



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
VPT-YL-2014-001**

**KUZU VE OĞLAKLARDAKİ MİYOKARDİYAL HASARIN
BELİRLENMESİNDE KARDİYAK TROPONİNLERİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Biyolog
Bahar BAYRAKTAR**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Recai TUNCA**

AYDIN-2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
VPT-YL-2014-001**

**KUZU VE OĞLAKLARDAKİ MİYOKARDİYAL HASARIN
BELİRLENMESİNDE KARDİYAK TROPONİNLERİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Biyolog
Bahar BAYRAKTAR**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Recai TUNCA**

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Patoloji Anabilim Dalı Veteriner Patoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi Bahar BAYRAKTAR tarafından hazırlanan “Kuzu ve oğlaklardaki miyokardiyal hasarın belirlenmesinde kardiyak troponinlerin etkinliğinin araştırılması” başlıklı tez, 30.01.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası

Prof. Dr. Nihat TOPLU

Adnan Menderes Üniversitesi

Doç. Dr. Recai TUNCA

Adnan Menderes Üniversitesi

Doç. Dr. M. Hüsnü BUĞDAYCI

Şifa Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıyla.....tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Kuzu ve oğlaklarda miyokardiyal hasar fokalden masife kadar değişen miyokard dejenerasyonları ve nekrozları şeklinde çeşitli hastalıklara ilişkin olarak oluşmaktadır. Bu hastalıkların başında Şap Hastalığı gelmektedir.

Şap hastalığında klinik olarak belirlenebilen ağız ve tırnak aralarında şekillenen veziküler lezyonların yanı sıra, post mortem muayenelerde rumen piluslarında ve özellikle de genç hayvanlarda kalpte oldukça tanıtıcı patolojik bulgular ortaya konulabilir. Kas dokusunda şekillen nonprulent intersitisyel miyokarditis makroskobik olarak kendini düzensiz solgun-boz beyaz renkte alanlar halinde ve kesit yüzü donuk, kas tellerinin sınırlarının seçilemediği alanlar şeklinde kendini gösterir. Bu lezyonlar incelemeyi yapan patologlarca çoğu kez kalp kasının “kaplan postu” manzarasını aldığı şeklinde yorumlanır.

Oluşan kardiyak hasarın erken tespit edilmesi, hasarın sonuçları göz önünde bulundurulduğunda son derece önemlidir, ancak histopatolojik olarak bile miyokardiyal hasarın 12. saatten sonra ortaya konulabiliyor olması miyokardiyal hasarın tespitinde yeni arayışların ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Son yıllarda veteriner kardiyolojide miyokardiyal hastalıkların değerlendirilmesinde, kardiyak troponin (cTn), özellikle de cTnI analizleri altın standart olarak kullanılmaya başlanmıştır. cTnI’ nın kalp kasında meydana gelen zedelenmeden kısa bir süre sonra kandaki yoğunluğunun yükselmesi henüz klinik bulgular şekillenmeden bile miyokard zedelenmesinin ortaya konulmasında önemli bir ölçüt olarak kullanılmasına olanak sağlanmaktadır.

Bu çalışmada kuzu ve oğlaklardaki miyokardiyal doku lezyonlarının şiddeti ve cTnI salınımının koordinasyonu noktasındaki mekanizmaların sağlıklı bir şekilde ortaya konması amaçlanmıştır. Patolojik verilerin klinik bulgulara yansımaları, serum ve kardiyomiyosit troponin seviyesinin gerek birbiri ile etkileşimi ve gerekse de kalp kasında şekillenen hasarın şiddeti, süresi ve yaygınlığı karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi ile kuzu ve oğlaklarda cTn-I’nın kalp hastalıklarında kullanımına yönelik önemli ölçüde katkı sağlanması hedeflenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR LİSTESİ	iv
TABLolar LİSTESİ	v
RESİMLER LİSTESİ	vi
1. GİRİŞ	1
1.1.KALP	2
1.1.1. Yapısı	2
1.1.1.1. Epikardiyum	2
1.1.1.2. Endokardiyum	3
1.1.1.3. Miyokardiyum	3
1.1.2. Histolojisi	4
1.1.3. Fizyolojisi	5
1.2. Hayvan Türlerinde Miyokardiyal Hasarın Nedenleri ve Patolojik Bulguları	6
1.3.Kardiyak Markırlar	9
1.3.1. Kreatin Kinaz (CK)	12
1.3.2. CK-MB İzoenzimleri	12
1.3.3. Aspartat Aminotransferaz (AST)	12
1.3.4. Alanin Transferaz (ALT)	12
1.3.5. Laktat Dehidrogenaz (LDH)	13
1.3.6. C reaktif protein (CRP)	13
1.3.7. Troponin I	14
1.3.7.1. İnce Flamentlerin Diğer Bileşenleriyle Troponin I'nın Etkileşimi	15
1.3.7.1.a. Tropomiyosin ve Aktinle Birlikte Troponin I'nın Etkileşimi ve Troponin I'nın İnhibitör Bölgeleri	15
1.3.7.1.b. Troponin I 'nın Troponin C ile Etkileşimi	16
1.3.7.1.c. Troponin I 'nın Troponin T ile Etkileşimi	17
1.3.7.2. Troponin I' nın Fosforilasyonu	18
1.3.7.2.a. Ca +2 Fosfolipid Bağlı Protein Kinazla Troponin I Fosforilasyonu	18

1.3.7.2.b. Cgmp Bağlı Protein Kinaz ce cAMP Bağlı Protein Kinaz ile Troponin I Fosforilasyonu	19
1.3.7.3. Kasların Kasılma Aktivitelerinin Düzenlenmesi ve Troponin I nın Fosforilasyonu	20
1.3.7.4. Troponin Ölçüm Yöntemleri	21
2. ÇALIŞMANIN AMACI	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Makroskobik İncelemeler	25
3.2. Mikroskobik İncelemeler	26
3.2.1. Histopatolojik İncelemeler	26
3.2.2. Immunohistokimyasal İncelemeler	26
3.2.2.1. Immunohistokimyasal incelemelerin skorlanması	27
3.2.3. Biyokimyasal İncelemeler	28
4. BULGULAR	29
4.1. Makroskobik Bulgular	29
4.1.1. Kalpte Saptanan Makroskobik Bulgular	29
4.1.2. Diğer Organlarda Saptanan Makroskobik Bulgular	30
4.2. Mikroskobik Bulgular	31
4.2.1. Histopatolojik Bulgular	31
4.2.2. Immunohistokimyasal Bulgular	35
4.3. Biyokimyasal Bulgular	41
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ	51
7. ÖZET	52
8. SUMMARY	54
9. KAYNAKLAR	56
10. TEŞEKKÜR	67
11. ÖZGEÇMİŞ	68

KISALTMALAR

cTn	Kardiyak Troponin
cTnI	Kardiyak Troponin I
cTnT	Kardiyak Troponin T
cTnC	Kardiyak Troponin C
C-CK	Kreatinin kinaz
CK-MB	Kreatinin kinaz miyokardiyal izoenzimi
LDH	Laktat dehidrogenaz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
CRP	C reaktif protein
AMI	Akut Miyokardiyal Infarktüs
PKC	Protein kinaz C
PKA	Protein kinaz A
PKG	Protein kinaz G
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
c GMP	Siklik Guanozin Monofosfat
PBS	Fosfat tamponlu solüsyonu
WHO	World health organization

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1: Kardiyak Biyomarkırlar	11
Tablo 2: TnI, CK-MB, LDH ve Miyogloblin biyomarkırlarının yükselme, pik verme ve normale dönme zamanı	11
Tablo 3: Hasta ve Kontrol gruplarında cTnI , CK, AST, CK-MB ve LDH konsantrasyonu değişimi	11
Tablo 4: Nekropsisi yapılan hayvanlara ait tür, cinsiyet, yaş ile ilgili bilgiler	24
Tablo 5: İmmunohistokimyasal Boyanma Skoru ile Pozitif Kardiyomiyosit oranı arasındaki ilişki	27
Tablo 6: Çalışma grubu ve Kontrol grubu hayvanlarda immunohistokimyasal boyanma skorları	38
Tablo 7: Çalışma grubu hayvnlarda dejenerasyon ve nekrozun şiddeti ile cTnI immunoreaktivitesinin karşılaştırılması	39
Tablo 8: Çalışma ve kontrol grubu hayvanlardan alınan serum örneklerinden elde edilen biyokimyasal veriler	42

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Kalp kasından histopatolojik, immunohistokimyasal incelemeler için; interventriküler, sağ/sol atriyal ve sağ/sol ventriküler alanlardan her bölümden birer örnek olacak şekilde tüm hayvanlardan toplam 5 doku örneğinin alındığı bölgeler 25

Resim 2: Kuzularda nonprulent intersitisyel miyokarditiste makroskopik bulgular (a-d). Perikardiyal kese buzlu cam görünümünde, ödemli ve jelatinöz kıvamda, hava ile temasta pıhtılaşan kanlı sıvı ile dolu (a). Miyokardiyal damarlar hiperemik, miyokardiyum yer yer solgun renkte, kalbin apeks kısmı belirgin koni şeklindeki görünümünü kaybederek yuvarlak bir şekilde (b). Kalp kasında intramural yerleşimli toplu iğne başı büyüklüğünden 2 cm' ye kadar varan büyüklükte beyazımtrak ve gri renkli alanlar halinde lezyonlar (c ve d). Kalp kasındaki boz beyaz renkli lezyonlar nedeniyle myokardiyum kaplan postu manzarasında (b-d). 30

Resim 3: Makroskopik olarak diş eti, dil ve dudak mukozasında (a) ve tırnak arasında (b) veziküler lezyonlar 31

Resim 4: Dilde (Olgu no 17) epitel hücrelerinde vakuoler ve hidropik dejenerasyon, hücreler arası ödem ve vezikül oluşumları ve submukozada çoğunlukla lenfositlerden oluşan yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları. H&EX90. 32

Resim 5: Nonprulent intersitisyel miyokarditis (a-d). Kardiyak myositler bantlaşmalarını yitirerek homojen eozinofilik bir görünümde (a). Bu alanlarda kimi hücrelerin çekirdeklerini tamamen kaybederek nekroze oldukları ya da piknoz ve karyoreksise uğramış çekirdeklere sahip oldukları göze çarpmakta (a-c). Kas demetleri ve kas telleri arasındaki intersitisyum ödemli ve intersitisyumda çoğunluğu lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan aralarında tek tük nötrofil lökositlerin bulunduğu yangısal hücre infiltrasyonları mevcut (a-c). Şiddetli lezyonların bulunduğu alanlarda ise kas tellerinin tamamen gözden kaybolmuş durumda (d). H&E, Büyütme a: 90, b-d: 260 33

Resim 6: Nonprulent intersitisyel miyokarditis. Dejenere ve nekrotik miyositlerde bazofilik mineralizasyon (a). Purkinje hücrelerinde (pf) dejeneratif ve nekrotik

değişiklikler (b). Perikard; ödem sıvısı, lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu ile kalınlaşmış durumda (c). Dejeneratif- Nekrotik değişikliklerin izlendiği kas tellerinin çevresinde uydu hücreleri yer almakta (d). H&E, Büyütme a,b,d: 260, c: 90. 34

Resim 7: Miyokardiyal lezyonlu hayvanlarda (a-c) tüm olgularda miyositlerde, cTnI immunoreaktivitesinde kontrol grubu (d) ile karşılaştırıldığında belirgin bir kayım göze çarpmakta. Avidin Biotin Peroksidaz (ABC) kompleks. Büyütme: a-d: 90. 36

Resim 8: Kardiak troponin I immunoreaktivitesi (a-d). Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC). (a):Histopatolojik olarak belirgin bir dejeneratif değişikliğin izlenmediği kardiak miyositlerde cTnI kayıpları (ok). (b):Yangısal değişikliklerin etrafındaki nekrotik miyositlerde cTnI immunoreaktivitesi tamamen ortadan kalkmış (ok). (c): Yangısal değişikliklerin etrafındaki miyositlerde cTnI immunoreaktivitesi tamamen ortadan kalkarken Purkinje hücreleri hala Purkinje cTnI immunopozitif (ok). (d): Şiddetli miyokardiyal lezyonlarda Purkinje hücrelerinde (ok) de cTnI immunoreaktivitesinde kayıplar. Büyütme: a,b:260, c: 180, d : 90. 37

Resim 9: Kardiak troponin I immunoreaktivitesi (a-d). Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC). cTnI kayıpları kas tellerinin, özellikle yangısal değişikliklerin şiddetli olduğu merkezi kısımlardan başlamakta. Büyütme: a-c: 90, d:180. 40

1. GİRİŞ

Son yıllarda veteriner kardiyolojide miyokardiyal hastalıkların değerlendirilmesinde, kardiyak troponin (cTn), özellikle de cTnI analizleri altın standart olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Akut miyokardiyal hasar sonrası, hasarlı miyokardiyal hücrelerden sızan cTnI'nın serum konsantrasyonu yükselir. cTnI, C-CK izoenzimi CK-MB den daha yüksek duyarlılık göstermektedir. Miyosit hasarını ve miyokardiyal nekrozu tespit etmek için insan hekimliğinde tercih edilen bir biyokimyasal parametre olarak kullanılır. İnsan ve hayvanlarda, cTnI'nın amino asid sekansları arasında olağanüstü bir homoloji vardır. cTnI hem insanlarda ve hemde hayvanlarda miyokardiyal hasarın belirlenmesinde immunohistokimyasal bir biyomarkır olarak kullanılır. Üstelik miyokardiyal hasarın erken dönemlerinde henüz keratin kinaz (CK) ve CK-MB seviyeleri normal sınırlar içindeyken bile, serum cTnI seviyesinin önemli ölçüde yükselmesi tanıdaki değerini artırmıştır. Serum cTnI düzeylerindeki yükselme insanlardakine benzer şekilde hayvanlarda da akut viral miyokarditis, beyaz kas hastalığı, retiküloperkarditis gibi olgularda raporlanmıştır.

Troponin tetkikleri için çeşitli tanı kitleri mevcut olmakla beraber, bu tanı testlerinin referans aralıklarında farklar bulunmaktadır. Bu farklar genellikle kalibrasyon materyali ve 'immunoassay' lerde kullanılan antikorlar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Son dönemde beşeri hekimlikte, testin standardizasyonuna yönelik olarak yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. İnsanlarda cTn I düzeyleri hem prognoz hem de tedavinin yönlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Ancak veteriner kardiyolojide cTn I' ların miyokard hasarının ortaya konulmasındaki rutin kullanım alanı, yapılan çalışmaların eksikliği nedeniyle mümkün olamamaktadır. Bu alanda hayvanlarda yapılan çalışmalar daha çok deneysel nitelikte ve Beşeri Hekimliğe modelleme amacı ile yapılan çalışmalar niteliğindedir.

Hayvanlarda miyokardiyal hasarla seyreden hastalıkların tanısında yukarıda bahsedilen testler hakkında çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. cTn I insan hekimliğinde biyokimyasal belirteç olmalarının yanı sıra, miyosit dejenerasyonunun

belirlenmesinde histolojik belirteç olarak da kullanılmaktadırlar. Buna karşın veteriner hekimlikte cTn'ların kullanımı immunohistolojik olmaktan ziyade daha çok biyokimyasaldır. Hayvanlarda oldukça sınırlı sayıda ve daha çok da beşeri hekimliğe yönelik deneysel az sayıdaki çalışmada mikroskobik olarak hasarlı miyositlerde cTn I kaybı gösterilmiştir. Bu nedenle de kardiyomiyosit hasarı şekillenen hayvanlarda, insanlarda olduğu gibi kardiyokitlerin kullanımı ile ilgili çalışmalar veteriner sahaya yansımamıştır. Kalp hastalıklarında cTnI seviyesinin biyokimyasal ve immunohistokimyasal olarak belirlenmesi ve bu hastalıkların pratik tanı prosedüründeki rollerinin değerlendirilmesi önem kazanmıştır.

1.1. Kalp

Dolaşım sisteminin merkezi kalptir. Mediastinum'un iki yaprağı arasında ve pericardium'un içinde bulunan içi boş, ritmik olarak kasılan kassal bir organdır (Dursun 1996). Genel formu koniktir, belli bir miktarda sağ taraftan basınç altındadır ve sol yüzeyi akciğerlerin medial bölgelerine ve göğüs duvarına bağlantılıdır (Dyce ve ark. 2002). Ruminant ve domuzda apex cordisi çok sivri bir koni, equidede dolgun bir koni, carnivorlarda ise yuvarlak bir koni şeklindedir (Dursun 1996).

Kalp göğüs boşluğunda asimetrik olarak %60 veya daha fazlası median hattın soluna yerleşmiş olarak bulunur (Dyce ve ark. 2002). Hayvan türlerine göre konumu farklılık gösterir.

1.1.1. Yapısı

Kalp duvarlarının kalın tabakası olan myocardium kalp kasını oluşturur. Bu organ kendine özgü bir çeşit çizgili kas yapısına sahiptir. Dışarıdan epicardium(visceral pericardium) ile içeriden ise endocardium ile kaplanmıştır (Dyce ve ark. 2002).

1.1.1.1. Epikardiyum

Bu tabakayı pericardium serosum'un lamina visceralis'i tarafından oluşturur. Myocardiumu, kalbe giren ve kalpten çıkan büyük damar köklerini sıkıca sarar (Dursun 1996).

1.1.2. Endokardiyum

Kalp duvarının iç katmanıdır. Kalbin boşluklarını, bu boşluklarda bulunan anatomik yapıları tamamen kaplayan ince, parlak, düz ve myocardium'a sıkıca yapışmış bir zardır. Kalınlığı kanın kalp duvarına sürtünmesinin çok olduğu bölgelerde belirgin olarak fazla, az olduğu yerlerde ise az olması ile değişir (Dursun 1996).

Endocardium'un kalp boşluklarına bakan bölgelerinin endotel hücrelerinden meydana gelmesinden dolayı kalp boşluklarının iç yüzü kaygan ve parlaktır. Myocardium'a bakan bölgeleri ise bağ dokudan meydana gelmiştir. Düz kas fibrillerini, elastik fibrilleri, kan damarlarını ve ayrıca kalbin uyarımlarını ileten purkinje fibrillerini kapsar (Dursun 1996).

1.1.3. Miyokardiyum

Kalp duvarının kas tabakası ve epikardiyum'dan sonra gelen ikinci tabakasıdır (Dursun 1996). Kas hücrelerinin çizgilenme göstermesi ve renginin kırmızı olması ile iskelet kaslarına, istem dışı çalışmasıyla düz kaslara benzemesine rağmen; myofibrillerinin birbirine yanal uzantılar aracılığıyla düzensiz bağlanmaları ve istemsiz çalışmasıyla iskelet kaslarından, rengi ve çizgileriyle de düz kaslardan tamamen ayrılırlar. Kısacası myocardium kırmızı, çizgili, istemsiz çalışan bir kastır (Bahadır, Yıldız 2008).

Ventrikulus duvarındaki kas tabakası ile atrium duvarındaki kas tabakası birbirlerinden anulus fibrosus'lar ile ayrılmıştır. Böylelikle ventrikuluslar ile atrium'lar ayrı ayrı çalışabilmektedir. Ventrikulusların kas tabakası atrium'ların kas tabakasından çok daha kalındır. Bu kalınlık fonksiyonel farklılığından kaynaklanan bir sonuçtur. Bununla birlikte iki ventrikulus'un kalınlığı da birbirinden farklıdır. Sol ventrikulusun kas tabakası sağ ventrikulus'un kas tabakasından 2-2,5 kat daha kalındır (Dursun 1996).

Ventrikulus'ların kas tabakası myofibrillerinin seyrine göre sınırları keskin olmayan dış, orta ve iç olmak üzere üç ayrı kısımdan oluşur. Myofibrillerin seyirleri ventrikulusların iç ve dış tabakalarında uzunlamasına orta tabakalarında ise dairesel seyirlidir. Her iki ventrikulus için ortak olan dış tabaka basis cordis'ten apex cordis'e doğru seyreder ve bu bölgede orta tabakanın myofibrilleri ile birleşerek vortex cordis'i

meydana getirirler. Orta tabakanın myofibrilleri özellikle basis cordis bölgesinde oldukça fazla, apex cordis bölgesinde ise oldukça az miktarlarda bulunurlar. Bunun sonucu olarak bahsedilen bölgenin kalınlığı diğer bölgelere göre daha azdır. Her iki ventrikulusu ayrı ayrı saran bu myofibriller anulus fibrosus'ta son bulurlar. Bahsedilen bu iç tabakaya ait myofibriller m. papillaris'lere giderler (Dursun 1996).

1.1.4. Histolojisi

Kalp kası üzerinde elektron mikroskobu ile çalışılmadan önce, bu dokunun sonu olmayan dallanmış liflerden meydana gelen multinükleer sinsityal bir iletişim ağı olduğuna inanılıyordu. Fakat elektron mikroskobu ile dikkatlice bakıldığında bu liflerin birleşme yerlerinden birbirine bağlanan birbirinden ayrı kas hücrelerinden meydana geldiği açıkça görülmüştür (Cormark 1987).

Kalp kası liflerinin boyları 100 mikron, enleri ise 15 mikron kadardır. İskelet kas lifleri gibi benzer çizgisel desen sergiler. Kardiyak kas liflerinin kendine özgü geçiş aralıklarında koyu boyanan yapıları vardır. Işık mikroskobunda bu liflerin birbirine bağlandıkları yerler Z bandlarından daha kalın diskler olarak görülür ve interkalar diskler olarak adlandırılır. Bu bağlantı noktaları ayrıca uyarıların iletilmesini de sağlar (Cormark 1987, Sağlam ve ark 2001).

Kalp kası lifleri miyofibrillerinin bandlaşma göstererek çizgili bir görünüme sahip olmasından dolayı iskelet kası liflerine, kas liflerinin tek çekirdekli olup bu çekirdeklerin liflerin merkezine yerleşmiş olması ile kalp kası düz kaslara benzerlik gösterir. Bunun yanı sıra kalp kası liflerinin kendilerine özgü bir şekilde ard arda bağlanma ve kollateral'ler ile birbirlerine bağlanma özellikleri diğer kas liflerinde bulunmayan özelliklerdir (Sağlam ve ark 2001).

Kas doku, sağlıklı erişkin insan ve hayvan vücudundaki metabolik, kimyasal ve fiziksel olayların dinlenme halinde bile hemen hemen yarısının cereyan ettiği (Altınışik 2006), farklılaşmış hücrelerin bir araya gelip, kasılabilen proteinlere sahip yapıları (miyofibrilleri) oluşturmasıyla meydana gelen bir dokudur. Kas hücrelerinde üretilen kimyasal enerjinin mekanik işe dönüştürülerek belli bir yönde kısılmanın (kontraksiyon) sağlanması için özel yapı değişiklikleri meydana gelir. Kısılmanın yeterli derecede

meydana gelebilmesi için kas hücrelerinin morfolojik görünümü ince uzundur. Bu nedenle kas lifi olarak da anılırlar. Kas hücrelerinde sayıları birkaç yüz ile bin arasında değişen miyofibril bulunur ve her miyofibrilde 1500 *miyozin* filamentleri (kalın) ile 3000 *aktin* filamentleri (*ince*) bulunur (Lieber 1999). Kalın filamentleri, 16 nm çapındadır ve büyük oranda miyozinden meydana gelir. İnce filamentleri 6 nm çapındadır, aktin, tropomiyozin ve troponinden oluşur (Altınışık 2006).

1.1.5. Fizyolojisi

Sarkomer miyokardiyal hücrenin temel yapı ve fonksiyonel ünitesidir. Her bir sarkomer, birbirine çıkıntılarla bağlanmış ince ve kalın filamentleri kapsar, sahip olduğu bu yapı ise ışık mikroskopunda iskelet kasına benzer çizgili bir görünüm sergilemesine sebep olur (Amos 1985). Total kas hücre proteinlerinin %60-70'ini oluşturan kalın filamentler miyozini asıl oluşturan proteinlerdir. Aktin ince filamentlerin ana bileşenidir. Aktin proteinleri G-aktin monomerlerinin çift sarmal oluşumunun ipliksi yapısını oluşturur ve Z bandlarından miyozinin merkezine kadar uzanır (Wallace 2004). İnce filamentin en küçük yapısal elementi 7 aktin monomer ile ilişkili tek bir tropomiyozin-troponin kompleksidir (Dean 1998). Tropomiyozin-troponin kompleksi bütün çizgili kas tiplerinin sarkomerleri içinde 3,850 nm aralıklarla halat bükümü gibi aktin ince filament iplikleri boyunca periyodik olarak lokalize olmuştur ve kontraksiyonu sağlar, düz kaslar da ise kontraksiyonu kalmodulin regüle eder. Aktin ve miyozin filamentleri arasındaki etkileşim çizgili kasların kontraksiyonunun temelini oluşturur (Wallace 2004).

Kasılma süreci tropomiyozin ve troponin kompleksi tarafından kontrol edilir. Tropomiyozin aktin filamentinin her iki ucuna doğru uzun eğimli bir oluk içinde uzanmış katı bir çubuk şeklinde 66 kDa ağırlığında bir proteindir. Düşük kalsiyum konsantrasyonunda tropomiyozinin sterik olarak aktin-miyozin etkileşimini engellediği düşünülmektedir. Tropomiyozin molekülleri, kalsiyum konsantrasyonu arttığında hafifçe pozisyonlarını değiştirirler, bu durum kontraktil cevabın oluşması için miyozin ve aktinin etkileşimine izin verir (Wallace 2004).

1.2. Hayvan Türlerinde Miyokardiyal Hasarın Nedenleri ve Patolojik Bulguları

Hayvan türlerinde miyokardiyal hasar fokalden masife kadar değişen miyokard dejenerasyonları ve nekrozları şeklinde çeşitli hastalıklara ilişkin olarak oluşmaktadır:

Ateş, anemi ve toksemi ile seyreden çeşitli sistemik hastalıklarda; diffuz nonspesifik miyokard dejenerasyonu görülür. Kalp kasında şekillenen hidropik dejenerasyonda myokart donuk ve sogun görünümde ve gevrek kıvamdadır. Myokardın kesit yüzü normale göre daha düz ve kas tellerinin sınırları silinmiş olarak görülür. Yağ değişikliği hidropik dejenerasyona oranla daha şiddetli olup kalp kasında düzensiz solgun sarı odaklar halinde göze çarpar ve özellikle de akut sistemik bir bakteriyel intoksikeasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkar.

Miyokard nekrozları endomiyokarditis, miyokarditis ve/veya perimiyokarditis ile seyreden enfeksiyöz hastalıklarda yaygın şekilde rastlanır (Tunca ve ark. 2008, Tunca ve ark. 2009, Christenson RH 1998). Vücudun herhangi bir yerindeki supuratif odaktan köken alan pyojenik bakteriler prulent miyokarditise neden olur. *Listeria monocytogenes* ve *Actinobacillus equuli* gibi bakteriler ise miyokarda yerleştiklerinde fokal apse oluşumlarına ya da yaygın doku yıkımına kadar ilerleyen akut yangısal değişikliklere neden olur. *Haemophilus somnus* enfeksiyonunda ise miyokartta, benzer apse oluşumlarının yanı sıra yaygın myokardial nekroz ve infarktüs ile birlikte ani ölüm sendromu gelişir. Birçok enfeksiyöz hastalıkta ise hastalığın diğer doku ve organlardaki ortaya konulan belirgin patolojik bulguları miyokardial lezyonların göz ardı edilmesine neden olur. Oysa ki bu hastalıklarda da myokartta makroskobik olarak fark edilmeyen daha az spesifik yangısal değişiklikler bulunur (Wolfe ve ark. 1998).

Kronik kalp yetmezliği birçok ülkede, milyonlarca insanı ilgilendiren yüksek bir morbidite ve mortalite nedeni olan bir hastalıktır (American Heart Association 2001-2002). Henüz klinik bulgu oluşturmayan ancak kalp kasında fonksiyon bozukluğuna yol açan bir hasarla başlayan bu kronik süreç, tedaviye dirençli kalp yetersizliği ve ölüm ile son bulur. Buna yol açan ve yeniden biçimlenme ("remodelling") olarak bilinen olaylar dizisi miyokardın kas, kollajen ve vasküler yapılarını da içine alır. Bu durumdaki kalbin morfolojik yapısında miyokardiyal hücre ölümü ve yer yer fibrozis yer almaktadır. Yaşlı köpeklerde intramural koroner arterlerde değişen derecede hiyalinleşmeye sık sık

rastlanılmaktadır. Bu olgularda kalp dilatasyonu ve hipertrofisi ve yer yer nekroz odakları şekillenir. Ancak veteriner kardiolojide kronik kalp yetmezliğine neden olan durumlarla ilgili çalışmalar ise özellikle de ülkemizde son derece sınırlı durumdadır (Wolfe ve ark. 1998).

Kronik böbrek yetersizliği olan hastalarda ölümlerin yaklaşık olarak %50'si kardiyovasküler hastalıklara bağlı olarak şekillenmektedir (Wolfe ve ark. 1998). Bu hastalarda sıklıkta sol ventrikül hipertrofisi gözlenmektedir (Iliou ve ark. 2001).

Şap hastalığında klinik olarak belirlenebilen ağız ve tırnak aralarında şekillenen veziküler lezyonların yanı sıra, post mortem muayenelerde rumen piluslarında ve özellikle de genç hayvanlarda kalpte oldukça tanıtıcı patolojik bulgular ortaya konulabilir. Kas dokusunda şekillen nonpurulent intersitisyel miyokarditis makroskobik olarak kendini düzensiz solgun, boz beyaz renkte alanlar halinde ve kesit yüzü donuk, kas tellerinin sınırlarının seçilemediği alanlar şeklinde kendini gösterir. Bu lezyonlar incelemeyi yapan patologlarca çoğu kez kalp kasının “kaplan postu” manzarasını aldığı şeklinde yorumlanır. Benzer lezyonlara iskelet kaslarında da rastlanabilir. Histolojik değerlendirmede akut olgularda intesitisyel dokunun çoğunlukla lenfosit, plazma hücreleri, makrofajlar ve ödem nedeniyle genişlemiş olduğu dikkati çeker. Kardiak miyositlerde hidropik dejenerasyonun yanı sıra Zenker dejenerasyonu ve nekroz belirgindir. Özellikle nekrotik miyositlerin bulunduğu alanlarda makrofaj ve tek tük lökositlere de rastlanılabilir (Kitching ve ark. 2002).

E vitamini ve selenyum yetersizliğinin yol açtığı beyaz kas hastalığında ise bazen ölümle sonuçlanabilen şiddetli miyokard nekrozları şekillenir (Tunca ve ark. 2008, Tunca ve ark. 2009, Christenson 1998). E vitamini ve selenyum yetersizliğinin yanı sıra karnivorlarda tiamin yetmezliğinde, sığırlarda uzun süreli bakır eksikliğine bağlı düşme hastalığında da miyokartta nekrozlara rastlanılır.

Gosipol, monensin maddelerin kardiyotoksik etkilerinin ortaya çıkması sonucu oluşan zehirlenmelerde de miyokard nekrozları şekillenir. Kardiyak glikozidleri içeren bitkilerin yenmesi sonucunda kalp kasında yer yer nekroz odakları görülür. Ayrıca glikozidlerin dışında Phalaris teki akut toksik faktör miyokard nekrozuna yol açar. Lantana camara koyunlarda miyokard nekrozuna neden olur. Cassia occidentalis ve Karwinskia

humboldtiana koyunlarda iskelet kasında ve kalp kasında nekrozlara yol açar. *Vicia villosa* ise nekroz ile birlikte granülatöz yangı oluşmasına neden olur (Hazıroğlu R.).

Koroner embolizm de fokal miyokard nekrozlarının yaygın bir nedenidir; emboluslar sol taraflı endokarditislerdeki vejetasyonlardan kaynaklanır. Septik emboluslar miyokard apselerine yol açabilir (Hazıroğlu R.). Akut pulmoner emboli ise sağ ventrikül disfonksiyonuna neden olabilir (Meyer ve ark. 2000).

Arteriyosklerozisde lezyonlar abdominal aortada ve arterlerin kollara ayrıldığı noktalarda yerleşir ve iskemiye yol açacak şiddette olur. Bu lezyonlar miyokard infarktüsüne yol açar. Kalp dilatasyonu ve hipertrofisinde ise yer yer nekroz odakları şekillenir, sol ventrikulsdaki ve papiller kaslardaki nekroz odakları oldukça geniştir (Tunca ve ark. 2008, Tunca ve ark. 2009, Christenson 1998).

Paraziter enfeksiyonlarda kas dokusuna ilgisi olan parazitler paraziter miyokarditise neden olurlar. Özellikle *Trichinella spiralis* kalp kasında şiddetli interstisyel miyokarditise sebep olur, yangı bölgelerinde bazofilik dejenerasyon ve nekroz oluşturur.

Miyokardiyal nekrozun makroskobik ve mikroskobik görünümü, ilk etki ile ölüm arasındaki süreye bağlı olur (Tunca ve ark 2009). Makroskobik olarak, zedelenmenin üzerinden 12 saat geçmedikçe nekroza rastlanmaz (Tunca ve ark 2009). Etkilenen bölge 18.-24. saatler arasında solgun ve gri esmer renkte olur kalsiyum tuzları çökebilir (Tunca ve ark. 2009). İki-dört gün içinde nekrotik bölge hiperemik kuşakla keskin olarak sınıflandırılır. 10. günde ise nekrotik alan içine doğru fibröz doku ürer ve fibrosis 6. haftanın sonunda tamamlanır (Tunca ve ark. 2009).

Miyokardiyal hasarın başlangıcında, mikroskobik olarak, ilk 6-12 saat içinde lezyonlar saptanamaz (Tunca ve ark. 2008, Fishbein 2003). Nekroz 12. saatten sonra görülmeye başlar (Tunca ve ark 2009). Daha sonra bölgeye nötrofiller infiltre olur, miyositlerin çekirdekleri piknotiktir, bu dönemde makrofajlarda ortaya çıkar, ilk haftanın sonunda lezyonun çevresinden başlayan granülasyon dokusu 6. haftanın sonunda belirginleşir (Tunca ve ark 2009). Miyokardisitlerde ve doğal olarak görülen ya da deneysel olarak oluşturulan miyokard nekrozlarında Anichkov hücreleri (tırtıl hücreleri) gözlenmektedir. Anichkov hücreleri büyük mononüklear hücreler şeklindedir; çekirdekteki

kromotin lateral ışınal uzantılara sahip dalgalı görünümde olur (Tunca ve ark. 2008, Tunca ve ark. 2009).

Kardiyak hasarın erken tespit edilmesi, hasarın sonuçları göz önünde bulundurulduğunda son derece önemlidir, ancak histopatolojik olarak bile miyokardiyal hasarın 12. saatten sonra ortaya konulabiliyor olması miyokardiyal hasarın tespitinde yeni arayışların ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Veteriner kardiyojide, kalp kasında şekillenen miyokardiyal hasar ile doku ve kan Tn I seviyeleri arasında korelasyonun sağlandığı yalnızca iki çalışmadan birinde buzağılardaki şap hastalığı (Tunca ve ark. 2008) diğesinde de kuzulardaki beyaz kas hastalığı (Tunca ve ark. 2009) ele alınmış ve bu hastalıklarda şekillenen miyokardiyal hasarda cTn'lerin tanısai standardizasyonuna ilişkin önemli mesafeler kaydedilmiştir. Şimdiye kadar veteriner kardiyojide yapılan çalışmalar sadece kandaki Tn I seviyesinin belirlenmesine yöneliktir. Beyaz kas hastalıklı kuzularda kalp kası hasarının teşhisinde kullanılan cTnI kitleri ve serum aktivitelerinin değerlendirilmesi sonucu serum enzim aktiviteleri ile cTn bulgularının birbiriyle uyumlu olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç doğrultusunda hayvanlarda miyokardiyal hasarının tanısında cTn I analiz verilerinin sensitif ve spesifik bir belirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Sungen ve Güneş 2008).

Her ne kadar bu çalışmalarda miyokardiyal hasarın belirlenmesinde cTn I nın önemi vurgulansa da kandaki cTn I seviyesi ile miyokardiyal hasarın doğru orantılı olup olmadığı belli değildir (Tunca 2008). Sağlıklı bir değerlendirme amacıyla miyokardiyal dokudaki hasarın da ortaya konulması gerekliliği ortadadır. Ancak bu standardizasyonlar sağlandığında, cTn I oldukça ucuz, kolay uygulanabilir ve kardiomyosit hasarının belirlenmesinde tanısai değeri oldukça kıymetlidir.

1.3. KARDİYAK MARKIRLAR

Genel olarak, CK ve miyokardiyal izoenzimi CK-MB son zamanlara kadar akut miyokardiyal hasarın enzimatik olarak ortaya konulmasında ‘ altın standart’ olarak kabul edilmekte ve bu veriler LDH, AST ve ALT seviyelerinin belirlenmesiyle desteklenmekteydi (Adams ve ark. 1994, Jaffe ve ark. 1996, Jaffe ve ark. 2000). Ancak

akut miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında son veriler cTnI ların ölçülmesinin daha yararlı olabileceğini ortaya koymaktadır (Apple ve ark. 1997, Jaffe ve ark. 2000, Apple ve ark. 2002, Fishbein ve ark. 2002).

Amerikan Kardiyoloji Koleji ve Avrupa Kardiyoloji Derneği kalp kasına daha spesifik, daha duyarlı ve daha uzun süre kanda kalmaları sebebiyle CK-MB testlerinin yerini cTn I'ların testlerinin alması gerektiğini önermektedir (Alpert ve ark. 2000). Bu yüksek spesifite ve sensitivitelelerinden dolayı insanlarda miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında, artık Tn'ler “altın standart” olarak kabul edilmektedir (O'Brien ve ark. 2008).

cTn I analizi miyokardiyal zedelenmenin belirlenmesinde “altın standart” olarak kabul edilmesine rağmen sonuçların yorumunda; kullanılan test tekniği, kalp kasında şekillenen lezyonların farklılığı ve derecesi ayrıca bu alanda oldukça sınırlı sayıda çalışmanın bulunmasından kaynaklanan nedenlerden dolayı pratik kullanıma yönelik önemli eksiklikler bulunmaktadır (Ebell ve ark.2000, Apple ve ark. 2002)

Tablo 1: Kardiyak Biyomarkırlar

YAPISAL VE DÜZENLEYİCİ MARKIRLAR	
1- cTnT (Apple 1999)	
2- cTnI (Apple 1999)	
3- Miyozin hafif zincirleri (MLCs) (Gupta 2007)	
4- Miyozin ağır zincirleri (MHCs) (Gupta 2007)	
SİTOZOLİK MARKIRLAR	
1-Kreatin Kinaz (CK) (Apple 1997)	
2-Myoglobin (Lemos ve ark. 2002)	
3-LDH izoenzimleri (Karaçalıoğlu ve ark. 2006)	
4-CK-MB izoenzimleri (Apple 1999, Aydınçer 2006)	
5-Aspartat aminotransferaz (AST) (Dolci, Panteghini 2006)	
6-Alanin aminotransferaz (ALT) (Dolci, Panteghini 2006)	
BİYOKİMYASAL MARKIRLAR	
1-C-Reaktif protein (CRP) (Şişman ve ark. 2007, Yılmaz ve Öngen 2009)	

Tablo 2: TnI, CK-MB, LDH, Miyoglobin biyomarkırlarının yükselme, pik ve normale dönme zamanı

Kardiyak Markırlar	Yük. zamanı	Pik zamanı	Nor.Dön. Zamanı
cTnI (Apple 1999)	4-6 h	12 h	3-10 gün
CK-MB (Apple 1999)	4-6 h	12-24 h	3-4 gün
LDH (Karaçalıoğlu ve ark. 2006)	2-5 gün		10 gün
Miyoglobin (Lemos JA ve ark. 2002)	2-4 h	8-10 h	24 h

Tablo 3: Hasta ve kontrol gruplarında cTnI, CK, AST, CK-MB VE LDH konsantrasyonu değişimi (TUNCA ve ark. 2007)

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu(n=8)	
cTnI (ng/ml)	14.8+/- 1.9	0.24 +/-0.03	P < 0.001
CK	573+/-407	30+/-10	P < 0.001
CK-MB	238+/-37	61+/-16	P < 0.001
LDH	298+/-29	109+/-23	P < 0.001
AST	84+/-7	30+/-9	P < 0.001

1.3.1. Kreatin Kinaz (CK)

CK, Kreatin Fosfokinaz (CPK) ya da Fosfo-Kreatin Kinaz olarak da bilinmektedir. Omurgalıların kasında bulunan yüksek enerjili bir moleküldür. CK, üç sitozolik enzime sahiptir (Aydınçer 2006).

- CK1=CK-BB= beyin tipi
- CK2=CK-MB= kalp tipi
- CK3=CK-MM= kas tipi (Apple 1999)

Klinik olarak, kan testleri analizleriyle miyokardiyal infarktüs, rabdomiyolizis, musküler distrofi, serebral felç ve travma gibi beyindeki doku hasarının belirlenmesinde markır olarak kullanılır (Apple 1999).

1.3.2. CK-MB İzoenzimleri

Miyokarda spesifik olup, az miktarlarda diyafram, uterus, dil, ince bağırsak ve prostatta da bulunabilir (Aydınçer 2006). Kalpte yüksek miktarlarda bulunduğundan, kalp krizlerinin tanısında primer indikatör olarak kullanılır. Eğer CK-MB seviyesi total CK seviyesinin % 5'ini oluşturuyorsa kalp krizinden şüphe edilir (Apple 1999)

1.4. Aspartat Aminotransferaz (AST)

Aminotransferaz grubundan bir enzimdir. Kalp kasında yüksek miktarda bulunması nedeniyle ilk kez 1954 yılında AMI vakalarında belirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır (Yılmaz 2004, Altınışık 2006). Ancak bununla birlikte iskelet kası ve karaciğere ilişkin hastalıklarda da artıyor olması nedeniyle günümüzde tercih edilmemektedir. Öte yandan acil tayini oldukça kolaydır (Altınışık 2006).

1.4.1. Alanin Aminotransferaz (ALT)

Aminotransferaz grubundan bir enzimdir. Amino grublarını bir başka oksoaside transfer ederek ya da tam tersine işleterek aminoasitlerle oksoasidlerin birbirlerine dönüşümlerini kataliz ederler. Keto asidlerin aminoasidlere çevrilmesini sağlarlar.

Normalde hücre içerisinde bulunur. Hücre hasarı durumunda kana karışırlar. %73 hepatositlerde, % 12 kalpte, % 8 böbrekte, % 4 pankreasta, %2 dalakta, % 1 oranında ise akciğerlerde bulunurlar. Vücudun birçok yerinde bulunduklarından dolayı kalp hasarı için tercih edilmezler (Altınışik 2006).

1.4.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) İzoenzimleri

CK gibi pek çok dokuda bulunmaktadır. Kalpte bulunmalarının haricinde böbrek, beyin, eritrosit, mide, karaciğer, iskelet kasında da bulunur (Melikoğlu 2008, Ölmez 2008). Laktik asidi pirüvik aside çevirir, sitoplazmik bir enzimdir. Hücre içi düzeyleri serumdaki düzeylerinden 500 kat daha fazladır ve buna bağlı olarak serum seviyesindeki en ufak artış hücre hasarının bir belirtecidir. Beş izotipi ve dört alt grubu vardır bunlardan LDH1 kalp kası dokusuna özgüdür. Fakat buna rağmen düşük özgüllükleri nedeniyle yerlerini miyokard dokusu için çok daha özgül serum markırlarına bırakmışlardır (Karaçalıoğlu ve ark. 2006).

1.4.3. C-Reaktif protein (CRP)

CRP, non-kovalent bağlı, 120 kDa ağırlığında, beş özdeş alt birimden oluşan, dairesel pentamerik disk şeklindeki proteinlerden meydana gelen pentraksin ailesinin bir üyesi olan, prototip akut faz proteinidir (Şişman ve ark. 2007, Yılmaz ve Öngen 2009). Son dekadda üzerinde çalışılan çok sayıda yangısal belirteç arasından yaygın olarak incelenen yüksek sensitif C reaktif proteindir (Osmanbaşoğlu 2008). Yangı prosesi süresince serum ve plazmada yüksek seviyede bulunan bir proteindir. Enfeksiyon, akut ve kronik yangı durumlarının sensitif markıdır (Pichler ve ark. 2004). Kalp kasının nekroze olmadığı kardiyovasküler hastalıklarda, aterosklerozun şiddetine ve genişliğine göre serum CRP düzeyi korelasyon göstermektedir. Ayrıca AMI durumunda, sirkülasyondaki CRP seviyesinin infarktın genişliği ile bağlantılı olduğu saptanmıştır (Topal ve ark. 2006). Apoptotik ve nekroze hücrelerin temizlenmesini sağlayarak, hasarlı dokunun yapısının ve işlevinin onarımına katkı sağlamaktadır (Şişman ve ark. 2007). Öte yandan, trombotik olaylara ilişkin risklerin önceden belirlenmesinde CRP seviyelerinin incelenmesi kullanılmaktadır (Pichler ve ark. 2004)

1.4.4. Troponin I

Troponin (cTn), çizgili kasların ince filamentleri üzerine düzenli aralıklarla yerleşmiş ve çizgili kaslarda kontraksiyonu düzenleyen globüler yapıda bir protein kompleksidir (Christenson ve ark.1998, Wu ve ark 1998, Kaneko ve ark. 1997). Troponinin izoformu olan cTn I yalnızca kardiyak kasında bulunduğu bilinmektedir. Aynı zamanda aktin flamenti için güçlü bir affiniteye sahiptir ve aktomyozin ATPaz aktivitesinin bir inhibitörü olarak, aktin ve myozin arasındaki ilişkiyi düzenler (Christenson ve ark.1998, Wu ve ark 1998).

Tüm Tn proteinleri miyofibrillerin gerilme ve gevşeme süreci içerisinde tamamlayıcı olarak yer alırlar (Cardinet,1997). Diğer kardiyak cTn'ler çizgili kaslardakine benzer biçimde aktin filamentlerine bağlanırsa da cTn-I izoformu, kalp kasında farklı genler tarafından kodlanır (Christenson ve ark.1998). Bu farklılık kardiyak izoformlara karşı hazırlanmış olan antikorlarla miyokardiyal hasarın belirlenmesinde kullanılan, hassas cTn-I testinin temelini oluşturur. cTn-I miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında önemli diagnostik kriterlerden biridir (Güneş ve ark. 2005, Güneş ve ark. 2008, Tunca ve ark. 2008, Tunca ve ark. 2009).

Zedelenmiş miyositlerden kana cTn'ler -I, -C, -T kompleksleri (cTn-I-C-T üçlü kompleksi ve cTn-I-C ikili kompleksi) şeklinde ve serbest alt gruplar (cTn-I, cTn-C ve cTn-T) olarak salınırlar (Christenson ve ark.1998, Wu ve ark. 1998). Kalp kasında meydana gelen zedelenmeden kısa bir süre sonra kandaki yoğunluklarının yükselmesi, henüz klinik bulgular şekillenmeden bile miyokard zedelenmesinin ortaya konulmasında önemli bir ölçüt olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Güneş ve ark. 2005, Güneş ve ark 2008, O'Brien ve ark. 2008, Tunca ve ark. 2008, Tunca ve ark. 2009). Sağlıklı bir kalp kasında cTn-I'nın büyük bir bölümü kardiomiyosit içinde yapısal olarak bağlı durumdadır ve sadece kardiomiyositte meydana gelen dejenerasyon ve nekroz durumunda yıkılan hücreden salınır (Tunca ve ark. 2008, Tunca ve ark. 2009). İnsanlarda, Tn'ler miyokardial hasardan 5-7 saat gibi oldukça kısa bir süre sonra kanda tespit edilebilir ve hasarın 1-2 günü kandaki en üst seviyelerine ulaşır (Mair 1999).

cTn I aktomiyosin ATPaz ın inhibisyonundan sorumludur (Leavis ve ark. 1984). cTn Inın 3 izoformu çizgili kaslarda tespit edilmiştir. 2 izoformu iskelet kasları için

karakteristiktir 1 izoformu ise kardiyak kaslar için karakteristiktir (Dhoot G. K. Ve ark 1978). 181-211 aminoasit dizililerinden meydana gelen cTn I ve kardiyak izoformu yaklaşık olarak ekstra 30 dizilik N terminal peptidin varlığına neden olur (Perry 1999).

cTn I izoformları 3 farklı gen tarafından kodlanır. İnsan kardiyak cTn I genleri 19. Kromozomun 8. eksonunda lokalize olmuştur (MacGeoch, G ve ark. 1991). cTn I genlerinin ekspresyonu ontogenez aşamasına bağlıdır (Schiaffino G ve ark. 1993). cTn I'nin hem kalp hem iskelet kası izoformları insan fetusunun kalbinde ifade edilmiştir. Doğumdan sonra iskelet kası izoformları bloke olur oysa kardiyak izoformların oluşumu artar bu değişim yaşamın 9. Ayına kadar özel kardiyak izoformlarının üretimini sağlar (Sasse S ve ark. 1993). mRNA seviyesi protein sentezi seviyesine ulaşıncaya kadar izoform ekspresyonunun kontrolü translasyon seviyesinde olur.

1.4.5. İnce Flamentlerin Diğer Bileşenleriyle cTn I'nin Etkileşimi

1.3.7.1.a. Tropomiyosin ve Aktinle birlikte cTn I'nin etkileşimi ve cTn I'nin inhibitör bölgeleri

Daha önceden de bahsedildiği gibi cTn I aktomiyosin ATPaz'ın inhibisyonundan sorumludur. Bu inhibisyon tropomiyosin varlığını artırır ve Ca bağımlı cTn C'nin varlığını tamamen kaldırır (Perry 1999). cTn I'nin bu mekanizmasını anlamak için aktin tropomiyosin ve cTn C ile etkileşimini analiz etmek çok önemlidir.

HcTn I'nin farklı fragmentleri; ince flamentlerin bileşenleriyle birlikte cTn I'nin etkileşim bölgelerinin haritalamak için oluşturulur. İskelet kası cTn I fragmentleri arasında 96-116 sıra diziden oluşan kısa bir peptid aktomiyosin ATPaz aktivitesini inhibe edecek yeteneğini korur (Syska ve ark. 1976). Bu peptid endojen cTn I'ları tüketilen iskelet fibrillerinin kasılmasını inhibe eder (Perry 1999). Buna ek olarak bu peptid diğer önemli sağlam cTn I'ların özelliklerini korur ve aktin ve cTn C ile etkileşime girmesini sağlar (Syska ve ark. 1976). daha sonra ikinci inhibitör peptid cTn I'nin yapısında bulunmuştur. Bu inhibitör bölge 128-148 aa dizilerinden meydana gelir (Tripet ve ark. 1997). iki inhibitör peptidin yapısında da bazı homolojiler ortaya çıkmıştır (Pearlstone J.R. ve ark. 1999). Birinci inhibitör peptidin yapısındaki çeşitli aa dizilerinin rolü ortaya çıkmıştır. İnhibitör aktivitesini koruyan minimal sekanslar 1004-115 aa dizilimleri arasında bulunur.

Özellikle 105 ve 114 aa dizilimleri kritik rol oynar (Van Eyk, J. E.ve ark 1988). Kardiyak ve iskelet kası cTn I larının inhibitör peptidleri korunumlu bir primer yapıya sahiptir, ama buna rağmen iskelet cTn I ları iskelet kaslarının kasılması ve actomiyosin ATPazın aktivasyonun inhibisyonuna karşılık kalbin cTn I dan daha etkilidir (Talbot J.A. ve ark 1981). Bu farklılık cTn I inhibitör peptidlerindeki tek nonkoservatif değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. İskelet kası cTn I inhibitör peptidi 109 ve 110 dizisindeki pro aminoasidini içerir, oysa cTn I inhibitör peptidi aynı dizilerde pro ve thr aminoasitlerini içerir. İskelet kası cTn I inhibitör peptidi (96NQKLFDLRGKFKRPPLRRVRM116) 109 pro- 110pro dipeptidinin saç tokası yapı oluşumuyla 2 amfifilik alfa helikaz yapısı oluşturur. cTn I olayında olduğu gibi inhibitör peptidleri 2 alfa helikaz yapıları daha serbest haldedir. Bu yüzden actomiyosin ATPaz aktivitesini inhibe etmesi daha zordur. P110G değişimiyle İskelet kası cTn I sentetik inhibitör peptidleri 2 alfa halikazın hareketinin artışıyla karakterize edilir. Bu durum actomiyosin ATPaz aktivitesinin inhibisyonun azalmasını sağlar (Campbell A.D. ve ark 1992).

1.3.7.1.b. cTn I nın cTn C ile Etkileşimi

Bilindiği gibi cTn I nın inhibitör etkileri cTn C tarafından bloke edilir. Bu iki protein birbiriyle etkileşim içindedir. Ca yokluğunda cTn I nın inhibitör bölgeleri aktin ile etkileşime geçer oysa Ca varlığında bu bölgeler cTn C ile etkileşime geçerler (Farah C.S. ve ark. 1994).

cTn C ve I nın polipeptid zincirlerinin oryantasyonları antiparaleldir (Farah C.S. ve ark. 1994). cTn I nın ilk inhibitör peptidi bu oryantasyonla birlikte cTn C' nin N ve C terminal domainleriyle etkileşime girebilir ya da cTn C' nin C terminal ucu ve alfa heliksin merkezine yakın bölgede lokalize olabilir (Ngai S.M. ve ark. 1994). cTn I nın inhibitör peptidindeki pro-110 ile thr veya gly değişimi inhibisyon reaksiyonunun azalmasına neden olur (Van Eyk J.E. ve ark. 1988). Bu mutasyon cTn C ve cTn I inhibitör peptidlerinin etkileşimlerini etkiler. Sağlam inhibitör peptidleri kalsiyumun cTn C nin kalsiyum bağlanma bölgelerine afinitesini artırır, oysa P110G değişimiyle mutant peptidler cTn C nin kalsiyum bağlanma bölgelerini etkileyemezler (Van Eyk J.E. ve ark. 1988).

cTn I nın birinci inhibitör peptidi (96-116 dizisi) cTn C nin iki globular domaini ve heliks merkeziyle etkileşime girebilir (Ngai S.M. ve ark. 1994). cTn I nin C terminal ucu cTn C nin N terminal ucuyla etkileşime girer. Kalsiyum yokluğunda cTn C troponin I ile zayıf bir etkileşime girer. cTn C nin kalsiyum bağlanmayı düzenleyici bölgeleri aktinden cTn I nın inhibitör bölgelerinin ayrılmasını ve 116-131 bölgelerinin içeren troponin I ile troponin nin etkileşimini artırır. Bu durum actomiyosin ATPaz inhibisyonuna engel olur.

Bu model iskelet kası troponin kompleksindeki cTn I ve C etkileşimini açıklar. Bilindiği gibi cTn I ve C nin primer yapısı iskelet kasından farklıdır. Bu yüzden kardiyak kasda ki cTn C ve I nın C terminal uçlarındaki etkileşim farklılıklarını açıklamak zordur (Rarick H.M. ve ark. 1997).

Şimdiye kadar hiçbir X ray kristalografik verilerde tüm troponin kompleksi ya da ikili cTn I ve C kompleksi mevcut değildir. Her iki proteinlerin merkezi kümeleri birbiriyle rast gelir ve her iki protein birbiriyle uyum sağlayarak simetrik olarak lokalize olurlar.(Van Eyk J.E. ve ark. 1988) cTn I ve C nin polipeptid zincirlerinin antiparalel oryantasyonlarını dikkate alarak bu durum daha önce açıklanan sonucun aynısıdır.

1.3.7.1.c. cTn I nın cTn T ile Etkileşimi

cTn T ve I nin sıkı etkileşimi jel filtrasyonu, sirküler dikroizm ve kimyasal çapraz bağlamalarla tespit edilmiştir. Bu etkileşimin gücü cTn I nın cys-48 ve cys 64 aminoasitlerinin eksilmesine bağlıdır (Stefancsik, R. Ve ark. 1998). cTn I da ilk 57 dizinin delesyonu cTn T ile etkileşimini etkilemez (Jideama, N. M. Ve ark. 1996). cTn T kimyasal modifikasyonlar için cTn I' nın lys 70 aminoaside erişilebilirliğini etkiler (Stefancsik, R. Ve ark. 1998). Tüm troponin kompleksinin kimyasal çaprazlamalar cTn I ve T nin birbirine yakın bir ortamda olmasını sağlar (Jideama, N. M. Ve ark. 1996). cTn I ve T nin etkileşimi kalsiyuma bağlı olan tüm Troponin kompleksini içine alır. cTn T nin 205-255 aa dizilerini içeren alfa helix ve cTn I nın 53-106 aa dizilerini içeren alfa heliks oluşan sarmal yapı cTn I ve T nin etkileşimini sağlar (Talbot J.A. ve ark. 1981). Bu nedenle cTn T bağlanma bölgesi cTn I nın 40-96 dizileri arasında lokalize olduğu görülür ve cTn C ile etkileşimini içeren cTn I nın 1-40 ve 96-148 dizileri arasında sıkıştırılır (Talbot J.A. ve ark. 1981).

1.4.5.1. Troponin I'nin Fosforilasyonu

Protein protein etkileşimlerini içeren troponin kompleksleri sadece kalsiyum tarafından kontrol edilir fakat buna ek olarak cTn I fosforilasyonu ile değiştirilebilir. Fosforilasyon özellikle cTn I lar için karakteristiktir.

İn vitro koşullar altında cTn I üç tane protein kinaz tarafından fosforillenebilir:

- ⇒ Ca²⁺-phospholipid- bağlı protein kinaz (protein kinaz C, PKC)
- ⇒ cGMP-bağılı protein kinaz (protein kinaz G, PKG)
- ⇒ cAMP-bağılı protein kinaz (protein kinaz A, PKA)

1.3.7.2.a. Ca²⁺ phospholipid- bağlı protein kinazla cTn I fosforilasyonu (protein kinaz C, PKC)

Ca²⁺ phospholipid- bağlı protein kinaz tüm troponin kompleksini içeren cTn I'nin ve izole edilen kardiyak troponin kinazların Ser-144 ve 43, 45, 23, 24 dizilerini fosforillediği tanımlanmıştır. Daha detaylı yapılan araştırmalarda ise bu protein kinazın farklı izoformlarının cTn I'nin farklı bölümlerini fosforillediği açıklanmıştır: (Jideama, N. M. Ve ark. 1996)

- PKC'nin izoformu çoğunlukla cTnI'nin Ser-23 ve 24 buna ek olarak Ser 43-44 ü fosforiller
- α ve β izoformu çoğunlukla cTn I'nin Ser 43-45i fosforiller
- Oysa δ izoformu cTn I'yı çok az miktarda fosforilleyebilir.

Elde edilen bilgilere göre PKC yle cTn I'nin fosforilasyonu aktomiyozin ATP az aktivitesindeki artışla sonuçlanır. Bu nedenle eğer PKC cTn I'yı in vivo ortamda fosforillerse bu miyofibrillerin ATPaz aktivitesinin artışına neden olur ve büyük olasılıkla kardiyak kasılmasında azalmaya neden olur (Jideama, N. M. Ve ark. 1996).

1.3.7.2.b. cGMP-bağlı protein kinase (protein kinase G, PKG)ve cAMP-bağlı protein kinase (protein kinase A, PKA) ile Troponin I fosforilasyonu

cTn I'nin her iki protein kinaz ile fosforilleştiği bilinir. İn vitro koşullar altında her iki protein de cTn I'yi aynı bölgelerinden (Ser23-24) fosforiller (Sulakhe, P. V. Ve ark. 1995). cAMP-bağlı protein kinase (protein kinase A, PKA) cTn I'yi hem in vitro hem de in vivo ortamda fosforilleyebilir (Perry S.V. 1999). cTn I'nin PKA tarafından fosforillenmesi kalsiyum için kasılma düzenin hassasiyetinin bozulmasındaki azalmayla sonuçlanır. Bu yüzden cTn I'nin fosforilasyonundan sonra ATPaz aktivitesi daha yüksek kalsiyum konsantrasyonlarda sağlanır. Bu etkiye cTn I' nin cTn C' ye olan affinitesini azaltan fosforilasyon neden olabilir (Malhotra A. ve ark 1997).

cTn I ile etkileşiminin azalmasının bir sonucu olarak, cTn C'nin regülatör bölgeleri kalsiyuma daha düşük affiniteyle bağlanır. Asp için Ser-24 ve 23'ün değişimiyle oluşan mutant protein için sağlam cTn I'nin yerine geçmesi, kasılma düzeninin hassasiyetinin azalmasıyla birlikte oluşur. Başka bir değişle, fosforilasyon veya cTn I'nin 23 ve 24. Pozisyondaki Ser ve Asp'nin yer değiştirmesiyle oluşan negatif yük girişi önemli miktarda cTn C'nin kalsiyuma bağlanmasını azaltır. Bu etki cTn I yapısındaki değişimleri indükleyen fosforilasyondan kaynaklanır. Gerçekten de cTn I' nin kısa peptidlerindeki ser23 ve 24'ün fosforilasyonu büyük konformasyonel değişimlere neden olur (Malhotra A. ve ark 1997). Fosforilasyon troponinin 5. Peptid zincirine bağlanan floresans etiketinin parametrelerini ve fosforilasyon olduğu bölgelerin yakınlarında bulunan yapıları da etkiler. Hem ser 23 ve 24'ün fosforilasyonu cTn I yapısında büyük değişimlerle sonuçlanır. Gerçekten, cAMP bağlı protein kinaz la sağlam cTn I'nin fosforilasyonu C terminalinde bulunan Trp ve cTn I'nin N terminaline yakın bir yerine sabitlenen floresan etiketi arasındaki mesafedeki azalmasına eşlik eder (Dong W.J. 1997). Hem fosforilasyon cTn C'nin N terminalindeki regülatör bölgelerini ve α heliks merkezi olan bölgeleri, cTn I'nin C terminal bölgeleri ve merkezine bağlı floresans etiketleri etkiler. (Jaquet, K. Ve ark. 1998). cTn C ile birlikte cTn I' nin fosforilasyonu önemli derecede kalsiyuma affinitesinin azalmasına neden olur (Dong W.J. 1997). cTn C'nin kalsiyuma bağlanmasına cTn I'nin fosforilasyonunun etkisi açıklanmıştır (Jaquet, K. Ve ark. 1998). Bu bilgi, Ser 23 ve 24'ün fosforilasyonunun cTn I yapısından önemli değişiklikler yaptığı ve cTn C'nin regülatör bölgeleriyle kalsiyuma bağlanması ve cTn C ile I'nin etkileşimini etkilediğini

desteklemektedir. Bu yüzden, protein G ve A ile cTn I'nın ser 23 ve 24'ün fosforilasyonu kasılma düzeninin kalsiyum hassasiyetini azaltır.

1.4.6. Kasların kasılma aktivitelerinin düzenlenmesi ve cTn I'nın fosforilasyonu

cTn I fosforilasyonu ile tetiklenen kas kasılmasındaki değişiklikler ve hormon aktivasyonu arasındaki bağ uzun yıllardır anlamaya çalışılır. B adrenerjik stimülasyonunun kalp kasılmasının gücü ve sıklığındaki azalmasıyla sonuçlandırıldığı çok iyi bilinir (Jaquet, K. Ve ark. 1998). B₁ veya B₂ adrenoreseptörlerinin aktivasyonu adenylate döngüsü aktivitesindeki artışla ve protein kinaz A aktivitesinin artışıyla birlikte meydana gelir (Malhotra A. ve ark. 1997). B reseptör inhibitörleri varlığında α_1 adrenoreseptörlerinin stimülasyonu protein kinaz aktivasyonu ve fosfotidilinositol devrindeki artışla birlikte meydana gelir. α_1 adrenoreseptörü tarafından stimüle edilen kalp kasılmasının gecikmesinin protein kinaz C tarafından cTn I fosforilasyonu ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür (Pearlstone, J. R. Ve ark. 1997). Adenosin A₁ reseptörleri adenilat döngüsünü bloke eder. Bunun sebebi adenosin reseptörlerinin cTn I'nın fosforilasyonundaki azalmaya buna ek olarak kalp kasılmasının gücünün ve frekansının azalmasına neden olmasıdır. Bu durum yalnızca cTn I'nın fosforilasyonu tarafından kalp kasılmasındaki tüm değişimleri açıklamak için basittir. Aslında kalp kasılması frekansı ve genişliği hem kasılabilir aparatların kalsiyuma duyarlılığı hem de miyoplazmadaki kalsiyumun düzensiz değişimiyle tanımlanır. Kalsiyum geçiş sistemlerinin etkinliği fosfolamban ve fosfolemanın fosforillenmesiyle kontrol edilebilir (Jaquet, K. Ve ark. 1998). Bu yüzden kalbin kasılma aktivitesi hem regülatör proteinlerin hem de membran proteinlerinin fosforilasyonuna bağlıdır. Troponin fosforilasyonunun kalbin kasılma aktivitesi regülasyonunda önemli rol oynadığı şüphe götürmez bir gerçektir. Kalp yetmezliği, miyokardiyal infarktüs, arteriyel hipertansiyon gibi farklı patolojilerin cTn I fosforilasyonunu etkilediği bilinir (Pearlstone, J. R. Ve ark. 1997). Ama ne yazık ki, şu anda cTn I fosforilasyonu ve bu farklı patoloji oluşumları arasında bağlantı olduğu tespit edilememiştir. Ancak, farklı protein kinazlar tarafından cTn I'nın fosforilasyonunun kalp kasılma aktivitesini yeterince etkilemesi de şüphe götürmeyen bir gerçektir.

1.4.7. Troponin ölçüm yöntemleri

İlk cTnT ölçüm kitleri 1989 yılında geliştirilmiştir. Duyarlılığı ve özgüllüğü düşük olan bu ilk kuşak testlerin ardından geliştirilen ikinci kuşak ölçüm yöntemleri ile bu sorunlar ortadan kaldırılmıştır (Wu AH ve ark. 1999). Günümüzde en az 18 tane farklı cTn-I ölçüm kiti bulunmaktadır. Bunların kendi aralarında standardizasyonu henüz tam olarak yapılmamıştır. Şu anda cTn I için belirtilen bir miyokard infarktüsü limiti yoktur, ancak >0.1 ng/ml düzeyindeki artışların prognostik öneminin olduğu gösterilmiştir. Klinik kullanım için 0.03 ng/ml saptanabilme sınırı olarak belirlenmiştir. Bu değerin üzerindeki değerler miyokard hasarını gösterir. Ancak cTn I için yapılan ölçümlerde yanlış pozitiflik oranı %3.1 olarak gösterilmiştir. Bu istenmeyen durumun peş peşe cTn I düzeyi ölçümleri yapılarak giderilmesi önerilmektedir (Fleming SM ve ark. 2000).

cTn I, 22 - kDa ağırlığında bir proteindir. Aktin tropomiyozin kompleksindeki miyozin köprülerinin oluşmasını engelleyen ve böylece çizgili kas kasılmasını önleyen troponin kompleksinin inhibitör parçasıdır. cTn T gibi, cTn I da üç izoform halinde bulunur:

- Kardiyak kası formu
- İskelet kası (hızlı kasılan) formu.
- İskelet kası (yavaş kasılan) formu

cTn I plazmada başlıca troponin-tropomiyozin kompleksine bağlı olarak bulunur, ancak küçük bir oranı (%2.5) sitoplazmada serbest halde saptanabilir.

cTn- I hücre hasarına bağlı olarak, iskemik semptomların başlangıcından sonraki 4-6 saat içerisinde plazmada saptanmaya ve 10 gün - 2 hafta kadar yüksek kalmaya devam eder. Plazmadaki uzun yarı ömürleri nedeniyle troponinler erken dönem reinfarktüs tanısında kullanılamazlar (Topol EJ 2000).

2. ÇALIŞMANIN AMACI

Son zamanlara kadar CK ve miyokardiyal izoenzimi CK-MB akut miyokardiyal hasarın enzimatik olarak ortaya konulmasında ‘ altın standart’ olarak kabul edilmekteydi. Ayrıca bu veriler LDH, AST seviyelerinin belirlenmesiyle desteklenmekteydi. Ancak yapılan son çalışmalarda akut miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında son veriler cTnI ların ölçülmesinin daha yararlı olabileceğini ortaya koymaktadır

cTn-I miyokard kasılma fizyolojisinin bir bileşeni olup, miyokard zedelenmesini gösteren yeni nesil belirteçlerdir. Kalp kası miyositlerindeki dejenerasyondan nekroza kadar ilerleyen hasarın değerlendirilmesinde kullanılır. Ancak Veteriner Hekimlik pratiğinde cTn’ lerin kullanımına ilişkin erişilebilir nitelikteki çalışmalar oldukça sınırlıdır. Var olan çalışmaların eksik yönleri, yetersizliği gibi nedenlerle çalışma konusu olan cTn-I için gerekli standardizasyon yeterince sağlanamamıştır. Buna bağlı olarak önceki çalışmaları takip edecek, yeni araştırmalara örnek oluşturacak çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Bu kapsamda, Veteriner Hekimlikte miyokardiyal hasarın belirlenmesinde cTn-I’nın rolünün belirlenmesi amacıyla, nekropsisi yapılan ve miyokard hasarı şüphesi bulunan kuzu ve oğlakların kapsamlı makroskobik, mikroskobik ve immunohistokimyasal incelemeleri yapılarak immunohistokimyasal bulgular semikantitatif olarak değerlendirildi. Aynı olgulardan elde edilen kan örneklerinde serum cTn-I, AST, ALT, LDH, CK, CK-MB aktiviteleri belirlenerek elde edilen diğer verilerle karşılaştırmalı olarak incelendi.

Çalışmada elde edilen verilerin ışığında, kuzu ve oğlaklardaki miyokardiyal doku lezyonlarının şiddeti ve cTn-I salımının koordinasyonu noktasındaki mekanizmalar sağlıklı bir şekilde ortaya konması amaçlanmıştır.

Bununla birlikte, patolojik verilerin klinik bulgulara yansımaları, serum ve kardiyomiyosit troponin seviyesinin gerek birbiri ile etkileşimi ve gerekse de kalp kasında şekillenen hasarın şiddeti, süresi ve yaygınlığı karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi ile kuzu ve oğlaklarda cTn-I’nın kalp hastalıklarında kullanımına yönelik önemli ölçüde katkı sağlanması hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma materyalini, Aydın ili ve çevresinde 2011 yılında ortaya çıkan ve Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Şap Enstitüsü tarafından Serotip O suşunun neden olduğu raporlanan Şap hastalığı salgını sırasında ölen kuzu ve oğlaklar oluşturdu.

Bu kapsamda, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na 9 farklı sürüden getirilen klinik olarak miyokardiyal hasar şüpheli 12 adet kuzu ve 6 adet oğlak olmak üzere toplam 18 adet hayvan değerlendirildi.

Ayrıca klinik, makroskopik, mikroskopik olarak miyokardiyal lezyon saptanmayan 10 adet kuzu kontrol olarak kullanıldı.

Bu çalışma dizaynı Adnan Menderes Üniversitesi, Deney Hayvanları Etik Kurulu B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2012/008 sayılı oturumu tarafından onaylanmıştır. Çalışma materyali Tablo 4' de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

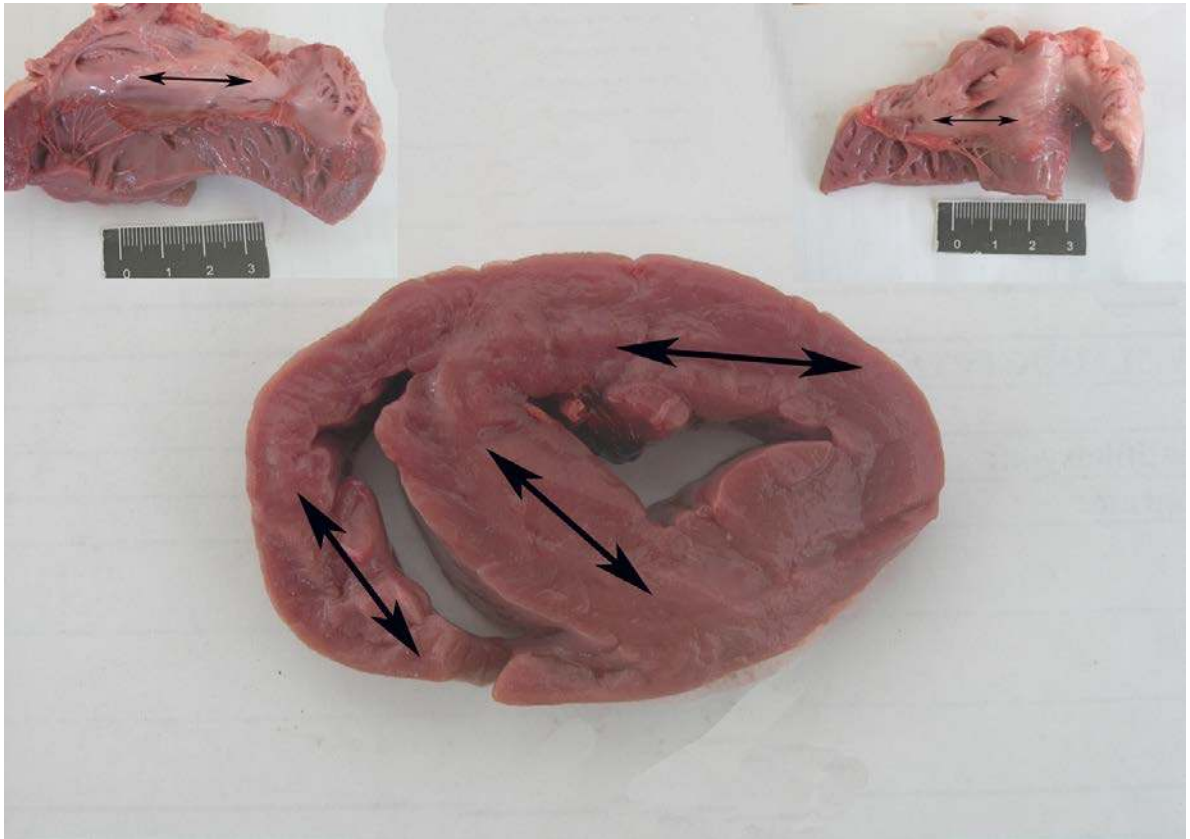
Tablo 4: Nekropsisi yapılan hayvanlara ait tür, cinsiyet, yaş ile ilgili bilgiler

Çalışma Grubu				
Olgu No	Tür	İrk	Yaş (Gün)	Cins.
01	Kuzu	Karagöz	25 günlük	Erkek
02	Kuzu	Karya	4 günlük	Dişi
03	Kuzu	Karya	15 günlük	Erkek
04	Oğlak	Kıl	30 günlük	Erkek
05	Kuzu	Karya	45 günlük	Dişi
06	Oğlak	Kıl	10 günlük	Dişi
07	Kuzu	Karya	15 günlük	Erkek
08	Kuzu	Karya	20 günlük	Dişi
09	Kuzu	Karya	20 günlük	Dişi
10	Kuzu	Karya	10 günlük	Dişi
11	Kuzu	Karya	4 günlük	Erkek
12	Kuzu	Karya	10 günlük	Erkek
13	Oğlak	Kıl	30 günlük	Dişi
14	Kuzu	Merinos	7 günlük	Erkek
15	Kuzu	Karya	10 günlük	Erkek
16	Oğlak	Kıl	10 günlük	Dişi
17	Oğlak	Seanen	9 günlük	Dişi
18	Oğlak	Kıl	30 günlük	Erkek
Kontrol Grubu				
01	Kuzu	Sakız	365 günlük	Erkek
02	Kuzu	Sakız	365 günlük	Erkek
03	Kuzu	Sakız	365 günlük	Erkek
04	Kuzu	Sakız	365 günlük	Erkek
05	Kuzu	Sakız	365 günlük	Erkek
06	Kuzu	Sakız	365 günlük	Erkek
07	Kuzu	Sakız	365 günlük	Erkek
08	Kuzu	Sakız	45 günlük	Erkek
09	Kuzu	Sakız	30 günlük	Erkek
10	Kuzu	Sakız	15 günlük	Erkek

3.1. Makroskopik İncelemeler

Ölen tüm hayvanların nekropsileri yapıldıktan sonra görülen makroskopik değişiklikler kaydedildi. Kontroller dahil olmak üzere her hayvandan serum tüplerine kan alınarak serumları çıkartıldı ve -20°C 'de muhafaza edildi. Ölümü takiben kalp dokusundan alınan doku örnekleri patolojik ve immunohistokimyasal incelemelerde kullanıldı.

Bu amaçla, kalp kasından; interventriküler, sağ/sol atriyal ve sağ/sol ventriküler alanlardan her bölümden birer örnek olacak şekilde tüm hayvanlardan toplam 5 doku örneği histopatolojik değerlendirmeler için % 10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna alındı. Alınan bu örnekler 24 saat süre ile tespit edildi. Patolojik değerlendirme amacı ile alınan doku örneklerinin hangi bölgelerden yapıldığı Resim 1' de gösterilmiştir:



Resim1: Kalp kasından histopatolojik, immunohistokimyasal incelemeler için; interventriküler, sağ/sol atriyal ve sağ/sol ventriküler alanlardan her bölümden birer örnek olacak şekilde tüm hayvanlardan toplam 5 doku örneğinin alındığı bölgeler (oklar).

3.2. Mikroskopik İncelemeler

3.2.1. Histokimyasal İncelemeler

Nekropsileri yapılan hayvanlardan alınan doku örnekleri 12-24 saat % 10'luk formalin solüsyonunda tespit edildi. Örnekler 6-8 saat süre ile akan çeşme suyu ile yıkandıktan sonra, doku takip cihazında (Leica TP1020) bilinen yöntemlerle, alkol (%70, %80, %90, %96 ve %100) ve ksilol serilerinde, işlem gördükten sonra parafinde bloklandı. Bu bloklardan 4-6 µm kalınlığında kesitler alındı (mikrotom, Leica RM2135). Alınan kesitler Hematoksilen ve Eozin (HE) ile boyandı (Culling 1985). Ayrıca Poly-L-lysin'li lamlar üzerine alınan kesitler ise immunohistokimyasal incelemeler için ayrıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi. Gerekli görülen preparatlardan mikroskopik dijital fotoğraflar (Olympus C-5050) çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı. İncelenen olgu preparatlarındaki dejenere ve nekroza uğramış hücrelerin yoğunluk oranı ışık mikroskopuyla semikantitatif olarak değerlendirildi. Bulgular şu şekilde sınıflandırıldı:

- %0-5 dejenere ve nekroze hücre oranı.....(0)
- %6-29 dejenere ve nekroze hücre oranı.....(1)
- %30-59 dejenere ve nekroze hücre oranı.....(2)
- %60 ve üzeri dejenere ve nekroze hücre oranı.....(3)

3.2.2. İmmunohistokimyasal İncelemeler

Poly-L-lysine kaplı lamlara alınan kesitlere immunohistokimyasal yöntemlerden avidin-biotin peroksidaz kompleks (ABC) metodu, ilgili firmanın (avidin-biotin peroxidase complex (ABC), DakoCytomotion LSAB+System-HRP for Autostainer, Denmark) önerdiği yönteme göre takip edildi. Testin her aşaması nemli kamarada yapıldı ve takipler arasında 3x5 dakika süreyle fosfat tamponlu solüsyonu (PBS Phosphate buffer saline, pH: 6,2) ile yıkandı. Parafin kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize ve dehidre edildi. Kesitler deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemlerinden sonra antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması amacıyla sitrat buffer solüsyonu ile (pH: 6) mikrodalga fırında (600 Watt) 5 dakika işleme tabi tutuldu. Dokulardaki endojen peroksit aktivitesini

önlemek için hidrojen peroksitin (H_2O_2) metanoldeki çözeltisinde (%3) 15 dakika bekletildi. Daha sonra PBS de yıkandı. PBS ile yıkanan kesitlere, primer serum olan Poliklonal goat anti cTn- I antikoru (1/100) ile kaplandı ve $+4^{\circ}C$ 'de bir gece süreyle inkübe edildi. Dokular PBS ile yıkandıktan sonra, biyotinlenmiş rabbit anti goat sekonder antikoru ile kaplanarak ve oda ısısında 30 dakika nemli kamarada inkübe edildi. Bunu takiben, PBS'te tekrar yıkanan dokular streptavidin peroksidaz konjugatı ile oda ısısında 20 dakika süreyle nemli kamarada inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAKO)- H_2O_2 substratı ile reaksiyon sonlandırıldı. Tekrar PBS'te yıkanan dokular hematoksilin ile karşıt boyaması yapıldıktan sonra alkol serilerinde dehidre edildi. Ksilolde şeffaflaştırılan kesitler yapıştırıcı (Entellan-Merck) ile kapatıldı. Sonuçlar ışık mikroskobunda değerlendirildi.

3.2.3. İmmunohistokimyasal İncelemelerin Skorlanması

Her hayvanda kalbin beş bölümünden alınan kesitlerden, her birinde en iyi immunohistokimyasal reaksiyonu yansıtan 10 alandaki cTnI pozitif kardiyomiyosit yüzdeleri 40'luk objektif ve 10 luk oküler odakta ışık mikroskobu altında semikantitatif olarak değerlendirildi. Her bir kesitte, 10 alanda pozitif işaretli kardiyomiyositler % olarak değerlendirildi. Her bir kesitte elde edilen bu 10 verinin ortalaması o kesite ait % boyanma skoru olarak kabul edildi. Bu değerlendirmeler Tablo 5' de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 5: İmmunohistokimyasal Boyanma Skoru ile pozitif kardiyomiyosit oranı arasındaki ilişki

Pozitif Kardiyomiyosit Oranı	İmmunohistokimyasal Boyanma Skoru
%100 – 90	0
%90 – 70	1
%70 – 50	2
% 50-0	3

3.2.4. Biyokimyasal İncelemeler

Çalışma grubu hayvanlardan nekropsi öncesi, kontrol grubu hayvanlardan ise kesim öncesi kan örnekleri toplandı ve 800 xg devirde 10 dakika santrifüj edildi. Bu serum örnekleri analiz zamanına kadar -20 °C de saklandı.

Nekropsisi yapılan hayvanlardan ve kontrol amacıyla çalışma kapsamına alınan canlı hayvanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlardaki serum cTn-I aktivitesi ticari kitler (“Card-I Kit Combo Test” kiti) kullanılarak ölçüldü. Serum cTn I reaktivitesi üretici firmanın talimatlarına göre Card-I Kit Combo Testi kullanılarak belirlendi. Test kartında 15-20 dakika içerisinde kırmızı-kahverengi 2 çizgi oluşuyorsa sonuçlar pozitif olarak, tek çizgi oluşuyorsa sonuçlar negatif olarak değerlendirildi.

Ayrıca aynı serum örnekleri modüler platform analizörü (Roche Cobas E411) ile işlenerek cTn-I düzeyleri ve kimyasal analizör (Roche Cobas c311) ile işlenerek de LDH, AST, ALT, CK, CK-MB ve CRP aktiviteleri sayısal veri olarak ortaya kondu.

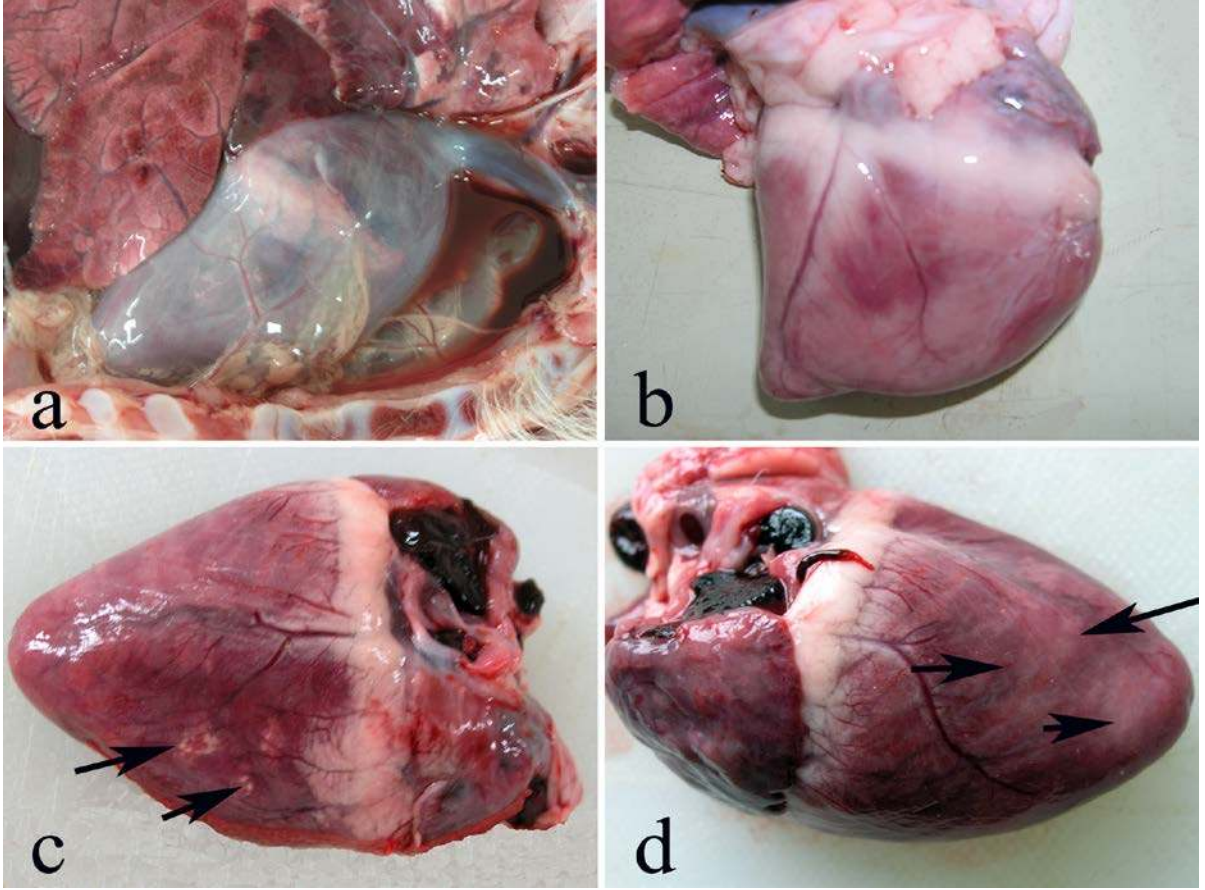
4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Kontrol gruplarında herhangi bir makroskopik bulguya rastlanmadı. Tüm çalışma materyalinin toplandığı kuzu ve oğlakların bulundukları sürülerde yetişkin hayvanlarda Şap hastalığının klasik klinik ve patolojik bulguları bulunmaktaydı. Çalışma grubunda incelenen tüm kuzu ve oğlaklar ani ölüm anamnezine sahipti. İncelenen 18 olgunun 15 tanesinde şap hastalığının, ağız ve ayaklarda tanımlanan klasik makroskopik bulgularına rastlanmadı. Üç olguda ise (Olgu No: 5, 8, 17) şap hastalığının ağız ve tırnak arası lezyonları, aşırı salivasyon ile belirgin tipik klinikopatolojik bulguları görüldü.

4.1.1. Kalpte saptanan makroskopik bulgular

Tüm olgularda perikardiyal kese buzlu cam görünümünde, genişlemiş, sarımsı renkte, jelatinöz kıvamda ve yer yer hava ile temasta pıhtılaşan sıvı ile doluydu (Resim 1a). Perikardiyal yüzeyler pürüzlü görünümdeydi. Miyokartta tüm damarlar hiperemikti. Buna karşın kalp kası yer yer solgun renkte, ödemli ve yumuşak kıvamlıydı, apeks kısmı belirgin koni şeklindeki görünümünü kaybederek yuvarlak bir şekil almıştı (Resim 1b). Her iki ventrikulus da belirgin bir şekilde genişlemişti. Kalp kasında intramural yerleşimli toplu iğne başı büyüklüğünden 2 cm' ye kadar varan büyüklükte beyazımtrak ve gri renkli alanlar halinde lezyonlar görüldü (Resim 1c). Bütün bu lezyonlar nedeniyle kalp tipik kaplan postu manzarasını andıran alacalı görünümdeydi (Resim 1d). Bu lezyonlar çoğunlukla interventriküler septumda, sağ-sol ventrikulus duvarlarında daha belirgin iken, atriyal bölgelerde daha hafif şiddetteydi. Sağ-sol Atriyum ve sağ-sol ventrikulus lümenleri ile kalbe giren ve kalpten çıkan tüm damarların lümenlerinde pıhtılaşmış kan mevcuttu.



Resim 2: Kuzularda nonprulent intesitisyel miyokarditiste makroskopik bulgular (a-d). Perikardiyal kese buzlu cam görünümünde, ödemli ve jelatinöz kıvamda, hava ile temasta pıhtılaşan kanlısıvı ile dolu (a). Miyokardial damarlar hiperemik, miokardiyum yer yer solgun renkte, kalbin apeks kısmı belirgin koni şeklindeki görünümünü kaybederek yuvarlak bir şekilde (b). Kalp kasında intramural yerleşimli toplu iğne başı büyüklüğünden 2 cm' ye kadar varan büyüklükte beyazımtrak ve gri renkli alanlar halinde lezyonlar (oklar) (c ve d). Kalp kasındaki boz beyaz renkli lezyonlar nedeniyle myokardiyum kaplan postu manzarasında (b-d).

4.1.2. Diğer organlarda saptanan makroskopik bulgular

Tüm olgularda Lenf düğümleri şişkin, kesit yüzleri gri renkte ve nemli görünümde idi. Üç olguda (Olgu No:05-08-17) ağız mukozası, diş eti, dudak, yanakların iç yüzleri, dilin üst yüzeyi ile tırnak aralarında vesikül ve erozyonlara rastlandı (Resim 3a-b). Bağırsak segmentlerinin subserozal damarları hiperemikti (Olgu No: 17). Bağırsak lumenleri açıldığında mukoza yüzeyinin yer yer konjesyone olduğu görüldü (olgu no 01-

02-11- 17). Karaciğerin parietal yüzü solgun ve alacalı görünümde idi (Olgü No: 17). Göğüs boşluğunda kanlı eksudat mevcuttu (Olgü No: 01-02-11). Akciğerin kranial loplarda konsolide alanlar dikkati çekti (Olgü No: 01-02).



Resim 3: Makroskobik olarak diş eti, dil ve dudak mukozasında (a) ve tırnak arasında (b) veziküler lezyonlar (oklar).

4.2. Mikroskobik Bulgular

4.2.1.Histopatolojik Bulgular:

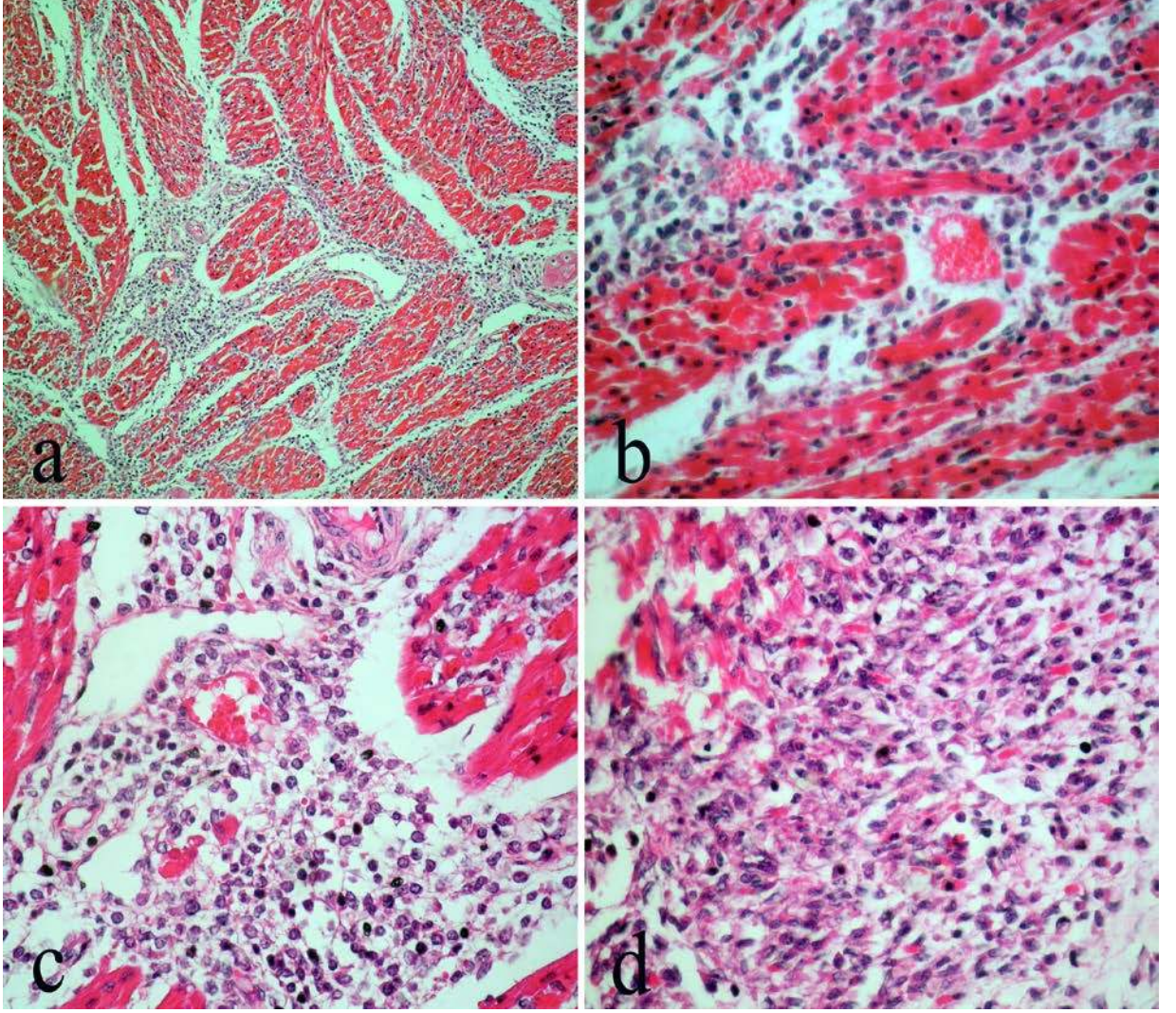
Kontrol gruplarında herhangi bir lezyon saptanmadı. Çalışma grubundaki üç olguda (Olgü No: 5,8,17) ağız ve mukozası, diş etleri ile tırnak arasında epidermiste epitel hücrelerinde vakuoler ve hidropik dejenerasyonun yanısıra hücreler arası ödem ve vezikül oluşumları dikkati çekti. Kimi alanlarda veziküllerin açılarak erezyonların şekillendiği görüldü. Bu olgularda submukozada damarlar hiperemik ve çoğunlukla lenfositlerden oluşan yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları mevcuttu (Resim 4).



Resim 4: Dilde (Olgu no 17) epitel hücrelerinde vakuoler ve hidropik dejenerasyon, hücreler arası ödem oluşumları ve submukozada çoğunlukla lenfositlerden oluşan yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları. H&EX90.

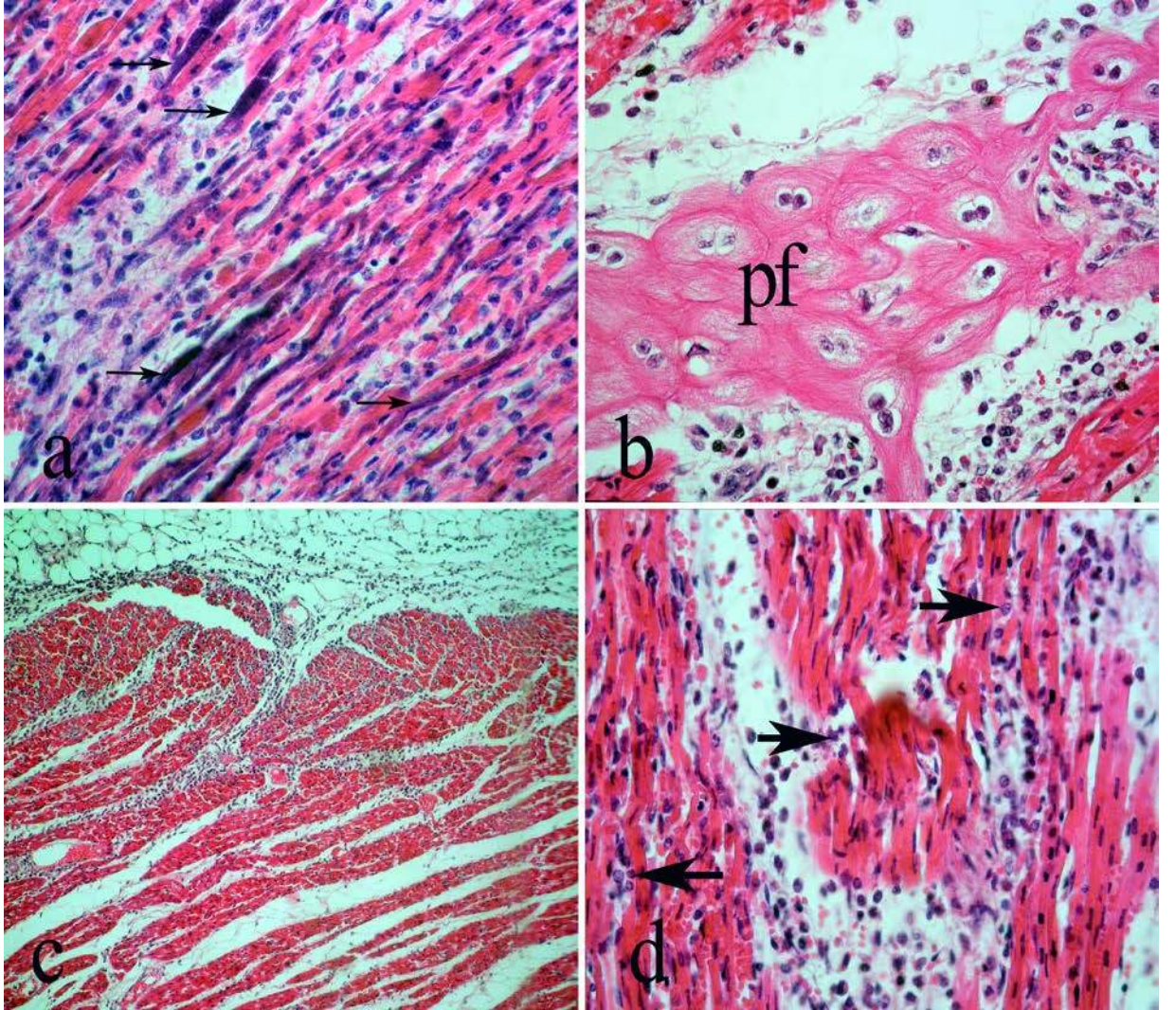
Çalışma grubundaki tüm hayvanlarda nonprulent intersitisyel miyokarditis ile uyumlu histopatolojik veriler mevcuttu (Resim 5a-d). Kardiyak myositlerin yer yer bantlaşmalarını yitirerek homojen eozinofilik bir görünüm aldığı şiddetli hiyalin dejenerasyonu ve nekroz görüldü (Resim 5a). Bu alanlarda kimi hücrelerin çekirdeklerini tamamen kaybederek nekroze oldukları ya da piknoz ve karyoreksise uğramış çekirdeklere sahip oldukları göze çarptı (Resim 5a-c). Kas demetleri ve kas telleri arasındaki intersitisyum ödemliydi ve intersitisyumda çoğunluğu lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan aralarında tek tük nötrofil lökositlerin bulunduğu yangısal hücre infiltrasyonları mevcuttu (Resim 5a-c). Şiddetli lezyonların bulunduğu alanlarda ise kas tellerinin tamamen gözden kaybolduğu, bu alanların eozinofilik, nekrotik doku artıkları ödem sıvısı ve yangı hücrelerinden ibaret olduğu dikkati çekti (Resim 5d). Böyle olgularda (Olgu No: 14) yangısal reaksiyonların endokarda kadar ulaştığı, endokardın ödemli yer yer hiperplazik olduğu dikkati çekti. Kimi alanlarda ise miyofibrillerin nadiren, bazofilik renkte mineralizasyona uğradığı göze çarptı (Resim 6a). Miyositlerde şiddetli dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin bulunduğu olgularda purkinje hücrelerinde de dejeneratif ve nekrotik değişikliklere rastlandı. (Olgu No: 16,17)(Resim 6b). Perikard; ödem sıvısı,

lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu ile kalınlaşmıştı (Resim 6c). Tüm damarlar hiperemik, damar endoteli hücreleri hiperplazik görünümdeydi. Kimi alanlarda ise damarlar çevresinde interstitisyumda kanamalar dikkati çekti.



Resim 5: Nonprulent intersitisyel miyokarditis (a-d). Kardiyak myositler bantlaşmalarını yitirerek homojen eozinofilik bir görünümde (a). Bu alanlarda kimi hücrelerin çekirdeklerini tamamen kaybederek nekroze oldukları ya da piknoz ve karyoreksise uğramış çekirdeklere sahip oldukları göze çarpmakta (a-c). Kas demetleri ve kas telleri arasındaki intersitisyum ödemli ve intersitisyumda çoğunluğu lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan aralarında tek tük nötrofil lökositlerin bulunduğu yangısal hücre infiltrasyonları mevcutt (a-c). Şiddetli lezyonların bulunduğu alanlarda ise kas tellerinin tamamen gözden kaybolmuş durumda (d). H&E, Büyütme a: 90, b-d: 260

Miyokardiyal lezyonlar, en şiddetli olarak ventriküler ve interventriküler bölgelerde idi. Dejeneratif- Nekrotik değişikliklerin izlendiği kas tellerinde klasik bantlaşma kaybolmuş ve hemen miyositin periferinde uydu hücreleri yer almaktaydı (Resim 6d). Şiddetli doku yıkımının görüldüğü bölgelerde infiltrate makrofajların bazılarının sitoplazmalarında nekrotik yıkıntıları kapsayan eozinofilik granüller dikkati çekti.

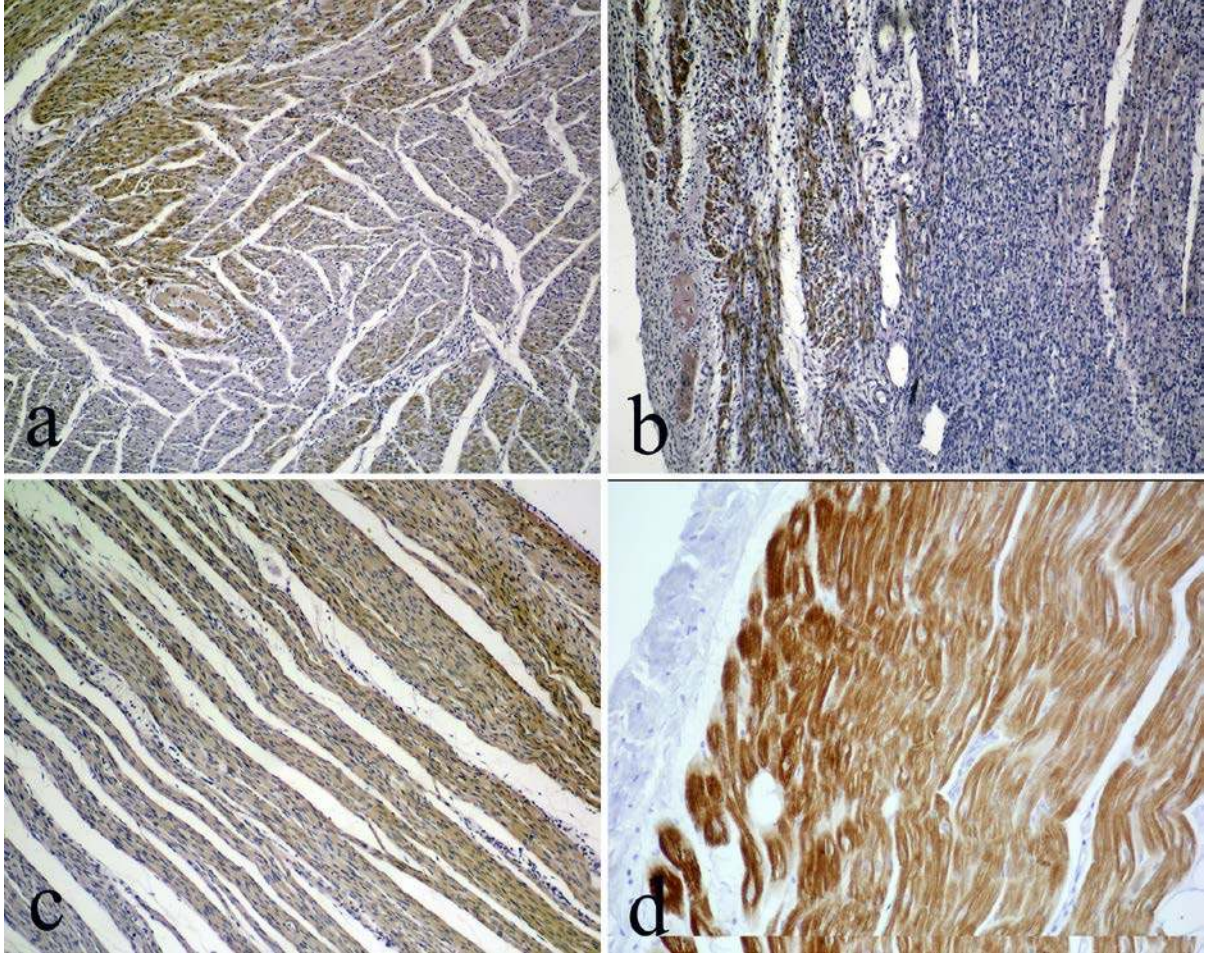


Resim 6: Nonprulent intersitisyel miyokarditis. Dejenere ve nekrotik miyositlerde bazofilik mineralizasyon (a). Purkinje hücrelerinde (pf) dejeneratif ve nekrotik değişiklikler (b). Perikard; ödem sıvısı, lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu ile kalınlaşmış durumda (c). Dejeneratif- Nekrotik değişikliklerin izlendiği kas tellerinin çevresinde uydu hücreleri yer almakta (d). H&E, Büyütme a,b,d: 260, c: 90.

Miyokardiyal hasarın daha hafif şiddette olduğu kimi olgularda (Olgu No: 06, 02, 12, 13) ya da miyokardiyal hasar şiddetli olmasına rağmen miyokardiyal hasarın daha hafif seyrettiği alanlarda kas demetleri ve kas telleri arasında intersitisyel ödem ön plandaydı, buna karşın mononüklear hücre infiltrasyonları daha hafif şiddetteydi. Böyle bölgelerde myosit hasarı histopatolojik olarak seçilememektedir. Üç olguda (olgu no 4,6,10) akut, yangısal ve nekrotik değişikliklerin yanı sıra kronik, subakut-kronik değişiklikler mevcuttu. Bu olgularda akut değişikliklerin yanı sıra kimi miyositlerde kalsifikasyonlar da dikkati çekti. (olgu no 6,10). Bazı alanlarda ise kas tellerinin tamamen gözden kaybolduğu yerini lenfosit, plazmosit ve makrofajlardan oluşan yangı hücreleri ile fibrosit ve fibroblastlardan oluşan bağ doku hücreleri tarafından doldurulduğu görüldü (Olgu No: 4,6,10).

4.2.2. İmmunohistokimyasal Bulgular:

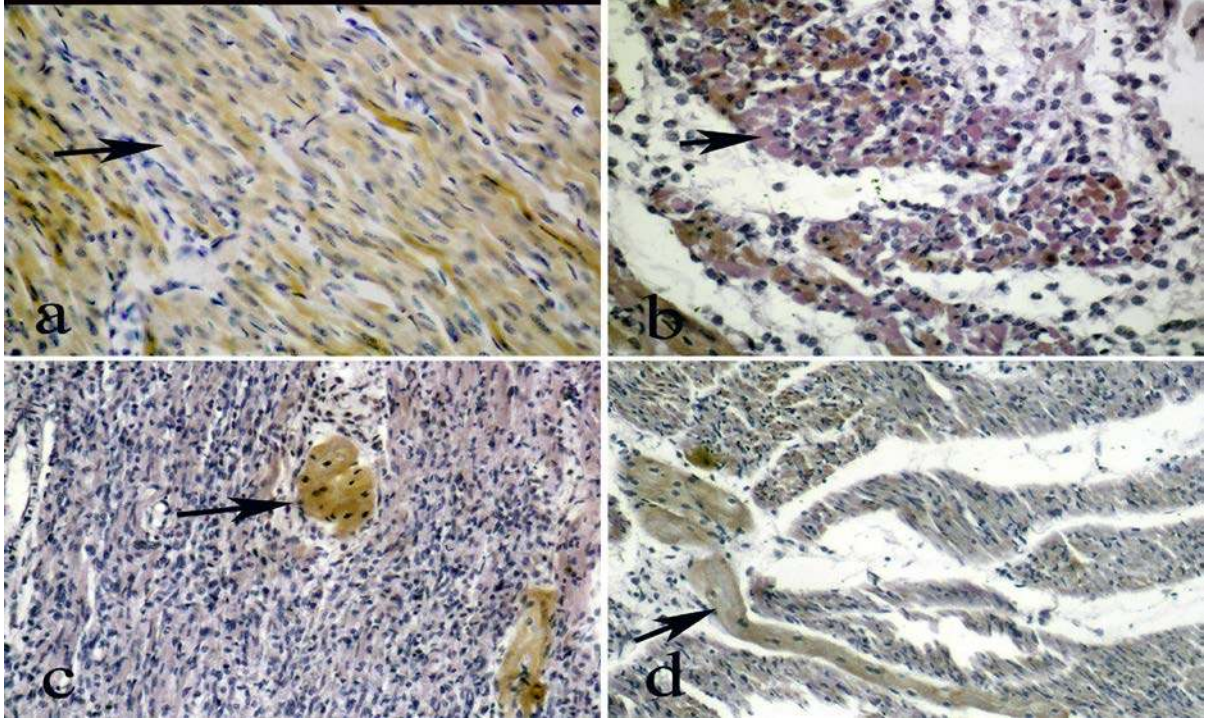
Çalışma grubundaki hayvanların kalp dokularının immünohistokimyasal değerlendirmesinde bu olguların tümünde miyositlerde cTnI immünoreaktivitesinde belirgin bir azalma tespit edildi (Resim 7a-c). Kontrol grubu hayvanlarında ise kardiyak miyositlerde diffüz, yoğun, intrasitoplazmik cTnI immünoreaktivitesi mevcuttu (Resim 7d).



Resim 7: Miyokardiyal lezyonlu hayvanlarda (a-c) tüm olgularda miyositlerde, cTnI immunoreaktivitesinde kontrol grubu (d) ile karşılaştırıldığında belirgin bir kayıp göze çarpmakta. Avidin Biotin Peroksidaz (ABC) kompleks. Büyütme: a-d: 90.

Histopatolojik olarak dejenerasyon ve nekrozun tespit edildiği kardiyomiyositlerde 18 olgunun tamamında kas hücrelerindeki immunoreaktivitede belirgin bir azalma mevcuttu. cTnI immunoreaktivitesinin yoğunluğu ile dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin şiddeti arasında negatif bir korelasyonun bulunduğu dikkati çekti. Çalışma ve kontrol grubundaki hayvanlardaki immunohistokimyasal boyanma skorları ve dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin şiddeti ile cTnI immuno reaktivitesi arasındaki ilişki Tablo 6 ve 7’de ayrıntılı olarak gösterildi. Şiddetli dejenerasyon ve nekrozun bulunduğu alanlarda ise cTnI immunoreaktivitesine hiç rastlanmadı. Üstelik Hematoksilen – Eozin ile boyanan kesitlerde eozinofilik görünüm dışında herhangi bir dejeneratif ya da nekrotik değişiklik izlenmeyen kardiyomiyositlerde de cTnI immunoreaktivitesinde belirgin bir azalmanın olduğu görüldü. Bu bölgelerde cTnI

immunoreaktivitesi yangısal reaksiyonlara yakın kısımlarda tamamen ortadan kalkmış iken, bu lezyonlardan uzaklaştıkça zayıftan yoğunu doğru bir artış göstermekteydi.



Resim 8: Kardiak Troponin I immunoreaktivitesi (a-d). Avidin Biyotin Peroksidaz Kompleks (ABC). (a):Histopatolojik olarak belirgin bir dejeneratif değişikliğin izlenmediği kardiak miyositlerde cTnI kayıpları (ok). (b):Yangısal değişikliklerin etrafındaki nekrotik miyositlerde cTnI immunoreaktivitesi tamamen ortadan kalkmış (ok). (c): Yangısal değişikliklerin etrafındaki miyositlerde cTnI immunoreaktivitesi tamamen ortadan kalkarken Purkinje hücreleri hala Purkinje cTnI immunopozitif (ok). (d): Şiddetli miyokardiyal lezyonlarda Purkinje hücrelerinde (ok) de cTnI immunoreaktivitesinde kayıplar. Büyütme: a,b:260, c: 180, d : 90.

Tablo 6: Çalışma grubu ve kontrol grubu hayvanlarda immunohistokimyasal boyanma skorları

Çalışma Grubu Olgu No	İmmunohistokimyasal Boyanma Skoru					Ortalama Skor
	SaV	SV	SaA	SA	IS	
1	1	1	0	0	1	1
2	1	1	1	1	1	1
3	2	2	2	2	2	2
4	3	3	2	2	3	3
5	1	1	0	0	1	1
6	1	1	1	1	1	1
7	3	2	2	2	2	2
8	2	1	1	1	1	1
9	2	2	1	1	2	2
10	2	2	2	1	2	2
11	1	1	1	1	1	1
12	3	3	2	2	3	3
13	2	1	1	1	1	1
14	2	2	2	2	2	2
15	2	1	1	1	1	1
16	3	3	2	2	3	3
17	3	2	2	2	2	2
18	2	2	1	1	1	1
Kontrol Grubu Olgu No						
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

SaV: Sağ Ventrikulus **SV:** Sol Ventrikulus **SaA:** Sağ Atriyum **SA:** Sol Atriyum
IS: Interventrikuler Septum

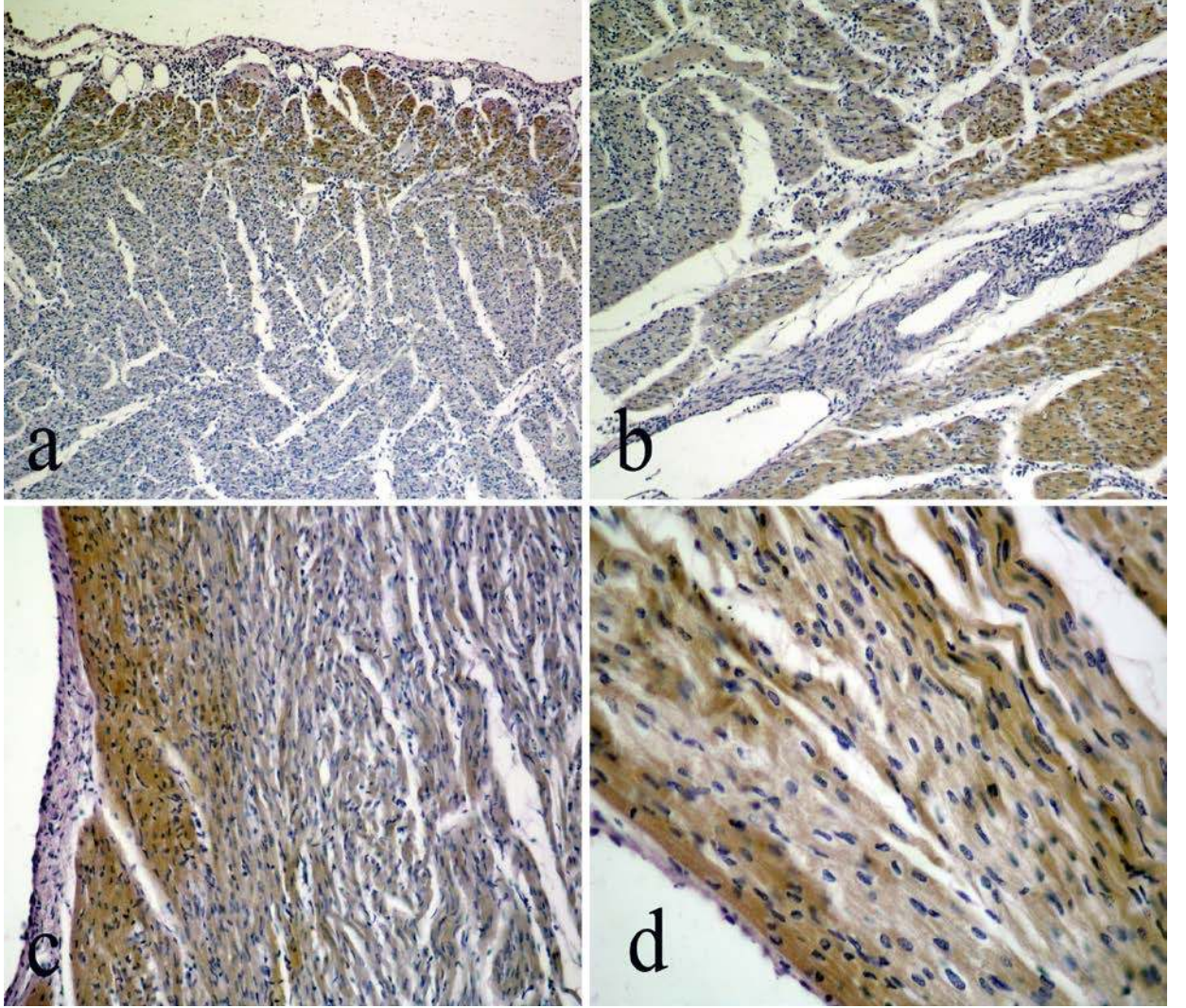
Tablo 7: Çalışma grubu hayvanlarda dejenerasyon ve nekrozun şiddeti ile cTnI immunoreaktivitesinin karşılaştırılması

Çalışma Grubu Olgu No	Dejenerasyon ve nekrozun şiddeti	cTnI Reaktivitesi (%)
1	+1	80
2	+1	70
3	+2	65
4	+3	40
5	+1	85
6	+1	75
7	+3	50
8	+2	70
9	+2	60
10	+2	55
11	+1	80
12	+3	45
13	+2	65
14	+2	60
15	+2	65
16	+3	40
17	+3	40
18	+2	45

Purkinje hücreleri, histopatolojik lezyonların hafif ve orta şiddette olduğu alanlarda çoğunlukla cTnI immuno pozitif. Buna karşın nekrotik değişikliklerin şiddetli olduğu ve purkinje hücrelerinde de dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin bulunduğu olgularda purkinje hücrelerinin cTnI immunoreaktivitesinin azaldığı ya da tamamen ortadan kaybolduğu görüldü.

Nekrotik alanların çevresinde nekrotik materyali fagosit etmiş, nötrofil lökosit ve makrofajların sitoplasmasında da cTn I immuno reaktivitesi dikkati çekti. Buna karşın

kardiyak miyositler dışında kalan damar duvarları, perikardiyal ve endokardiyal hücreler ile intersitisyel alanlardaki bağ doku hücreleri ve kronik olgulardaki bağ doku proliferasyonlarındaki bağ doku hücrelerinde cTn I immunoreaktivitesine rastlanmadı. Genel olarak değerlendirildiğinde cTnI kayıpları kas tellerinin özellikle yangısal değişikliklerin şiddetli olduğu merkezi kısımlardan başlamaktaydı.



Resim 9: Kardiak troponin I immunoreaktivitesi (a-d). Avidin B,yotin Peroksidaz Kompleks (ABC). cTnI kayıpları kas tellerinin, özellikle yangısal değişikliklerin şiddetli olduğu merkezi kısımlardan başlamakta. Büyütme:a-c: 90, d:180.

4.3. Biyokimyasal Bulguları

Serum örnekleri modüler platform analizörü (Roche Cobas E411) ile işlenerek cTn-I düzeyleri ve kimyasal analizör (Roche Cobas c311) ile işlenerek de LDH, AST, ALT, CK, CK-MB ve CRP aktiviteleri sayısal veri olarak ortaya kondu. Bu sayısal veriler Tablo 8 'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 8: Çalışma ve Kontrol grubu hayvanlarından alınan serum örneklerinden elde edilen biyokimyasal veriler

Çalışma Grubu Olgu No:	CTnI(ng/ml)	CK(U/l)	CK-MB(U/l)	AST(U/l)	ALT(U/l)	LDH(U/l)	CRP
1	5.2	193.3	119	43.4	16	698.5	5.3
2	10.8	328.9	198.5	52.7	22.8	710.1	5.4
3	20.4	622.1	235.9	62.5	27.3	898	6
4	17.9	730	232.8	69	31.9	829	7.3
5	25	782	342	77.4	38.6	968.2	7.4
6	12.1	498	201.8	55.7	25.3	735.6	5.9
7	22	685	248.3	68.2	35.2	937	6.3
8	26.1	599.1	348.6	78.1	38.9	1024	7.5
9	19.1	596	248.2	62	32.5	865	5.6
10	19.8	591.2	238.9	68.8	34.7	887.3	8.1
11	11.3	450	191.4	52.3	20.5	728.7	6.2
12	17.6	688.5	235.1	67.6	30.3	802.8	7.2
13	16.8	502.8	208.9	65.9	28.4	796.4	7.3
14	12.5	571	256	50.5	24.6	941	6.8
15	7.3	354.6	167.4	49.9	18.9	702	6.7
16	24	652	332.5	76.4	35.2	956.2	6.2
17	22	618	318	70.2	32.1	945.3	8.5
18	14.8	534	187	65	21.9	752	5.6
Kontrol Grubu Olgu No	CTnI(ng/ml)	CK(U/l)	CK-MB(U/l)	AST(U/l)	ALT(U/l)	LDH(U/l)	CRP
1	0.100	82.7	61.2	15.9	13.2	187	5.6
2	0.100	80.9	32.5	22	13.9	165	5.4
3	0.100	73.5	30.8	20.9	12.6	157	8.2
4	0.100	68.2	33.8	28.1	11.2	138	7.1
5	0.100	53.1	30.9	18	11	124	5.8
6	0.100	58.6	28.5	26.7	8.2	329	5.2
7	0.100	128.9	15	31.4	8.5	378	3.8
8	0.100	119.6	6	38.1	4.9	450	4.1
9	0.100	84.3	5.7	45.5	5.1	502	5.6
10	0.100	78.1	13.2	56.2	6.3	318	7.1
Ref değ:	>0.100	146.6±46.9	30.07±2.24	66.5±13.5	10.91±3.36	668±111	0±6

5. TARTIŞMA

Kuzu ve Oğlaklarda miyokardiyal hasar, miyokard dejenerasyonu ve nekrozu şeklinde; endomiyokarditis, miyokarditis ve/veya perimiyokarditis ile seyreden enfeksiyöz hastalıklar, kronik kalp yetmezliği, şap hastalığı, vitamin E ve selenyum yetersizliği gibi çeşitli hastalıklara ilişkin olarak oluşmaktadır. Çalışma materyali Aydın ili ve çevresinde Şap Hastalığı salgını esnasında, nekropsileri gerçekleştirilen kuzu ve oğlaklarda nonpurulent miyokarditis görüldü. Çalışmada materyalini oluşturan hayvanlarda Şap hastalığının karakteristik ağız, dudak ve tırnak arası lezyonları görüldü. Ayrıca tüm hayvanların da biyokimyasal parametreleri Şap hastalığı ile uyumluydu.

Miyokardiyal hasarın klinik bulgular ile tanısı koymak mümkün olmadığı için miyokardiyal hasar tanısı ancak miyokardiyal biyopsi örnekleri ya da nekropsisi sonrası yapılan makroskobik ve mikroskobik değerlendirmeler ile klinik olarak bazı serum biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi ile yapılır (Dewin ve ark. 2011). Bu biyokimyasal parametreler arasında cTn I, CK-MB, LDH, CRP, ALT ve AST'dan sıkça faydalanılır (Dewin ve ark. 2011). Veteriner Hekimlikte kuzu ve oğlaklarda miyokardiyal hasarın klinik açıdan biyokimyasal olarak belirlenmesinde bu belirteçler giderek artan yaygınlıkta kullanılmaktadır. Buna karşın bu parametrelerin miyokardiyal hasarın derecesiyle korelasyonun yapıldığı çalışmalar Veteriner Hekimlik alanında eksiktir. Çeşitli nedenlerle oluşan miyokardiyal hasarın ortaya konulmasında bu parametrelerin miyokardiyal hasar şiddetiyle olan korelasyonları ile yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır (Elliott M. Antman, M.D ve ark.1996).

Bu çalışma kapsamında kuzu ve oğlaklarda miyokarditise bağlı ortaya çıkan miyokardiyal hasarın klinik, biyokimyasal ve patolojik değerlendirmeler ile bu testler arasındaki korelasyon değerlendirmeleri gösterildi.

Miyokardiyal hasarın tespitinde kullanılan CK aktivitesinin ilk olarak insanlarda 1979 yılında, akut koroner sendromlu hastaların belirlenmesinde kullanılabileceği WHO tarafından rapor edilmiştir (Elliott M. Antman, M.D ve ark.1996). Daha sonraki yıllarda ise, CK, CK-MB, LDH ve AST İnsan Hekimliğinde kullanım alanına girmiştir (Elliott M. Antman, M.D ve ark.1996). Veteriner Hekimlikte de miyokardiyal hasarın klinik tespitinde CK aktivitesi kullanılmaktadır (R.Tunca ve ark. 2007). Hayvanlarda kardiyak

miyozitlerden CK salınımının miyokardiyal hasarın irreversibl döneminde meydana geldiği çeşitli deneyler ile gösterilmiştir (Elliott M. Antman, M.D ve ark.1996). Akut koroner sendromlu hastaların teşhisinde özellikle CK ve CK-MB rutin olarak kullanılan iki biyokimyasal belirleyicidir (Christenson RH ve ark. 1998).

CK ve CK' nin farklı bir izoenzimi olan CK-MB iskelet kası ve beyinde bulunmasına rağmen sadece miyokardiyumda yüksek oranda bulunan enzimlerdir (Devın W. Kehl ve ark 2011). Yapılan bir çalışmada çalışma grubu hayvanlardan belirli periyodlar halinde kan örnekleri alınarak yapılan incelemelerde CK ve CK-MB seviyelerinin miyokardiyal infarktüs meydana geldikten 2-6 saat sonra artmaya başladığı tespit edilmiştir. Bu seviye artışlarının ancak 12-24 saatleri arasında pik vermeye başladığı görülmüştür. Aynı çalışmada CK seviyesi 3-4 günde normal haline dönerken, CK-MB seviyesi 2-3 gün içerisinde normal haline döndüğü görülmüştür (Devın W. Kehl ve ark 2011). Özellikle CK-MB düzeylerindeki tipik artış ve azalmalar, 1980'li yıllardan 1995 yılına kadar kabul edilen bir teşhis markası olarak kalmıştır (Chen Y. Ve ark.). Ancak cTnI ların kanda CK ve CK-MB den daha hızlı tespit edilmesi nedeniyle günümüzde miyokardiyal hasar tanısında pek kullanılmamaktadır Bu çalışmada belirli periyodlarda kan alımı gerçekleşmediği için CK ve CK-MB seviyesindeki artış ve düşüşler ortaya konamamıştır. Yine de miyokardiyal hasar sonrasında ölüm öncesi alınan kan örneklerinde CK ve CK-MB seviyelerinde kontrol grubu ve Dewin ve ark. larının belirtmiş olduğu referans değerlerine göre belirgin bir artış görüldü. Üstelik miyokardiyal hasarın şiddetli olduğu olgularda aynı doğrultuda CK ve CK-MB seviyelerinde artış mevcuttu. Bu veriler miyokardiyal hasar şiddeti ile CK, CK-MB nin seviyeleri arasında belirgin bir korelasyon olduğunu ortaya koydu.

LDH da miyokardiyal infarktüs sırasında salınan bir enzimdir. LDH' ın salınan izoenzimlerinden sadece iki tanesi (LDH1 ve LDH2) miyokardiyal infarktüs tanısı için kullanılır (Devın W. Kehl ve ark 2011).

Yapılan bir çalışmada sağlıklı hayvanlarda kanda LDH 2in miktarı LDH 1 den daha fazla iken miyokardiyal infarktüs geçirmiş hayvanlarda bu oran bunun tam tersi olduğu gözlenmiştir (Gök H. 1996). Sonuç olarak miyokard infarktüsü durumunda LDH-1, LDH-2'den daha fazla yükseldiği ve bu durumun 7-10 gün içinde normale döndüğü belirtilmiştir (Adams J.E. ve ark.1993).

Miyokardiyal İnfarktüstten 8–10 saat sonra LDH aktivitesinde bir artma olduğu ve 3–5 gün sonra maksimum değere eriştiği bildirilmiştir. Ayrıca İnfarktüsü takiben 10. -15. günlerde LDH aktivitesi normale döndüğü, diğer kardiyomarkır aktivitelerinin aksine LDH seviyelerinin uzun bir süre yüksek kaldığı tespit edilmiştir (Adams J.E. ve ark.1993). LDH ın bu özelliğinin miyokardiyal hasarın üzerinden zaman geçtiği olgularda da miyakardiyal hasarın ortaya konmasına katkı sağladığı düşünülmektedir (Owen A 1995). Bu çalışmada ise belirli periyodlarda kan alımları olmadığı için zamana bağlı olarak LDH miktarındaki artış ve düşüşler ortaya konamamıştır. Ancak miyokardiyal hasar sonrasında ölüm öncesi alınan kan örneklerinde LDH seviyelerinde kontrol grubu ve Dewin ve ark. larının belirtmiş olduğu referans değerlerine göre belirgin bir artış görüldü. Bu veriler miyokardiyal hasar şiddeti ile LDH nin seviyeleri arasında belirgin bir korelasyon olduğunu ortaya koydu.

Ancak LDH seviyesindeki bu yüksekliğin böbrek ve hemolitik hastalıklarda da artış gösterdiği bilinmesi üzerine miyokardiyal hasarın tanısının klinik olarak ortaya konmasında güvenilir bir kardiyak markır olarak kullanılmaz (Y.Ölmez 2008).

İnsanlarda ALT enzimi seviyeleri ile yapılan çalışmada ALT nin miyokardiyal infarktus sonrası 6.-8. Saat arasında artış göstermeye başladığı ve 24 saat sonra en yüksek seviyelerine ulaştığı ve ancak 5. Günden sonra normal seviyesine geri döndüğü gösterilmiştir (LaDue ve Wroblewski, 1955). Veteriner Hekimlik alanında ise ALT seviyeleri ve miyokardiyal hasarın süresi arasındaki korelasyonun gösterildiği çalışmalar eksiktir.

AST ile ilgili insanlarda yapılan bir çalışmada miyokardiyal infarkutus geçirmiş hastalarıda serumdaki AST miktarı miyokardiyal infarktüsünün 8-12. Saatlerinde yükselmeye başladığı, 24-72 saatte pik yaptığı ve 2-5 gün yüksek olarak devam ettiği görülmüştür (Moss D.W ve ark. 1994). Veteriner Hekimlikte bu alanda yapılan çalışmalar azdır. Sığırlarda yapılan bir çalışmada miyokardiyal hasar olan sığırların ALT değerlerinin sağlıklı sığırlardan daha yüksek miktarda olduğu görülmüştür (R.Tunca ve ark 2007).

Ancak ALT karaciğer de daha fazla konsantre edildiği için, AST de konjestif kalp yetmezliğinde, karaciğer hastalığı durumunda, iskelet kası hasarında, miyokarditte, paroksizmal tasikardi ataklarında, dissekananevrizmada ve pankreatitte de yükselmesi nedeniyle miyokardiyal hasarın ortaya konmasında spesifik bir markır değildirler (Gök H 1996). Hem iskelet kası hasarında hem de miyokariyal hasarda bu enzimlerin seviyesinde artışlar şekillenmektedir. ALT ve AST enzimleri ve miyokardiyal hasarın şiddeti arasındaki korelasyona ilişkin verilerin doğruluğu konusunda, iskelet kası hasarının da bu enzim seviyelerinde artışa neden olması nedeniyle doğrudan bir miyokardiyal belirteç olarak kullanılmamaktadırlar. Buna karşın miyokardiyal hasarın ortaya konmasında yardımcı bir veri olarak değerlendirilmektedir (Moss D.W ve ark. 1994). Bu çalışmada şiddetli miyokardiyal hasar görülen bazı olgularda ALT ve AST seviyelerinde artış görülmesine karşın bu artış çok göze çarpar nitelikte değildi.

CRP' nin kalp hastalıklarıyla ilişkisi ilk kez 1982 yıllarında insanlarda yapılan birkaç çalışma ile ortaya çıkarılmıştır (De Beer FC ve ark. 1982). CRP ve kalp hastalıkları ile ilişkili ilk veriler, CRP düzeyi yüksek olan miyokardiyal infarktüs geçirmiş hastalarda prognozun daha kötü olduğunu gösteren çalışmalardan gelmiştir (De Beer FC ve ark. 1982). Daha sonraları CRP seviyelerinin belirlenmesinin yaygınlaşması ile, CRP seviyesindeki artışın ateroskleroz için yüksek risk faktörü olduğuna ilişkin çok sayıda çalışma yapılmıştır (Ridker PM ve ark. 1998). İnsanlarda yapılan bir çalışmada, CRP düzeyi üst 1/3'lük kısımda olan kişilerin koroner arter hastalığı gelişimi açısından CRP düzeyi alt 1/3'lük kısımda olan kişilere oranla, rölatif riskini 2.0 olarak belirlemişlerdir (Danesh ve arkadaşları 2000). CRP düzeyleri ile iki yıllık süre içinde ortaya çıkan AMI ve ani kardiyak ölüm arasında anlamlı bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Haverkate F ve ark. 1997). De Beer 1982 yılında AMI geçiren 33 hastada CRP yüksekliğinin infarkt alanı ile korelasyon gösterdiğini ve devam eden yüksek CRP düzeylerinin yeni koroner bozukluklarla birlikte olduğunu belirtmiştir (De Beer FC ve ark. 1982). Pietila 1987 yılında ilk kez AMI geçiren 23 hastada, AMI sonrası CRP yüksekliğinin infarkt alanı ile korelasyon gösterdiğini saptamıştır (Pietila K ve ark. 1987). Biasucci ise 1999 yılında kararsız anginalı ve troponin (-) hastada yaptıkları çalışmada 1 yılda C reaktif proteinin prognostik rolü olduğunu göstermiştir (Biasucci LM ve ark. 1999). FRISC (Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease) çalışmasında 900' den fazla akut koroner sendromlu hastada yapılan 5 ay-48 ay arası takiplerde C reaktif protein >10 mg/L olan

hastalarda anlamlı olarak artmış mortalite belirlenmiştir (Toss H ve ark 1997, Lindhal B ve ark. 2000). C reaktif proteinle ilgili Veteriner Hekimlikte yapılan çalışmalar çok azdır. Tavşanlarla yapılan bir çalışmada miyokardiyal iskemi saptanan tavşanlarda C reaktif protein miktarlarında artış görülmüştür (Terrance D. Barret ve ark. 2002).

Ancak CRP lerin kardiyak hastalıkların dışında infeksiyon hastalıkları (özellikle bakteriyel olanlar), malign hastalıklar, travma, infarktlar, inflamatuvar artritler ve vaskülitler gibi birçok hastalıkta yüksek olarak buldukları için miyokardiyal hasar tanısında pek tercih edilmez. Çalışmada tüm olgularda CRP seviyeleri kontrollere göre yüksek bulunurken 3 olgu dışında CRP oranlarında bu artış çok belirgin değildi. Muhtemelen bu durum miyokardiyal hasarın bu 3 olgu dışındaki hayvanlarda çok erken dönemde olduğunu düşündürdü.

Serum cTnI ise, miyokardiyal hasar sırasında en erken ortaya çıkan biyomarkırdır (Boccaro G ve ark. 2000). cTn I kalp kası için %100 spesifiktir (Bodor GS. ve ark. 1995). Bu durum miyokardiyal hasarın saptanmasında biyokimyasal ve immunohistokimyasal incelemelerde kullanmak için en uygun markır olarak kullanılmaya başlanmıştır (Christenson RH. ve ark. 1998). Ayrıca cTnler miyokardiyal hasarın reversible dönemde bile yükseldiği gösterilmiştir (Harnemann T ve ark. 2000). Kardiyak troponin düzeyleri yüksek hayvanlarda kardiyak komplikasyon riskinin, CK-MB düzeyleri normal olsa dahi, yüksek olduğu tespit edilmiştir (Ooi DS. ve ark. 2000). Böylece cTn I nın hasarlı hücrelerden erken ve sürekli salınımı ve ayrılması tanıdaki hassaslığını açıklar. Hasarlı miyokardiyal hücrelerdeki sızıntıdan dolayı serumda cTn I konsantrasyonları birçok miyokardiyal hasar türünde artış gösterir. Ayrıca miyokardda cTn ler CK-MB ye göre yaklaşık 13 kat daha fazla bulunmasına rağmen serum da bulunmadığı için en küçük artışları bile anlamlıdır (OBrien PJ ve ark.).

cTnI lar miyokardiyal hasardan kısa bir süre sonra kanda tespit edilebilir. Konsantrasyonları uzun süre yüksek değerlerde kalır. Çünkü troponinlerin %75 i miyofibril yapısına bağlıdır. % 6 sı da sitozol içerisinde çözünür. Sitozol içerisinde olanlar şiddetli hücre hasarları aniden diffüzyon ile kan içine salınmaya başlar. Tam tersi miyofibril yapısına bağlı olan kısımları da proteolitik parçalanmalardan sonra salınır.

Hasarlı hücrelerden bu gecikmiş salınım serumda troponin konsantrasyonlarının uzun süreli yüksek değerde olmasının bir kanıtıdır (Lim BK ve ark. 2005).

Kuzu ve oğlaklarda cTn I ölçümü miyokardiyal hasar tespiti için yararlı bir biyomarkır olarak kullanılır. İnsanlarda görülen akut perikarditiste kalpten dolaşım sistemine cTnI ların salınımı, yangısal miyokardiyal hücre hasarının habercisidir (Horwich TB ve ark. 2003). Akut miyokardiyal infarktüs geçiren insanlarda yapılan çalışmalarda cTnI konsantrasyonlarının ilk 11 saat içerisinde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu değerlerin 100 saat boyunca aynı oranlarda devam ettiği görülmüştür (Brandt RR. Ve ark 2001). İdiopatik ineklerde cTnI konsantrasyonu 0,89 ng/ml olarak raporlanmıştır. Aynı çalışmada 5 sağlıklı hayvandan alınan örneklerde serum konsantrasyonu değerleri 0 ila 0,004 arasında bulunmuştur (Jesty SA ve ark. 2005) . Başka bir çalışmada şaplı sığırlarda cTn I değerleri 11,7-16,4 ng/ml değerleri arasında bulunmuştur. Sağlıklı hayvanlarda bu değer 0,24 ng/ml'dir (R.Tunca ve ark. 2007). Sığırlarda yapılan başka bir çalışmada ise çalışma grubundaki miyokardiyal hasar görülen hayvanların cTn I değerleri 14,8-1,9 ng/ml arasında, kontrol grubundaki hayvanların cTn I değerleri ise 0.24-0.03 ng/ml değerleri arasında bulunmuştur (Gunes V. ve ark. 2005). Bu çalışmada ise, elde edilen Troponin değerleri, çalışma grubundaki hayvanlarda, 25-14,5 ng/ml arasında, kontrol grubu hayvanlarda 0.100 ng/ml den düşük olduğu tespit edildi.

Ayrıca histolojik ve biyokimyasal verilerin karşılaştırılmasıyla cTn I serum konsantrasyonları ve histolojik skor değerleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edildi. Çalışma grubundaki 18 hayvanın immunohistokimyasal değerlendirmesinde miyokardiyal hücre dejenerasyonu ve nekrozu görülen alanlarda cTnI ekspresyonunun azaldığı ya da tamamen ortadan kalktığı görüldü. Histolojik olarak miyokardiyal hasarın şiddeti ile immunohistokimyasal boyanma skoru arasında negatif korelasyonun bulunduğu ortaya konuldu.

Viral perikarditis teşhisi konan insanlarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Imazio M ve ark. 2003). Ayrıca köpeklerde yapılan bir çalışmada serumdaki cTn I düzeyindeki artışın iskemik miyokardiyumdan troponin kayıplarıyla paralel olarak meydana geldiği tespit edilmiştir (Ricchiuti V. Ve ark. 1998). Bu çalışmada ise dejenerasyon ve nekroz oluşmamış dokularda bile troponin immuno reaktivelerinin düşük olduğu, serum troponin seviyelerinin arttığı görülmüştür. Bu durum cTnI ların virus

enfeksiyonundan sonra yansılal yanıt oluşmadan erken aşamada miyokardiyal hasarın belirlenmesinde kullanılabilecek biryomarkırlar olduğunu gösterir. Ayrıca bu çalışmada Serum daki TnI miktarındaki artış veya dokudaki TnI ifadesinin azalması hemen hemen hastalığın şiddetiyle bağlantılı olduğu tespit edildi. Dejenerasyon ve nekrozun şiddeti arttıkça cTnI reaktivesinin buna bağlı olarak azaldığı görüldü.

Miyokardiyumdaki dejeneratif değişikliklerin ve yangı süresinin troponin değerlerini muhtemelen etkilediği düşünülmektedir. İnsanlarda kalp yetmezliğinde troponin değerlerinin yüksek çıkması hastalığın kötüye doğru gittiğini gösteren bir işaret olarak kabul edilir. Ayrıca miyokarditisin kesin tanısı endomiyokardiyal biyopsilerde lenfositik infiltrasyonlar veya miyositosisin görülmesiyle ayırt edilir. Akut miyokarditis hasarların sadece % 10 nunda klinik belirtiler gösterir (Tunca ve ark. 2008).

İnsan otopsisinde elde edilen kalp örneklerinde miyokardiyal nekrozu tanımlamak için cTnI'nın immunohistokimyasal olarak işaretlenmesinin yararlı olduğu öne sürülmüştür (Horwich TB ve ark. 2003). Buna benzer olarak da; köpeklerde miyokardiyal infarktüslerde dokularda histolojik olarak nekroz oluşmadan ilk 30 dakika içerisinde cTnI kayıpları olduğu görülmüştür (Ricchiuti V. Ve ark. 1998) . Bu sonuçlarda deney grubu hayvanlar ve insanlardaki parakut miyokardiyal nekrozun tanımlanmasında immunohistokimyasal boyamaların hematoksilin-eozin boyamadan daha hassas olduğunu gösterir. Bu çalışmada dejenere miyokardiyumda heterojen cTnI kayıpları görülmüştür. Dejeneratif bölgelerde cTnI için oluşan boyanmalar çok büyük bir çeşitlilik göstermiştir. Bu immun işaretlemelerin çeşitliliği miyokardiyumun bazı bölgelerinde diğer bölgelerden daha hızlı nekroz meydana gelmesiyle birlikte iskemik dokudaki akışın heterojen dağılımından kaynaklanmış olabilir. İmmun işaretlemedeki bu değişkenlik kardiyak nekrozların ilerleyişi arasındaki farkı ortaya çıkarır. Bazı nekrotik kardiyomiyositlerde cTnI immunoreaktivliğinde azalmalar olmasına neden olur. Üstelik histopatolojik değerlendirmede dejenerasyon ve nekrozun tespit edilemediği bazı alanlarda da cTnI immunoreaktivitesinde belirgin bir azalmanın görülmesi, erken miyokardiyal hasarın belirlenmesinde cTnI immunoreaktivitesinin belirlenmesinin histopatolojik değerlendirmeden daha anlamlı olduğu sonucuna işaret etmekteydi.

Bu çalışma kapsamında miyokarddaki histopatolojik doku hasarı ve serum cTnI seviyeleri ile immunohistokimyasal boyanma skorları arasında negatif bir korelasyonun,

serum cTnI seviyesi ve histopatolojik karyomiyosit hasarı arasında ise pozitif bir korelasyonun varlığı ortaya konuldu. Dokuda cTnI immunopozitivitedeki azalma veya negatif immunopozitivite hasarlı miyokardiyumda periferden ziyade merkezi kısımlarda daha belirgindi. Buna karşın köpeklerde yapılan bir çalışmada dokudaki cTnI kaybının merkezden ziyade periferde olduğu gösterilmiştir (Fishbein V. ve ark. 2003). Ancak bu çalışmada miyokardiyal hasar deneysel infarktüs modeliyle oluşturulmuş ve bu durumun infarktüs sonrası şekillendirilen reperfüzyonda dokunun perifer kısımlarının antegrad ve retrograd kan akımıyla daha çok kanlanması ve bu kan akımıyla birlikte cTnI proteinlerinin daha hızla yıkanarak dolaşıma karışmasıyla ortaya çıktığı öne sürülmüştür. İnfarktüsün periferinde görülen cTnI miktarının reperfüzyon ile birlikte geniş oranda azalması bu hasarın oluştuğuna dair bir kanıt olarak düşünülmektedir. Ancak diffuz miyokardiyal dejenerasyon ve nekroza neden olan viral miyokarditislerde cTnI kayıplarının lezyonların merkezinden ziyade periferinde daha belirgin olduğu ortaya konulmuş ve bu durumun miyokardiyal infarktüs modelinde şekillenen miyokardiyal hasar ile viral miyokarditislerde ortaya çıkan hasarın oluşumunda farklı patogenetik mekanizmaların rol oynadığı ve farklılığın buna bağlı olarak şekillendiği öne sürülmüştür. Viral miyokarditislerin değerlendirildiği bu çalışmalarda lezyonların periferindeki pozitif işaretlemeler sadece sınırlı derecede hasar görmüş miyositlerde tespit edilmiştir (Lim BK. Ve ark. 2005, Tunca ve ark. 2008). Nonpurulent miyokarditisli kuzu ve oğlak kalplerinin değerlendirildiği bu çalışmada da lezyonların merkezi kısımlarında cTnI kayıplarının daha belirgin olması viral miyokarditislerde cTnI kayıplarını tanımlayan çalışmalarla paralellik göstermekteydi.

Sonuç olarak miyokarditis tespit edilen şaplı hayvanlardaki TnI konsantrasyonlarının yanı sıra yüksek CK, CK-MB, LDH, AST, ALT, CRP değerleri miyokardiyal hasarla korelasyon göstermiş ve histokimyasal ve immunohistokimyasal bulgular da bunu desteklemiştir.

6. SONUÇ

Aydın ili ve çevresinde 2011 yılında ortaya çıkan Şap hastalığı salgını sırasında ölen çalışma grubu hayvanların bulundukları sürülerdeki yetişkin hayvanların klinik ve patolojik muayenelerinde hastalığın klasik klinik ve patolojik bulguları bulunmasına rağmen çalışma grubu hayvanların çoğunda ani ölüm anamnezine sahip olduğu görülmüştür. Böylece miyokardiyal hasarın klinik ve makroskobik olarak tanısının zor olduğu görülmüştür. Daha kesin tanı koymak için hayvanlardan örnekler alınıp histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelenmeler yapılmıştır.

Bu çalışmada yapılan biyokimyasal, histolojik ve immunohistokimyasal incelemeler sonucunda serumdaki yüksek cTnI seviyelerinin kuzu ve oğlaklarda oluşan miyokardiyal hasar için bir sonuç sağladığı görülmüştür. Ayrıca CK, CK-MB, AST, ALT, LDH ve CRP değerlerinin de cTnI ile birlikte doğru bir korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Serumdaki cTnI konsantrasyonu artışının dokulardaki cTnI ifadesinin azalması ya da yok olmasıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir.

Miyokardiyal hasar olan hayvanlarda, serum cTnI ölçümleri kardiyak miyosit hasarı için oldukça hassas ve spesifiktir. Ve şap hastalığından kaynaklanan miyokarditisin tanısında ilk adım olarak kullanılabilir. Ayrıca cTnI immunohistokimyasal analiz sonuçlarına göre cTnI ların miyokardiyal dejenerasyon ve nekrozda oldukça hassas bir markır olarak kullanılabilecekleri tespit edilmiştir.

7. ÖZET

Kuzu ve Oğlaklardaki Miyokardiyal Hasarın Belirlenmesinde Kardiyak Troponinlerin Etkinliğinin Araştırılması

Çalışma materyalini Aydın ili ve çevresinde 2011 yılında ortaya çıkan Şap hastalığı salgını sırasında ölen 18 adet çalışma grubu hayvanı ve 10 adet kontrol grubu hayvanı oluşturdu. Bu çalışma kapsamında kuzu ve oğlaklarda miyokarditise bağlı ortaya çıkan miyokardiyal hasarın klinik, biyokimyasal ve patolojik değerlendirmeler ile bu testler arasındaki korelasyon değerlendirmeleri gösterildi.

Nekropside, Şap Hastalığı'nın karakteristik lezyonları olguların 3 tanesinde oluşurken, olguların 15 tanesinde nonkarakteristik olgular görüldü.

Histopatolojik incelemelerde, çalışma grubu hayvanların 3 tanesinde ağız ve mukozası, diş etleri ile tırnak arasında epidermiste epitelyum hücrelerinde vakuoler ve hidropik dejenerasyonu, hücreler arası ödem, vezikül oluşumları dikkati çekti. Kalpte dejenerasyon ve nekrozun görüldüğü alanlarda bazı hücrelerin tamamen çekirdeklerini kaybettiği ya da piknoz ve karyoreksise uğramış çekirdeklere sahip olduğu görüldü. Kas demetleri ve kas telleri arasındaki intersitisyumda çoğunluğu lenfosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücre infiltrasyonları görüldü. Şiddetli lezyonlarda ise kas telleri şişkin ve bantlaşma özelliklerini kaybetmişti. Myositlerin periferinde uydu hücreleri yer almaktaydı.

İmmunohistokimyasal incelemelerde miyokardiyal hücre dejenerasyonu ve nekrozu görülen alanlarda cTnI ekspresyonunun azaldığı ya da tamamen ortadan kalktığı görüldü. Miyokardiyal hasarın şiddeti ile immunohistokimyasal boyanma skoru arasında negatif korelasyonun bulunduğu ortaya konuldu. Ayrıca histolojik ve biyokimyasal verilerin karşılaştırılmasıyla cTn I serum konsantrasyonları ve histolojik skor değerleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edildi.

Biyokimyasal, histolojik ve immunohistokimyasal incelemeler sonucunda serumdaki yüksek cTnI seviyelerinin kuzu ve oğlaklarda oluşan miyokardiyal hasar için bir sonuç sağladığı görülmüştür. Ayrıca CK, CK-MB, AST, ALT, LDH ve CRP değerlerinin de cTnI ile birlikte doğru bir korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak Miyokardiyal hasar olan hayvanlarda, serum cTnI ölçümleri kardiyak miyosit hasarı için oldukça hassas ve spesifik bir markır olarak kullanılabilecekleri tespit edilmiştir. Ve şap hastalığından kaynaklanan miyokarditisin tanısında ilk adım olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Histopatoloji, immunohistokimya, oğlak, kuzu, miyokardiyal hasar, kardiyak troponin, biyomarkır, laktat dehidrogenaz, kreatinin kinaz, alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz

8. SUMMARY

Determination of Cardiac troponins in lambs and kids with miyokardiyal damage

In this study, 18 diseased animal groups which died during the outbreak foot and mouth diseases in Aydın and around Aydın province were examined in 2011, and 10 control animal groups were used. Biochemical and pathological evaluations of myocardial damage which established with myocarditis and the correlations among this evaluations were presented in this study.

At the necropsy, Characteristic findings of FMD were detected in 3 of the animals and noncharacteristic finding were observed in 15 of them.

At the histological evaluations, epithelial cells of three animals which exist in epidermis of the buccal mucosa, gingiva and nail cross, had vacuolar and hydropic cell degenerations, edema which exists in the interstitium and vesicles. In the heart, some cells which were exposed to degeneration and necrosis, lost their nucleus or their nucleus had been exposed to pyknosis or karyorrhexis. Inflammatory cell infiltration which involve lymphocytes, macrophages, plasma cells were seen among the muscle fibers. In the severe lesions muscle fibers were swollen and the cross striations disappeared. Satellite cells were seen in the periphery of myocytes.

At the histological evaluations, the significant reduction or total loss of cTnI expression were seen in the areas which had been exposed to degeneration and necrosis. Negative correlation which existed between the severe myocardial damage and immunolabeling score was shown. In addition, positive correlation which existed between the serum concentrations of cTnI and histological score was also shown.

As a result of biochemical, histological and immunohistochemical evaluations, the high serum concentrations of cTnI is significant data for myocardial damage in the lambs and kids. Elevated CK, CK-MB, LDH, AST, ALT, CRP activities supported this data as well.

Finally, serum cTnI concentrations can be used as sensitive and specific markers for myocardial lesions within animals having myocardial damage. cTnI may be an important first step to diagnose FMD- induced myocarditis

Key Words: Histopathologia, immunohistochemical, kids, lambs, myocardial damage, cardiac troponin, biomarker, laktat dehidrogenase, creatinin kinase, alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase

9. KAYNAKLAR

1. **Adams J.E., Abendschein D.R., Jaffe A.S.:** Biochemical markers of myocardial injury: is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation* 1993; 88:750-763.
2. **Adams JE III, Schechtman KB, Landt Y, Ladenson JH, Jaffe AS.** (1994):Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I. *Clin Chem* 40:1291–1295
3. **Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP** (2000) Myocardial Infarction Redefined a Consensus of the Joint European Society of Cardiology /American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 36:959-969.
4. **Altınışık M.,** Akut Miyokard İnfarktüsünün Diagnostik Laboratuvar Belirleyicileri I, 2006
5. **American Heart Association:** 2002 Heart and Stroke Statistical Update.Dallas, Tex: American Heart Association; 2001
6. **Amos L,** (1985) Structure of Muscle Filaments Studied by Electron Microscopy. *Ann Rev Biophys Chem* 14: 291-313.
7. **Apple FS** (1999),Tissue specificity of cardiac Troponin, cardiac Troponin T and creatine kinase-MB, *Clin Chim Acta*, 284:151-159.
8. **Apple FS, Falahati A, Paulson PR, Miller E, Sharkey SW.** (1997) Improved detection of minor ischemic myocardial injury with measurement of serum cardiac troponin I. *Clin Chem* 43:2047–2051.
9. **Apple** (2002) Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase – MB , *Clin Chim Acta*, 284: 151-159.
10. **Aydınçer C.,** Göğüs Ağrısı Şikayetiyle Acil Servise Başvuran Hastaların CK-MB ve Troponin-T Enzim Seviyelerinin Karşılaştırılması, İstanbul 2006.

- 11. Bahadır A, Yıldız H (2008)** Veteriner Anatomi Hareket Sistemi ve İç Organlar, İkinci Baskı, Ezgi Kitapevi 118-119.
- 12. Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Buffon A, et al;** Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation*. 1999 Feb 23;99(7):855-60.
- 13. Boccara G, Pouzeratte Y, Troncin R, et al.:** 2000, The risk of cardiac injury during laparoscopic fundoplication, cardiac troponin I and ECG study. *Acta Anaesthesiol Scand* 44:398–402.
- 14. Bodor GS, Porter S, Landt Y, Ladenson JH:** 1992, Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. *Clin Chem* 38:2203–2214.
- 15. Brandt RR, Filzmaier K, Hanrath P:** 2001, Circulating cardiac troponin I in acute pericarditis. *Am J Cardiol* 87:1326–1328.
- 16. Campbell, A. D., van Eyk, J. E., Hodges, R. S., and Sykes, B. D. (1992)** *Biochim. Biophys. Acta*, 1160, 25-54.
- 17. Cardinet GH (1997):** Cardinet, Skeletal muscle function. In: J.K. Kaneko, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*(fifth ed.) Academic Press, San Diego, p 413.
- 18. Chen Y, Serfass RC, Mackey-Bojack SM, Kelly KL, Titus JL, Apple FS. (2000)** Cardiac troponin T alterations in myocardium and serum of rats after stressful, prolonged intense exercise.
- 19. Christenson RH, Apple FS, Morgan DL, Alonsozana GL, Mascotti K, Olson M, McCormack RT, Wians FH Jr, Keffer JH, Duh SH. (1998):** Cardiac troponin I measurement with the Access immunoassay system: analytical and clinical performance characteristics. *Clin Chem* 44: 52-60.2

- 20. Cormark DH** (1987) Ham's Histology 9. Edt., by J.B. Lippincott Comopany.
- 21. Danesh J, Whincup P, Walker M, et al.** Low grade inflammation and coronary heart disease: Prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 2000; 321: 199-204. (39)
- 22. Dean KJ** (1987) Biochemistry and Molecular Biology of Troponin I and T. Cardiac Markers. A.H.B. Wu, Humana, Totowa, NJ ,pp. 193-204.
- 23. De Beer FC, Hind CR, Fox KM, et al.** Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J* 1982; 47: 239-43. (30)
- 24. Devin W Kehl, Navaid Lqbal, Arrash Fard, Ben A.Kibber, Alejandro De La Parra Landa, Alan S Maisel** (2011) Biomarkers in acute myocardial injury.
- 25. Dhoot, G. K., Gell, P. G. H., and Perry, S. V.** (1978) *Exp. Cell. Res.*, 117, 357-370.
- 26. Dong, W. J., Cheung, H. C., Solaro, R. J., She, M., Xinng, J., and Chandra, M.** (1997) *Biochemistry*, 36,6754-6761.
- 27. Dolci A,Panteghini M,** (2006) The exciting story of cardiac biomarkers From retrospective detection to gold diagnostic Standard for acute mocardial infarction and more; *Clin Chim Acta* 369 179-187.
- 28. Dursun N** (1996) *Veteriner Anatomi II ANKARA: Medisan Yayınevi* 186-200.
- 29. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG** (2002 B) *Textbook of Veterinary Anatomy*, 3th Edition Saunder, Philadelphia, Pennsylvania, 219-224, 661-662.
- 30. Ebell MH, Flewelling D,Flynn CA,** (2000) A systematic review of Troponin T and I for diagnosing acute miyocardial infarction. *J Fam Practice* 49: 550-556.

- 31. Elliott M. Antman, M.D., Milenko J. Tanasijevic, M.D., Bruce Thompson, Ph.D., Mark Schactman, M.S., Carolyn H. McCabe, B.S., Christopher P. Cannon, M.D., George A. Fischer, Ph.D., Anthony Y. Fung, M.B., B.S., Christopher Thompson, M.D., Donald Wybenga, M.D., and Eugene Braunwald, M.D.N Engl J Med (1996) Cardiac-Specific Troponin I Levels to Predict the Risk of Mortality in Patients with Acute Coronary Syndromes**
- 32. Recai TUNCA, H. Metin ERDOĞAN, Mahmut SOZMEN, Mehmet CİTİL, Alparslan Kadir DEVRİM, Serpil ERGİNSOY, Erdoğan UZLU (2007) Evaluation of Cardiac Troponin I and Inducible Nitric Oxide Synthase Expressions in Lambs with White Muscle Disease**
- 33. Farah, C. S., Miyamoto, C. A., Ramos, C. H. I., da Silva, A. C. R., Quaggio, R. B., Fujimori, K., Smillie, L. B., and Reinach, F. C. (1994) J. Biol. Chem., 269, 5230-5240.**
- 34. Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, Hong L, Apple FS. (2003) Miyocardial tissue troponins T and I. An immunohistochemical study in experimental models of miyocardial ischemia. Cardiovasc Pathol 12:65-71.**
- 35. Fleming SM, O'byrne L, Finn J, Grimes H, Daly KM: False positive cardiac troponin I in a routine clinical population. Am J Cardiol 2000;89:1212-15**
- 36. Gök H. Klinik Kardioloji.1. baskı Nobel Kitabevi LTD ST_ ;1996:ss 97-171.**
- 37. Gupta MP, (2007) Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure, jmOL Cell Cardiol 43 388-403.**
- 38. Güneş V, Erdoğan HM, Çitil M, Özcan K. (2005) Assay of Cardiac Troponins in the Diagnosis of Miyocardial Dejenérations due to Foot and Mouth Disease in a Calf, Vet Rec 156: 714-715.**
- 39. Güneş V, Erdoğan HM, Çitil M, Özcan K. (2008) Use of Cardiac Troponins Kit for the Qualitative Determination of Miyocardial Cell Damage due to Traumatic Reticuloperitonitis in Cattle, Vet Rec 162: 514-517.**

- 40. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore RJ, Pepys MB.** Production of C-reactive protein and the risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet*. 1997; 349: 462–466.
- 41. Hazıroğlu R., Milli Ü.H.** (2001) *Veteriner Patoloji* 2. Cilt, Kardiyovasküler Sistem 371-408.
- 42. Horwich TB, Patel J, MacLellan WR, Fonarow GC:** 2003, Cardiac troponin I is associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure. *Circulation* 108:833–838.
- 43. Iliou MC, Fumeron C, Benoit MO, et al:** Factors associated with increased serum levels of cardiac troponin T and I in chronic hemodialysis patients:chronic hemodialysis and new cardiac markers evaluation (CHANCE) study. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1452-8
- 44. Imazio M, Demichelis B, Cecchi E, et al.:** 2003, Cardiac troponin I in acute pericarditis. *J Am Coll Cardiol* 42:2144–2148.
- 45. Jaffe AS, Landt Y, Parvin CA, Abendschein DR, Geltman EM, Ladenson JH.** (1996): Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clin Chem* 42:1770–1776.
- 46. Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, Katus H.** (2000) Its time for a change to a troponin standard. *Circulation* 102:1216 –20.
- 47. Jaquet, K., Lohmann, K., Czisch, M., Holak, T., Gulati, J., and Jaquet, R.** (1998) *J. Muscle Res. Cell Motil.*,19, 647-659.
- 48. Jesty SA, Sweeney RA, Dolente BA, Reef BA:** 2005, Idiopathic pericarditis and cardiac tamponade in two cows. *J Am Vet Med Assoc* 226:1555–1558.

- 49. Jideama, N. M., Noland, T. A., Jr., Raynor, R. L., Blobe, G. C., Fabbro, D., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Hannun, Y. A., and Kuo, J. F. (1996) J. Biol. Chem., 271, 23277-23283.**
- 50. Kaneko JK (1997): Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Fifth Edt., Academic Press, San Diego, pp 413.**
- 51. Karaçalıoğlu A.Ö., Selim Kılıç, Turgay Çelik, Zekeriya Arslan, Halil Yaman, Seyfettin Ilgan, Mehmet Ali Özgüven: ‘Geri Dönüşümlü İskeminin Miyokard Hasarı ile İlgili Biyokimyasal Belirteçlerin Serum Düzeyleri Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması’, Gülhane Tıp Dergisi 2006; 48: 87-93.**
- 52. Kitching RP, Hughes GJ. (2002) Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats. Rev Sci Tech;21:505-12**
- 53. LaDue JS, Wroblewski F. (1955)The significance of the serum glutamic oxalacetic transaminase activity following acute myocardial infarction**
- 54. Leavis, P. C., and Gergely, J. (1984) CRC Crit. Rev. Biochem., 16, 235-305.**
- 55. Lemos JA, Morrow DA, Gibson CM, Murphy SA, Sabatine MS, Rifai N, McCabe CH, Antman EM, Cannon CP, Braunwald E, (2002) The Prognostic Value Of Serum Myoglobin in Patients With Non – ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes, J Am Coll Cardiol Vol. 40, No. 2,238-244**
- 56. Lieber RL(1999) Skeletal Muscle is a Biological Example of a Linear Electro-Active Actuator, Proceedings of SPIE’s 6th Annual International Symposium on Smart Structures and Materials, 1-5 March, 1999, San Diego, CA. P. 3669-03.**
- 57. Lim BK, Shin JO, Choe SC, et al.: (2005), Myocardial injury occurs earlier than myocardial inflammation in acute experimental viral myocarditis. Exp Mol Med 37:51–57.**

- 58. Lindhal B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L.** (2000) Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*; 343: 1139– 1147.
- 59. MacGeoch, G., Barton, P. J., Vallins, P. J., Bhavzar, P., and Spurr, N. K.** (1991) *Hum. Genet.*, 88, 101-104.
- 60. Mair J** (1999) Tissue release of cardiac markers; from physiology to clinical applications. *Clin Chem Lab Med* 37:1077-1084.
- 61. Malhotra, A., Buttrick, P., Bowman, J., and Nakouzi, A.** (1997) *Mol. Cell. Biochem.*, 170, 99-107.
- 49. Melikoğlu L.** (2008) ‘Akut Miyokard İnfarktüsü ve Unstabil Angina Pectoris Tanıları Olan Hastalarda Ürik Asit ve Lipit Seviyelerinin Tespiti’, İstanbul.
- 62. Meyer T, Blinder L, Hruska N, Luthe H:** (2000) Cardiac troponin I elevation in acute pulmonary embolism is associated with right ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*;36:1632-6
- 63. Moss D.W., Henderson A.R.:** (1994) *Enzymes*. “Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Second Ed., Eds.:C.A. Burtis and E.R. Ashwood. W.B. Saunders Company, Philadelphia.p.735-896.
- 64. Ngai, S. M., Sonnichsen, H. M., and Hodges, R. S.** (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 2165-2172.
- 65. O’Brien PJ, Landt Y, Landenson JH,** (1997) Differential Reactivity of Cardiac and Skeletal Muscle from Various Species in Cardiac Troponin I Immunoassay. *Clin Chem* 43:2333-2338.
- 66. Ooi DS, Isotalo PA, Veinot JP.** (2000), Correlation of antemortem serum creatine kinase-MB, troponin-I and troponin-T with cardiac pathology. *Clin Chem* 46: 338– 344.

- 67. Osmanbaşoğlu E.,** (2008) Akut Korener Sendromu Olan Hastalarda Birinci ve Altıncı Saatteki PAPP-A Değerlerinin Bir Aylık Sonlanım Noktası İle Olan İlişkisi, İstanbul .
- 68. Owen A.:** (1995) Tracking the rise and fall of cardiac enzymes. Nursing May; 25(5):34-38.
- 69. Ölmez Y.,** (2008) ‘Akut Miyokard İnfarktüsünde High Sensitif CRP Düzeyleri’, İstanbul.
- 70. Pearlstone, J. R., Sykes, B. D., and Smillie, L. B.** (1997) Biochemistry, 36, 7601-7606.
- 71. Perry, S. V.** (1999) Mol. Cell. Biochem., 190, 9-32.
- 72. Pichler R, Berg J, Maschek W, Schimetta W, Steinwender C, Hofmann R, Leisch F** (2004) proinflammatory parameters as CRP and IL-6 do not discriminate between post_PCI cardiac patients with and without exercise-induced ischemia as indicated by TI-201 myocardial scintigraphy. Cardiovasc Pathol 13 299-305.
- 73. Pietila KO, Harmoinen AP, Jokiniitty J, Pasternack AI.** (1996) Serum C-reactive protein concentration in acute myocardial infarction and its relationship to mortality during 24 months of follow-up in patients under thrombolytic treatment. Eur Heart J. ; 17: 1345–1349.
- 74. Rarick, H. M., Tu, X.-H., Solaro, R. J., and Martin, A. F.** (1997) J. Biol. Chem., 272, 26887-26892.
- 75. Ricchiuti V, Sharkey SW, Murakami MM, et al.:** (1998) , Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction. Am J Clin Pathol 110:241–247.

- 76. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E.** (1998) Inflammation, pravastatin and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation.* 98: 839–844.
- 77. Sağlam M, Aştı RN, Özer A** (2001) Genel Histoloji 6. Baskı, Yorum Matbaacılık, ANKARA.
- 78. Sasse, S., Brand, N. J., Kyprianou, P., Dhoot, G. K., Wade, R., Arai, M., Periasamy, M., Yacoub, M., and Barton, P. J.** (1993) *Circ. Res.*, 72, 932-938.
- 79. Schiaffino, G., Gorza, L., and Ausoni, S.** (1993) *Trends Cardiovasc. Med.*, 3, 12-17.
- 80. Stefanicsik, R., Jha, P. K., and Sarkar, S.** (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 957-962.
- 81. Sulakhe, P. V., and Vo, X. T.** (1995) *Mol. Cell. Biochem.*, 149/150, 103-126.
- 82. Sungen B. Ve V. Güneş** (2008) Beyaz Kas Hastalıklı Kuzularda Kalp Kası Hasarının Teşhisinde cTn Kit Analizleri ve Serum Enzim Aktivitelerinin Önemi, *Journal of Health Sciences* 17(3) 144-149.
- 83. Syska, H., Wilkinson, J. M., Grand, R. J., and Perry, S. V.** (1976) *Biochem. J.*, 153, 375-387.
- 84. Şişman A. R., T. Küme, P. Akan, P. Tuncel,** (2007) C-Reactive Protein: Clinical Significance, Improvements in Methodology, Pre-Analytical and Analytical Variations, *Türk Klinik Biyokimya Dergi*; 5(1): 33-41.
- 85. Talbot, J. A., and Hodges, R. S.** (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 12374-12378.

- 86. Terrance D. Barret, James K. Hennan, Rory M. Marks, and Benedict R. Lucchesi**(2002) C-Reactive-Protein-Associated Increase in Myocardial Infarct Size After Ischemia/Reperfusion *University of Michigan Medical School, Departments of Pharmacology (T.D.B., J.K.H., B.R.L.) and Internal Medicine (R.M.M.), Ann Arbor, Michiga*
- 87. Topal K., S. Sandıkçı, H. Demirhindi, E. Akpınar, Esra Saatçı,** (2006) Akut Miyokard İnfarktüsünde Yükselmiş Serum CRP Düzeyi ve Diabetes Mellitus ile İlişkisi, *Marmara Medical Journal*;19(2);58-64.
- 88. Topol EJ:** Acute Coronary Syndromes, Second Edition, Chap 13: 329-65
- 89. Tripet, B., van Eyk, J. E., and Hodges, R. S.** (1997) *J. Mol. Biol.*, 271, 728-750.
- 90. Tunca R., Toplu N,** (2007) Doğal Enfekte Köpek Parvovirus Enfeksiyonunda Patolojik Bulgular ve Viral Antijenin Floresan Antikor Tekniği ile Demonstrasyonu *Ankara Üniv. Vet Fak. Derg.* 54 55-59.
- 91. Tunca R., M. Sözmen, H. Erdoğan, M. Çitil, E. Uzlu, H. Özen, E. Gökçe,** (2008) Determination of Cardiac Troponin I in the Blood and Heart of Calves with Foot-and-Mouth Disease, *J Vet Diagn Invest* 20:598–605
- 92. Tunca R., M. Sözmen, H. Erdoğan, M. Çitil, AK Devrim, S Erginsoy, E Uzlu** (2009 A) Evaluation of Cardiac Troponin I and Inducible Nitric Oxide Synthase Expressions in Lambs with White Muscle Disease, *Turk. J Vet Anim Sci* 33: 53-59.
- 93. Tunca R., M. Sözmen, M.Çitil, M. Karapehlivan, S. Erginsoy, K. Yapar,**(2009 B) Pyridine induction of cytochrome P450 1A1, iNOS and metallothionein in Syrian hamsters and protective effects of silymarin, 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved. doi:10.1016/j.etp.
- 94. Van Eyk, J. E., and Hodges, R. S.** (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 1726-1732.

- 95. Wallace KB, Hausner E, Herman E, Holt GD, Macgregor JT, Metz AL, Murphy E, Rosenblum IY, Sistare FD, York MJ, (2004) Serum Troponins as Biomarkers of Drug- Induced Cardiac Toxicity, Toxical Pathol, 32:106-121.**
- 96. Wu AHB, Feng YJ, Moore R, Apple FS, McPherson PH, Buechler KF, Bodor G, (1998): Characterization of Cardiac Troponin Subunit Release Into Serum After Acute Miyocardial Infarction and Comparison of Assays for Troponin T and I. Clin Chem 44: 1198-1208.**
- 97. Wolfe RA, Porte FK, Webb RL, et al: (1998) Annual data report of the United States renal data system VI. Causes of death. Am J Kidney Dis:32 Suppl:S81-8**
- 98. Wu AH, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R Jr: (1998) National Academy of Clinical Biochemistry Standarts for the use of cardiac markers in coronary artery disease Clin Chem; 45:1104-21,**
- 99. Yılmaz Y. ve Z. Öngen, (2009)The importance of non-lipid risk factors: a review focusing on C-reactive protein, Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol;37 Suppl 4:7-13**

10.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim ve öğrenimim süresince ilgi ve uyarıları ile beni yönlendiren, tezimin oluşturulmasında ve tezimin her aşamasında bilgi birikimini, tecrübelerini, görüş ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Recai TUNCA'ya; değerli görüş ve tecrübeleriyle ışık tutan başta Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nihat TOPLU 'ya ve Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Serap BiRiNCiOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Hamdi AVCI'ya; yardım ve destekleri ile her zaman yanımda olan çalışma arkadaşlarım Araştırma Görevlisi Erkmen Tuğrul EPIKMEN ve Araştırma Görevlisi Emrah İPEK'e; tezimin yürütülmesi için gerekli mali desteği sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na; her koşulda yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim Annem ve Babam'a teşekkür ediyorum.

11.ÖZGEÇMİŞ

08.05.1989'da Aydın'da doğdum. İlkokul ve Ortaokul öğrenimimi Aydın'da Adnan Menderes İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi Cumhuriyet Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde tamamladım. 2006 yılında girdiğim Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ağırlıklı Biyoloji Bölümü'nü 2010 yılında bitirdim. 2011 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğretimime başladım. 2013 yılında Şifa Üniversitesi Patoloji A.D. 'da Biyolog olarak göreve başladım.