,9 sırasıyla) göre anlamlı azaldı.

IPostC' nin Fas, Faslg, Gadd45a ve kaspaz 2 genleri ve ilişkili miRNA-139-3p ile apoptozu düzenleyerek I/R hasarında koruyucu olabileceği düşünülebilir. Bu özellikleri ile IPostC uygulaması reperfüzyon aritmelerini de önleyebilir.

**Anahtar kelimeler:** iskemik ardkoşullanma, aritmi, apoptoz, miRNA-139-3p, Fas, Faslg, kaspaz 2.



## 2. ABSTRACT

### **The effects of myocardial ischemic postconditioning on the levels of apoptotic genes Fas, Faslg, caspase 2 and microRNA-139-3p with reperfusion arrhythmias**

Ischemic postconditioning (IPostC) is short I/R sections that are administered immediately after long-term ischemia and is considered as one of the strongest mechanisms limiting the size of myocardial infarction and reducing I/R injury.

The aims of this study were to investigate proapoptotic genes Fas, Faslg, 45 alpha (Gadd45a) genes that cause growth arrest and DNA damage, an antiapoptotic gene Caspase 2 and microRNA-139-3p (miRNA-139-3p) on the I/R injury and to determine possible beneficial effects of IPostC on these genes. In addition, the effects of IPostC on oxidative stress-related malondialdehyde (MDA) levels, number of ventricular extrasystole in reperfusion and incidence of ventricular tachycardia were investigated.

Sixty-six adult male Sprague Dawley rats weighing  $300\pm 50$  g were used in the study. 7 min ischemia and 7 min reperfusion were applied for evaluation of MDA and arrhythmias. Molecular parameters associated with apoptotic pathway were evaluated by 30 min ischemia and 120 min reperfusion. IPostC was induced with 3 cycles of I/R (10 s each) after 30 min ischemia. ECG, blood pressure and heart rate were recorded throughout the experiment. MDA levels were determined by spectrophotometer, gene levels and miRNA-139-3p by qRT-PCR.

MDA, Fas and Faslg genes were significantly increased with I/R compared to control group. Fas, Faslg, Gadd45a were significantly decreased and miRNA-139-3p increased significantly with IPostC treatment. Caspase 2 gene decreased significantly in I/R group ( $0,19 \pm 0,05$ ) compared to control group ( $1,00 \pm 0,09$ ), but increased significantly with IPostC application ( $0,36 \pm 0,05$ ). In the I/R+IPostC group, the number of ventricular extrasystoles in reperfusion ( $3,86 \pm 1,23$ ) and the incidence of ventricular tachycardia (14,3%) were compared to the I/R group ( $25,29 \pm 8,65$ ; 51,9%, respectively) significantly decreased.

IPostC may be thought to be protective of I/R injury by regulating apoptosis with the Fas, Faslg, Gadd45a, caspase 2 genes and related miRNA-139-3p. In addition to these features, IPostC application can prevent reperfusion arrhythmias.

**Keywords:** Ischemic postconditioning, arrhythmia, apoptosis, miRNA-139-3p, Fas, Faslg, caspase 2.

### 3. GİRİŞ

#### 3.1. İskemik kalp hastalıkları

İskemik kalp hastalıkları (İKH) genellikle kalbi besleyen damarlardaki ateromatöz değişiklikler sonucu görülür. Bu süreç endotel disfonksiyonu ile tetiklenir. Aşırı stres, serbest radikallere bağlı oksidasyon hasarı, kronik enfeksiyon veya hiperkolesterolemi gibi birçok faktörün birinden veya kombinasyonundan oluşabilir. İKH' da tip II diyabet, hipertansiyon, sigara kullanımı, obezite ve metabolik sendrom değiştirilebilir risk faktörleri arasında yer alırken, yaş, cinsiyet ve aile öyküsü önlenemeyen risk faktörlerindedir (1).

İKH ve onun major komplikasyonu akut koroner sendrom (AKS) dünyadaki önde gelen morbidite ve mortalite nedenleri arasındadır. İKH, WHO'nun 2018 yılı bildirisine göre dünyada ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır (2).

#### 3.2. Miyokard infarktüsü

Miyokard infarktüsü (MI), ekonomisi gelişmiş ülkelerde yüksek mortaliteye yol açan kardiyovasküler hastalıkların en sık nedenidir. MI, infarkt alanında iskemi ve hipoksi sonucu ortaya çıkan oksidatif stres ve inflamasyonun neden olduğu akut kardiyak hasarla sonuçlanır (3).

Uzun süreli iskeminin miyokarda nekroza ve fonksiyon kaybına neden olduğu bilinmektedir. Miyokarda, iskemiden etkilenen alanın hızlı reperfüzyonu halen akut MI için altın standart tedavi yöntemidir; ancak reperfüzyon da kan akımını iyileştiren faydalara karşılık 'reperfüzyon hasarı' olarak adlandırılan bazı

olumsuzluklara neden olabilir. Oksidatif stres, hücre içinde kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) artışı, hızlı pH değişimi gibi birçok faktör bu hasara sebep olabilir (4).

### 3.2.1. Miyokardiyal İskemi – Reperfüzyon Hasarı

İskemi reperfüzyon (I/R), bir organda kan akışının durmasının akabinde tekrar kanlanmasını takip eden patofizyolojik stres durumudur. İskeminin şiddeti ve süresi, hücre işlev bozukluğu ve / veya ölüm derecesini belirler. Reperfüzyon yokluğunda miyokard iskemisi, miyokardın % 70' ine kadar enfarktüs büyüklüğüne neden olabilir; ancak zamanında reperfüzyon ile infarkt büyüklüğü % 30' a düşebilir (4). Kardiyak hasar; anaerobik glikolizin başlaması, hücre içi ATP seviyelerinde düşüş ve asidozda hızlı bir artış ile karakterize edilen miyokard iskemisi ile başlar. Erken koroner reperfüzyon infarkt boyutunu sınırlasa da, doku hasarını yoğunlaştıran lokal ve sistemik inflamasyonun artışına neden olur; bu fenomen, I/R hasarı olarak bilinir (5). I/R hasarı, bir organa kan tedarikini tehlikeye atabilecek herhangi bir durumdan kaynaklanabilir. Vasküler tromboz, ateroskleroz, arteriyel hipotansiyon, organ nakli, kardiyopulmoner baypas, uyku apnesi ve orak hücre hastalığı bu sebeplerden bazılarıdır (6).

I/R' ye bağlı miyokardiyal hasar; kalbin kasılma fonksiyonunun kaybı, aritmiler, apoptoz ve irreverzibl miyosit hasarını içerir (7). Oksidatif stres, önemli bir I/R hasarı faktörüdür. I/R hasarı ile ilişkili oksidanlar; ksantin oksidaz, NADPH oksidaz (NOX) ve bağlanmamış endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) gibi bileşenleri içeren çeşitli enzim sistemleri tarafından üretilir (8). Oksidatif stres esas olarak, süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hipokloröz asit (HOCl) ve hidrosil anyonu ( $OH^-$ ) gibi toksik oksidanların



oluşmasına neden olur. Bu reaktif oksijen türleri (ROS), I/R hasarının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir (7). Bu radikaller, membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu ve bunları takiben apoptoz, nekroz ve otofaji yollarını aktive ederek hücre ölümüne neden olurlar (9, 10).

I/R sırasındaki ROS ve  $Ca^{2+}$  aşırı yükü; ATP ve ROS üretimini etkileyerek, iyonik dengesizliklere ve hücrelerin şişerek parçalanmasına yol açan mitokondriyal permeabilite transizyon porunun (MPTP) açılmasına yol açar. Otofaji, I/R hasarı sırasında artarken reperfüzyon sırasında gelişen disfonksiyonel mitokondriyi tamamen ortadan kaldıramaz. Bu durum, I/R hasarı sırasında salınan yüksek miktarlarda ROS ve  $Ca^{2+}$  aşırı yükünün, MPTP' nin açılmasını tetikleyen ve sonuçta hücre ölümüne yol açan otofaji kapasitesini baskılayabildiğini göstermektedir. Otofajinin bloke edilmesinin doku hasarını artırmasının aksine, farmakolojik indüksiyonunun I/R hasarında koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (11, 12).

### **3.2.2. Miyokardiyal I/R hasarı ve malondialdehit**

ROS' lar hücre disfonksiyonu, nekroz veya apoptoza yol açan oksidasyona ek olarak; kalpteki önemli hücresel proteinlerin ve sinyal yollarının fonksiyonunu değiştirerek spesifik translasyon sonrası modifikasyonlara neden olur (13). Oksidatif stresin kardiyovasküler patofizyolojideki önemli rolü, ROS' un hastalık sürecini yansıtan umut verici bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmüştür.

Oksidatif stresin biyobelirteçleri, mikro-ortamdaki ROS ile etkileşimleriyle modifiye edilmiş moleküller ve artmış redoks stresine cevaben

değişen antioksidan sistemin molekülleri olarak sınıflandırılabilir. DNA, lipitler (fosfolipitler dahil), proteinler ve karbonhidratlar in vivo olarak aşırı ROS ile modifiye edilebilen molekül örnekleridir. Reaktif çift bağlardan zengin moleküler yapıdaki lipitlerin peroksidasyonu ile önemli biyobelirteçlerden olan toksik malondialdehit (MDA) oluşur. MDA, membranlarda reseptörlerle ve enzimlerle etkileşime girerek ateroskleroz gibi büyük sorunlara yol açar (14). Bu önemli oksidanın DNA' da mutasyonlara neden olarak kanser ve genetik hastalıklara zemin hazırladığı düşünülmektedir (15).

### **3.3. Kardiyak aritmiler**

Kardiyak aritmiler, miyokardiyumun normal aktivasyonu sırasındaki herhangi bir anormalliği ifade eder. Aritmiler hızına (taşikardi, bradikardi), mekanizmasına (otomatisite, re-entry, tetiklenen gibi), süresine (izole erken atım, çift atım gibi) veya orijin bölgesine göre sınıflandırılabilir. Bazı aritmiler klinik öneme sahip olmamakla birlikte, bazıları da felç gibi komplikasyonlara zemin hazırlayan yapısal kalp hastalıklarının göstergesi olabilir, hemodinamiğin bozulmasına ve kardiyak arreste neden olabilir (16).

#### **3.3.1. Reperfüzyon aritmileri**

Akut miyokard iskemisine, yüksek potasyum ( $K^+$ ), lisofosfoglisitler ve adozin konsantrasyonları, artan laktat ve karbondioksit ( $CO_2$ ) üretimi, asidoz ve katekolamin salınımı gibi hücre dışı; asidoz, yüksek konsantrasyonlarda siklik adozin monofosfat (cAMP),  $Ca^{2+}$ , magnezyum ( $Mg^{2+}$ ) ve sodyum ( $Na^+$ ) iyonları gibi hücre içi değişiklikler eşlik eder. Bu biyokimyasal ve metabolik

değişiklikler, farklı aritmi formlarına neden olan, iç ve dış transmembran mevcut iyonik akışını değiştirir (17).

I/R, hücresel hasara ek olarak ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyonu içeren çeşitli aritmileri indükleyebilir. Aritmiler reperfüzyon sırasında veya hemen sonrasında görülür. İskemi boyunca membran potansiyellerinin depolarizasyon hızı ve refrakter periyotları miyokarda iskemik ve iskemiden etkilenmeyen bölgeler arasında gösterilmiştir. Reperfüzyonla, depolarizasyon sıklığı gibi bazı parametreler hızlı bir şekilde restore edilirken, refrakter periyodu da aynı anda onarılmadığından senkronizasyon sağlanamamakta ve bu durum aritmileri artırabilmektedir.

Aritmiler özellikle trombolizden sonra, reperfüze ST-segment elevasyonlu miyokardiyal infarktüs (STEMI) hastalarında sıklıkla bulunur. Aslında erken reperfüzyon aritmileri, erken kan artışı ile birlikte hücre içi biyobelirteçlerin, başarılı reperfüzyonun ve miyositlerin dayanma gücünün kanıtı olarak kabul edilir (18).

Klinik olarak, reperfüzyon aritmileri, erken ventriküler komplekslerden ventriküler fibrilasyona kadar değişen ventriküler aritmilerden oluşur; ancak esas olarak hızlandırılmış idioventriküler ritimlerden oluşur. Bu aritmiler, reperfüze olmuş alandan bir köken ile tutarlı bir konfigürasyona sahiptir. İlk zamanlarda tıkalı damarın yeniden açılması gibi yararlı bir işaret olarak düşünülürken, daha yakın tarihli çalışmalarda aritmiler olmadan reperfüzyonun risk altındaki eşit başlangıç alanlarına rağmen daha küçük infarktlara yol açtığı gösterilmiştir (19-21).

### 3.3.2. Reperfüzyon aritmelerinin patofizyolojisi

Reperfüzyon aritmelerinin ardındaki patofizyolojik süreç henüz tam olarak anlaşılamasa da ilgili bazı durumlar bilinmektedir. Gecikmiş depolarizasyonlar reperfüzyon aritmelerinin en sık görülen muhtemel elektrofizyolojik nedenidir. Gecikmiş depolarizasyonlar önceki aksiyon potansiyelinin repolarizasyonunun tamamlanmasından sonra ortaya çıkan membran potansiyeli salınımlarıdır. Diğer patolojilerde olduğu gibi, gecikmiş depolarizasyonlar reperfüzyondan sonra hücre içi aşırı  $Ca^{2+}$  yüklemesinden kaynaklanır ve  $Ca^{2+}$ 'nin hücreye girişi üzerine sarkoplazmik retikulum tarafından salınımıyla daha da artar (22). Depolarizasyon akımı için eşik değere ulaşıldığında, kendiliğinden bir aksiyon potansiyeli ortaya çıkacaktır. Bu aksiyon potansiyeli, tekrar kendi kendine devam eden ritmik aktivite ile sonuçlanan bir postpotansiyele neden olabilir. Hızlandırılmış idioventriküler ritimler, gecikmiş depolarizasyonlar ile ilişkili ritimlerle tutarlı özelliklere sahiptir (23).

Hücre içi aşırı  $Ca^{2+}$  yükü yukarıda tarif edildiği gibi oksidatif fosforilasyonun ayrılmasıyla reperfüzyon aritmelerine neden olabilir. Oksidatif fosforilasyonun ayrılması, ATP konsantrasyonlarının azalmasına neden olarak  $K^+$  - ATP kanallarının kapanmasıyla aksiyon potansiyelinin kısılmasına neden olur (24).

Reperfüzyon hasarının elektrobiyolojik belirteci olan reperfüzyon aritmeleri, infarkt alanını azaltma stratejilerine odaklanan klinik çalışmalarda rapor edilmektedir. Yukarıda belirtilen patofizyoloji ve klinik gözlemler reperfüzyon

aritmlerinin reperfüzyon hasarını azaltma stratejileri ve risk sınıflandırmasında önemli, erken ve benzersiz bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir (25).

### **3.4. Miyokardiyal I/R hasarı ve apoptoz**

Apoptoz, temelde DNA merkezli aksaklıklardan kaynaklanan, enerji tüketimiyle hücre ölümü şeklidir. Apoptotik hücre ölümünün başlamasındaki en önemli olay MPTP' nin açılmasıdır (26). MPTP' nin oluşumu ve açılması, dış zarın yırtılmasıyla sonuçlanarak; kaspaz kaskadının aktifleştiği sitozole, sitokrom C' nin salıverilmesine neden olur. Bcl ailesinin proapoptotik ve antiapoptotik proteinleri MPTP ile etkileşime girer (27).

#### **3.4.1. Miyokardiyal I/R hasarı ve apoptozda Fas ve Faslg**

Hücre apoptozunun oluşumu ve gelişimi çoklu sinyal yolu ile düzenlenir. Fas/Fas ligandı (Faslg) sinyal yolu, miyokardiyal hücre apoptozu ile yakından ilişkilidir. Apo1 veya CD95 olarak da bilinen Fas, çeşitli hücre yüzeylerinde yaygın olarak bulunan bir transmembran glikoproteinidir. Tümör nekroz faktörü reseptörü ve sinir büyüme faktörü reseptörü ile homologdur. Fas ligandı Faslg ise, bir tip II transmembran glikoproteinidir.

Fas/Faslg sisteminin çeşitli kardiyovasküler hastalıkların oluşumuna ve gelişimine katıldığı kanıtlanmıştır (28). Koroner arter ligasyonu yöntemiyle oluşturulan miyokardiyal I/R modeli içeren bir çalışmada, Fas/Faslg protein ekspresyonunun I/R süresiyle doğru orantılı olarak arttığı bulunmuştur (29). Çalışmamızda I/R' de miyokard hücrelerinde Fas/Faslg seviyelerinin yükseldiği doğrulandı. İn vitro ortamda miyokardiyal I/R modelinde Fas ve Faslg genleri

aşırı eksprese edilmiştir (30). Başka bir çalışmada MI 2 saat sürdüğünde apoptotik hücrelerin seviyeleri % 90 civarında iken, süre uzatıldığında Fas mRNA ekspresyonunun kademeli olarak arttığı bulunmuştur (31). Hücre apoptozunun veya Fas/Faslg sisteminin blokajı miyokardiyal I/R' nin önlenmesi ve tedavisi için yeni bir yaklaşım olabilir.

### **3.4.2. Miyokardiyal I/R hasarı ve apoptozda Gadd45a geni**

Otofajinin indüklenmesinde rol alan Forkhead box O (FoxO)' lar süperoksit dismutaz, katalaz gibi kardiyoprotektif antioksidan enzimleri ve Gadd45a genini hedefleyerek oksidatif strese karşı koruyucu bir role sahiptir. Oksidatif streste antioksidan, antiapoptotik ve otofaji genlerinin aktivasyonu yoluyla FoxO' ların aracılığıyla kardiyovasküler koruma sağlanır. FoxO' nun doğrudan hedefi ve bir DNA onarım proteini olan Gadd45a' nın ekspresyonu oksidatif stresi indükleyen paraquat ile artmıştır. Gadd45a geni I/R hasarında proapoptotik olarak rol oynamaktadır (32).

### **3.4.3. Miyokardiyal I/R hasarı ve apoptozda Kaspaz 2**

Kaspazlar, apoptozun kapsamlı efektörleri olan bir sistein proteaz ailesidir. Bu aileden olan kaspaz 2' nin inhibisyonu, sırasıyla endoplazmik retikulum  $Ca^{2+}$  pompasını ve golgi taşınımını inhibe eden apoptoz ajanlarından korunmuş hücreleri bloke etmiştir (33). Kaspaz 2 ekspresyonunun baskılanması, otofajiyi indükleyen FoxO' ları kodlayan mRNA' nın ekspresyonunun azalmasına neden olur. Bunun sonucunda, antioksidan süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin hedef genlerin ekspresyonunu azalttığı bilinmektedir. Bu antioksidan

eksikliđinin, kaspaz 2 bulunmayan hücrelerde tespit edilen yüksek ROS seviyelerine neden olduğu görölmektedir (34).

### **3.5. I/R hasarı tedavi yöntemleri**

I/R hasarının etkilerini en aza indirmek ve ortadan kaldırmak için çeşitli terapötik stratejiler araştırılmış ve araştırılmaya devam edilmektedir. Tedavi yaklaşımları iki ana gruba ayrılabilir: farmakolojik ve mekanik yaklaşımlar.

#### **3.5.1. Farmakolojik tedavi**

I/R hasarından korunmak için farmakolojik yollar arasında antioksidanlar, anti-CD18 antikoları gibi antiinflamatuvar ajanlar (35) veya P-selektin antagonisti (36), son zamanlarda ise reperfüzyon hasarı kurtarma kinaz (RISK) yolundaki hedefler (37) ve MPTP yer alır. Asetil salisilik asit, klopidogrel, beta blokerler, kalsiyum kanal blokerleri, nitrogliserin ve nitratlar, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, lipit düşürücü ajanlar (statinler), ranolazin, ivabradin, nikorandil ve trimetazidin gibi ilaçlar iskemik kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılırlar. Fasudil, allopurinol ve molsidomin ise iskeminin tedavisinde etkili diğer farmakolojik ajanlardır (38).

Disodyum etilen diamin tetraasetik asitin (EDTA) seri infüzyonlar şeklinde uygulanmasını içeren şelasyon tedavisinin ise oksidatif stresi azaltarak aterosklerotik damarda kan akımını iyileştirdiği, anginayı tedavi ettiği ve kardiyak olaylara karşı koruyucu olduğu öne sürölmüştür. FDA kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde ve bu hastalıklara karşı korunmada bu tedavinin uygulanabilirliğini henüz onaylamamıştır (39). Serelaksin, tolvaptan ve

omekamtiv mekarbil gibi yeni ilaçlar ise kalp yetmezliği tedavisinde ümit vaad etmektedir.

### **3.5.2. Mekanik tedavi**

Son 30 yıldır üzerinde yoğunlaşılın reperfüzyon hasarının tedavisi, başlangıçta klinik çalışmalara çevrilmesinde zorluk çekilen hayvan modellerinde çalışılmıştır. Bu çalışmalar, reperfüzyonun başlangıcında tedaviye başlandığında farmakolojik ajanlarla olduğu gibi mekanik tedaviyle de reperfüzyon hasarını önlemenin mümkün olduğunu ortaya koymaktadır.

Bahsedilen bu çalışmalar sonucunda koroner arter bypass, anginası olan hastalar için standart bir prosedür haline gelmiştir. Bazı kötü sonuçlara rağmen zamanla geliştirilerek, MI' da girişimsel tedavi seçeneği haline gelmiştir. Daha sonra I/R hasarına karşı koruma sağlayabilecek kardiyopleji ve hipotermi gibi teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerin başarısı, iskemi indüklenmeden önce uygulanmalarına dayanmaktadır.

1970' lerde perkütan koroner girişim yöntemiyle akut MI gelişiminin ortasında bile, perfüzyon açığı hafifletilerek koroner arterlerdeki engeller kaldırılmaya başlandı. Zamanında primer anjiyoplasti akut iskemi tedavisi için altın standart olarak kabul edilse de, reperfüzyona geçme zamanının tedavideki başarının anahtarı olduğu kısa sürede anlaşılmıştır.

1990'lardan itibaren; kameralı, lazerli, ilaç salınımlı ve/veya koroner arterlerde yok olan ustaca geliştirilmiş stentler, ilaç kaplı kateterler ve iskemik



koşullanma yöntemleri geliştirilerek miyokardiyal hasar ve ileri trombozdan korunma hedeflenmektedir (40).

### 3.5.2.1. Miyokardiyal İskemik Koşullanma

İskemik koşullanma; kalpte, kalpten uzak doku veya organlarda lokal olarak gerçekleştirilen, I/R hasarını azaltarak kardiyak korumayı indükleyen, tekrarlanan kısa I/R bölümleridir. İskemik ön koşullanma (IPC), tekrarlanan kısa I/R bölümlerinden hemen önce; iskemik perkoşullanma ise I/R esnasında uygulanır (41, 42). Lokal iskemik koşullanma; sadece iskemik ön- ve ardkoşullanma (IPostC) olarak uygulanabilirken, uzaktan iskemik koşullanma; iskemik ön-, per- veya IPostC' yi içerir. Uzaktan iskemik koşullanma (RIC), uzuv üzerine yerleştirilmiş bir tansiyon manşetinin şişirilip söndürülmesi ile indüklenebileceği için klinik uygulamada basittir (42).

İskemik koşullanmaya, komplike olan ancak iyi tanımlanmış RISK ve sağ kalımı aktive edici faktör artırma (SAFE) yolları aracılık eder. Bir dizi hücre yüzeyi G proteinleri ile birleşik reseptörler, fosfoinositol-3 kinaz (PI3K), Akt ve hücre dışı sinyal ayarlı kinaz  $1/2$  (ERK) gibi hücre içi sinyal moleküllerini kullanarak, kademeli olarak hayatta kalma basamaklarını başlatır. Bu yollar, MPTP' nin açılmasının engellenmesi, mitokondriyal elektrokimyasalların ayrışmasının önlenmesi, membran potansiyelinin düşmesi, ATP tüketimi, sitokrom C salınımı, hiperkalsemi ve sonuçta hücre ölümü gibi koşullanmada yaygın son basamaklarla mitokondriyal K-ATP kanalı (mK-ATP) üzerinde birleşir (43, 44).

### 3.5.2.1.1. İskemik önkoşullanma

IPC, kalpte öldürücü I/R hasarına karşı en güçlü koruyucu mekanizmalardan biri olarak ortaya çıkmıştır. Daha uzun bir iskemiden hemen önce tekrarlayan I/R' nin kısa bölümleri, enfarktüs boyutunu önemli ölçüde azaltır, kardiyak fonksiyonu korur ve aritmi insidansını azaltır (45-48). Bununla birlikte, IPC' nin insanlarda klinik terapötik uygulamaya çevrilmesi, öngörülemeyen akut MI ve IPC' nin koruyucu etkilerinin sınırlı zaman içinde ortaya çıkması nedeniyle çok zor olmuştur.

IPC bir yandan reperfüzyon hasarının öldürücülüğünü kanıtlarken, diğer yandan farmakolojik olmayan kardiyak korumanın prototipidir. Murry ve ark. tarafından, tesadüfen uzun süreli I/R' den önce, kısa süreli periyotlar halinde I/R tekrarının köpeklerde enfarktüs boyutunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Miyokarddaki bu koruma herhangi bir yardımcı kan akımından etkilenmemiştir; ancak iskemi süresi 2 veya 3 saate uzatıldığında IPC etkisiz kalmıştır (49). Yani IPC' nin gecikmesi iskemik hasarı önleyememektedir.

IPC ile indüklenen kardiyak korumanın altında yatan mekanizmalar, mevcut endojen sinyal moleküllerinin aktivasyonuna dayanır (50). Bu moleküller, intraselüler mediyatör basamakları ve miyositleri stabilize eden, onların ölümlerini önleyen farklı efektörlerin aktivasyonunu tetikler. Farklı türlerde birçok sinyal yolağı keşfedilmiştir. Nitrik oksit (NO), protein kinaz aktivasyonu ve MPTP' nin açılması IPC' nin sinyal yollarında vazgeçilmez unsurlar olarak kabul edilir (51).

### **3.5.2.1.2. İskemik ardkoşullanma**

Zhao ve ark., uzun süreli I/R' den hemen sonra yapılan kısa I/R bölümlerinin köpeklerdeki nihai enfarktüs boyutunu azalttığını göstererek bu fenomeni IPostC olarak adlandırmıştır. Staat ve ark. ise, erkek STEMI hastalarında, primer anjiyoplasti sonrasındaki 1 dakika içinde, balonu 1 dakikalık bir döngüde şişirip söndürerek benzer bir protokol uygulamıştır. Sonuçta kreatin fosfokinaz eğrisinin altında kalan alan % 34 oranında azalmıştır. Bununla birlikte, IPostC' nin STEMI' de daha geniş randomize klinik çalışması nötr olarak değerlendirilmiştir.

IPostC' de, çoklu kısa I/R bölümleri gerçekleştirilerek hemen ardından damarın reperfüzyonu izlenir. Teorik olarak, bu durumun iskemik miyokardiyumun normal kan akışına yeniden adapte olabilmesi için daha fazla zaman vermesi, hücrelerin hızlıca yeniden oksijenlenmesinin zararlı etkilerini azaltması ve potansiyel olarak hücre zarı yırtılmasını önlemesi gerekir. IPostC' nin enfarktüs boyutu üzerindeki etkisi başlangıçta hayvan çalışmalarında ümit verici görünmekle birlikte, insanlarda daha hassas ölçüm yöntemleri kullanıldığında enfarktüs alanının daha küçük veya kalıcı olmayan bir azalmaya eğilimi gibi karışık sonuçlar vermiştir (52). Bununla birlikte, IPostC' nin hayvan ve insan çalışmalarında reperfüzyon aritmeleri üzerinde potansiyel olarak faydalı olduğu gösterilmiştir (53, 54).

### **3.5.2.1.3. Uzaktan iskemik koşullanma**

IPC' den yola çıkılarak geliştirilen RIC, bir veya daha fazla kısa, odak iskemisi döngüsünün ardından reperfüzyonun uzak organlarda daha sonraki

şiddetli iskemilerde koruyuculuk gösterdiği sistemik bir protektif stratejidir (55). RIC genel olarak, kanın perfüzyonunu bloke eden basınca bağlı şişirilmiş tansiyon manşonlarıyla uzuvlar üzerinde gerçekleştirilmektedir (56).

RIC' in beyni koruma mekanizmaları net değildir; ancak iskemik hasara karşı serebral toleransı arttırdığı, serebral enfarktüs riskini azaltıp perfüzyon durumunu iyileştirdiği ve serebral kollateral oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (57, 58). Geleneksel tedavilere kıyasla RIC, non-invaziv, uygun maliyetli, kolay uygulanabilir ve güvenli olduğundan klinikte umut vericidir.

#### **3.5.2.1.4. Farmakolojik koşullanma**

Miyokardiyal iskemik koşullanmanın etkilerinin ve fizyolojisinin aydınlatılmasından sonra koruyuculuğu arttırmak için yeni terapötik hedefler geliştirilmiştir. İskemik koşullanma adenosin sinyal yollarıyla ilişkili bulunmuştur (59). Anestezi uygulanmış köpeklerde yapılan son çalışmalarda, allogliptin ile sağlanan kardiyoprotektif etkinin RISK yolları aktifleştiği halde adenosin A1 reseptörünün blokajı ile kaldırıldığı gösterilmiştir. Adenosin, glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1) sinyalleri ve kardiyoprotektif aşırım arasında bir etkileşim olduğu öne sürülerek (60), GLP-1' in bazı etkilerinin mK-ATP kanalına bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu durum mK-ATP bloke edici ajan glibenklamid ile baskılanan sıçan aortunun konsantrasyona bağlı gevşediğini ifade eder. Glibenklamid ayrıca GLP-1 ile yapılan önkol kan akımı çalışmalarında insanlarda arterlerdeki akış aracılı dilatasyonu da inhibe etmiştir (61). Adenosin ve GLP-1 agonistleri dışında uçucu anesteziklerin de kalpte koşullanma etkisi oluşturduğu gösterilmiştir (62).

### 3.6. MikroRNAlar

MikroRNAlar (miRNAlar, miRler) ~22–24 nükleotid uzunluğunda, kodsuz RNA dizileridir. Primer işlevleri gen ekspresyonlarının ince ayarının, doku gelişiminin ve homeostazinin kontrolüdür (63). Pre-miRNA DNA' dan RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlenir. Çeşitli enzimlerle modifikasyon sonrasında sitoplazmaya taşınır. Olgun miRNA, Dicer, argonaute 2 ve transaktivasyon RNA - bağlayıcı protein (TRBP) ile RNA - indüklenmiş susturma kompleksini (RISC) oluşturur (64). MiRNAlar hedef mesajcı RNAların (mRNA) 3' çevrilmemiş bölgelerinden 8 nükleotidlik çekirdek dizisi boyunca bağlanır. Olgun miRNA'nın yarı - tamamlayıcılığı ile hedef mRNA translasyonel baskılamaya öncülük eder. Ancak olgun miRNAların tamamlayıcılığı ile hedef mRNA, mRNA dejenerasyonuna öncülük eder (65).

MiRNAlar embriyonik gelişme, normal fizyoloji ve kardiyovasküler sistem fonksiyonunda kritiktir (66). MiRNAların hücresel ekspresyon seviyeleri; hipertansiyon, obezite, hiperlipidemi ve diyabetin yanısıra MI, kalp yetmezliği ve hipertrofi de dahil çeşitli kardiyovasküler patolojilerde değişmektedir. Çeşitli in vitro ve in vivo ateroskleroz modelleri, farklı miRNAların endotelial hücre aktivasyonu, inflamasyon, anjiogenez, damar düz kas hücreleri proliferasyonu, göç ve neointim oluşum gibi aterogenezin çok önemli proseslerini kapsar (67).

MiRNAlar, bilinen insan genlerinin yaklaşık 2/3' ünü düzenlediğinden, gen ekspresyonunun kontrolünde önemli rol oynar (68). Fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda sırasıyla kalp fonksiyonunda ve disfonksiyonunda rol alırlar (69). Da Costa Martins ve ark. (70) bir anahtar nükleazın miRNA biyogenez ve fonksiyonuna katılarak miyokardiyal yeniden modellenmenin başladığını

göstermiştir. Bu gözlem, düzgün kalp organogenezinde ve fonksiyonunda miRNAların rolünün altını çizmektedir.

MiRNAlar sadece hücre merkezinde gen ekspresyonunu düzenlemez, ayrıca hücreler arası iletişimde anahtar oyuncu rolündedir. Bu nedenle, miRNAlar canlı hücreler tarafından seçici ve aktif olarak salgılanarak hücreler ve dokular arasındaki iletişime katkıda bulunur. Salgılanan miRNAlar, argonaute 2, nükleofosmin ve lipoproteinler gibi ekstraselüler taşıyıcılar tarafından taşınır; ya da ekstraselüler mikro araçlar içine paketlenmiş olarak ve gen ekspresyonunu değiştirdikleri yerde alıcı hücrelere transfer edilirler (71). Bu nedenle, mRNAların aksine, miRNAlar dolaşımda stabildir ve endojen ribonükleaz aktivitesinden korunurlar. Bu bulgular dolaşımda miRNAların AKS' nin farklı türlerinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak potansiyel bir rol oynayabileceği fikrine izin vermektedir. Bu koşullarda tanıda miRNAların potansiyelini değerlendirmek için birçok çalışma yapılmıştır. Kalp I/R hasarı ile ilişkili bir dizi miRNA keşfedilmiştir. Fakat detaylı mekanizmaları konusunda az şey bilinmektedir. Kardiyovasküler hastalıklara aracılık eden miRNAlar, hastalık yönetiminde terapötik hedef olma potansiyeline sahiptir (72).

### **3.6.1. Miyokardiyal I/R ve Hücre Ölümünde MikroRNAlar**

Hızla artan sayıda çalışma, kalp ve dolaşımdaki miRNAların, miyokard iskemisi veya MI' da belirgin bir şekilde değiştiğini göstermiştir. Bu yeni bulgular MI komplikasyonlarına, post - MI ventriküler yeniden modellemeye ve kalp bakımına yol açan mekanizmalara yeni bir ışık tutmuştur. Son çalışmalar dolaşımdaki miRNAların MI' nın yeni ve duyarlı biyolojik belirteçleri

olabileceğini ve hücreler arası muhtemel bir sinyal mekanizması olarak işlev gördüğünü göstermiştir.

Kardiyomiyosit apoptozu, iskemik kalplerde önemli bir hücreyel olaydır. Önemli kardiyovasküler proteinleri hedef alarak proapoptotik etkiler ortaya koyan miRNAlar vardır. MiRNA-34 ailesi üyeleri büyüme arrestini ve apoptozu teşvik etmektedir (73). MiRNA-34' ün terapötik inhibisyonu, iskemi - indüklenmiş yeniden modellemeyi ve kardiyak iyileşmenin geliştirilmesini zayıflatmaktadır (74). *In vivo* koşullarda miRNA-21' in adenoviral transferi, hedef geni, programlanmış hücre ölümü 4 (PDCD4) ve aktive edici protein 1 (AP1) yolu ile sınırdaki hücre apoptozunu ve infarkt alanlarını azaltmıştır. MiRNA-24 ise proapoptotik protein Bim' i baskılayarak kardiyomiyosit apoptozunu engellemiştir (75). *Ex vivo* miRNA-24 zenginleştirilmesi, miRNA-21 ve miRNA-221 ile birlikte, iskemik kemirgenlerde transplantasyon sonrası öncü kardiyak hücrelerin terapötik potansiyelini geliştirmiştir (76).

İskemik kalpte erken reperfüzyon, MI sonrasında klinik sonuçların iyileştirilmesi için en etkili müdahale olmaya devam etmektedir. Miyokard reperfüzyonu sırasında intraselüler  $Ca^{2+}$  düzeyindeki anormal artışlar I/R hasarı olarak bilinen kardiyomiyosit ölümüne neden olabilir. Aşırı ROS üretimi de hücredeki bu yıkıma katkıda bulunduğundan, tipik bir enflamasyon yanıtı nekrozu takip eder. NOX ailesinin NADPH oksidazları, ROS' un önemli enzimatik kaynakları ve redoks sinyalleşmesinin kritik düzenleyicileridir. NOX enzimlerinin temel işlevi, büyük transmembran NOX proteininde ortaya çıkan ROS üretimidir. Elektron taşınmasını NADPH' den moleküler oksijene katalize ederek  $H_2O_2$ ' ye dönüştürülebilen süperoksit üretmektedirler. NOX izoformları NOX1, NOX2 ve

NOX4 kardiyomiyositlerde eksprese edilir. NOX ailesinin ilk keşfedilen üyesi sitokrom b-245 beta zinciri (Cybb) olarak da bilinen NOX2, miRNA-139-3p ile ilişkilidir.

Kardiyak I/R hasarına miRNAların ekspresyonundaki dinamik değişiklikler de eşlik eder. Geçici orta serebral arter tıkanıklığında miRNA-139 azalmıştır. Potansiyel olarak Cybb ve NOX4 genlerini hedef aldığı düşünülen apoptotik yolakta etkin miRNA-139-3p, kardiyomiyosit otofajisinin düzenlenmesinde rol oynayan Fox1 proteinini azaltmıştır (77).

Bu çalışma da;

- Oksidatif stresle ilişkili *MDA*,
- Proapoptotik genler *Fas*, *Faslg* ve *Gadd45a*,
- Antiapoptotik gen *kaspaz 2*,
- Apoptotik yolakta etkili *miRNA-139-3p*' nin I/R hasarındaki rolleri ve IPostC' nin bu genler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ile
- IPostC uygulamasının reperfüzyondaki *ventriküler aritmiler (ventriküler atım sayıları, taşikardi insidansları)* üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.



## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Deney hayvanları

Çalışmada Spraque Dawley cinsi, 300±50 g ağırlığında 66 adet yetişkin erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından 03/09/2014 tarih ve 172 nolu etik kurul kararınca karşılandı. Sıçanlara 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık sıklusta, havalandırmalı, sabit sıcaklıktaki (21 ±1 °C) odalarda ve özel kafeslerde standartlara uygun olarak bakıldı ve beslenmeleri 8 mm' lik standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile sağlandı.

### 4.2. Deney planı

Sıçanlar rastgele 6 gruba ayrıldı.

*Gruplar:*

*Biyokimyasal parametrelerin (Fas, Faslg, Gadd45a, kaspaz 2 ve MiRNA-139-3p) değerlendirilmesi için deney grupları:*

*(30 dk iskemi, 120 dk reperfüzyon uygulandı)*

*(IPostC reperfüzyondan önce 3 siklus 10 sn iskemi - 10 sn reperfüzyon olarak uygulandı)*

Grup 1: Kontrol grubu (n=7)

Grup 2: İskemi- reperfüzyon uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 3: İskemi- reperfüzyon ve ardkoşullanma uygulanan sıçanlar (n= 7)

*Aritmi değerlendirmeleri (MDA için) deney grupları:*

*(7 dk iskemi, 7 dk reperfüzyon uygulandı)*

*(IPostC reperfüzyondan önce 3 siklus 10 sn iskemi - 10 sn reperfüzyon olarak uygulandı)*

Grup 1: Kontrol grubu (n= 15)

Grup 2: İskemi- reperfüzyon uygulanan sıçanlar (n= 15)

Grup 3: İskemi- reperfüzyon ve ardkoşullanma uygulanan sıçanlar (n= 15)

### **4.3. Cerrahi uygulamalar**

#### **4.3.1. I/R uygulama**

Sıçanlara 1.2 g/kg üretanın ip olarak verilmesi ile anestezi uygulandı. Yapay solunum için trakea kanülasyonu yapıldı ve sıçanlar solunum pompasına bağlandı. Karotid artere yerleştirilen bir kanülden, transdüser (Biopac MP36) yardımıyla kan basıncı ve EKG yazdırıldı. Göğsün sol tarafına 1-1.5 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldıktan sonra cilt altı dokuları ve göğüs kasları geçildi, sternumun hemen solunda dördüncü kosta kesilerek sol torakotomi yapıldı. Toraks açıldığı anda, içerideki negatif basıncın ortadan kalkması nedeniyle, solunumun devamı ve normal pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> ve pH değerlerini korumak amacıyla ventilasyon cihazıyla (Harvard Animal Rodent Ventilator) 1.5ml/100g.'lık hacim ve 60 atım/dk'lık bir hızla oda havası verilerek pozitif basınçlı solunum uygulanmaya başlandı. Perikardiyum yavaşça sıyrılarak kalp serbestleştirildi ve göğsün sağ tarafına hafifçe basılarak kalp dışarı alındı. 6/0 ipek iplik ve 10 mm'lik yuvarlak uçlu iğneyle sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızlıca geçildi. Daha sonra kalp yeniden göğüs içine yerleştirilerek 20 dk stabilizasyon için beklendi. Lambeth Conventions' da

belirlenen değerlendirme kriterleri göz önüne alınarak bu işlemlere bağlı herhangi bir aritmi görülmesi ya da ortalama kan basıncının oklüzyon öncesi 70 mm Hg' nin altına düşmesi halinde denek çalışma dışı bırakıldı.

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

Aritmilerin değerlendirmeleri için sol koroner arter 7 dk kapatılarak iskemi ardından 7 dk açılarak reperfüzyon sağlandı. Bu iskemi ve reperfüzyon süreleri daha önce de aynı deney modelinde başarıyla uygulanmış ve protokolün optimum sayı ve önemde ektopik aktivite oluşturduğu bildirilmiştir. Ventriküler ektopik aktivite Lambeth Conventions' da (Walker vd 1988) önerilen diagnostik kriterlere uygun olarak değerlendirildi. Deney sonunda yapılan kayıtlardan ventriküler ekstrasistol sayıları ve ventriküler taşikardi insidansları değerlendirildi.

#### **4.4. Biyokimyasal parametreler**

Miyokard dokusu MDA düzeyi her grup için 15 hayvanda, Fas, Faslg, Gadd45a, kaspaz 2 ve miRNA-139-3p düzeyleri ise her grup için 7 hayvanda ölçüldü. Her in vivo çalışmanın sonunda, kalp hızlı bir şekilde çıkarıldı ve

biyokimyasal analiz için tahlil edilinceye kadar -80 °C' de saklandı. Üreticinin talimatlarına göre, ticari olarak temin edilebilen bir Trizol Reaktif (Life Technologies, katalog no. 15596) kullanılarak kalpten toplam RNA ekstre edildi. Kısaca, dondurucudan 50 mg kalp çıkarıldı ve hemen 1 ml Trizol reaktifine daldırıldı. Kalp, otomatik bir homojenleştirici (Next Advance, Averill Park, ABD) kullanılarak homojenleştirildi. Havuzlardan cDNA, Yüksek Kapasiteli RNA-cDNA kiti (Invitrogen, Carlsbad, ABD) kullanılarak sentezlendi.

Total RNA, 1 ug toplam RNA kullanılarak Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Sentez Kitleri (Applied Biosystem, ABD) kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA sentezi, 10 dakika boyunca 25 °C, 120 dakika boyunca 37 °C ve 5 dakika boyunca 85 °C, 60 dakika boyunca 4 °C olan bir gradyanlı termal döngüleyicide (Biometra, Almanya 07-850) gerçekleştirildi. ABI Prism 7500 Hızlı Gerçek Zamanlı PCR Cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ile miR139-3p, Fas, Faslg, Gadd45a genleri ve Tag Man Assay ve Tag Man Mix GAPDH genleri ile Gerçek Zamanlı PCR analizi yapıldı. Tüm sonuçlar GAPDH seviyelerine göre standardize edildi. Deney, üç kopya ile üç bağımsız deney ile gerçekleştirildi. Farklı gruplar arasındaki transkript seviyelerini karşılaştırmak için  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanıldı (78). MDA analizleri ise spektrofotometre ile yapıldı.

#### **4.5. İstatistik**

Çalışma öncesi uygulanan güç analizine göre; biyokimyasal parametrelerin analizini 0.05 anlamlılık ve %80 bir güç ile belirleyebilmek için her bir grupta en az 7 adet sıçanın çalışmaya alınmasının yeterli olduğu görüldü ( $\alpha= 0.05$ ,  $\beta = 0.2$ ). Elde edilen tüm veriler 'SPSS for Windows 21' paket programı kullanılarak

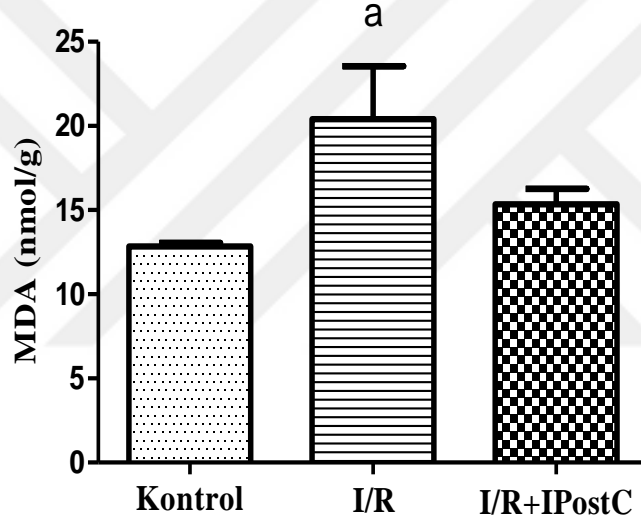
istatistiksel olarak yorumlanıp değerlendirildi. Veriler aritmetik ortalamalar  $\pm$  S.E.M olarak belirlendi.  $P < 0.05$  olduğunda, fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verilerin normallik analizi Shapiro–Wilk testi ile, parametrik analizlerin değerlendirilmeleri One-Way ANOVA ve Tukey Post Hoc testleriyle yapıldı. Aritmiler arasındaki insidans farkları Fisher Exact testi ile grup ortalamaları ise Mann-Whitney-U testi ile değerlendirildi.



## 5. BULGULAR

### 5.1. I/R ve IPostC' nin MDA üzerine etkisi

Oksidatif hasar göstergesi olan MDA, I/R grubunda ( $20,40 \pm 3,14$  nmol/g) kontrole ( $12,85 \pm 0,19$  nmol/g) göre anlamlı arttı. I/R+IPostC grubunda ( $15,35 \pm 0,91$  nmol/g) ise I/R grubuna göre yaklaşık olarak % 25 azaldı; ancak anlamlı değildi (Şekil 1) ( $p < 0.05$ ).

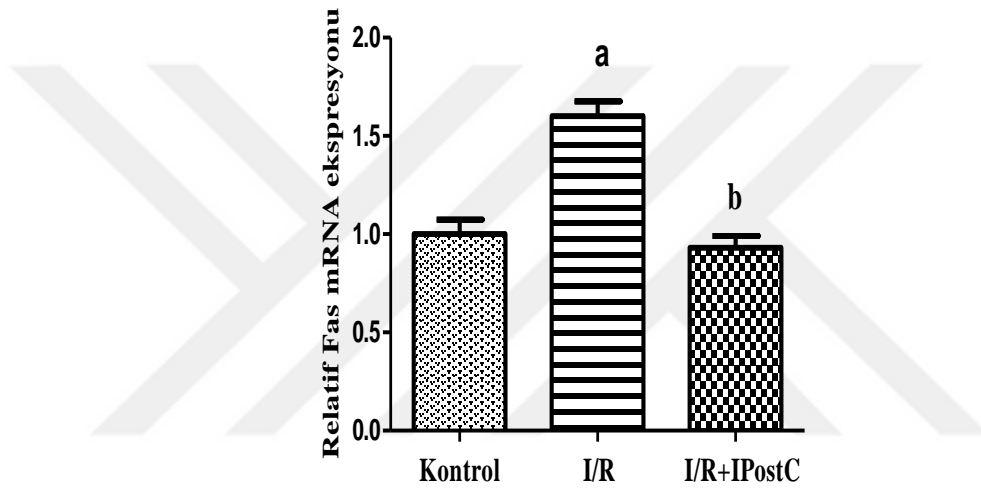


**Şekil 1:** I/R ve IPostC' nin MDA' ya etkisi

a: Kontrole göre anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ )

## 5.2. I/R ve IPostC' nin apoptoz genleri Fas, Faslg, Gadd45a ve kaspaz 2 mRNA ekspresyonlarına etkisi

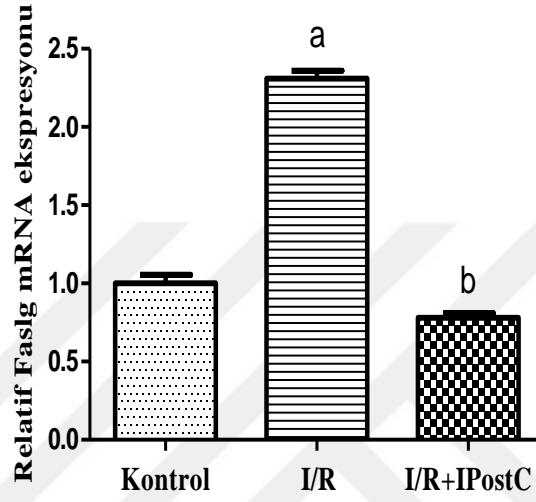
Proapoptotik Fas seviyeleri kontrol grubuna göre I/R grubunda ( $1,65 \pm 0,23$ ) anlamlı arttı. I/R+IPostC grubunda ( $0,93 \pm 0,21$ ) ise I/R grubuna göre anlamlı azaldı (Şekil 2) ( $p < 0.05$ ).



Şekil 2: I/R ve IPostC' nin Fas mRNA ekspresyonuna etkisi

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık ( $p < 0.05$ )

Faslg geni I/R grubunda ( $2,31\pm 0,15$ ) kontrol grubuna göre anlamlı arttı. I/R+IPostC grubunda ( $0,78\pm 0,09$ ) ise I/R grubuna göre anlamlı azaldı (Şekil 3) ( $p<0,05$ ).

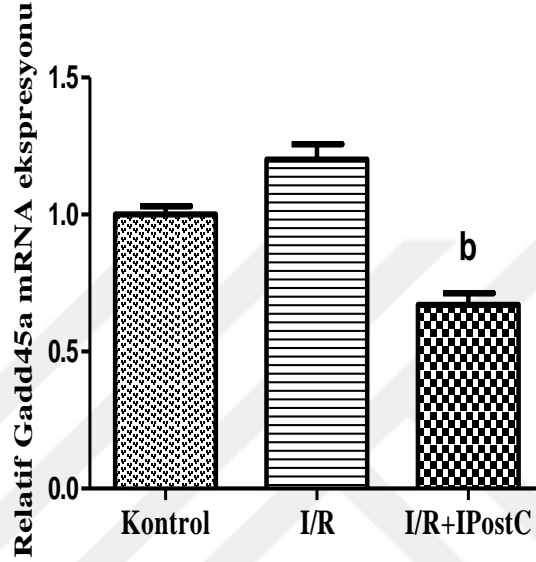


**Şekil 3:** I/R ve IPostC' nin Faslg mRNA ekspresyonuna etkisi

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık ( $p<0,05$ )



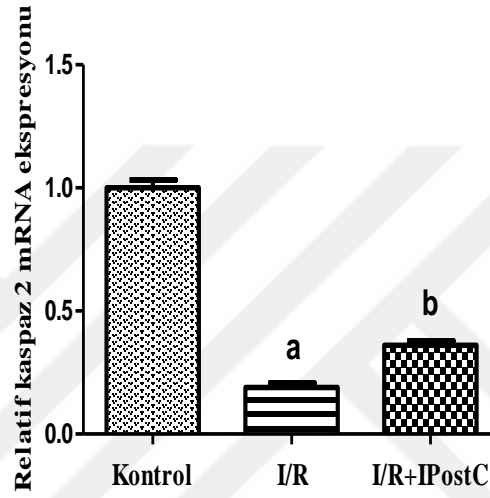
Proapoptotik Gadd45a geninin I/R grubundaki  $(1,2 \pm 0,21)$  % 20' lik artışı kontrol grubuna kıyasla anlamlı değildi. I/R+IPostC grubunda  $(0,67 \pm 0,16)$  ise I/R grubuna kıyasla anlamlı azaldı (Şekil 4) ( $p < 0,05$ ).



Şekil 4: I/R ve IPostC' nin Gadd45a mRNA ekspresyonuna etkisi

b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık ( $p < 0,05$ )

Antiapoptotik kaspaz 2 düzeyi kontrol grubuna göre I/R grubunda ( $0,19\pm 0,05$ ) anlamlı azalırken; I/R grubu ile karşılaştırıldığında I/R+IPostC grubunda ( $0,36\pm 0,05$ ) anlamlı arttı ( $p < 0,05$ ) (Şekil 5).

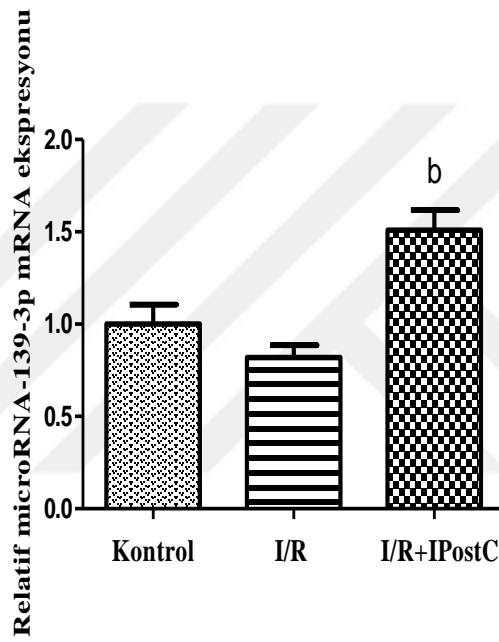


**Şekil 5:** I/R ve IPostC' nin kaspaz 2 mRNA ekspresyonuna etkisi

a: Kontrole göre anlamlı farklılık, b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık ( $p < 0,05$ )

### 5.3. I/R ve IPostC' nin miRNA-139-3p mRNA ekspresyonuna etkisi

MiRNA-139-3p seviyeleri, I/R grubunda ( $0,82 \pm 0,22$ ) kontrol grubuna göre % 18 azaldı, ancak anlamlı değildi. I/R+IPostC grubunda ( $1,51 \pm 0,28$ ), I/R grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı arttı (Şekil 6) ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 6:** I/R ve IPostC' nin miRNA-139-3p mRNA ekspresyonuna etkisi

b: Ardkoşullanmaya bağlı anlamlı farklılık ( $p < 0,05$ )

#### 5.4. I/R ile görülen aritmi değerlendirme

I/R+IPostC (3,86±1,23) grubunda görülen reperfüzyondaki ventriküler ekstrasistol sayıları I/R (25,29±8,65) grubuna göre anlamlı azaldı. Reperfüzyondaki ventriküler taşikardi insidansı da I/R+IPostC grubunda (% 14,3) I/R (% 51,9) grubuna kıyasla anlamlı azaldı.

**Tablo 1:** Reperfüzyon sırasında gözlemlenen ventriküler atım sayıları ve taşikardi insidansları

a: I/R' ye göre anlamlı farklılık (p<0.05)

Gruplar	Reperfüzyonda görülen ventriküler ekstrasistol sayıları	Reperfüzyonda ventriküler taşikardi insidansı (%)
I/R	25,29 ± 8,65	51,9
I/R+IPOSTC	3,86 ± 1,23 <sup>a</sup>	14,3 <sup>a</sup>

## 6. TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçlarına göre proapoptotik gen Fas, Faslg ve Gadd45a I/R ile anlamlı artarken; antiapoptotik gen kaspaz 2 ve miRNA-139-3p seviyeleri anlamlı azaldı. Oksidatif stres göstergesi MDA, I/R ile anlamlı arttı. IPostC tedavisi IR ile oluşan bu değişiklikleri azalttı.

Dokuların reperfüzyon ile oksijenlenmesinden kaynaklanan aşırı ROS miktarları, I/R hasarının ortaya çıkmasında önemli rol oynar. En önemli hücrel ROS kaynakları NOX ve mitokondridir (79). NOX' lar biyolojik membranlarda elektron transferini sağlar ve ROS üretir (80). MiRNA-139-3p' nin hedefi olan NOX2 olarak da bilinen bir nekroz göstergesi olan Cybb geni I/R' ye yanıt olarak artar. Böylece ROS üretimine ve buna bağlı miyokard hasarına katkıda bulunur (81). Bir çalışmada, Cybb eksik kalplerde reperfüzyon sonrası oksidatif stres azalmıştır (82). Kalpte miyosit kasılması, kardiyak büyüme ve aritmojenез dahil birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol oynayan miRNAların (83), son zamanlarda MI patofizyolojisine katıldığı bildirilmiştir (74). Bu çalışmada, miRNA-139-3p I/R ile stres koşullarında azalırken, IPostC ile anlamlı arttı. Varga ve ark. (84)' nin çalışmaları kardiyoproteksiyon ile genel olarak ilişkilendirilen miRNAları hem IPC hem de IPostC uygulamasıyla tanımlayan çalışmalarında, miRNA-139-3p bizim çalışmamıza benzer şekilde I/R ile azaldığını ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada miRNA-188, miRNA-532-3p, miRNA-125b, miRNA-139-3p ve miRNA-320' nin apoptotik sinyalizasyonun düzenlenmesinde rol oynarak I/R hasarında önemli terapötik hedefler olabilecekleri gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, geçici orta serebral arter tıkanıklığında potansiyel olarak

Cybb ve NOX4 genlerini hedef alan miRNA-139 azalmıştır (77). Ayrıca, miRNA-139 kardiyomiyosit otofajisinin düzenlenmesinde rol oynayan Fox1 proteinini azaltmıştır (85). Bu nedenle miRNA-139-3p' nin, Cybb ve FoxO1 gibi nekroz ve otofaji genlerinin protein ekspresyonlarını düzenleyerek IPostC' nin koruyuculuğuna katkıda bulunabileceği ileri sürülebilir.

Bir hücrenin yaşamını veya ölümünü modüle edebilme yeteneği, güçlü terapötik potansiyeli ile ilişkilidir. Programlı hücre ölümü anlamına gelen apoptoz, normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin gelişimi ve işleyişi gibi çeşitli işlemlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilir (86). Apoptoz süreci iki ana yoldan meydana gelir: intrinsik yol, kaspazı aktive eden mitokondri ile ilgiliyken, ekstrinsik yol tümör nekroz faktörünün (87) aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu çalışmada Fas, Faslg ve Gadd45a proapoptotik genlerinin seviyeleri I/R ile yükseldiğini, antiapoptotik gen kaspaz 2' nin I/R ile azaldığını ve IPostC' nin bu genlerin seviyesindeki değişiklikleri iyileştirdiğini bulduk.

Fas ve Faslg, tümör nekroz faktör süper ailesinin üyeleridir ve Faslg' nin birincil işlevi, Fas' a bağlanarak apoptozun indüklenmesidir (88). Zhao ve ark. (89), akut MI' lı hastalarda artan Fas ve Faslg plazma konsantrasyonlarının, perkütan koroner girişim IPostC protokolü tedavisiyle azaldığını göstererek, Fas/Faslg sisteminin akut MI' da apoptoz seviyelerinin tespitinde önemli bir biyobelirteç olabileceğini bildirmiştir. I/R hasarından sonra, Fas mRNA' sı ve yetişkin sıçan kardiyomiyositlerindeki protein seviyelerindeki artış morfin farmakolojik IPC ile önlenmiştir (90). Serum Faslg seviyelerinin kronik kalp yetmezliğinde progresyon oranında arttığı bildirilmiştir (91). Plazma Faslg

düzeşinin koroner kalp hastalarında (92) ve akut MI' da arttığı gösterilmiştir. Yüksek doz glukoz - insülin - potasyum tedavisi ile enfarktöslü hastalarda Faslg düzeylerinde anlamlı bir düşüş sağlanmıştır (93). Stres kaynaklı bir protein olan Gadd45a, Hela hücrelerinde apoptozu indükleyen Bim ve Bcl-2 etkileşimini artırarak mitokondri aracılı hücre ölüme katkıda bulunur (94). Bununla birlikte Gadd45a, otofaji geni Beclin1 ve fosfatidilinositol 3-kinaz arasındaki etkileşimi düzenleyerek otofajiyi inhibe edebilir (95).

Zamanında ve etkili reperfüzyon tedavisi, STEMI' lı hastaların tedavisinde kritik bir rol oynamaktadır. Reperfüzyon sırasında miyokardın fonksiyonu bozularak reperfüzyon aritmileri ortaya çıkabilir. IPostC' nin ciddi reperfüzyon aritmelerini önlemede faydalı olabileceği konusunda hayvan (53, 54) ve insan (48) çalışmalarından kanıtlar vardır. Spannbaue ve ark. (96), IPostC' nin mikrovasküler tıkanıklık ve miyokard ödemi üzerindeki yararlı etkilerinin R genliğinin düzelmesi ve ST-segmentinin ayrışması ile açıklanabileceğini belirtmiştir. Yine aynı çalışmada iskemiyle indüklenerek uzatılmış QT zamanının IPostC' den sonra geçici olarak kısaldığı gösterilerek IPostC' nin antiaritmik etkili olabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde IPostC uygulamasıyla reperfüzyonda görülen ventriküler ekstrasistol sayıları ve taşikardi insidansı anlamlı azaldı.

Kardiyovasküler patofizyolojide önemli bir oksidatif stres biyobelirteci MDA' nın melatonin ile anlamlı azaldığı bildirilmiştir (97). Başka bir çalışmada ise kardiyotoksik doksorubisin verilen pinealektomili sıçanlarda melatonin uygulamasıyla MDA seviyeleri anlamlı azalmıştır (98). Sevofluran farmakolojik

IPostC uygulaması ise hücre içi MDA ve ROS seviyelerini azaltmıştır (99). Zhang ve ark. (100) sıçan modellerinde IPostC' nin; miyokarddaki MDA düzeyini azaltıp, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini artırdığını ve miyokarddaki oksidatif hasara karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir. Wu ve ark. (101)' nin çalışmalarında butorfanol farmakolojik IPostC' sı nekroz alanı ile MDA ve miyeloperoksidaz düzeylerini anlamlı azaltmıştır. Benzer şekilde çalışmamızda da MDA, I/R' de artarken IPostC uygulaması ile azalma eğilimi gösterdi. Bu durum, IPostC' nin oksidatif hasarı hafifletebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak;

Proapoptotik genler *Fas*, *Faslg* ve *Gadd45a* artışı, antiapoptotik gen *kaspaz 2* düzeyinin ve apoptotik yolda etkili *miRNA-139-3p*' nin azalması I/R hasarında önemli rol oynayabilir.

IPostC uygulamasının *Fas*, *Faslg*, *Gadd45a* ve *kaspaz 2* ve *miRNA-139-3p* düzeylerindeki I/R kaynaklı değişiklikleri önleyerek apoptozu kontrol edebileceği düşünülebilir. Apoptozu aracılık eden bu genlerin düzenlenmesi kardiyoprotektif IPostC' nin koruyuculuğunda önemli bir rol oynayabilir. Nekroz - apoptoz ile ilişkili *miRNA-139-3p*' nin tedavi başarısının değerlendirilmesinde kullanılabileceği düşünülebilir.

IPostC uygulaması reperfüzyondaki, ventriküler ekstrasistol sayısı ve taşikardi insidansını azaltabilir, reperfüzyon aritmilerinde koruyucu olabilir.

Gen düzeylerinin protein ekspresyonları ile doğrulanamamış olması çalışmamızın kısıtı olarak düşünülebilir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Regmi M, Siccardi MA. Coronary artery disease prevention. StatPearls 2019.
2. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death. 2018.
3. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 2002; 53: 31–47.
4. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; 357: 1121-35.
5. Barzegar M, Kaur G, Gavins FNE, et al. Potential therapeutic roles of stem cells in ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Research* 2019; 37: 101421.
6. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischemia and reperfusion injury. *British Medical Bulletin* 2004; 70: 71–86.
7. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2000; 47: 446-56.
8. Kalogeris T, Baines C, Krenz M, Korthuis RJ. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 298: 229–317.
9. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. *Cardiovascular Research* 2003; 58: 10-9.
10. Verma S, Fedak PW, Weisel RD, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 105: 1332-6.
11. Cardinal J, Pan P, Tsung A. Protective role of cisplatin in ischemic liver injury through induction of autophagy. *Journal Autophagy* 2009; 5: 1211-1212.
12. Han Y, Zhao Y, Li J, et al. Stat3-Atg5 signal axis inducing autophagy to alleviate hepatic ischemia - reperfusion injury. *J Cell Biochem* 2018; 4: 3440-3450.
13. Figtree GA, Keyvan Karimi G, Liu CC, Rasmussen HH. Oxidative regulation of the Na(+)-K(+) pump in the cardiovascular system. *Free Radic Biol Med* 2012; 53: 2263-2268.
14. Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; 43: 550-557.
15. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 2002; 181: 219-222.
16. Bhaumik A, Kumar S, Saha S, et al. A review on cardiac arrhythmia and cardiac ablation: Invasive techniques and future perspective. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research* 2016; 2: 105-111.
17. Ghuran AV, Camm AJ. Ischaemic heart disease presenting as arrhythmias. *Br Med Bull* 2001; 59: 193–210.
18. Kukreja RC, Janin Y. Reperfusion injury: Basic concepts and protection strategies. *J Thromb Thrombolysis* 1997; 4: 7-24.

19. Majidi M, Kosinski AS, Al-Khatib SM, et al. Reperfusion ventricular arrhythmia ‘bursts’ predict larger infarct size despite TIMI 3 flow restoration with primary angioplasty for anterior ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J* 2009; 30: 757–764.
20. Majidi M, Kosinski AS, Al-Khatib SM, et al. Implications of ventricular arrhythmia “bursts” with normal epicardial flow, myocardial blush, and ST-segment recovery in anterior ST-elevation myocardial infarction reperfusion: a biosignature of direct myocellular injury “downstream of downstream”. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2015; 4: 51–59.
21. Weg K, Kuijt WJ, Bekkers SC, et al. Reperfusion ventricular arrhythmia bursts identify larger infarct size in spite of optimal epicardial and microvascular reperfusion using cardiac magnetic resonance imaging. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2018; 3: 246–256.
22. Akar JG, Akar FG. Regulation of ion channels and arrhythmias in the ischemic heart. *J Electrocardiol* 2007; 40: S37–S41.
23. Lakkireddy V, Bub G, Baweja P, et al. The kinetics of spontaneous calcium oscillations and arrhythmogenesis in the in vivo heart during ischemia/reperfusion. *Heart Rhythm* 2006; 3: 58–66.
24. Brown DA, O’Rourke B. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovasc Res* 2010; 88: 241–249.
25. Weg K, Prinzen FW, Gorgels PM. Reperfusion cardiac arrhythmias and their relation to reperfusion induced cell death. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care* 2019; 8: 101-103.
26. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the holy grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 151–4.
27. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2009; 104: 181–8.
28. Baban B, Liu JY, Mozaffari MS. Pressure overload regulates expression of cytokines, gammaH2AX, and growth arrest- and DNA-damage inducible protein 153 via glycogen synthase kinase-3beta in ischemic-reperfused hearts. *Hypertension* 2013; 61: 95-104.
29. Liu XM, Yang ZM, Liu XK. Fas/FasL induces myocardial cell apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion rat model. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2017; 21: 2913-2918.
30. Jeremias I, Kupatt C, Martin-Villalba A, et al. Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia. *Circulation* 2000; 102: 915-920.
31. Das J, Ghosh J, Manna P, Sil PC. Taurine suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiac apoptosis in rat via up-regulation of PI3-K/Akt and inhibition of p53, p38-JNK. *Biochem Pharmacol* 2011; 81: 891-909.
32. Tran H, Brunet A, Grenier JM, et al. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 2002; 296: 530–534.

33. Upton JP, Austgen K, Nishino M, et al. Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 3943–3951.
34. Shalini S, Dorstyn L, Wilson C, et al. Impaired antioxidant defence and accumulation of oxidative stress in caspase-2-deficient mice. *Cell Death Differ* 2012; 19: 1370–1380.
35. Baran KW, Nguyen M, McKendall GR, et al. Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (limit ami) study. *Circulation* 2001; 104: 2778–2783.
36. Mertens P, Maes A, Nuyts J, et al. Recombinant P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin, a P-selectin antagonist, as an adjunct to thrombolysis in acute myocardial infarction. The P-selectin antagonist limiting myonecrosis (PSALM) trial. *Am Heart J* 2006; 152: 125.e1–125.e8.
37. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (risk)-pathway. *Cardiovasc Research* 2004; 61: 448–460.
38. Kalyoncuoğlu M, Öztürk S, Durmuş G, ve ark. Güncel Tedavi Kılavuzları Işığında Kronik İskemik Kalp Hastalığı Tedavisine Yaklaşım. *Haseki Tıp Bülteni* 2017; 55: 85-100.
39. Fihn SD, Blankenship JC, Alexander KP, et al. ACC/ AHA/AATS/PCNA/SCAI/STS focused update of the guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Association for Thoracic Surgery, Preventive Cardiovascular Nurses Association, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *JACC* 2014; 64: 1929-49.
40. Ferrari R, Balla C, Malagu M, et al. Reperfusion Damage - A Story of Success, Failure, and Hope. *Circ J* 2017; 81: 13-141.
41. Heusch G. Critical issues for the translation of cardioprotection. *Circ Res* 2017; 120: 1477-1486.
42. Kleinbongard P, Skyschally A, Heusch G. Cardioprotection by remote ischemic conditioning and its signal transduction. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2017; 469: 159-181.
43. Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol* 2009; 104: 189–202.
44. Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 617–25.

45. Chen Z, Luo H, Zhuang M, et al. Effects of ischemic preconditioning on ischemia/reperfusion-induced arrhythmias by upregulation of connexin43 expression. *J Cardiothorac Surg* 2011; 6: 80.
46. Okishige K, Yamashita K, Yoshinaga H, et al. Electrophysiologic effects of ischemic preconditioning on QT dispersion during coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 70–73.
47. Kolettis TM, Vilaeti AD, Tsalikakis DG, et al. Effects of pre- and postconditioning on arrhythmogenesis in the in vivo rat model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2013; 18: 376–385.
48. Araszkievicz A, Grygier M, Pyda M, et al. Postconditioning attenuates early ventricular arrhythmias in patients with high-risk ST-segment elevation myocardial infarction. *J Cardiol* 2015; 65: 459–465.
49. Heusch G. Cardioprotection: Chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet* 2013; 381: 166–175.
50. Przyklenk K, Whittaker P. Remote ischemic preconditioning: Current knowledge, unresolved questions, and future priorities. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011; 16: 255–259.
51. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: Nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation* 2008; 118: 1915–1919.
52. Baranyai T, Giricz Z, Varga ZV, et al. In vivo MRI and ex vivo histological assessment of the cardioprotection induced by ischemic preconditioning, postconditioning and remote conditioning in a closed-chest porcine model of reperfused acute myocardial infarction: Importance of microvasculature. *J Transl Med* 2017; 15: 67.
53. Kloner RA, Dow J, Bhandari A. Postconditioning markedly attenuates ventricular arrhythmias after ischemia-reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2006; 11: 55-63.
54. Dow J, Bhandari A, Kloner RA. Ischemic postconditioning's benefit on reperfusion ventricular arrhythmias is maintained in the senescent heart. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008; 13: 141–148.
55. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993; 87: 893–899.
56. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol* 2016; 111: 70.
57. Meng R, Asmaro K, Meng L, et al. Upper limb ischemic preconditioning prevents recurrent stroke in intracranial arterial stenosis. *Neurology* 2012; 79: 1853–1861.
58. Meng R, Zhao W, Li S, et al. Abstract 76: long-term regular remote ischemic conditioning promotes arterial collateral opening and reconstruction in patients with intracranial atherosclerotic stenosis. *Stroke* 2017; 48: A76.

59. Kitakaze M, Hori M, Takashima S, et al. Ischemic preconditioning increases adenosine release and 5'-nucleotidase activity during myocardial ischemia and reperfusion in dogs. Implications for myocardial salvage. *Circulation* 1993; 87: 208–15.
60. Ihara M, Asanuma H, Yamazaki S, et al. An interaction between glucagon-like peptide-1 and adenosine contributes to cardioprotection of a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor from myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308: H1287–97.
61. Basu A, Charkoudian N, Schrage W, et al. Beneficial effects of GLP-1 on endothelial function in humans: dampening by glyburide but not by glimepiride. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E1289–95.
62. Bousselmi R, Lebbi MA, Ferjani M. Myocardial ischemic conditioning: Physiological aspects and clinical applications in cardiac surgery. *J Saudi Heart Assoc* 2014; 26: 93–100.
63. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011; 469: 336–342.
64. Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem* 2009; 284: 17897–17901.
65. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215–233.
66. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 2011; 91: 827–887.
67. Quiat D, Olson EN. MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment. *J Clin Invest* 2013; 123: 11–18.
68. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92–105.
69. Topkara VK, Mann DL. Role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011; 25: 171–182.
70. Costa Martins PA, Bourajjaj M, Gladka M, et al. Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation* 2008; 118: 1567–1576.
71. Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 186–192.
72. Dorn GW. Therapeutic potential of microRNAs in heart failure. *Curr Cardiol Rep* 2010; 12: 209–215.
73. Hermeking H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 2007; 12: 414–8.
74. Bernardo BC, Gao XM, Winbanks CE, et al. Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 17615–17620.

75. Qian L, Van Laake LW, Huang Y, et al. miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes. *J Exp Med* 2011; 208: 549–60.
76. Hu S, Huang M, Nguyen PK, et al. Novel microRNA pro-survival cocktail for improving engraftment and function of cardiac progenitor cell transplantation. *Circulation* 2011; 124: 27–34.
77. Liu Z, Tuo Y-H, Chen J-W, et al. NADPH oxidase inhibitor regulates microRNAs with improved outcome after mechanical reperfusion. *J Neurointerventional Surg* 2017; 9: 702–6.
78. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods San Diego Calif.* 2001; 25(4):402-408.
79. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol* 2015; 6: 472–85.
80. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245–313.
81. Matsushima S, Tsutsui H, Sadoshima J. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends Cardiovasc Med* 2014; 24: 202–5.
82. Laskey WK, Selzer F, Jacobs AK, et al. Importance of the postdischarge interval in assessing major adverse clinical event rates following percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2005; 95: 1135–9.
83. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011; 469: 336–42.
84. Varga ZV, Zvara Á, Faragó N, et al. MicroRNAs associated with ischemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischemic pre- and postconditioning: protectomiRs. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 2014; 307: H216–27.
85. Sengupta A, Molkenkin JD, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2009; 284(41): 28319-28331.
86. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516.
87. al SHW and I-CP et. Arsenic trioxide sensitizes CD95/Fas-induced apoptosis through ROS-mediated upregulation of CD95/Fas by NF- $\kappa$ B activation | Kopernio [Internet]. [cited 2019 May 27]. Available from: <https://kopernio.com/viewer?doi=10.1002/ijc.20433&token=WzYyMTY2NCwiMTAuMTAwMi9pamMuMjA0MzMzMiXQ.sQZYM4iXnPA2Kcpp0GpEbeBhV1s>
88. Ham O, Lee S-Y, Song B-W, et al. Modulation of Fas-Fas Ligand Interaction Rehabilitates Hypoxia-Induced Apoptosis of Mesenchymal Stem Cells in Ischemic Myocardium Niche. *Cell Transplant* 2015; 24: 1329–41.

89. Zhao WS, Xu L, Wang LF, et al. A 60-s postconditioning protocol by percutaneous coronary intervention inhibits myocardial apoptosis in patients with acute myocardial infarction. *Apoptosis* 2009; 14: 1204-1211.
90. He S-F, Zhu H-J, Han Z-Y, et al. MicroRNA-133b-5p Is Involved in Cardioprotection of Morphine Preconditioning in Rat Cardiomyocytes by Targeting Fas. *Can J Cardiol* 2016; 32: 996-1007.
91. Teplyakov AT, Berezikova EN, Shilov SN, et al. Role of soluble Fas ligand in myocardial remodeling, severity and outcomes of chronic heart failure. *Ter Arkh* 2016; 88: 10-6.
92. Szymanowski A, Li W, Lundberg A, et al. Soluble Fas ligand is associated with natural killer cell dynamics in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2014; 233: 616-22.
93. Zhang L, Zhang L, Li Y, et al. Effects of high dose glucose-insulin-potassium infusion on myocardial injury and serum sFas/ sFasL concentration in acute myocardial infarction. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2005; 44: 499-502.
94. Tong T, Ji J, Jin S, et al. Gadd45a Expression Induces Bim Dissociation from the Cytoskeleton and Translocation to Mitochondria. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 4488-500.
95. Zhang D, Zhang W, Li D, et al. GADD45A inhibits autophagy by regulating the interaction between BECN1 and PIK3C3. *Autophagy* 2015; 11: 2247-58.
96. Spannbaauer A, Traxler D, Lukovic D, et al. Effect of Ischemic Preconditioning and Postconditioning on Exosome-Rich Fraction microRNA Levels, in Relation with Electrophysiological Parameters and Ventricular Arrhythmia in Experimental Closed-Chest Reperfused Myocardial Infarction *Int J Mol Sci.* 2019; 20(9).
97. Sahna E, Parlakpinar H, Turkoz Y, Acet A. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion induced infarct size and oxidative changes. *Physiol Res* 2005; 54(5): 491-495.
98. Sahna E, Parlakpinar H, Ozer MK, et al. Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *J Pineal Res.* 2003; 35(4) :257-61.
99. Gong JS, Yao YT, Fang NX, Li LH. Sevoflurane postconditioning attenuates reperfusion-induced ventricular arrhythmias in isolated rat hearts exposed to ischemia/reperfusion injury. *Mol Biol Rep* 2012; 39(6): 6417-25.
100. Zhang L, Ma J, Liu H. Protective effect of ischemic postconditioning against ischemia reperfusion-induced myocardium oxidative injury in IR rats. *Molecules* 2012; 17(4): 3805-17.
101. Wu Y, Wan J, Zhen WZ, et al. The effect of butorphanol postconditioning on myocardial ischaemia reperfusion injury in rats. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2014;18(3): 308-12.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İstanbul/Fatih' te doğdum. İlköğretimimi İstanbul Güngören 75. Yıl İlköğretim Okulu' nda, ortaöğretimimi İstanbul Fatih Samiha Ayverdi Anadolu Lisesi' nde tamamladım. Lisans eğitimimi İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' nde 2015 yılında tamamladım. 2016 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2017-2019 yılları arasında kamu eczacısı olarak görev yaptım. 2019 yılı Mart ayından itibaren serbest eczacılık yapmaktayım.