

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

**KARDİYAK CERRAHİ UYGULANAN
RATLARDA, PREOPERATİF DİYETTEKİ
PROTEİN VE YAĞIN BİTKİSEL VEYA
HAYVANSAL KAYNAKLI
ALİMINİN MİYOKARD KORUNMASI ÜZERİNE
ETKİSİ**

MUSTAFA BARIŞ KEMAHLI

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF.DR. S. KIVANÇ METİN**

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2020

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

**KARDİYAK CERRAHİ UYGULANAN
RATLARDA, DİYETTEKİ PROTEİN VE YAĞIN
BİTKİSEL VEYA HAYVANSAL KAYNAKLI
ALİMINİN MİYOKARD KORUNMASI ÜZERİNE
ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
MUSTAFA BARIŞ KEMAHLI**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF.DR. S. KIVANÇ METİN**

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projesi Tarafından 2019.KB.SAG.070

Proje No İle Desteklenmiştir.

TEŞEKKÜRLER

Asistanlık eğitimime bilgi ve deneyimleriyle büyük ve değerli katkılarda bulunan hocalarım sayın Prof. Dr. Öztekin OTO, Prof. Dr. H. Hüdai ÇATALYÜREK, Prof. Dr. Ş. Baran UĞURLU, Prof. Dr. E. Erdem SİLİSTRELİ, Prof. Dr. A Cenk ERDAL, Prof. Dr. O. Nejat SARIOSMANOĞLU, Prof. Dr. D. Özalp KARABAY, Doç. Dr. Serdar BAYRAK ayrıca tezimi yöneten ve gerçekleşmesinde büyük emeği olan hocam sayın Prof. Dr. S. Kıvanç METİN'e

Büyük cerrahi ve hekimlik katkılarının yanı sıra benim için bir mentör olan her zaman yanımda ve arkamda duran hocam sayın Doç. Dr. Tuğra GENÇPINAR'a

Asistanlığım boyunca beraber çalıştığım asistan arkadaşlarıma, servis ve yoğun bakım hemşire ve personellerine, ameliyathanemizin hemşire, perfüzyonist ve personellerine, poliklinik çalışanlarımıza

Tez çalışmam boyunca emek yoğun destekleri için Biyokimya Ana Bilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. A. Semra KOÇTÜRK ve doktora öğrencileri Dr Tuğba ERKMEN, Dr. Belgin SERT SERDAR ve Dr Özgün KIMIZOĞLU'na

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman YILMAZ'a

Değerli katkıları için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı öğretim üyesi Kıvanç YÜKSEL'e

Beni her türlü zorluğa rağmen bugünlere getiren, sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem, ağabeyim ve bir yıl önce acı kaybını yaşadığım babama

En zor anlarımda yanımda olan, varlığıyla bana güç veren, hayat arkadaşım sevgili eşim Gözde KEMAHLI'ya

Doğduğu günden beri yaşama sevincimiz haline gelen mutluluk kaynağımız canım oğlum Tuna KEMAHLI'ya

Sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER TABLOSU

ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE TABLOLAR DİZİNİ	6
KISALTMALAR.....	7
ÖZET	8
ABSTRACT	9
GİRİŞ VE AMAÇ.....	11
GENEL BİLGİLER	12
1. Bitkisel Tabanlı Beslenme	12
2. Miyokard Korunması	13
3. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Altında Yatan İntrasellüler Mekanizmalar	14
4. Kristaloid kardiyopleji.....	16
5. Kan Kardiyoplejisi	17
6. Antegrad Kardiyopleji.....	18
7. Biyokimyasal Belirteçler	19
1. Bax ve Bcl-2	19
2. Glutathione.....	19
3. Hsp-70	20
4. Malondialdehit	20
5. Protein karbonil.....	20
6. Lipid Profili: HDL-C, LDL-C, Total Kolesterol.....	21
GEREÇ VE YÖNTEM	22
1. Lipid Profilini Değerlendirme Amaçlı Kan Örneklenmesi	22
2. Deney Prosedürü	23
3. Doku Homojenizasyonu ve ELISA Prosedürü	25
4. İstatistiksel Yöntem	25
BULGULAR	26

1. Lipid Profili Bulgularının Değerlendirilmesi	26
2. Büyüme Gelişmeye Yönelik Ağırlık Değerlendirilmesi	29
3. Apoptoz Belirteęlerinin Değerlendirmesi.....	29
4. İskemi Reperfüzyon Hasar Belirteęlerinin Değerlendirmesi.....	30
5. Kardiyoprotektif Belirteę Değerlendirmesi	32
6. Antioksidan Kapasite Değerlendirmesi.....	32
TARTIŞMA.....	33
SONUÇ	37



ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Grafik 1 Sekizinci hafta LDL-C düzeyleri (ng/ml)	26
Grafik 2 Sekizinci hafta HDL-C düzeyleri (ng/ml)	26
Grafik 3 Sekizinci hafta TC düzeyleri (ng/ml)	27
Grafik 4 on ikinci hafta LDL-C düzeyleri (ng/ml)	27
Grafik 5 on ikinci hafta HDL-C düzeyleri (ng/ml)	28
Grafik 6 on ikinci hafta TC düzeyleri (ng/ml)	28
Grafik 7 dördüncü ve sekizinci hafta ağırlıkları (gram)	29
Grafik 8 Bax protein düzeyleri (ng/mg protein)	30
Grafik 9 Bcl-2 protein düzeyleri (ng/mg protein)	30
Grafik 10 MDA düzeyleri (nmol/mg protein)	31
Grafik 13 Protein karbonil düzeyi ng/mg protein	31
Grafik 12 Hsp-70 protein düzeyi (ng/mg protein)	32
Grafik 11 GSH düzeyleri (ng/mg protein)	32
Tablo 1 Kardiyopleji solüsyonları ve içerikleri	16
Tablo 2 Kardiyoplejik solüsyonların değişen içerik ve sıcaklık değerlerine ek olarak farklı uygulama yolları	18
Şekil 1 Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarının ana komponentleri. Hücre içi kalsiyum artışı ve mitokondriyal kaynaklı ROT üretimi mPTP, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneği; SR, sarkoplazmik retikulum; Cyt c, sitokrom c	14
Şekil 2 Aort kökünden kristaloid kardiyopleji uygulanması	24
Şekil 3 onuncu dakikada kan kardiyoplejisi uygulaması	24

KISALTMALAR

ATP: Adenozin trifosfat

Bax: Bcl-2-associated X protein

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BCA: Bicinchoninic acid

BTB: Bitkisel Tabanlı Beaslenme

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

GSH: Glutatyon

HDL-C: Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol

Hsp-70: Isı Şok Proteini-70

H2O2: Hidrojen peroksit

I/R: İskemi reperfüzyon

LDL-C: Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol

MDA: Malondialdehit

mPTP: Mitochondrial permeability transition pore

Na/K-ATPaz: sodyum potasyum ATPaz

O2: Oksijen radikali

PBS: Phosphate Buffered Saline

SR, sarkoplazmik retikulum

TC: Total kolesterol

Cyt c: sitokrom c.

KARDİYAK CERRAHİ UYGULANAN RATLARDA, PREOPERATİF DİYETTEKİ PROTEİN VE YAĞIN BİTKİSEL VEYA HAYVANSAL KAYNAKLI ALİMINİN MİYOKARD KORUNMASI ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Mustafa Barış KEMAHLI

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Kalp ve damar hastalıkları dünyada önde gelen ölüm nedenlerindedir. Bu hastalıklar diyet alışkanlıklarımız ile sıkı bir ilişki içerisinde. Bitkisel tabanlı beslenme yararlı etkileri gittikçe daha fazla ortaya çıkan bir beslenme tipidir. Kardiyak hastalıkların tedavisinde uygulanan çoğu kardiyak cerrahi prosedürde kalp miyokardiyal koruma teknikleri de kullanılarak kardiyoplejik arrest yapılmaktadır. Buna rağmen miyokardiyal hasar meydana gelebilmektedir. Biz çalışmamızda diyetle alınan protein ve yağ kaynaklarının bitkisel veya hayvansal olmasının kardiyak cerrahi uygulamalarında kardiyoplejik arrest yapılan kalpteki miyokard korunması üzerine etkisini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Bitkisel veya hayvansal tabanlı besleme yapılacak iki rat grubu (n=8) oluşturuldu. Bitkisel tabanlı beslenme (BTB)'de soya proteini ve palmye yağı; hayvansal kaynaklı beslenme (HKB)'de kazein proteini ve süt yağı kullanıldı. Ratlar 12 hafta boyunca beslendi. Dördüncü ve sekizinci haftalarda ağırlıkları ölçüldü. Sekizinci ve 12. haftada lipid profilini gösterir LDL-C, HDL-C, TC düzeyleri değerlendirildi. 12. haftada ratlarda açık kardiyak cerrahi prosedüre uygun olarak aorta klemplenip kristaloid kardiyopleji ile kalp arrest edildi. Onuncu dakikada kan kardiyoplejisi verilerek kalp rezeke edildi, -80 °C'de korumaya alındı. Sol kalp miyokardından ELISA yöntemi ile MDA, Bax, Bcl-2, protein karbonil, glutatyon, Hsp-70 düzeyleri incelendi.

Bulgular: Gruplar arasında kolesterol düzeyi ve ağırlıklarda fark saptanmamıştır. BTB daha yüksek Bcl-2 düzeyi ile daha güçlü antiapoptotik etkinlik sağlamıştır(p<0,005). MDA, Bax, Hsp-70, GSH, Protein Karbonil düzeylerinde BTB'nin olumlu etkilerine yönelik ortalama/ortanca değerler oluşmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sağlamamıştır(p>0,05).

Sonuç: BTB kardiyak cerrahi uygulamalarında daha güçlü antiapoptotik etkinlik sağlar. I/R hasarı nedeni lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, antioksidan kapasite etkisinde fark gözlenmemiştir. Çalışmamızda gözlenen BTB'yi destekler ortalama değerler daha geniş

örneklem büyüklüğüyle yapılacak çalışmalarla istatistiksel anlamlılık kazanabilir. Daha uzun beslenme süresiyle diyet etkisi daha açık ortaya çıkabilir. Omnivor diyetle önemli yer kaplayan aterosklerotik potansiyeli daha yüksek olan kırmızı et ya da işlenmiş etlerin protein kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalarla farklı etkiler gözlemlenebilir.

Anahtar Kelimeler: bitkisel tabanlı beslenme, iskemi reperfüzyon hasarı, miyokard korunması, deneysel çalışma

ABSTRACT

EFFECT OF PREOPERATIVE INTAKE OF PLANT-BASED OR ANIMAL-BASED PROTEIN AND LIPID ON MYOCARDIAL PROTECTION IN RATS UNDERGOING CARDIAC SURGERY

Mustafa Barış KEMAHLI, MD

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine Department of Cardiovascular Surgery, Izmir

Objective: Cardiovascular diseases are among the leading causes of death in the world. These diseases are closely related to our dietary habits. Plant-based Diet(PBD) is a type of nutrition that has more and more beneficial effects. In most cardiac surgical procedures applied in the treatment of cardiac diseases, the cardioplegic arrest is performed for myocardial protection. However, myocardial damage can occur. In our study, we investigated the effect of dietary protein and lipid sources on the myocardial protection in cardiac surgery applications.

Material and Method: Two groups of rats (n = 8) were fed on plant-based(PBD) or animal-based diet. Soy protein and palm oil in plant-based nutrition; Casein protein and milk fat were used in animal nutrition(ABD). Rats were fed for 12 weeks. Weights were measured in the fourth and eighth weeks. LDL-C, HDL-C, TC levels, which show lipid profile at eighth and 12th weeks, were evaluated. At the end of the 12th week, in accordance with the open cardiac surgical procedure, the aorta was clamped in the rats and the heart was arrested by crystalloid cardioplegia. After reperfusion with blood cardioplegia at tenth minute, the heart was resected and protected at -80°C. Malondialdehyde(MDA), Bax, Bcl-2, Protein Carbonyl, Glutathione(GSH), Hsp-70 levels were examined by ELISA method from the left heart myocardium.

Results: There was no significant difference in cholesterol levels and weights between the groups. PBD provided stronger antiapoptotic activity with higher Bcl-2 level ($p < 0.005$). MDA, Bax, Hsp-70, GSH, Protein Carbonyl levels did not provide statistical significance despite the average / median values were in favor of PBD ($p > 0.05$).

Conclusion: PBD provides stronger antiapoptotic activity in cardiac surgery applications. No difference was observed in lipid peroxidation, protein oxidation caused by I/R damage and antioxidant capacity effects. Average values that support PBD in our study may be statistically significant with studies to be carried out with a larger sample size. With a longer feeding time, the dietary effect may be more obvious. Different effects can be observed with studies in which red meat or processed meats with higher atherosclerotic potential occupying an important place in the omnivorous diet are used as protein sources.

GİRİŞ VE AMAÇ

Kalp ve damar hastalıkları yaygınlığı giderek artmakla birlikte en önemli ölüm nedenlerinden biri haline gelmiştir[1]. Sebepleri irdelendiğinde hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon gibi diyetle ilişkili özellikler öne çıkmaktadır. Bunun sonucu olarak alınan diyet içerikleri tartışma konusu olmaktadır. Batı tipi, hayvansal kaynaklı beslenmenin kalp hastalıklarına predispozan faktör oluşturduğuna dair ciddi bulgular bulunmaktadır[2]. Batı tipi beslenmenin olası zararlarının farkındalığı ile birlikte son yıllarda bitkisel kaynaklı beslenme ile karşılaştırılmaktadır. Bitkisel tabanlı beslenmenin kalp ve damar hastalığı risk faktörleri olan diyabetes mellitus ve hipertansiyon üzerine olumlu etkiler göstermektedir[3, 4]. Bu beslenme tipinin kalp hastalıklarından koruyucu etkilerinin yanı sıra mortaliteyi düşürücü etkilerine dair kanıtlar artmaktadır[5].

Kalp ve damar hastalıklarının yaygınlaşmasının sonucu olarak kalp cerrahisi uygulamaları da gittikçe artmıştır. Kardiyak cerrahide kalp akciğer makinasının kullanılması ile birlikte önemli ilerlemeler yaşanmıştır ve kardiyopulmoner bypassın yapılabilmesini sağlamıştır. Birçok kardiyak cerrahi girişimde kardiyopulmoner bypass kullanılıp aortaya klemp yerleştirilerek kalbin diastolde durdurulduğu kansız ve hareketsiz bir ortam sağlanarak ameliyatlarda uygulanmaktadır. Cerrahinin uygulanmasının ardında klemp kaldırılıp kalp tekrar çalıştırılmaktadır. Benzer cerrahi prosedür ve kalp koruma yöntemlerine rağmen bazı hastalarda kardiyak arrest kalpte hasara neden olmakta, morbidite ve ameliyat mortalitesine neden olmaktadır.

Biz bu çalışmada diyet alışkanlıklarımızda yer alan protein ve yağ kaynaklarının bitkisel veya hayvansal olarak alınmasının, kardiyak cerrahi uygulanıp aortanın klemp lenip kardiyoplejik arrest yapılmış kalpte oluşan hasar ile ilişkisini ortaya koymayı amaçladık. Bunu belgelemek için iskemi reperfüzyon hasarında lipid ve protein oksidasyonu gösterir ürünler, kardiyoprotektif etkili proteinler ile apoptozu gösterir biyokimyasal belirteçler kullanılmıştır.

GENEL BİLGİLER

1. Bitkisel Tabanlı Beslenme

Bitkisel tabanlı diyetin birincil amacı bitkisel içerikli gıdaların tüketimini arttırırken işlenmiş yiyecekler, şeker ilaveleri ve hayvansal kaynaklı ürünlerin alımının en aza indirilmesidir [6]. Bu diyet tipi sebze (pişmiş veya pişmemiş), meyve, baklagil, soya, kabuklu kuru yemiş alımını destekler ve genellikle düşük yağ içeriğine sahiptir [7, 8]. Bu alanın önde gelen savunucuları BTB(bitkisel tabanlı beslenme)'nin içeriğini nelerin oluşturduğuna dair farklı fikirlere sahiptir. Az miktarda yumurta beyazı ve yağsız süt gibi hayvansal ürünlerin alımını uygun gören gruplar da mevcuttur [9, 10]. Bitkisel tabanlı beslenme; vegan ve vejetaryen terimleri birbirinin yerine kullanılabilmeyle beraber diyetteki detayları ve kısıtlanan besinleri anlamak için kullanımına dikkat edilmelidir [6]. Bitkisel tabanlı beslenme diyet tiplerinin neyi içerip neyi dışladığına göre ayrılmaktadır. Veganlar hayvanlardan elde edilmiş süt, yumurta, peynir hatta bal gibi ikincil ürünlerin hiçbirini tüketmezler. Vejetaryenlik ise veganlık ile omnivor beslenme arasındaki spektrumdur. Tüketilen hayvansal gıda türüne göre vejetaryen beslenme çeşitleri bulunmaktadır. Bunlar;

Lakto-ovo vejetaryen beslenme tipi: Hiçbir et tüketilmemekte ancak hayvanlardan üretilen süt, yumurta ve bal gibi ikincil gıdalar tüketilmektedir.

Lakto vejetaryen beslenme tipi: Hiçbir et, bunun yanında yumurta da tüketilmez ancak bal, süt ve süt ürünleri tüketilmektedir.

Ovo vejetaryen beslenme tipi: Yumurta hariç hiçbir hayvansal ürünün tüketilmemektedir.

Pesketaryen beslenme tipi: Kırmızı et ve kümes hayvanlarının tüketilmediği; ancak balık ve diğer deniz ürünlerinin tüketildiği beslenme çeşididir.

Polo vejetaryen beslenme tipi: Sadece kümes hayvanlarının etinin tüketildiği, diğer hayvansal gıdaların tüketilmediği vejetaryenlik çeşididir.

Whole-foods, bitkisel tabanlı, az yağlı: İşlenmemiş ve katkı maddesi eklenmemiş sebze, meyve, tohumlular, baklagiller ve az miktarda kabuklu kuru yemiş tüketimini içeren bitkisel besinlerin alımını teşvik eder. Bu diyet tipinde maksimum yarar için hayvansal ürün alımı sınırlıdır. Yağ alımı kısıtlanmıştır.

Akdeniz tipi beslenme: whole-foods beslenmeye benzer ancak az miktarda tavuk, süt ürünleri, yumurta, ayda bir iki kez kırmızı et tüketimine izin verir. Balık ve zeytinyağı tüketimi teşvik edilir [6, 11].

Total bitkisel tabanlı beslenme yapılabileceği gibi diyetin üç makronutrientinden biri olan protein kaynağının da değiştirilmesi de mümkündür. Çalışmamızda bahsi geçen spektrum içinde yer olacak şekilde protein kaynağının ve bunun değişimi sonucu yağ kaynağının da değişimi ile konu oluşturulmuştur. Bitkisel tabanlı proteinler potansiyel tıbbi faydalarından dolayı tüketicileri ve araştırmacıların ilgili çekmektedir. Bitkisel proteinler tabii olarak bitkisel ürünlerden alındıkları için bunların tüketimi ile birlikte bitkisel lifler, vitaminler, mineraller ve fitokimyasallar da alınmaktadır. Bunlar dolaylı olarak pozitif yarar sağlayabilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar bunları saf bitkisel protein alımından ayırtamaz, ancak izole proteinler ile müdahale çalışmaları da bulunmaktadır. Soya, bezelye, nohut gibi izole proteinler kullanılarak yapılan serum lipid düzeyi ve kalp ve damar sistemine olumlu etkilerini gösteren müdahale çalışmaları mevcuttur[12].

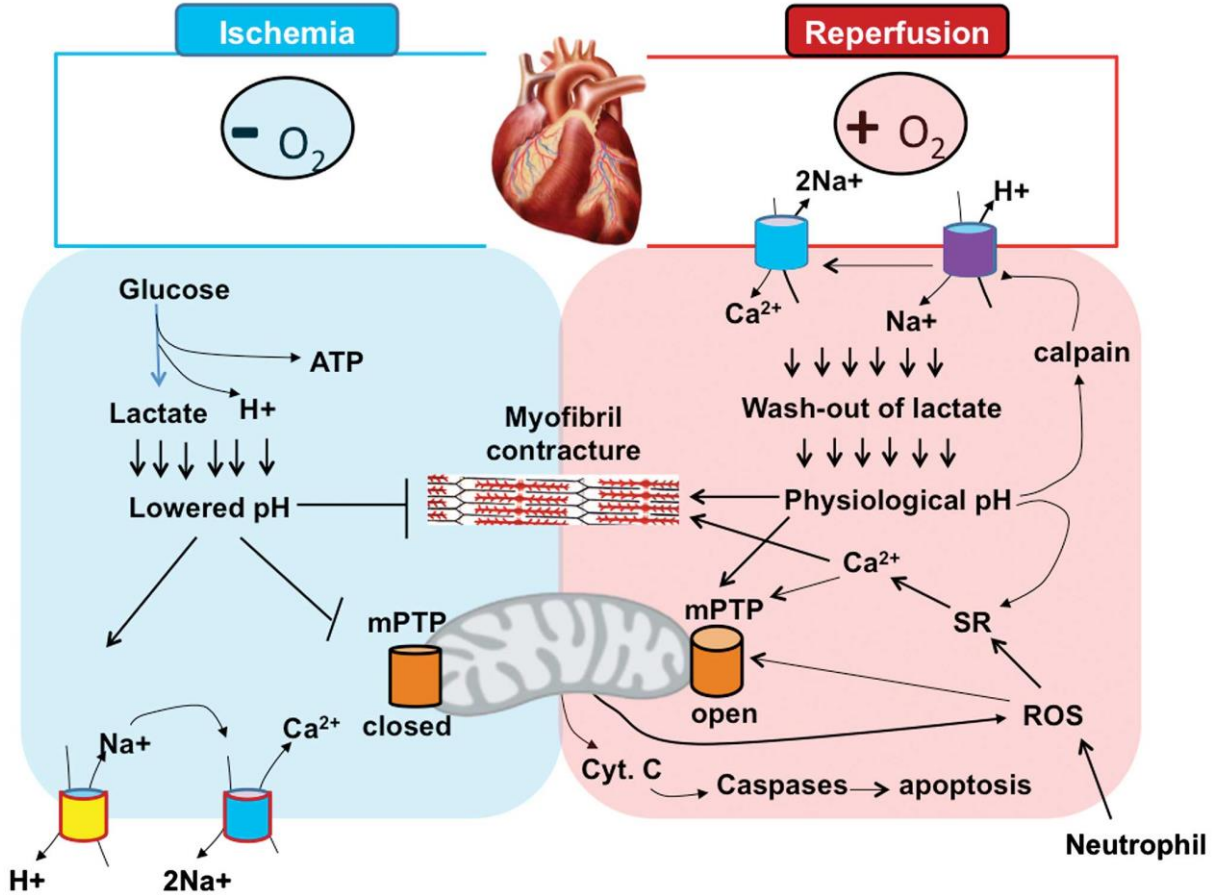
2. Miyokard Korunması

Birçok kardiyak cerrahi prosedür için kansız ve hareketsiz ortam sağlanması ve hava embolisinin engellenmesi için kalbin durdurulması gerekmektedir. Bu işlem kalpte global bir iskemiye neden olur. Bu global iskemi sonucu kalpte dört tip hasar meydana gelir. Bunlar: miyokardiyal hücresel *stunning*, miyokardiyal hücre nekrozu, endotelial hücre hasarı, özelleşmiş ileti hücresi hasarıdır.

Miyokardiyal *stunning* iskemi reperfüzyonun neden olduğu bir miyokardiyal hasar çeşididir[13]. Akut iskemik miyokardın reperfüzyonunda ortaya çıkan geri dönüşümlü, iskemik, sistolik ve diyastolik disfonksiyona miyokardiyal *stunning* denir[14]. Bu reperfüzyon hasarı formu, oksidatif stres ve hücre içi kalsiyum aşırı yüklenmesinin miyokardiyal kasılma aparatı üzerindeki zararlı etkilerinden kaynaklanır[15]. Miyokardiyal *stunning*'de iskemi, kas nekrozu yapmaksızın belirli bir süreyle sistolik ve diyastolik disfonksiyona neden olabilir ve geri dönüşlüdür. Bu iskemik periyod aynı zamanda ilerleyerek geri dönüşsüz olarak yani miyokardiyal nekrozla da sonuçlanabilir. Hasarın geri dönüşlü veya geri dönüşsüz olarak sonuçlanmasına neden olacak süre net değildir. İskemi sonrası 10. dakikada nekrozun olduğu çalışmalarda vardır, 6 saat sonra canlı miyokard görülenler çalışmaları da mevcuttur[16].

3. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Altında Yatan İntrasellüler Mekanizmalar

I/R hasarının primer mediatörleri intrasellüler kalsiyum yüklenmesi ve reperfüzyonun başlaması ile oluşan ROT'lerinin indüklediği oksidatif streştir[17].



Şekil 1 Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarının ana komponentleri. Hücre içi kalsiyum artışı ve mitokondriyal kaynaklı ROT üretimi mPTP, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenağı; SR, sarkoplazmik retikulum; Cyt c, sitokrom c.

Kaynak: L. C. Cardiac Surgery in the Adult

İskemi sırasında meydana gelen metabolik değişiklikler miyositlerin endojen antioksidan savunma mekanizmalarını deplase eder. I/R'nun mitokondriyal komplekse verdiği hasar nedeniyle oldukça fazla ROT (O₂ ve H₂O₂) oluşumu ve bunun sonucunda hücrel lipit, protein ve nükleik asit hasarı meydana gelir. Glutasyonun (GSH) burada oksidatif strese karşı kritik bir rolü mevcuttur. GSH okside protein thiollerinin tamirinde kullanılır. Glutatyondaki

azalma ROS ilişkili protein hasarının detoksifiye edilebilmesini zayıflatır. Hücrel glutatyondaki azalma ROS ilişkili protein hasarının tamir edilebilme yeteneğini azaltır[18, 19].

Miyokardiyal *stunning*'in ROT ile ilişkili olduğuna dair ikna edici kanıtlar mevcuttur. *In vivo* olarak kısa bir iskeminin ardından gelen reperfüzyon ile vasküler boşluğa ROT'lerinin hızlı bir salınımı olduğu ilgili çeşitli kimyasal ajanların varlığı ile gösterilmiştir. Mitokondri kardiyak miyositlerde major ROT kaynağıdır[20].

Tarihsel olarak miyokardiyal I/R hasarı; enzimatik salınım, lekelenme tekniğinin kullanıldığı histolojik incelemeye dayanan geri dönüşlü ve dönüşsüz hasarla karakterizedir. Artan kanıtlar ya hep ya hiç fenomeninden ziyade geri döndürülebilir den geri dönüşsüze uzanan bir süreç olduğu yönündedir.

Apopitoz ATP'nin mevcudiyetine dayanır ve hücrel membran bütünlüğünün kaybından önce gelir. Yine de hızlı bir ATP azalması apopitozun enzimatik süreci tamamlanmadan, Na/K-ATPaz'ın hücrel volumü düzenleyememesine ve sonucunda da plazma membranının rüptürü ve nekrotik hücre ölümüne neden olur[21, 22].

İntrasellüler ROS ve/veya intrasellüler kalsiyum yüklenmesi proapopitotik proteinlerin aktivasyonu ve antiapopitotik proteinlerin inaktivasyonu yoluyla apopitozisi başlatır. Böylece mitokondri dış membran permeabilitesi artar, sitokrom c sitozole salınır[23-25].

Kardiyoplejik cerrahi teknikte çeşitli kimyasallar içeren solüsyonlar ile kalp hızla diastolde durdurulup, iskemi reperfüzyon hasarına karşı korunarak hareketsiz bir cerrahi ortam sağlanır. Düşük riskli hastalarda modern cerrahi teknikler görece güvenli iken geçtiğimiz on yılda hasta özellikleri değişmektedir. Koroner arter hastalığı ve kötü ejeksiyon fraksiyonuna ek olarak hastalar obezite, diyabet, renal disfonksiyon, periferik arter hastalığı gibi birçok komorbidite ile prezente olmaktadır. Kardiyoplejik teknikteki ilerlemelere rağmen kardiyak cerrahi sonrası hala kötü klinik sonlanımla ilişkili olan düşük kardiyak output sendromu meydana gelmektedir. Bu nedenle hem kardiyoplejik solüsyonlara yeni katkı ihtiyacı hem de kardiyopleji tekniğinde gelişmelere olan ihtiyaç açıktır[26].

Günümüzde kristaloid ve kan kardiyoplejisi olmak üzere iki tip kardiyopleji solüsyonu kullanılmaktadır. Bu solüsyonların içerikleri tabloda gösterildiği şekildedir.

İntrasellüler kristaloid KP	Na	K	Mg	Ca	Tamponlayıcı	pH	Osmolarity (mOsm/L)	Diğer İçerikler
Bretschneider's no. 3	12	10	4	0	Histidine	7,4	320	Procaine; mannitol
Bretschneider's HTK	15	9	4	0	Histidine	7,3	310	a-ketoglutarate; tryptophan
Roe's	27	20	3	0	Tham	7,6	347	glukoz
Ekstrasellüler kristaloid KP								
del Nido solüsyonu	140	5	0,75	0	Bikarbonat	7,4	375	Lidokain, mannitol
St. Thomas no.1	144	20	32	4,8	yok	5,5	285	prokain
St. Thomas no.2	110	16	32	1,2	Bikarbonat	7,8	324	yok
Tyer's	138	25	3	1	Bikarbonat	7,8	275	Asetat; glukonat
Kan KP								
Soğuk İndüksiyon	118	18	6	0,3-0,5	± Tham	7,6-7,8	320-340	Glikoz, oksijen
Ilık İndüksiyon	122	25	1,6	0,15-0,25	± Tham	7,5-7,6	340-360	Glikoz;oksijen glutamat;aspartat

Tablo 1 Kardiyopleji solüsyonları ve içerikleri

4. Kristaloid kardiyopleji

İlk kardiyoplejik solüsyonlardan olan kristaloid kardiyopleji kardiyak metabolizmayı azaltıp kansız ve hareketsiz bir ortam sağlayarak cerrahinin uygulanabilirliğini sağlar. Kristaloid kardiyoplejinin içeriği farklılık gösterebilmektedir. İçeriklerin oluşmasını sağlayan temel prensip;

- potasyum veya magnezyum kullanarak hızlı kardiyak arrest sağlamak
- enerji ihtiyacını azaltmak ve hipotermiyi kullanarak ATP rezervini korumak
- intrasellüler iyon ve metabolik hemostazı sürdürmek

- d) miyokardiyal oksijen tüketimini azaltmak
- e) glikoz ve aminoasitlerden yararlanarak aerobik ve anaerobik enerji üretimini artırmak
- f) bikarbonat, fosfat ve histidin ile pH'yı stabilize etmek
- g) hücrel membranı, steroid, glutatyon gibi ROS süpürücüleri, kalsiyum antagonisti ve/veya prokain ile stabilize etmek
- h) hipokalsemik ortam sağlayıp ve magnezyum ekleyerek intrasellüler kalsiyum yüklenmesinden kaçınmak
- i) mannitol gibi kolloidler ekleyerek hücrel ödemi önleyip normal onkotik basıncı sürdürmek

5. Kan Kardiyoplejisi

Dünyada yaygın olarak kullanılan soğuk kan kardiyoplejisi Amerika Birleşik Devletlerinde en sık kullanılan kardiyoplejik tekniktir. Kanın potasyumun indüklediği kardiyak arrestte kullanılmasının temeli

- a) Oksijenlenmiş bir ortam ve kalbi arrest esnasında aralıklı olarak reoksijenize edebilmesi
- b) kardiyoplejik solüsyon volümlerini azaltarak hemodilüsyonu sınırlandırması
- c) osmotik özellikleri ve yüksek tamponlama kapasitesi
- d) fizyolojik elektrot ve pH düzenlemesine izin vermesi
- e) endojen antioksidan ve ROS süpürücülerini sunması
- f) diğer solüsyonların hazırlanmasından daha az kompleks olmasıdır.

Çeşitli formülasyonlar olmasına rağmen kan kardiyoplejisi hasta kardiyopulmoner bypass altında iken hastadan kan hastadan alınıp buna kristaloid kardiyopleji eklenerek oluşturulur. Bu karışım 8:1, 4:1, 2:1 olarak kullanılabilir. Kardiyoplejik solüsyonların değişen içerik ve sıcaklık değerlerine ek olarak farklı uygulama yolları vardır[26].

İnfüzyon Tipi	
I.	Antegrad
II.	Retrograd
III.	Kombine Retrograd/Antegrad

İnfüzyon Sıcaklıkları	
I.	Soğuk
II.	Ilık
III.	Sıcak

İnfüzyon Aralıkları	
I.	Aralıklı
II.	Devamlı

Tablo 2 Kardiyoplejik solüsyonların değişen içerik ve sıcaklık değerlerine ek olarak farklı uygulama yolları

6. Antegrad Kardiyopleji

Dünyada en yaygın kullanım alanı bulan kardiyopleji infüzyon tipidir. Uygulanması için aorta klempenmiş vaziyette olmalıdır, böylece aortik kök kardiyopleji solüsyonu ile dolabilmelidir. Kardiyopulmoner bypassın başlamasının ardından aortik kros klempin önüne aortaya yerleştirilen bir katater yoluyla verilen kardiyoplejik solüsyonun uygulanması ile hızlı bir kimyasal arrest gerçekleşir. Genellikle başlangıç dozu idame dozlardan daha yüksek konsantrasyonda potasyum içerir. Genellikle 250-300mg/ml'lik hızlı bir infüzyon ile aortik kapak kapanır. Kardiyak aktivite devam eder veya tekrarlırsa ek infüzyon yapılabilir. İdame 15-20 dakikalık aralıklarla veya gerektiğinde uygulanır. Soğuk salin ile eş zamanlı external soğutma yapılabilir. Kardiyopleji infüzyonu sırasında tipik olarak aort kök basıncı 60-80 mmHg arasında takip edilmelidir. 300-500 ml'lik aralıklı idame kardiyopleji dozu 15-20 dakikada bir veya kalpte elektriksel aktivite fark edildiğinde uygulanmalıdır. Antegrad kardiyopleji uygulaması kompeten bir aortik kapağa bağlıdır. Aortik yetmezliği olan hastalarda görece kontrendike olup olasılıkla inefektif olacaktır. Bunun gibi vakalarda antegrad kardiyopleji uygulaması her bir ostium için olan kanuller yoluyla direk koroner ostiumlardan yapılır. Bu teknik aort kapak replasmanı, asendan aort anevrizma tamiri ve aortik kök replasmanı gibi asendan aortanın açılması gereken vakalarda kullanılır[26].

7. Biyokimyasal Belirteçler

1. Bax ve Bcl-2

IRH, fizyolojik ve biyokimyasal göstergelerdeki değişikliklere ek olarak, hücre apoptozunu indükler. Kardiyomiyosit apoptozu, onkogenler ve Bcl-2 ile ilişkili apoptoz regülatörler protein ailesi gibi tümör baskılayıcı genler tarafından düzenlenir[27]. Bcl-2 ailesi proteinleri otonom apoptotik yolağın düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bax ve Bcl-2'nin sinyal transdüksiyonunu uygulamak için hücrenin farklı kısımlarına göç edebildiği, böylece hücre hayatta kalmasını veya apoptozu düzenleyebildiği bilinmektedir[28-30]. Protoonkogen olan bcl-2 familyası hücre ölümünün düzenlenmesinde anahtar rol oynar ve hücre ölümü kararının verilmesinde birçok düzeyde karar verici olarak rol alır[31]. Apoptotik yolun bir inhibitörü olarak tarif edilmesine ek olarak bcl-2 güçlü antioksidan özellikler içermektedir ve bu nedenle hücre hasarını apoptotik ve oksidatif stres modellerinde genel bir sağkalım fonksiyonu sağlayabilir[32]. Genetik olarak kontrol edilen ve programlanmış hücre ölümü olan apoptoz iskemik reperfüzyonun indüklediği miyokard hasarı ile ilişkilidir. Nekrotik miyokard zonuna komşu bölgelerde reperfüzyon sonrasında infarktın yaygınlaşmasına neden olan apoptotik hücre ölümü tespit edilmiştir[33-35]. İskemik reperfüzyonun indüklediği infarkt yaygınlığı antiapoptotik tedavi ile önemli ölçüde azaltılabilir[36, 37]. Reperfüzyon sırasında oluşan apoptozu neyin tetikleyip neyin regüle ettiği tam olarak bilinmese de, son zamanlardaki hayvan çalışmaları ve klinik çalışmalar antiapoptotik bcl-2 ve proapoptotik bax proteini arasındaki dengenin önemli bir rol oynadığını göstermektedir[23, 38, 39].

2. Glutathione

Glutathione tiyoester formasyonu ve hücre redoks reaksiyonlarına katılan majör hücre tioldür[40]. Glutathione bir tripeptittir ve vücudumuzdaki en büyük non-protein tiol havuzunu oluşturur, aynı zamanda da hücre içi majör antioksidandır[41]. GSH, glutathione disülfitten glutathione redüktaz ile rejenere olur ve bu, glutathioneun antioksidan savunmasının primer mekanizmasıdır[42]. Çok fonksiyonlu bir antioksidan olarak GSH, kalpteki önemli bir antioksidan savunma mekanizması olup, enzim ve diğer proteinlerin tiol gruplarını indirgenmiş halde muhafaza etmede ve membran lipitlerinin peroksidasyonunu önlemede koruyucu bir işlevi vardır[43]. Glutathione iskemik reperfüzyon sonrası ROS hasarına karşı koruyucudur[44]. Buna ek olarak, GSH, hidrojenperoksit ve lipid peroksitleri nötralize etmek için sadece elektron

donörü değil, aynı zamanda oksijen ve azot bazlı serbest radikallerin de temizleyicisidir[45-47].

3. Hsp-70

Isı şok proteinleri diğer endojen proteinlerle benzer etkileri olan, çeşitli stresörlere yanıt olarak salınan moleküler şaperonlardır. Hsp'ler moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılırlar. Artan Hsp düzeyleri miyokard enfarktüsünde hücre hasarını modifiye etmektedir[48]. Artan hsp-70 değerleri miyokardiyal iskemi reperfüzyona karşı rezistans sağlar[49, 50]. Antioksidan sistemin tamamlayıcısı gibi hareket eden, hücresel savunma mekanizması gibi çalışan Hsp'ler, oksidatif strese yanıt olarak hücre hasarının tamirinde destekleyici rol oynarlar[51]. Hsp'lerin ekspresyonu kardiyak hücre iskeletinin ve aktinin korunup devamının sağlanmasında rol alıp apoptozun inhibisyonunu sağlar[52].

4. Malondialdehit

İskemi reperfüzyon sonrasında oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stresin çeşitli biyolojik hedefleri vardır. Oksidatif strese en çok maruz kalan biyolojik molekül lipidlerdir. Lipid oksidasyonu çok sayıda sekonder ürün ortaya çıkarır. Ortaya çıkan ve oldukça kararsız olan lipid peroksitleri reaktif karbonil grupları içeren bir dizi bileşik form oluşturmak üzere ayrışırlar ve ürünleri esasen aldehitlerdir. Bunlardan poliansature yağ asiti peroksitleri malondialdehit (MDA) üretir. MDA poliansature yağ asiti peroksidasyon ürünlerinden en çok çalışılanıdır. Bu aldehitin kendisi de oldukça toksik bir moleküldür. Lipidlerin yanı sıra DNA ve proteinler ile de reaksiyona girerek mutajenik ve aterosklerotik ürünler ortaya çıkarır. MDA hem bir lipid peroksidasyon markeri hem de toksik bir üründür[53-55].

5. Protein karbonil

İskemi reperfüzyon oksidatif hasara neden olan hücresel reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur[56]. Protein karbonilasyonu, proteinleri en sık etkileyen ve genellikle irreversible olan oksidatif modifikasyonu yansıtmaktadır. Bu modifikasyon kimyasal olarak stabildir ve karbonile proteinlerin tespiti ve depolanması için özellikle önemlidir [57]. Protein karbonilasyonu oksidatif stres ilişkili bozukluklarından majör belirtisidir [58].

6. Lipid Profili: HDL-C, LDL-C, Total Kolesterol

Kanda ölçülen yüksek LDL-C düzeyleri iskemik kalp hastalığı ile ilişkilidir. LDL-C düzeyinin düşürülmesi kardiyovasküler mortalitede azalma ile birlikte dir[59]. LDL-C primer ilişkili kolesterol olsa da total kolesterol ve HDL-C de kardiyak hastalık riskinde rol alır. LDL-C, total kolesterol ve trigliserid hastalık riski ile pozitif ilişkili iken HDL-C koruyucu bir rol oynar[60, 61].



GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 07/2019 protokol nolu izin alınmıştır. Deneyde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisiplin Deney Hayvanları Laboratuvarında üretilen 16 adet 21 günlük wistar albino erkek yavru kullanılmıştır. Rat modeli kullanılmasının amacı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarından kolay temin edilebilme, güvenilirlik ve deneyin tekrar edilebilme oranının yüksek olmasıdır. Deneye alınacak ratlar ayrı kafese alınarak *ad libitum* beslenmiştir. 12 saatlik aydınlık – karanlık siklusu gözetilerek biyolojik ritm korunan ratlarda, stabil iklimlendirme sağlanmış, deney gruplarında içeriği değiştirilmiş olmak üzere doğal yemleme altında çalışma yapılmıştır. Çalışmamızda temel amacımız protein kaynağının değiştirilmesinin kardiyak cerrahi ve miyokardiyal iskemi reperfüzyona etkisini araştırmaktır. Ancak tabii olarak protein kaynağı değiştiğinde diyetsel yağın da kaynağı değişecektir. Bu sebepten ötürü yemler oluşturulurken bitkisel kaynaklı ve hayvansal kaynaklı protein ayırımına ek olarak yemlerin yağ içerikleri de değiştirilmiştir. Yemlerin içerikleri ve kalorimetrik dağılımı D12450J koda göre yapılmıştır. Ratlar iki gruba ayrılmıştır. Deney grubu-1 bitkisel kaynaklı protein ve yağ ile beslenen, deney grubu-2 hayvansal kaynaklı protein ve yağ ile beslenen olan gruptur. Her iki grup da 8 adet rat içermektedir. Kullanılan yemler saflaştırılmış (purified) yemdir. Bitkisel kaynaklı yemde protein kaynağı olarak soya proteini, yağ olarak palmiye çekirdeği yağı; hayvansal kaynaklı yemde protein kaynağı olarak kazein, yağ olarak süt yağı tereyağı kullanılmıştır. Karbonhidrat kaynağı her iki grup için de sukroz mısır nişastası maltodextrin (%95lik) doğal selülöz olmak üzere aynıdır. Protein en az %18, karbonhidrat en fazla %70, yağ en az yüzde %4'tür. Enerjinin %10'u yağdan gelmektedir. Metabolik enerji 4057 Kcal/kg'dır. Yemlerde vitamin mix V10001 mineral mix S10026 mineral premixi mevcuttur. İki gruba ayrılmış olan ratlar dört adet kafeste izlenmiştir. 12 hafta boyunca belirtilen yemler ile *ad libitum* beslenmiştir. Gelişimlerini değerlendirebilmek amaçlı ratların ağırlıkları dördüncü haftanın ve sekizinci haftanın sonunda ölçülmüştür.

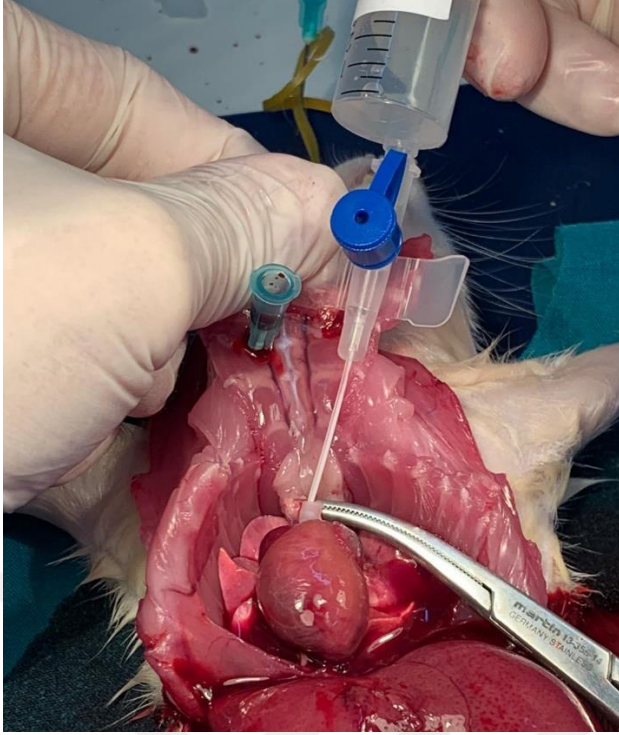
1. Lipid Profilini Değerlendirme Amaçlı Kan Örneklenmesi

Ratlardan, lipid profili gözlemlenmek amaçlı olarak sekizinci haftanın sonunda ve hayvanların sakrifiye edilip deneyin nihayete erdiği zamanda olmak üzere iki kez kan örneği alınmıştır. Sekizinci haftada alınan kan örnekleri ksilazin 10mg/kg dozundan kullanılıp uygun anestezi sağlanarak ratların kuyruk veninden alınmıştır. Bu kan alımında bir adet hayvansal

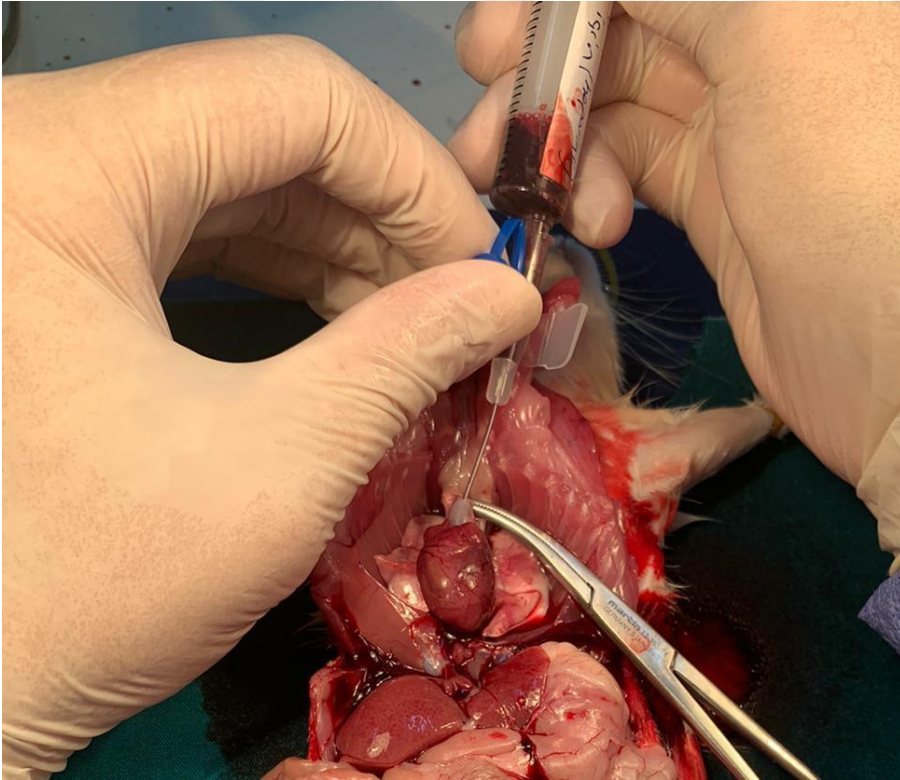
yem alan rat telef olmuştur. Bunun dışında her iki gruptan birer adet rat beslenme sürecinde telef olmuştur. Alınan örnekler dörtlü gruplar halinde soğuk uygulama altında biyokimya laboratuvarına transfer edilip eksi 80 derecede saklanmıştır. 12. haftada alınan örnekler ise hayvan sakrifikasyonu yapılacağı için santral olarak inferior vena kavadan elde edilmiştir.

2. Deney Prosedürü

12. Haftanın tamamlanmasının ardından ratlar ketamin 50mg/kg, ksilazin 10mg/kg dozundan uygulanarak anestezi ve analjezi sağlanıp tıraşları yapılmıştır. Batın insizyonu yapıp inferior vena kava eksplere edilip lipid profili değerlendirme, kan kardiyoplejisi ve reperfüzyon amaçlı önceden heparinlenmiş enjektöre kan örneği alınmıştır. Ponksiyon yapılan alan parsiyel olarak klemplenip kanama kontrolü sağlanmıştır. Solunum ve oksijenlenmenin bozulmaması için göğüs kafesi açılmadan önce belirtilen işlemler gerçekleştirilmiştir. Batın başlamış olan insizyon kaburgaları da içerecek şekilde soldan süperiora doğru uzatılmış kalp görünür hale getirilmiştir. Sol ventriküle 300 ü/kg dozdan heparin uygulanmıştır. Aorta pulmoner arterden serbestlenmiştir. Aortaya brakiosefalik arter çıkımından cross klemp yerleştirilip asendan aortadan St Thomas 2 kardiyopleji solüsyonu uygulanıp kalp diyastolde durdurulmuştur. Kan kardiyoplejisi verilmeden on dakika beklenmiştir. Bu sırada ratın karaciğeri, her iki böbreği çıkarılıp PBS'le yıkanıp parafilm sarılıp soğuk uygulamaya alınmıştır. On dakikanın sonunda kan kardiyoplejisi verilip kalp çıkartıldıktan sonra interventriküler septum solda kalacak şekilde kalp sağ ve sol kalp olarak ikiye ayrıldıktan sonra PBS'le yıkanıp ayrı ayrı parafilm sarılmıştır. Desenden aorta da çıkartılıp aynı şekilde yıkama parafilm işlemi yapılmıştır ve tüm dokular soğuk uygulamaya alınmıştır. Doku örnekleri ivedilikle biyokimya laboratuvarına götürülüp eksi 80 derecede korumaya alınmıştır.



Şekil 2 Aort kökünden kristaloid kardiopleji uygulanması



Şekil 3 onuncu dakikada kan kardioplejisi uygulaması

3. Doku Homojenizasyonu ve ELISA Prosedürü

Rat sol kalp dokusunun sakrifikasyon sonrası alınarak 0,01 g doku için 100 µl PBS oranına uygun olarak tissue lyzer ile bilye yardımıyla homojenizasyon sağlanmıştır. (2x2 dakika). Homojenizasyon sonrasında 20 dakika buz üzerinde tutularak 10 dakikada bir vorteksleme yapılmıştır. Ardından +4°C'de 20 dakika 10000 g de santrifüj edilip, süpernatant üzerinde protein miktar tayini BCA (bicinchoninic acid) kiti ile kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Doku ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) çalışma sonuçları mg protein başına hesaplanmıştır. Kan örnekleri 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum kısımları ayrılarak ELISA çalışmalarında kullanılmıştır.

ELISA kitleri ön denemeleri sonucunda kitler için belirlenen dilüsyon oranlarına göre kit prosedürüne uygun çalışma gerçekleştirilmiştir. Kısaca, hazırlanan örnekler ve standartlar kuyulara 50 µl hacminde eklenmiştir. Antikor (sadece örnek kuyulara) ve streptavidin-HRP çözeltileri kuyulara eklendikten sonra, plate'in üzeri kapatılarak 37°C'de bir saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında 5 kez yıkanıp ardından 50 µl substrat A ve B eklenerek 10 dakika 37°C'de inkübasyon yapılmıştır. Kuyulara stop solüsyonu (50 µl) eklenerek hemen 450 nm'de okuma gerçekleştirilmiştir.

4. İstatistiksel Yöntem.

İstatistiksel değerlendirmede anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel Değerlendirmeler SAS (versiyon 9.4) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir skor için uygulama gruplarına göre tanımlayıcı istatistikler sunulmuştur (n, Ortalama, Ortanca, Standart Sapma, Minimum, Maksimum, %95 LCLM, %95 UCLM).

Uygulama gruplarının ortalamaları (a.ortalama/Medyan) arasında istatistiksel olarak fark olup olmadığı, söz konusu skorun dağılımına bağlı olarak iki örnek student-t testi veya Wilcoxon testi (Man Whitney U testi) kullanılarak belirlenmiştir.

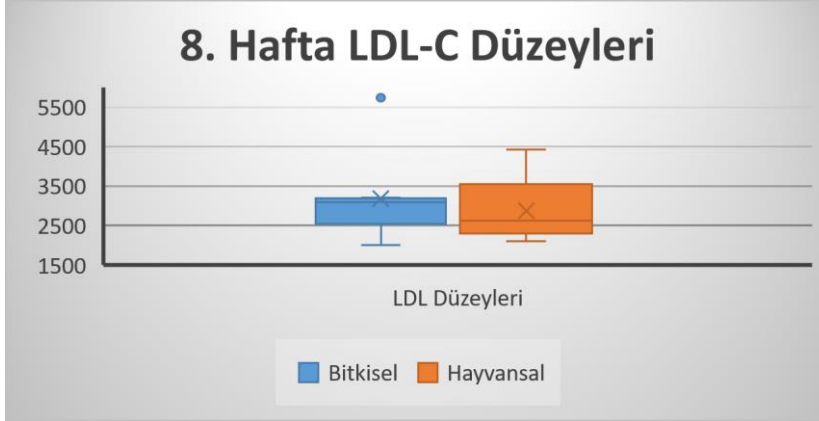
Normal dağılan skorların ortalamalarının (a.ortalama) gruplar bakımından karşılaştırılmasında student-t testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uygun olmayan skorların ortalamalarının (medyan) karşılaştırılmasında ise Wilcoxon testi (Man Whitney U testi) kullanılmıştır.

Verilerin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro Wilk normallik testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

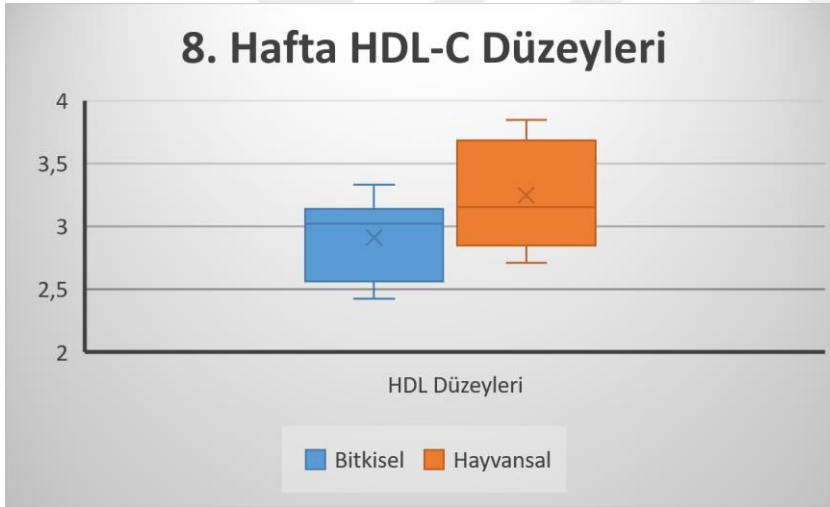
BULGULAR

1. Lipid Profili Bulgularının Değerlendirilmesi

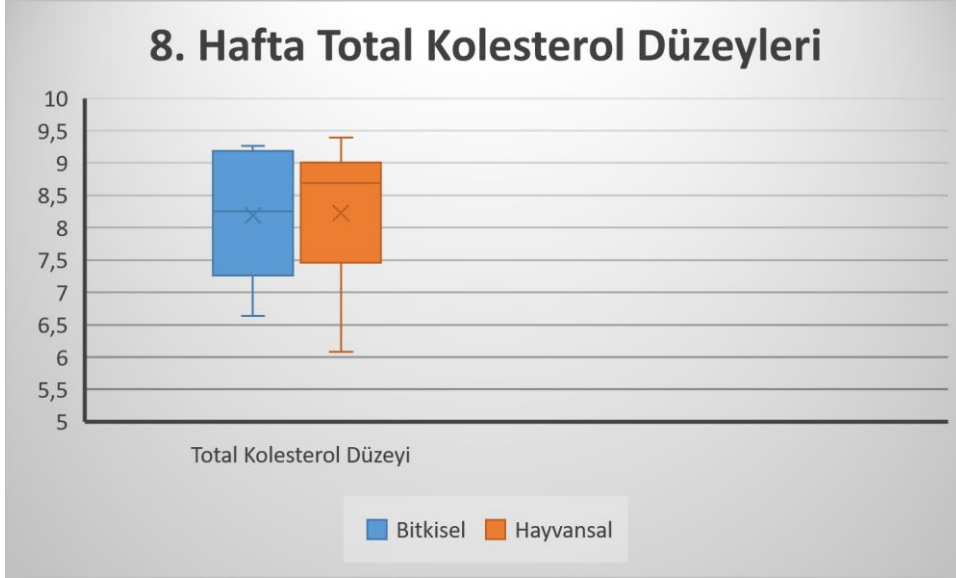
8 ve 12. haftada ratlardan alınan kan örneklerinde LDL-C, HDL-C, TC düzeyleri ölçülmüştür.



Grafik 1 Sekizinci hafta LDL-C düzeyleri (ng/ml)

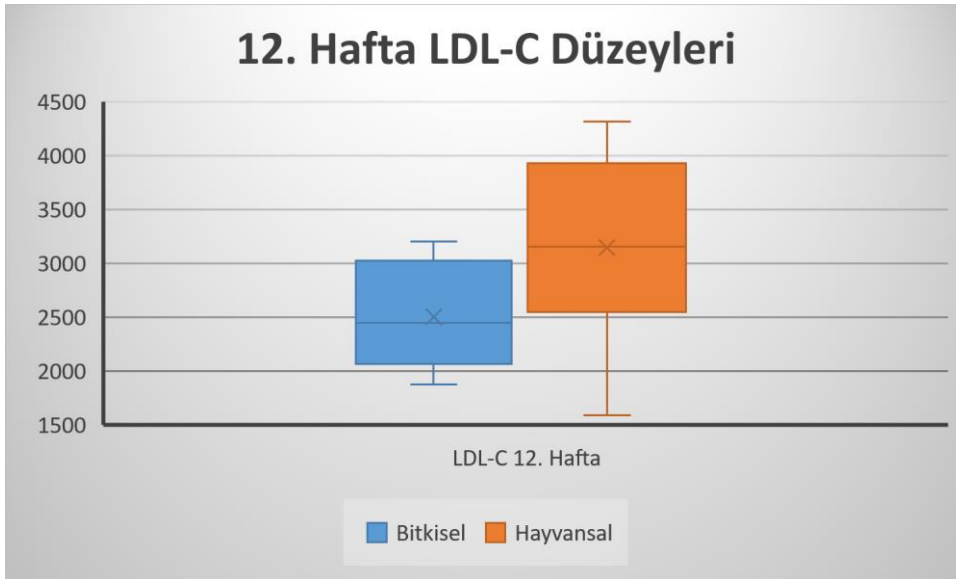


Grafik 2 Sekizinci hafta HDL-C düzeyleri (ng/ml)

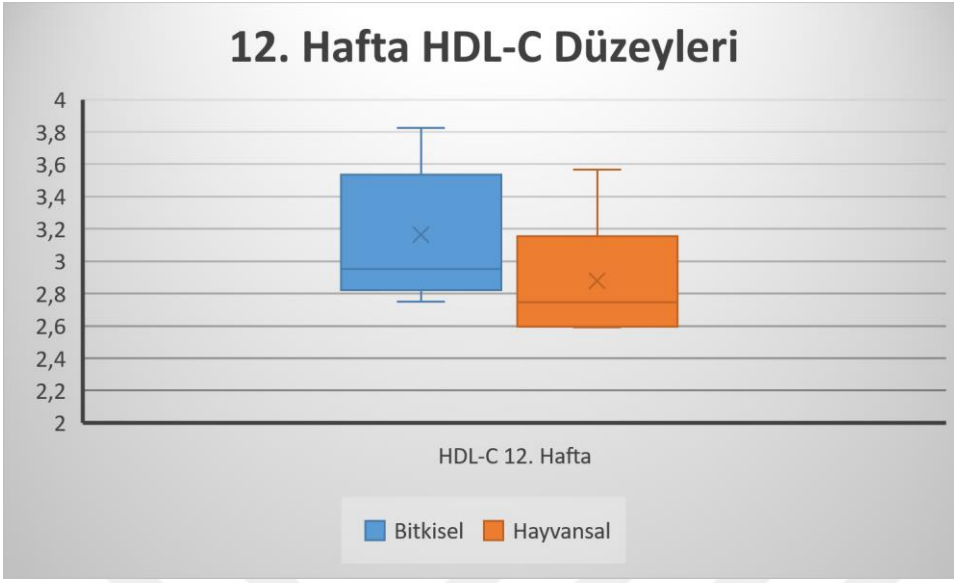


Grafik 3 Sekizinci hafta TC düzeyleri (ng/ml)

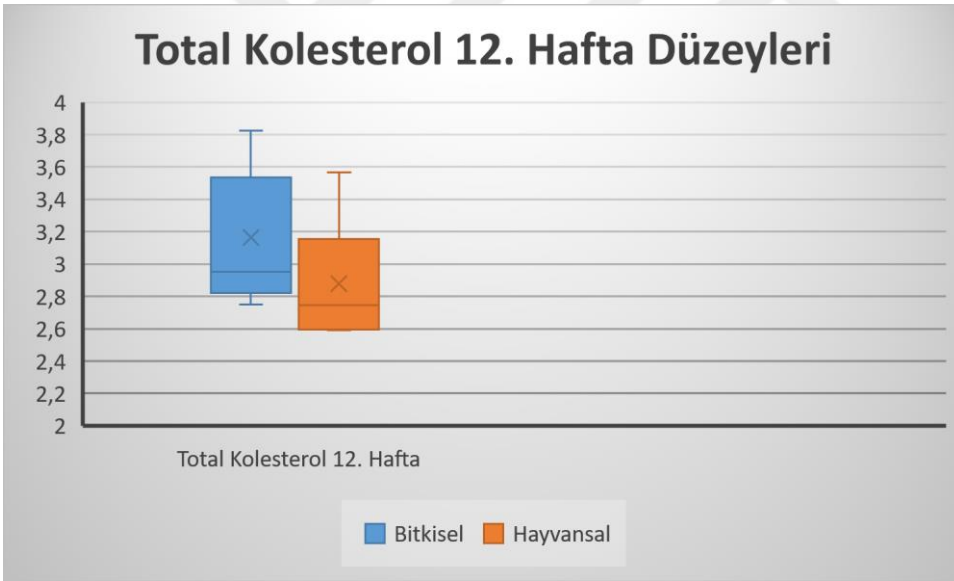
Sekizinci haftadaki LDL-C için BTB ve HKB grubunda ortanca değerler ve standart sapmalar sırasıyla $3098,3 \pm 475,92$; $2624,6 \pm 927,78$ 'dir ($p > 0,05$). Sekizinci haftadaki HDL-C için BTB ve HKB grubunda ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla $2,911 \pm 0,3249$; $3,2479 \pm 0,4448$ 'dir ($p > 0,05$). Sekizinci haftadaki TC için BTB ve HKB grubunda ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla $8,1816 \pm 1,0555$; $8,2302 \pm 1,0923$ 'dir ($p > 0,05$). Sekizinci haftadaki lipid profil sonuçlarında İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.



Grafik 4 on ikinci hafta LDL-C düzeyleri (ng/ml)



Grafik 5 on ikinci hafta HDL-C düzeyleri (ng/ml)

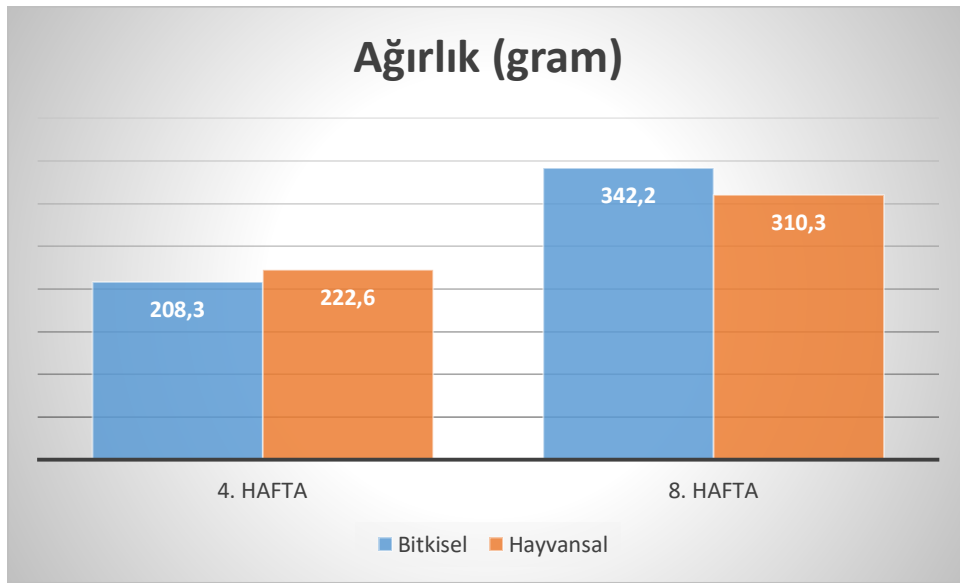


Grafik 6 on ikinci hafta TC düzeyleri (ng/ml)

12. haftadaki LDL-C için BTB ve HKB grubunda ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla $2502 \pm 475,92$; $3143,2 \pm 927,78$ 'dir ($p > 0,05$). 12. haftadaki HDL-C için BTB ve HKB grubunda ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla $3,1643 \pm 0,4119$; $2,8769 \pm 0,3817$ 'dir ($p > 0,05$). 12. haftadaki TC için BTB ve HKB grubunda ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla $10,389 \pm 2,9241$; $9,7333 \pm 1,5201$ 'dir ($p > 0,05$). On ikinci haftadaki lipid profil sonuçlarında İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

2. Büyüme Gelişmeye Yönelik Ağırlık Değerlendirilmesi

Dördüncü haftadaki ağırlıkları BTB ve HKB grubunda ortanca değerler ve standart sapmalar sırasıyla $208,38 \pm 17,864$; $222,63 \pm 23,311$ 'dir ($p>0,05$). Sekizinci haftadaki ağırlıkları BTB ve HKB grubunda ortanca değerler ve standart sapmalar sırasıyla $334,5 \pm 62,624$; $310,29 \pm 33,245$ 'dir ($p>0,05$). Her iki ağırlık ölçümünde de istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

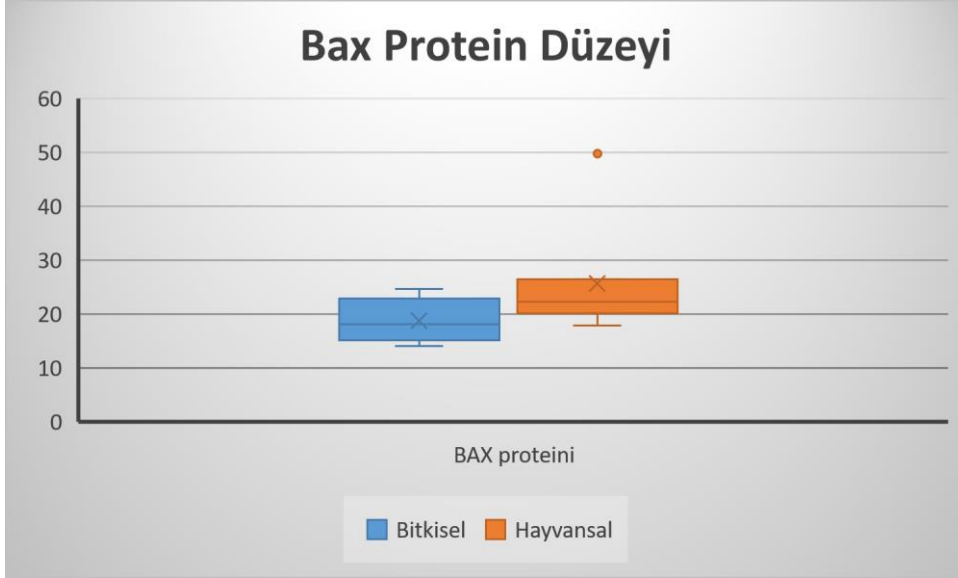


Grafik 7 dördüncü ve sekizinci hafta ağırlıkları (gram)

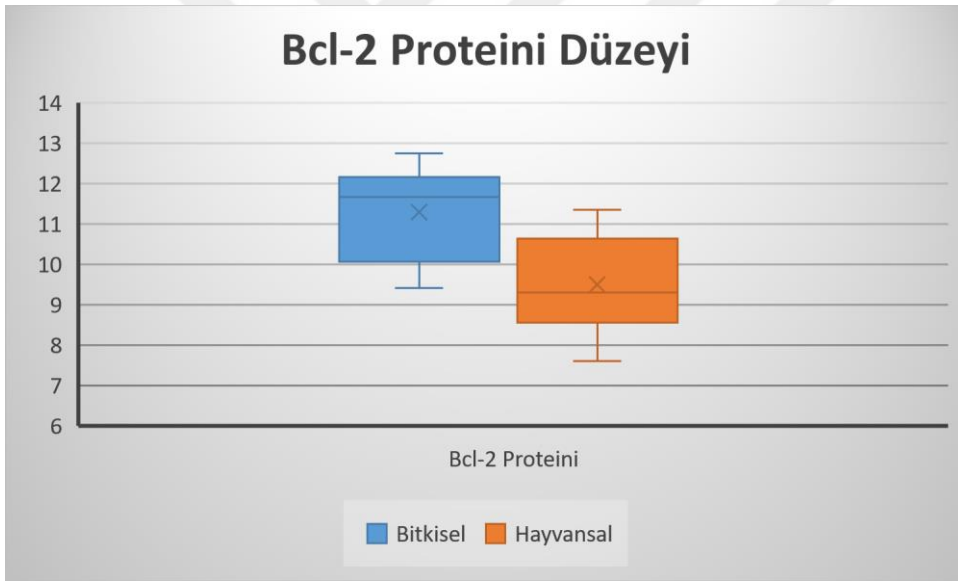
3. Apoptoz Belirteçlerinin Değerlendirmesi

Bax protein düzeyi BTB ve HKB grubunda ortanca değerler ve standart sapmalar sırasıyla $18,732 \pm 4,0021$; $25,655 \pm 10,929$ 'dir ($p>0,05$). Bax protein düzeyi ortalaması BTB yapılan grupta daha düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde değildir.

Bcl-2 protein düzeyi BTB ve HKB grubunda ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla $11,282 \pm 1,2229$; $9,501 \pm 1,2532$ 'dir. İstatistiksel olarak anlamlıdır. ($p<0,05$).



Grafik 8 Bax protein düzeyleri (ng/mg protein)

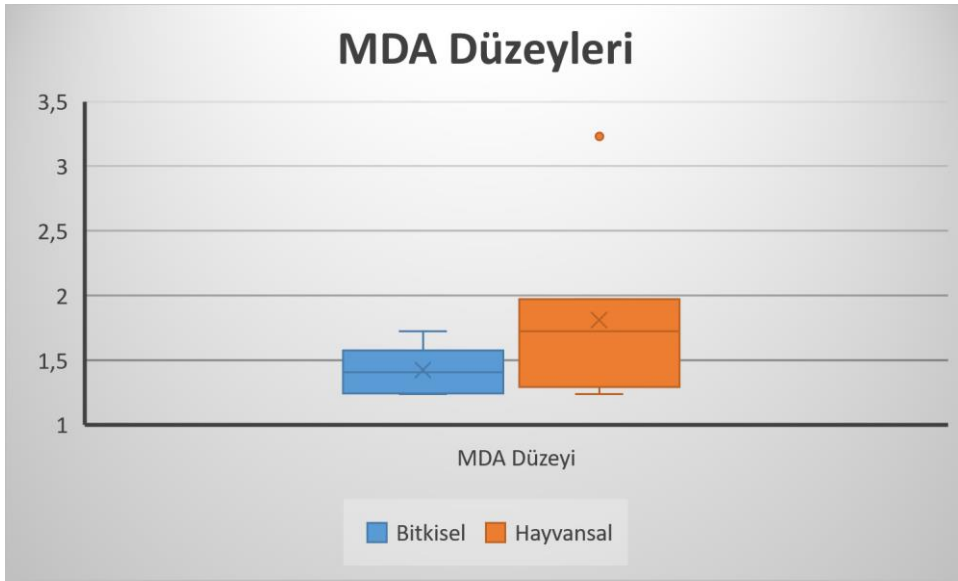


Grafik 9 Bcl-2 protein düzeyleri (ng/mg protein)

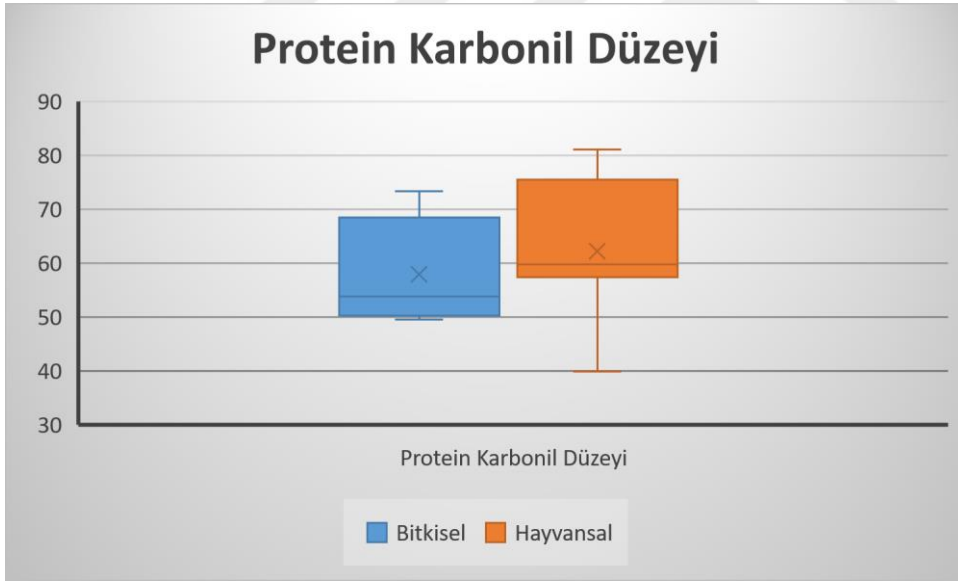
4. İskemi Reperfüzyon Hasar Belirteçlerinin Değerlendirmesi

MDA düzeyi BTB ve HKB grubunda ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla $1,4229 \pm 0,1868$; $1,809 \pm 0,6825$ 'dir ($p > 0,05$). Protein karbonil düzeyi BTB ve HKB grubunda ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla $57,934 \pm 9,7625$; $62,166 \pm 13,435$ 'dir ($p > 0,05$). MDA ve

protein karbonil düzeyi ortalaması BTB yapılan grupta HKB yapılan gruba göre daha düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde değildir.



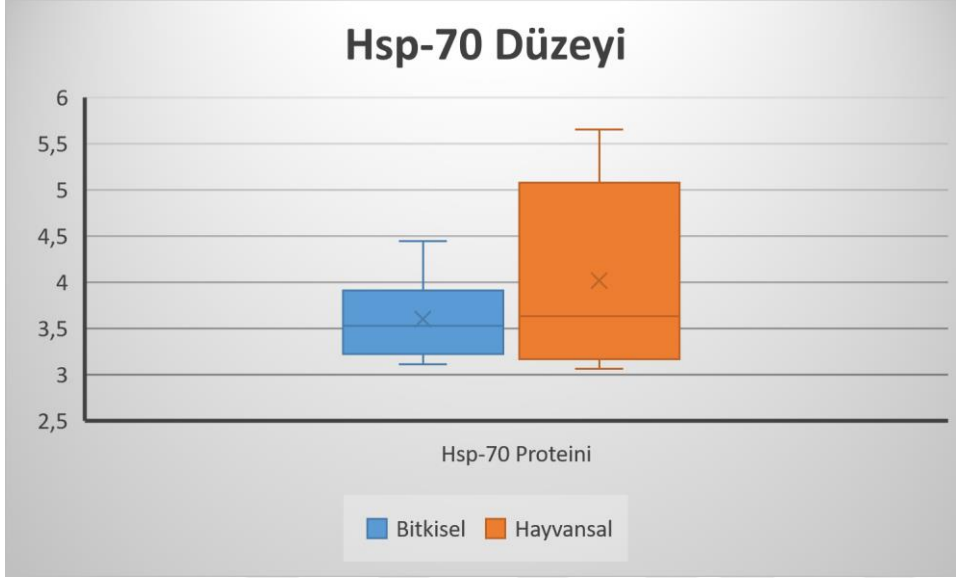
Grafik 10 MDA düzeyleri (nmol/mg protein)



Grafik 11 Protein karbonil düzeyi ng/mg protein

5. Kardiyoprotektif Belirteç Değerlendirmesi

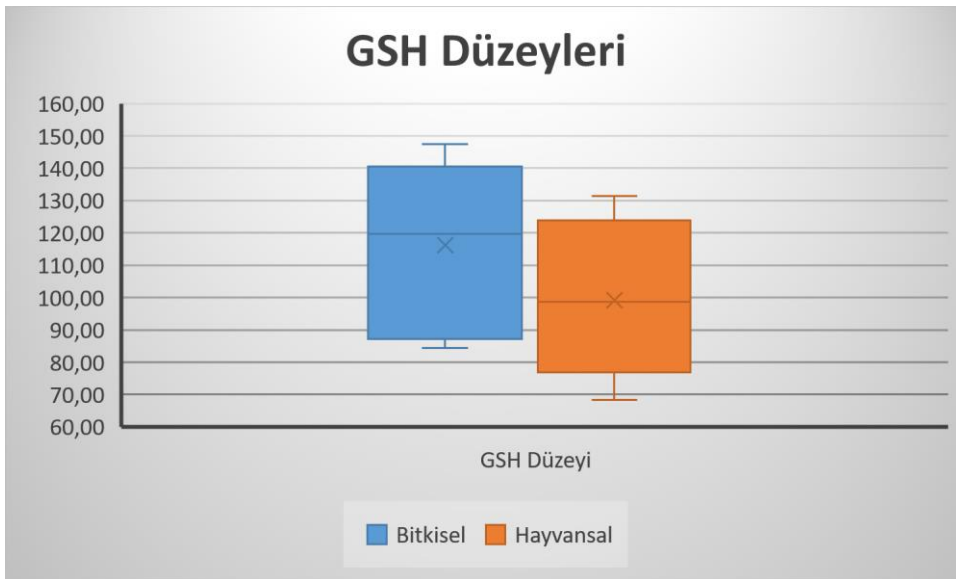
Hsp-70 protein düzeyi BTB ve HKB grubunda ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla $3,5971 \pm 0,4709$; $4,0149 \pm 1,0271$ 'dir ($p>0,05$). Hsp-70 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.



Grafik 12 Hsp-70 protein düzeyi (ng/mg protein)

6. Antioksidan Kapasite Değerlendirmesi

GSH düzeyi BTB ve HKB grubunda ortalama değerler ve standart sapmalar sırasıyla $116,19 \pm 26,012$; $99,078 \pm 25,024$ 'dir ($p>0,05$). GSH ortalama düzeyleri BTB yapılan grupta HKB yapılan gruba göre daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmamıştır.



Grafik 13 GSH düzeyleri (ng/mg protein)

TARTIŞMA

Çalışmamız; aortun klemplenip kardiyoplejik solüsyonlarla kalbin diyastolde durdurulduğu kardiyak cerrahi uygulanan ratlarda preoperatif BTB'nin HKB'ye göre anlamlı olarak daha iyi antiapopitotik aktivite sağladığını göstermiştir.

Kardiyovasküler hastalıklar gelişmekte olan ülkelerde artan sıklıkta olmak üzere dünyada en önemli ölüm nedenlerinden biridir [62]. Diyetel faktörler ile kalp hastalıkları, inme ve tip 2 diyabet nedenli ölümler arasında kuvvetli bir ilişki mevcuttur[63]. Bitkisel tabanlı beslenmenin daha az koroner kalp hastalığı, düşük kolesterol düzeyi, muhtemel daha düşük hipertansiyon ve diyabetes mellitus varlığı ve daha az sıklıkta obezite ile ilişkili olduğuna dair ikna edici kanıtlar mevcuttur[64]. Vejeteryan diyet iskemik kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalıkları azaltarak kardiyovasküler hastalıklarda risk azalması sağlar [65]. Üç kohort çalışmasının analiz edildiği bir incelemede koroner kalp hastalığında bitkisel tabanlı beslenmenin %32'lik bir risk azalması sağladığı belirlenmiştir[66]. Egzersizin eşlik ettiği düşük yağ içerikli vejeteryan diyetin aterosklerozisin ilerlemesini durdurduğu ve gerilettiği görülmüştür[9, 10, 67]. Geniş kapsamlı prospektif çalışmaların sistematik bir incelemesinde vejeteryan diyetin koruyucu etkisiyle iskemik kalp hastalığının mortalite ve insidansında dikkate değer bir azalma sağladığı tespit edilmiştir. Vejeteryan olmayanlara göre gözlenen risk azalması %25'dir[68].

Tüm bu çalışmalar göstermektedir ki BTB kardiyovasküler hastalık predispozan faktörlerine olumlu etkileriyle risk azalması sağlamaktadır. BTB bu yönüyle koruyucu etkileri cerrahi uygulanan aortun klemplendiği kardiyoplejik arrest edilmiş kalpte koruyucu etkiler ortaya koyabilir.

Diyetel kolesterol yalnızca et, süt ve yumurtayı içeren hayvansal ürünlerde bulunur. Hayvansal ürünlerden arındırılmış diyet alımı LDL ve total kolesterolde belirgin azalma sağlar, bu azalmanın kalp hastalığı riskinde %10'luk bir düşüş sağladığı randomize kontrollü klinik çalışmaların metaanalizi ile doğrulanmıştır[69].

Vejeteryan diyetle kırmızı et bulunmazken bazı diyet tipleri ise süt ürünleri ve yumurta içerir. Bu diyet sebze, meyve, tohumlu bitkiler ve tahıl tüketimini teşvik eder. Yapılmış olan çalışmalar bu diyet tipinin de serum lipid değerlerini düşürdüğünü göstermiştir[69, 70].

Yapılmış olan bazı çalışmalarda bitkisel proteinlerin plazma lipidleri ile ilişkili olduğu görülmüştür. Glutenden alman yüksek proteinin okside LDL-C, serum trigliserid ve ürik asiti düşürdüğü gösterilmiştir[71]. Benzer olarak yüksek soya proteini tüketimi serum total kolesterol, LDL-C ve trigliserid düzeylerinde belirgin düşüş ile ilişkili bulunmuştur[72].

Hayvansal proteinler yerine bitkisel proteinleri tüketimi koroner kalp hastalığında risk azalması ile ilişkilidir. Bu etkisi de olasılıkla kolesterol düşürücü etkisi ile ilişkilendirilmektedir[73]. Carroll ve ark'ları çalışmalarında soya proteininin laboratuvar hayvanlarında daha az hiperkolesterolemi ve ateroskleroza neden olduğuna göstermişlerdir[74]. James W. Anderson ve ark. yaptığı bir metaanalizde yüksek soya proteini alımı serum total kolesterol, LDL-C ve trigliserid düzeylerinde belirgin düşüş ile ilişkilirken bunun beden ağırlığı, diyetdeki sature yağ ve kolesterol düzeyinden bağımsız olarak bulmuşlardır[72]. Setchell ve ark. soya proteinin kolesterol düşürücü etkisine soyada bulunan soya östrojenin etkisini öne sürmüşlerdir[75].

Çalışmamızda sekizinci ve on ikinci haftadaki yapılan lipid profili ölçümlerinde istatistik yöntemine göre ortalama/ortanca değerlere baktığımızda ikinci ölçümde BTB'de görülen daha düşük LDL-C ve TC düzeylerine rağmen her iki ölçümde de iki deney grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu bulgularda bazı bitkisel tabanlı diyetlerde bile bulanabilen sütün hayvansal kaynaklı protein(kazein) ve yağ(süt yağı) olarak kullanılması etkin olabilir.

Büyüme gelişmelerini izleme amaçlı yapılan ağırlık ölçümlerinde dördüncü haftada HKB grubunda sekizinci haftada BTB grubunda daha yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel anlam ifade etmemiştir.

Ratlarda yapılan miyokardiyal iskemi reperfüzyon çalışmalarında apoptozis ile ilişkili bax proteinin ekspresyonu artarken, antiapoptotik protein bcl-2'nin ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir[76]. Klinik gözlemsel bir çalışmada nekrotik doku yakınındaki canlı dokularda Bcl-2 ekspresyonu tespit edilmiştir aynı dokuda bax proteinin overekspresyonu da gösterilmiştir. Bu çalışma göstermiştir ki hipoksi ve iskemi reperfüzyonun meydana getirdiği hücre ölümü bax ve bcl-2 ekspresyonu değiştirmektedir.[34]. Miyokardiyal iskemi reperfüzyonu azaltan antioksidanlar bax proteinini azaltıp bcl-2 ekspresyonunu artırarak hücre hasarını hafifletirler[77]. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar bitkisel tabanlı beslenen ratlarda hayvansal kaynaklı beslenenlere göre antiapoptotik aktivitesi bulunan bcl-2 proteininin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu bulgu bitkisel proteinle beslenenlerin kardiyak cerrahi nedenli meydana gelen iskemi reperfüzyon hasarından daha az apoptotik zarar göreceğini göstermektedir. Apoptozisi indükleyen bax proteinin BTB yapılanlarda ortanca değeri daha düşük iken istatistiksel anlamlılık düzeyine çıkamamıştır.

Multifonksiyonel bir antioksidan olan glutatyon miyokardın oksidantlardan korunmasında hayati bir rol oynar[78]. Sentez veya transportunun inhibisyonu yoluyla GSH düzeylerinin

azalması iskemi reperfüzyonda kardiyak fonksiyon bozukluklarını şiddetlendirmektedir[79]. Bu önemli antioksidan özellikler nedeniyle GSH iskemi reperfüzyon sırasında reaktif oksijen ürünlerine karşı miyokard üzerinde koruyucu etki gösterir[80]. Çalışmamızda intrinsik miyokardiyal glutatyon düzeylerini ölçtüğümüzde BTB yapılan ratlarda HKB ratlara göre ortalama glutatyon düzeyleri daha yüksek olmakla birlikte bu istatistiksel anlamlılık ifade etmemiştir.

Kukreja ve arkadaşları Hsp-70 ekspresyonunu indükleyerek enfarktüs bölgesinde önemli bir azalma elde etmişlerdir[81]. Enfarktüs alanındaki bu azalmaya ek olarak, Hsp-70 ekspresyonundaki artış iskemi reperfüzyon hasarı sonrası iyileşmeyi artırır[82]. Kardiyoplejik iskemi öncesi Hsp-70 upregülasyonu, iskemi sonrasında sistolik fonksiyonların derlenmesini sağladığı gibi daha düşük kardiyak hasar markerları düzeyleri ile birlikte[83, 84]. Hsp-70 ekspresyonundaki artış kalpte iskemi reperfüzyon sonrası azalmış apoptoz ile ilişkilidir[85]. Aortik basınç artışında ve kalp yetmezliğinin başlangıç aşamalarında kalbi koruma amaçlı kardiyak dokuda ekspresyonu artmaktadır[86, 87]. Hsp-70'in düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Hsp-70 bir proteindir ve kalpte ortaya çıkan hasar sonrası yanıt olarak sentez edilmektedir. Protein yapımının gerçekleşebileceği I/R hasarı sonrası kalbin tekrar çalıştırıldığı langendorff gibi I/R modelinde anlamlı sonuçlar elde edilebilir. Çalışmamızda kardiyak arrest sonrası onuncu dakikada verilen kan kardiyoplejisi sonrası kalp çıkarıldığı için fark gösterilememiş olabilir.

MDA iskemi reperfüzyon hasarının gösterilmesinde bir marker olarak kullanılmaktadır[88]. İskemi reperfüzyon sonrası artmış MDA düzeyleri artmış miyokardiyal hasar ile ilişkilidir[89]. İskemi reperfüzyon modeli oluşturularak flavonoidlerin incelendiği bir çalışmada flavonoid alan grupta reaktif oksidatif hasarı gösterir MDA düzeyleri daha düşük iken tamponlayıcı superoksid dismutaz enzim düzeyleri artmış olarak bulunmuştur[90]. Altı haftalık diyet süresinden oluşan artmış sebze ve meyve tüketiminin incelendiği bir çalışmada plazma MDA düzeyleri belirgin olarak düşük bulunmuştur[91]. Çalışmamız miyokardiyal MDA düzeylerinin bitkisel tabanlı beslenen ratlarda hayvansal beslenenlere göre ortanca değeri daha düşük bulmuştur, ancak istatistiksel anlamlılık ifade etmemiştir.

Kardiyak cerrahi prosedürlerinde uygulanan ekstrakorporeal dolaşım lipid peroksidasyonu ve protein karbonilasyonuna neden olarak iskemi reperfüzyon hasarına ve neden olur. Bu iki biyomarker da kalpte meydana gelen oksidatif hasarla ilişkilidir[92]. Oksidatif stres tarafından indüklenen en yaygın olarak incelenen protein değişiklikleri, karbonil

gruplarının oluşumudur. Oksidatif stres sırasında proteinlerin doğrudan hasarı, genel oksidatif stres için biyobelirteç olarak işlev görebilen protein karbonillerin oluşumuna neden olabilir.[93]. Postiskemik reperfüzyonda artmış miyofibriler protein karboksilasyonu gösterilmiştir[94]. Çalışmamızda BTB ratlarda miyokardiyal protein karbonilasyonu HKB ratlara göre ortalama değeri daha düşük bulunmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemiştir.

Bitkisel tabanlı beslenme biçiminde diyetin doğası gereği artmış lif, vitamin, mineral ve fitokimyasal tüketimi olmaktadır[95]. Çalışmamızda verilen diyetlerde ek lif kaynağı olan karbonhidrat içeriklerinin yanı sıra vitamin ve mineraller de aynıydı bu yüzden BTB yapılanlar bu makronutrient grubundaki ek fitokimyasallardan yararlanmadılar. Flavonoidlerin antiaterosklerotik ve iskemik kalp hastalığını önleyici etkileri bulunmaktadır[96, 97]. Bulgulardaki BTB lehine ve birbiriyle tutarlı olan ancak istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşamayan sonuçlarda bu diyet içerik etkenleri de rol oynamış olabilir.

SONUÇ

Çalışmamızda; ratlarda bitkisel veya hayvansal tabanlı protein ve yağ ile beslenmenin, aortun klemlenip ve kardiyopleji uygulanıp diyastolde durdurulmuş olan kalpte miyokardiyal korunma üzerine etkisini araştırdık. BTB kardiyoplejik arrest altındaki kalpte HKB'ye göre daha iyi antiapoptotik etkinlik ve bunun sonucu olarak da daha miyokard hasarı sağlamaktadır. Kolesterol düzeyi ve ağırlıklarda fark yaratmamıştır. Lipid profili, iskemi reperfüzyon, apoptoz, antioksidan kapasite belirteç düzeylerinin tamamında BTB'nin olumlu etkilerine yönelik ortalama/ortanca değerler oluşmasına rağmen istatistiksel anlamlılık sağlamamıştır; daha geniş örneklem büyüklüğüyle yapılacak çalışmalarla bu ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlılık kazanabilir. Çalışmamızda omnivor diyetle önemli bir yer kaplayan ve aterosklerotik potansiyeli daha fazla olan kırmızı et veya işlenmiş et (processed meat) yerine protein ve yağ kaynağı olarak seçilen kimi bitkisel tabanlı diyetlerde bile bulabilen kazein ve süt yağının bozulmuş apoptotik yanıtla miyokard hasarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Protein ve yağ kaynakları değiştirilerek yapılacak çalışmalar diyet ile kalp cerrahisi nedenli miyokard hasarı arasında ilişkiyi ortaya çıkmasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKÇA

1. DALYs, G.B.D. and H. Collaborators, Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 2018. 392(10159): p. 1859-1922.
2. Oikonomou, E., et al., Western Dietary Pattern Is Associated With Severe Coronary Artery Disease. *Angiology*, 2018. 69(4): p. 339-346.
3. Rizzo, N.S., et al., Vegetarian dietary patterns are associated with a lower risk of metabolic syndrome: the adventist health study 2. *Diabetes Care*, 2011. 34(5): p. 1225-7.
4. Yokoyama, Y., et al., Vegetarian diets and blood pressure: a meta-analysis. *JAMA Intern Med*, 2014. 174(4): p. 577-87.
5. Chen, X., et al., The Associations of Plant Protein Intake With All-Cause Mortality in CKD. *Am J Kidney Dis*, 2016. 67(3): p. 423-30.
6. Tuso, P.J., et al., Nutritional update for physicians: plant-based diets. *Perm J*, 2013. 17(2): p. 61-6.
7. Blaney, D. and H. Diehl, *The optimal diet: the official CHIP cookbook*, Hagerstown, Editor. 2009, Autumn House Publishing.
8. McDougall, J. and M. McDougall, *The new McDougall cookbook: 300 delicious ultra-low-fat recipes*. 1997, New York: Plume.
9. Ornish, D., et al., Can lifestyle changes reverse coronary heart disease? The Lifestyle Heart Trial. *Lancet*, 1990. 336(8708): p. 129-33.
10. Ornish, D., et al., Intensive lifestyle changes for reversal of coronary heart disease. *JAMA*, 1998. 280(23): p. 2001-7.
11. Tunçay, G., Veganism in Terms of Bioethics from Different Viewpoints. *Journal of Current Researches on Health Sector*, 2016. 6(1): p. 51-62.
12. Yokoyama, Y., S.M. Levin, and N.D. Barnard, Association between plant-based diets and plasma lipids: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*, 2017. 75(9): p. 683-698.
13. Bolli, R., et al., Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res*, 1989. 65(3): p. 607-22.

14. Braunwald, E. and R.A. Kloner, The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 1982. 66(6): p. 1146-9.
15. Kloner, R.A., et al., Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation*, 1998. 97(18): p. 1848-67.
16. Beyersdorf, F., et al., Studies on prolonged acute regional ischemia. I. Evidence for preserved cellular viability after 6 hours of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1989. 98(1): p. 112-26.
17. Bolli, R. and E. Marban, Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*, 1999. 79(2): p. 609-34.
18. Verbunt, R.J. and A. Van der Laarse, Glutathione metabolism in non-ischemic and postischemic rat hearts in response to an exogenous prooxidant. *Mol Cell Biochem*, 1997. 167(1-2): p. 127-34.
19. Sharikabad, M.N., et al., Effect of calcium on reactive oxygen species in isolated rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. 32(3): p. 441-52.
20. Tsuji, T., et al., Rat cardiac contractile dysfunction induced by Ca²⁺ overload: possible link to the proteolysis of alpha-fodrin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 281(3): p. H1286-94.
21. Gill, C., R. Mestril, and A. Samali, Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target? *FASEB J*, 2002. 16(2): p. 135-46.
22. Elsasser, A., et al., The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol*, 2001. 96(3): p. 219-26.
23. Kirshenbaum, L.A. and D. de Moissac, The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation*, 1997. 96(5): p. 1580-5.
24. Kluck, R.M., et al., The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 1997. 275(5303): p. 1132-6.
25. Freude, B., et al., Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. 32(2): p. 197-208.
26. L., C., *Cardiac Surgery in the Adult*. 5 ed. 2019.
27. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 1999. 13(15): p. 1899-911.
28. Han, X., et al., Protective effect of gastrodin on myocardial ischemia-reperfusion injury and the expression of Bax and Bcl-2. *Exp Ther Med*, 2019. 17(6): p. 4389-4394.

29. Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: p. 395-419.
30. Adams, J.M. and S. Cory, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 1998. 281(5381): p. 1322-6.
31. Kroemer, G., The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*, 1997. 3(6): p. 614-20.
32. Lee, L., K. Irani, and T. Finkel, Bcl-2 regulates nonapoptotic signal transduction: inhibition of c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation by IL-1 beta and hydrogen peroxide. *Mol Genet Metab*, 1998. 64(1): p. 19-24.
33. Basile, D.P., H. Liapis, and M.R. Hammerman, Expression of bcl-2 and bax in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. *Am J Physiol*, 1997. 272(5 Pt 2): p. F640-7.
34. Misao, J., et al., Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation*, 1996. 94(7): p. 1506-12.
35. Zhao, Z.Q., et al., Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*, 2000. 45(3): p. 651-60.
36. Vakeva, A.P., et al., Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation*, 1998. 97(22): p. 2259-67.
37. Yue, T.L., et al., Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Circ Res*, 1998. 82(2): p. 166-74.
38. Hockenbery, D.M., et al., Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993. 75(2): p. 241-51.
39. Knudson, C.M. and S.J. Korsmeyer, Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet*, 1997. 16(4): p. 358-63.
40. Sies, H., Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 1999. 27(9-10): p. 916-21.
41. Cheung, P.Y., W. Wang, and R. Schulz, Glutathione protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by detoxifying peroxynitrite. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. 32(9): p. 1669-78.

42. Le, C.T., et al., Protection of myocytes against free radical-induced damage by accelerated turnover of the glutathione redox cycle. *Eur Heart J*, 1995. 16(4): p. 553-62.
43. Meister, A. and M.E. Anderson, Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 1983. 52: p. 711-60.
44. Lesnefsky, E.J., I.M. Dauber, and L.D. Horwitz, Myocardial sulfhydryl pool alterations occur during reperfusion after brief and prolonged myocardial ischemia in vivo. *Circ Res*, 1991. 68(2): p. 605-13.
45. Liu, J.H., et al., Characterization of vasopressin-mediated GSH efflux from Hep G2 cells: significance of protein kinase C. *Life Sci*, 1993. 52(14): p. 1217-23.
46. Lu, S.C., et al., Hormonal regulation of glutathione efflux. *J Biol Chem*, 1990. 265(27): p. 16088-95.
47. Sies, H. and P. Graf, Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. *Biochem J*, 1985. 226(2): p. 545-9.
48. Santos-Junior, V.A., et al., Heat Shock Proteins: Protection and Potential Biomarkers for Ischemic Injury of Cardiomyocytes After Surgery. *Braz J Cardiovasc Surg*, 2018. 33(3): p. 291-302.
49. Marunouchi, T., et al., Possible involvement of phosphorylated heat-shock factor-1 in changes in heat shock protein 72 induction in the failing rat heart following myocardial infarction. *Biol Pharm Bull*, 2013. 36(8): p. 1332-40.
50. Zhong, N., et al., Intermittent hypoxia exposure-induced heat-shock protein 70 expression increases resistance of rat heart to ischemic injury. *Acta Pharmacol Sin*, 2000. 21(5): p. 467-72.
51. Rinaldi, B., et al., Exercise training affects age-induced changes in SOD and heat shock protein expression in rat heart. *Exp Gerontol*, 2006. 41(8): p. 764-70.
52. Wang, Y., et al., Regulation of heat shock protein 60 and 72 expression in the failing heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. 48(2): p. 360-6.
53. Del Rio, D., A.J. Stewart, and N. Pellegrini, A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2005. 15(4): p. 316-28.
54. Draper, H.H. and M. Hadley, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1990. 186: p. 421-31.

55. Godfraind, T., Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005. 360(1464): p. 2259-72.
56. Zhou, T., et al., Interplay between ROS and Antioxidants during Ischemia-Reperfusion Injuries in Cardiac and Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(2).
57. Colombo, G., et al., A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016. 1019: p. 178-90.
58. Fedorova, M., R.C. Bollineni, and R. Hoffmann, Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev*, 2014. 33(2): p. 79-97.
59. Kuklina, E.V., P.W. Yoon, and N.L. Keenan, Trends in high levels of low-density lipoprotein cholesterol in the United States, 1999-2006. *JAMA*, 2009. 302(19): p. 2104-10.
60. Lemieux, I., et al., Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: the Quebec Cardiovascular Study. *Arch Intern Med*, 2001. 161(22): p. 2685-92.
61. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, E. and A. Treatment of High Blood Cholesterol in, Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 2002. 106(25): p. 3143-421.
62. Collaborators, G.B.D.C.o.D., Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 2018. 392(10159): p. 1736-1788.
63. Micha, R., et al., Association Between Dietary Factors and Mortality From Heart Disease, Stroke, and Type 2 Diabetes in the United States. *JAMA*, 2017. 317(9): p. 912-924.
64. Fraser, G.E., Vegetarian diets: what do we know of their effects on common chronic diseases? *Am J Clin Nutr*, 2009. 89(5): p. 1607S-1612S.
65. Kwok, C.S., et al., Vegetarian diet, Seventh Day Adventists and risk of cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*, 2014. 176(3): p. 680-6.
66. Key, T.J., et al., Mortality in vegetarians and nonvegetarians: detailed findings from a collaborative analysis of 5 prospective studies. *Am J Clin Nutr*, 1999. 70(3 Suppl): p. 516S-524S.

67. Esselstyn, C.B., Jr., Updating a 12-year experience with arrest and reversal therapy for coronary heart disease (an overdue requiem for palliative cardiology). *Am J Cardiol*, 1999. 84(3): p. 339-41, A8.
68. Dinu, M., et al., Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: A systematic review with meta-analysis of observational studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017. 57(17): p. 3640-3649.
69. Wang, F., et al., Effects of Vegetarian Diets on Blood Lipids: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc*, 2015. 4(10): p. e002408.
70. Ferdowsian, H.R. and N.D. Barnard, Effects of plant-based diets on plasma lipids. *Am J Cardiol*, 2009. 104(7): p. 947-56.
71. Jenkins, D.J., et al., High-protein diets in hyperlipidemia: effect of wheat gluten on serum lipids, uric acid, and renal function. *Am J Clin Nutr*, 2001. 74(1): p. 57-63.
72. Anderson, J.W., B.M. Johnstone, and M.E. Cook-Newell, Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*, 1995. 333(5): p. 276-82.
73. Terpstra, A.H., R.J. Hermus, and C.E. West, The role of dietary protein in cholesterol metabolism. *World Rev Nutr Diet*, 1983. 42: p. 1-55.
74. Carroll, K.K., Hypercholesterolemia and atherosclerosis: effects of dietary protein. *Fed Proc*, 1982. 41(11): p. 2792-6.
75. Setchell, K., Estrogens in the environment II: influences on development, ed. I.M. JA. 1985: Elsevier. 69-85.
76. Szobi, A., et al., Mitigation of postischemic cardiac contractile dysfunction by CaMKII inhibition: effects on programmed necrotic and apoptotic cell death. *Mol Cell Biochem*, 2014. 388(1-2): p. 269-76.
77. Genade, S., et al., Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of its anti-adrenergic actions. *J Pineal Res*, 2008. 45(4): p. 449-58.
78. Ceconi, C., et al., The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: effects of N-acetyl cysteine. *J Mol Cell Cardiol*, 1988. 20(1): p. 5-13.
79. Leichtweis, S. and L.L. Ji, Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. *Acta Physiol Scand*, 2001. 172(1): p. 1-10.
80. Werns, S.W., et al., Myocardial glutathione depletion impairs recovery of isolated blood-perfused hearts after global ischaemia. *J Mol Cell Cardiol*, 1992. 24(11): p. 1215-20.

81. Kukreja, R.C., et al., Role of protein kinase C and 72 kDa heat shock protein in ischemic tolerance following heat stress in the rat heart. *Mol Cell Biochem*, 1999. 195(1-2): p. 123-31.
82. Yamanaka, K., et al., Role of protein kinase C in geranylgeranylacetone-induced expression of heat-shock protein 72 and cardioprotection in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2003. 35(7): p. 785-94.
83. Nomura, F., et al., Myocardial self-preservative effect of heat shock protein 70 on an immature lamb heart. *Ann Thorac Surg*, 1999. 68(5): p. 1736-41.
84. Ooie, T., et al., Single oral dose of geranylgeranylacetone induces heat-shock protein 72 and renders protection against ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Circulation*, 2001. 104(15): p. 1837-43.
85. Gauthaman, K., et al., Terminalia arjuna (Roxb.) protects rabbit heart against ischemic-reperfusion injury: role of antioxidant enzymes and heat shock protein. *J Ethnopharmacol*, 2005. 96(3): p. 403-9.
86. Tanonaka, K., et al., Myocardial heat shock protein changes in the failing heart following coronary artery ligation. *Heart Lung Circ*, 2003. 12(1): p. 60-5.
87. Osaki, J., et al., Pressure-induced expression of heat shock protein 70 mRNA in adult rat heart is coupled both to protein kinase A-dependent and protein kinase C-dependent systems. *J Hypertens*, 1998. 16(8): p. 1193-200.
88. Ghyasi, R., et al., Effect of mebudipine on oxidative stress and lipid peroxidation in myocardial ischemic-reperfusion injury in male rat. *J Res Med Sci*, 2012. 17(12): p. 1150-5.
89. Zheng, W., et al., Superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in plasma and morphological evaluation of acute severe hemorrhagic shock in rats. *Am J Emerg Med*, 2008. 26(1): p. 54-8.
90. Lv, D., et al., The cardioprotective effect of total flavonoids on myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Biomed Pharmacother*, 2017. 88: p. 277-284.
91. Thompson, H.J., et al., Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis*, 1999. 20(12): p. 2261-6.
92. Rodrigo, R., et al., Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers*, 2013. 35(6): p. 773-90.
93. Bulteau, A.L., et al., Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20 S proteasome degradation in vitro. *J Biol Chem*, 2001. 276(49): p. 45662-8.

94. Canton, M., et al., Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(3): p. H870-7.
95. Ahnen, R.T., S.S. Jonnalagadda, and J.L. Slavin, Role of plant protein in nutrition, wellness, and health. *Nutr Rev*, 2019.
96. Loke, W.M., et al., Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30(4): p. 749-57.
97. Pietta, P.G., Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 2000. 63(7): p. 1035-42.

