

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



**UZAKTAN İSKEMİK PERKOŞULLANMANIN**  
**KALPTE İSKEMİ-REPERYÜZYONA BAĞLI**  
**NEKROZ ÜZERİNDEKİ KORUYUCULUĞUNDA**  
**MELATONİNİN FİZYOLOJİK VE**  
**FARMAKOLOJİK ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**Kübra GÜL KAHRAMAN**

**2018**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

Fırat Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

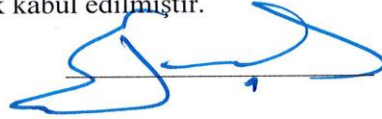


Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Engin ŞAHNA



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Hülya ÖZDEMİR



Prof. Dr. Engin ŞAHNA



Doç. Dr. Hasan AKKOÇ





### ETİK BEYAN

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

Kübra GÜL KAHRAMAN

04.01.2018

İmza

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "K. Gül", written over the word "İmza".

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı  
ELAZİĞ

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini ve bilgisini esirgemeyen tez danışmanım ve ana bilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Engin ŞAHNA'ya, biyokimyasal analizlerimizi yapan Tıbbi Biyoloji A.D Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Ebru ÖNALAN, bu süreçte aramıza katılan desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Elif ONAT'a, aynı anlarda benzer yollardan geçtiğim bölüm arkadaşlarıma, eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen eczane personellerim Sefa ve Harun'a, tez sürecim de dahil nefes aldığım her anımda en büyük destekçim, eşim Süleyman Murat KAHRAMAN'a ve bu süreçte en büyük şansım olarak hayatıma giren canım oğlum Eymen Çınar KAHRAMAN'a, hangi birini sayacağımı bilemediğim canım aileme ve bir sürü yeğenime, olmasaydınız olmazdım dediğim canım anneme ve rahmetli babama en içten teşekkürlerimle...

Ayrıca bu bilgilerin elde edilmesine olanak tanıyan TÜBİTAK (115S323) ve FÜBAP'a (TF17.02) teşekkür ederim.

Ecz. Kübra GÜL KAHRAMAN

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                   |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>BAŞLIK SAYFASI</b>                                                             | <b>i</b>    |
| <b>ONAY SAYFASI</b>                                                               | <b>iii</b>  |
| <b>TEŞEKKÜR</b>                                                                   | <b>iii</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                                                | <b>v</b>    |
| <b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>                                                           | <b>viii</b> |
| <b>TABLolar LİSTESİ</b>                                                           | <b>ix</b>   |
| <b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>                                                        | <b>x</b>    |
| <b>1. ÖZET</b>                                                                    | <b>1</b>    |
| <b>2. ABSTRACT</b>                                                                | <b>3</b>    |
| <b>3. GİRİŞ</b>                                                                   | <b>5</b>    |
| 3.1. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarı                                       | 5           |
| 3.2. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarının Mekanizması                        | 6           |
| 3.2.1. Mitokondriyal Disfonksiyon ve Kritik Bir Mediyatör Olan mPTP'nin Açılması  | 8           |
| 3.2.2. Aşırı ROS Üretimi                                                          | 10          |
| 3.2.3. NO Biyoyararlanımının Azalması                                             | 11          |
| 3.2.4. İnflamasyon                                                                | 12          |
| 3.3. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarları                                    | 13          |
| 3.3.1. Reperfüzyon Aritmileri                                                     | 13          |
| 3.3.2. Nekroz                                                                     | 13          |
| 3.3.3. Miyokardiyal Dona Kalma                                                    | 13          |
| 3.3.4. Mikrovasküler Obstrüksiyon                                                 | 13          |
| 3.4. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Terapötik Yaklaşımlar | 14          |
| 3.4.1. Hücre Ölümünün Yeni Formları                                               | 14          |
| 3.4.2. İskemik Ön Koşullanma (IPC)                                                | 15          |
| 3.4.2.1. Olası Mekanizması                                                        | 16          |
| 3.4.2.2. Klinikte Kullanımı                                                       | 16          |
| 3.4.3. İskemik Ard Koşullanma (IPostC)                                            | 17          |
| 3.4.3.1. Olası Mekanizması:                                                       | 17          |
| 3.4.3.2. Klinikte Kullanımı                                                       | 18          |

|                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.4. Farmakolojik Koşullanma                                           | 19        |
| 3.4.4.1. Klinik Kullanımı                                                | 19        |
| 3.4.5. Uzaktan İskemik Koşullanma (RIC)                                  | 20        |
| 3.4.5.1. Olası Mekanizmaları                                             | 21        |
| 3.4.5.2. Klinik Kullanımı                                                | 27        |
| 3.5. Risk Faktörlerinin Kardiyoprotektif Stratejiler Üzerindeki Etkileri | 29        |
| 3.6. Pineal Bez                                                          | 30        |
| 3.6.1. Melatonin                                                         | 31        |
| 3.6.1.1. Sentezi ve Salınımı                                             | 32        |
| 3.6.1.2. Sekresyonunun Düzenlenmesi                                      | 34        |
| 3.6.1.3. Metabolizması                                                   | 35        |
| 3.6.1.4. Etki Mekanizması                                                | 35        |
| 3.6.1.5. Fizyolojik Fonksiyonlar Üzerine Etkileri:                       | 36        |
| 3.6.1.6. Yaşlanmanın Etkisi                                              | 36        |
| 3.7. Melatonin ve İskemi-Reperfüzyon Hasarı                              | 38        |
| 3.7.1. Melatonin ve Oksidatif Stres                                      | 38        |
| 3.7.2. Melatonin ve İnflamasyon                                          | 39        |
| 3.7.3. Sirkadiyen Ritim                                                  | 40        |
| 3.8. Çalışmanın Amacı                                                    | 41        |
| <b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                                | <b>43</b> |
| 4.1. Deney Hayvanları ve Gruplar                                         | 43        |
| 4.2. Cerrahi uygulamalar                                                 | 44        |
| 4.2.1. Pinealektomi                                                      | 44        |
| 4.2.2. İskemi-Reperfüzyon Uygulaması:                                    | 45        |
| 4.2.3. Uzaktan İskemik Perkoşullanma Uygulaması                          | 47        |
| 4.3. İlaç Uygulanması                                                    | 48        |
| 4.4. Nekroz Alanının Belirlenmesi                                        | 48        |
| 4.5. Laboratuvar Analizleri                                              | 49        |
| 4.5.1. RNA İzolasyonu ve Spektrofotometrik Ölçümü                        | 49        |
| 4.5.2. Komplementer DNA Sentezi                                          | 50        |
| 4.5.3. RT-PCR ile cDNA Amplifikasyonu:                                   | 50        |
| 4.6. İstatistik                                                          | 51        |

|                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5. BULGULAR</b>                                                                               | <b>52</b> |
| 5.1. İskemi-Reperfüzyon, RPerC, Melatonin ve Pinealektominin Nekroz Alanına Etkisi               | 52        |
| 5.2. İskemi-Reperfüzyon, RPerC, Melatonin ve Pinealektominin Cybb Gen Ekspresyonuna Etkisi       | 54        |
| 5.3. İskemi-Reperfüzyon, RPerC, Melatonin ve Pinealektominin HIF-1 $\alpha$ Ekspresyonuna Etkisi | 56        |
| 5.4. İskemi-Reperfüzyon, RPerC, Melatonin ve Pinealektominin Nf $\kappa$ B Düzeyine Etkisi       | 57        |
| <b>6. TARTIŞMA</b>                                                                               | <b>59</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>                                                                              | <b>70</b> |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                               | <b>85</b> |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                  |                                                                         |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1:</b>  | Miyokardiyal İ/R hasarının temel bileşenleri                            | 8  |
| <b>Şekil 2:</b>  | Miyokardiyal İ/R hasar mekanizmasının şeması.                           | 10 |
| <b>Şekil 3:</b>  | Uzaktan iskemik koşullanmanın potansiyel mekanizmaları ve zamanlaması.  | 22 |
| <b>Şekil 4:</b>  | Uzaktan iskemik koşullanma mekanizmaları.                               | 23 |
| <b>Şekil 5:</b>  | Melatoninin kimyasal yapısı                                             | 32 |
| <b>Şekil 6:</b>  | Melatonin sentezi.                                                      | 33 |
| <b>Şekil 7:</b>  | Sıçan kafatasında Pineal bezin yeri ve çıkarılmış şekli.                | 45 |
| <b>Şekil 8:</b>  | LAD ligasyonu ve nekrotik bölgenin gösterimi.                           | 46 |
| <b>Şekil 9:</b>  | İskemi başladığı anda EKG ve kan basıncındaki değişimler                | 47 |
| <b>Şekil 10:</b> | Sıçanda femoral arter ve ven.                                           | 48 |
| <b>Şekil 11:</b> | İ/R, RlPerC, melatonin ve Px'in nekroz alanları üzerine etkisi.         | 53 |
| <b>Şekil 12:</b> | İ/R, RlPerC, melatonin ve Px'in Cybb düzeyleri üzerine etkisi.          | 55 |
| <b>Şekil 13:</b> | İ/R, RlPerC, melatonin, Px'in HIF1 $\alpha$ düzeyleri üzerine etkisi.   | 56 |
| <b>Şekil 14:</b> | İ/R, RlPerC, melatonin ve Px'in Nf $\kappa$ B düzeyleri üzerine etkisi. | 58 |

## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1:</b> İskeminin Hücresel Etkileri                                                              | 7  |
| <b>Tablo 2:</b> İ/R hasarında ön, ard ve uzaktan koşullanmanın koruyuculuğunda risk faktörlerinin etkisi | 30 |
| <b>Tablo 3:</b> Deney grupları ve uygulanacak işlemlerin tablo olarak gösterimi                          | 43 |
| <b>Tablo 4:</b> İ/R, RİPerC, melatonin ve Px'in Cybb düzeyleri üzerine etkisi.                           | 54 |
| <b>Tablo 5:</b> İ/R, RİPerC, melatonin ve Px'in NfκB düzeyleri üzerine etkisi.                           | 57 |



## KISALTMALAR LİSTESİ

|                                   |                                                                                         |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AMI</b>                        | Akut miyokard enfarktüsü                                                                |
| <b>ATP</b>                        | Adenozin trifosfat                                                                      |
| <b>DRIPostC</b>                   | Geciktirilmiş uzaktan iskemik ard koşullanma – delayed remote ischemic postconditioning |
| <b>ETZ</b>                        | Elektron transport zinciri                                                              |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Hidrojen peroksit                                                                       |
| <b>IPC</b>                        | İskemik ön koşullanma - ischemic preconditioning                                        |
| <b>IPostC</b>                     | İskemik ard koşullanma - ischemic postconditioning                                      |
| <b>İ/R</b>                        | İskemi-reperfüzyon                                                                      |
| <b>İKH</b>                        | İskemik kalp hastalığı                                                                  |
| <b>KABC</b>                       | Koroner arter bypass cerrahisi                                                          |
| <b>LAD</b>                        | Sol ön inen koroner arter - left anterior descending                                    |
| <b>mPTP</b>                       | Mitokondriyel permabilite geçiş porunun                                                 |
| <b>NE</b>                         | Norepinefrin                                                                            |
| <b>NK</b>                         | Doğal öldürücü – Natural killer                                                         |
| <b>NO</b>                         | Nitrik oksit                                                                            |
| <b>NOS</b>                        | Nitrik oksit sentaz                                                                     |
| <b>O<sub>2</sub>•–</b>            | Süperoksit anyonu                                                                       |
| <b>OH•</b>                        | Hidroksil radikali                                                                      |
| <b>ONOO•</b>                      | Peroksinitrit                                                                           |
| <b>PCI</b>                        | Perkütan koroner girişim - percutaneous coronary intervention                           |
| <b>Px</b>                         | Pinealektomi                                                                            |
| <b>RIC</b>                        | Uzaktan iskemik koşullanma – remote ischemic conditioning                               |
| <b>RIPC</b>                       | Uzaktan iskemik ön koşullanma – remote ischemic preconditioning                         |
| <b>RIPerC</b>                     | Uzaktan iskemik perkoşullanma – remote ischemic perconditioning                         |
| <b>RIPostC</b>                    | Uzaktan iskemik ardkoşullanma – remote ischemic postconditioning                        |
| <b>RNS</b>                        | Reaktif nitrojen türleri                                                                |
| <b>ROS</b>                        | Reaktif oksijen türleri                                                                 |
| <b>SCN</b>                        | Suprakiazmatik nukleus                                                                  |
| <b>STEMI</b>                      | ST-yükselmeli miyokard enfarktüsü                                                       |

## 1. ÖZET

İskemik kalp hastalıkları gelişmiş ülkelerde ilk sırada gelen morbidite ve mortalite nedenidir. Son yıllarda, uzaktan iskemik koşullanma (RIC) olarak adlandırılan uzak organ/uzvun geçici iskemisinin, letal iskemik sonuçlar oluşmasına engel olarak koruma oluşturabildiği bulunmuştur. Bu olgunun keşfi, kardiyak korumada direkt kalbe müdahale zorunluluğunu ortadan kaldırmaktadır. Yaşlanmada, komorbiditelerde ve komedikasyonlarda koşullanmaların kardiyoprotektif etkilerinin bozulduğu gösterilmiştir. Yaşlanmayla pineal bezden melatonin sentezinin azalması, yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada İ/R hasarında uzaktan iskemik perkoşullanma (RIPerC) ve melatoninin nekroz alanı, nekrotik gen Cybb, hipoksiyle indüklenen faktör (HIF-1 $\alpha$ ) ve inflamasyon mediyatörü nükleer faktör-kappa B (Nf $\kappa$ B) üzerindeki etkileri incelendi.

Bu amaçla kullanılan Sprague Dawley sıçanlar pinealektomi yapılmayan (Non-PX) ve pinealektomili (Px) olarak 2 gruba ayrıldı ve İ/R'ye kadar 2 ay bekletildi. (i)Kontrol; (ii)İ/R (sol koroner arter ligasyonu ile oluşturulan 30 dk iskemi, 120 dk reperfüzyon); (iii)İ/R+RIPerC (miyokardiyal iskemiye başlandığında 3 siklus 5 dakika iskemiye takiben 5 dk reperfüzyon); (iv)İ/R+Melatonin (10 gün 10 mg/kg); (v)Px; (vi)Px+İ/R; (vii)Px+İ/R+RIPerC; (viii)Px+İ/R+RIPerC+Melatonin gruplarına ayrıldı.

Hemodinamik parametreler EKG, kan basıncı, kalp hızı değerlendirildi. Nekroz alanı 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorür (TTC) boyamayla belirlendi ve Image J programıyla hesaplandı. Cybb, HIF-1 $\alpha$  ve Nf $\kappa$ B qRT-PCR ile analiz edildi.

Non-Px gruplarda İ/R’de artan enfarkt boyutu, Cybb ve NfκB RİPerC ve melatonin ile azaldı. Px ile artan enfarkt boyutu RİPerC ile minimal, RİPerC+Melatonin ile anlamlı azaldı. Hem Non-Px hem de Px gruplarında RİPerC ve Melatonin Cybb ve NfκB ekspresyonlarını anlamlı olarak azalttı. HIF-1α ekspresyonu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında İ/R ve Px grubunda up-regüle (%28-%14) oldu. Melatonin ve RİPerC ise ekspresyonunu (%17,6-%30,4) down-regüle etti. Ancak veriler istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşamadı.

İlk kez bu çalışmada RİPerC ile nekroz üzerinde sağlanan kardiyoprotektifliğin Px ile azaldığı gösterildi. Dışarıdan melatonin verilmesi koruyuculuğu geri çevirebildi. Melatoninin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonları İ/R hasarında ve RİPerC’nin koruyuculuğunda önemli olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Uzaktan iskemik perkoşullanma, melatonin, İ/R, Cybb, NfκB, HIF-1α

## 2. ABSTRACT

### **Physiological and pharmacological effects of melatonin at remote ischemic per conditioning protectiveness onto ischemia-reperfusion-induced necrosis in the heart**

Ischemic heart disease is the leading cause of morbidity and mortality in developed nations. In recently, it has been found that remote organ/limb temporary ischemia that renamed remote ischemic conditioning (RIC) can provide protection as an obstacle to the formation of lethal ischemic outcomes. The finding of this phenomenon can remove the requirement for direct cardiac intervention in cardiac protection. It has been shown that the cardioprotective effects of conditioning in aging, comorbidities and comedications are impaired. With aging, decreased melatonin synthesis in the pineal gland suggests that it is important in the pathogenesis of aging and aged-related cardiovascular diseases.

In this study, it were investigated effects of remote ischemic perconditioning (RIPerC) and meletonin on the necrosis area, necrotic gene *Cybb*, hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) and inflammatory mediator nuclear factor-kappa B (NfkB) in I/R injury.

Sprague Dawley rats used for this purpose were divided into 2 groups as non-pinealectomized (Non-Px) and pinealectomized (Px) groups, and waited for 2 months until I/R. They were divided into (i) Control; (ii)I/R (30 min ischemia, 120 min reperfusion caused by left coronary artery ligation); (iii)I/R+RIPerC (when myocardial ischemia initiated, 3 cycles of 5 min occlusion followed by 5 min reperfusion); (iv)I/R+Mel (10 days 10 mg/kg); (v)Px; (vi)Px+I/R; (vii)Px+I/R+RIPerC; (viii)Px+I/R+RIPerC+Melatonin groups.

Hemodynamic parameters that involving ECG, blood pressure, heart rate were evaluated. The necrosis area was determined by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and calculated by the Image J program. Cybb, HIF-1 $\alpha$  and NfkB was analyzed by qRT-PCR.

Increased infarct size, Cybb and NfkB in I/R of Non-Px groups decreased with RPerC and melatonin. Increased infarct size with Px was minimal with RPerC, and significantly decreased with RPerC+Melatonin. In both Non-Px and Px groups, RPerC and Melatonin significantly reduced Cybb and NfkB expressions. HIF-1 $\alpha$  expression was up-regulated in the I/R and Px groups (respectively; %28-%14) when compared with the control group. Melatonin and RPerC down-regulated (respectively; %17,6-%30,4) expression of HIF-1 $\alpha$ . However, the data were not statistically significant.

For the first time with this study, it was shown that the cardioprotection on necrosis provided by RPerC decreased with Px. The administration of melatonin from the outside could reverse the protection. The physiological and pharmacological contractions of melatonin may be important in I/R injury and in the protection of RPerC.

**Anahtar Kelimeler:** Remote ischemic preconditioning, melatonin, I/R, Cybb, NfkB, HIF-1 $\alpha$

### 3. GİRİŞ

#### 3.1. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Organ ve dokulara giden kan akımının herhangi bir nedenle belirgin olarak azalması veya tamamen kesilmesi sonucunda perfüzyonun bozulmasına *iskemi* denir ve iskemiye maruz kalan dokunun belirli bir süre oksijenden yoksun kalması doku hasarı veya nekrozu ile sonuçlanır. İskemi sonrası kan akımının yeniden sağlanması ise *reperfüzyon* olarak adlandırılır ve iskeminin neden olduğu hasarın genişlemesine yol açar. Bu durum genel olarak *iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı* olarak adlandırılır. Hasarın yol açtığı lokal ve sistemik etkilerin organ transplantasyonu, miyokard enfarktüsü, serebrovasküler hastalıklar, majör cerrahi girişimler, trombolitik tedavi, hemorajik şok ve resüsitasyon gibi birçok klinik durumda ortaya çıkan yüksek morbidite ve mortaliteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir. “*Oksijen paradoksu*” olarak da bilinen İ/R hasarının biyokimyasal mekanizmalarının anlaşılması klinikte doku hasarını azaltacak yeni tedavi seçeneklerinin ve prosedürlerinin geliştirilebilmesi açısından oldukça önemli bir role sahiptir (1).

İskemik kalp hastalığı (İKH) ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde önde gelen morbidite ve mortalite nedenidir. VISION adlı (The Vascular events In non-cardiac Surgery patIents cOhort evaluatioN) güncel bir çalışma ile non-kardiyak cerrahi sonrası, %84,2’si asemptomatik olan 45 yaş üzerindeki hastaların, %8’inin miyokard hasarına maruz kaldığı troponin testiyle saptanmıştır. Bu hastaların 10’da 1’i takip eden 30 gün içerisinde öldüğünden bulgular anlamlı kabul edilmiştir (2). İlk kez 1972 yılında Ginks ve ark. (3) tarafından gerçekleştirilen çalışma ile koroner arter oklüzyonu ardından reperfüzyonun, miyokard enfarkt boyutunu azaltabildiği gösterilmiştir. Günümüzde, akut ST-yükselmeli miyokard enfarktüsünün (STEMI)

tedavisinde anjiyoplasti, trombolizis, perkütan koroner girişim (PCI - percutaneous coronary intervention) ve koroner arter bypass cerrahisi (KABC) gibi terapötik stratejiler kullanılmaktadır ancak çalışmalar iskemiden sonraki 30 gün içerisinde mortalite ve morbidite görülme sıklığının hala anlamlılığını sürdürdüğünü göstermektedir (4). Yani miyokardiyal kurtarma için reperfüzyon gerekli olmasına rağmen bir bedeli vardır, bu miyokard hasarını indükleyen ve kardiyomiyosit ölümüne neden olan “*miyokardiyal İ/R hasarı*” olgusudur (5). Bu nedenle iskemik miyokardın reperfüzyonunu sağlayarak dokuyu kurtarma ve paradoksik reperfüzyon hasarından korumak için müdahalelerin geliştirilmesine verilen önem artmaktadır.

### **3.2. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarının Mekanizması**

Akut miyokard enfarktüsü (AMI) genellikle koroner arterlerde oluşan ateromatöz plağın rüptürüne bağlıdır. Reperfüzyon, iskemik kalmış miyokardı kurtarmak için zorunludur ve buna mitokondriyel permabilite geçiş porunun (mPTP) açılması, reaktif oksijen türlerinin oluşumu (ROS), nitrik oksit (NO) biyoyararlanımında değişim, hücre içi  $Ca^{2+}/Na^{+}$  dağılımı ve pH'daki değişiklikler eşlik etmektedir (5) (Şekil 1).

Dokuya giden kan akımının azalması ve oksijen yetersizliğiyle başlayan iskemik hasar, reperfüzyon sağlandığında hasarlanan dokuların yeniden oksijenasyonu ile devam eder. Hücredeki mitokondriyel adenosin trifosfat (ATP) üretiminde azalma hücre içi metabolizmayı anaerobik yöne kaydırır ve asidoza sebep olur. ATP bağımlı  $Na^{+}/K^{+}$  iyon pompasının yavaşlaması ile hücre içi  $H^{+}$  artışını dengelemek için ATP bağımlı olmayan  $Na^{+}/Ca^{2+}$  pompası intraselüler  $Ca^{2+}$  miktarını artırır ve artmış  $Ca^{2+}$  yükü sitozolik proteazları aktive eder (Tablo 1). Hücre içi proteaz aktivasyonu ve reperfüzyonla dokuların yeniden oksijenasyonu

hidroksil radikali ( $\text{OH}\cdot$ ), süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gibi ROS ile peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) gibi reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimine yol açan kritik biyokimyasal yolları hızlandırır. Ayrıca artmış serbest radikallerin neden olduğu inflamasyon, bölgede inflamatuvar hücrelerin toplanmasını tetikler. Endotelial hücrelerle inflamatuvar hücreler (başta polimorf çekirdekli lökositler) arasındaki etkileşimler, birçok sitokinin salınmasına ve iskeminin yol açtığı hasarın reperfüzyonla genişlemesine yol açar. Ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS), mitokondrilerde bulunan elektron transport zinciri (ETZ) ve NADPH oksidaz; ROS ve RNS üretiminden sorumlu başlıca mekanizmalardır. Oluşan serbest radikaller hücre membranındaki lipit yapılara, hücre içi yapısal ve fonksiyonel proteinlere ve genetik materyal gibi önemli makromoleküllere zarar vererek hücre hasarı veya ölümüne yol açmaktadır (6).

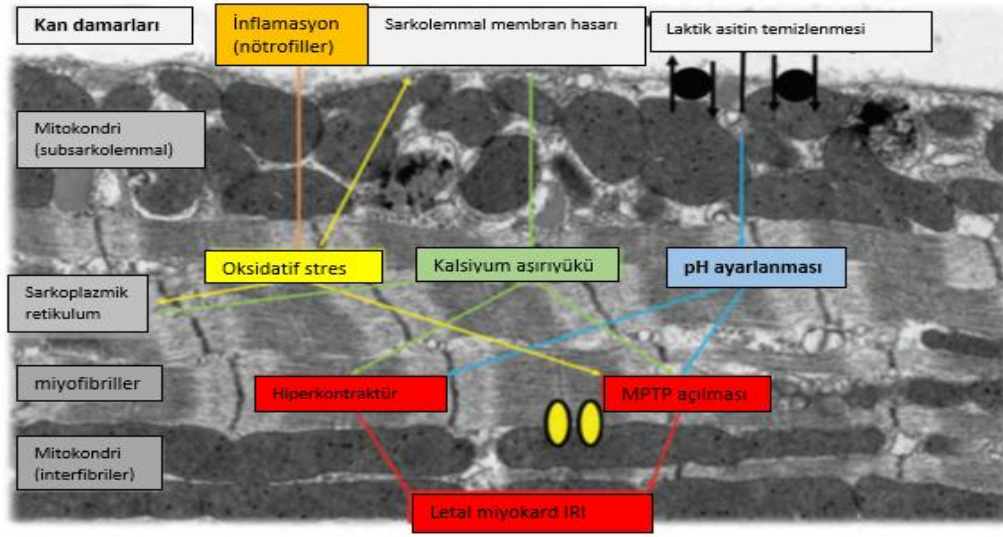
**Tablo 1:** İskeminin Hücresel Etkileri

---

|                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------|
| Değiştirilmiş zar potansiyeli                                         |
| Değiştirilmiş iyon dağılımı (hücre içi $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ ) |
| Hücresel şişme                                                        |
| Sitoskelet sisteminin dağılması                                       |
| Artmış hipoksantin                                                    |
| Azalan ATP                                                            |
| Azalmış fosfokreatin                                                  |
| Azalan glutatyon                                                      |
| Hücresel asidoz                                                       |

---

Collard ve ark. (7) ait çalışmadan düzenlenmiştir



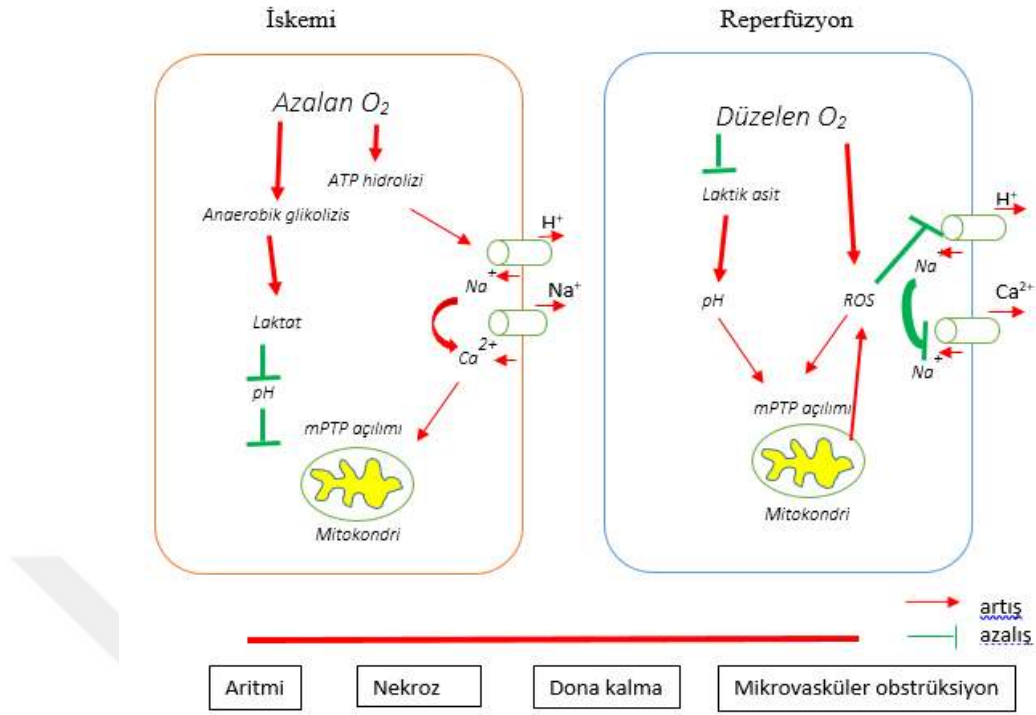
**Şekil 1:** Miyokardiyal İ/R hasarının temel bileşenleri

### 3.2.1. Mitokondriyal Disfonksiyon ve Kritik Bir Mediyatör Olan mPTP'nin Açılması

İlk kez Crompton ve Costi (8) tarafından yapılan çalışmayla letal İ/R hasarında mPTP'nin kritik bir mediyatör olduğu gösterilmiştir. Fizyolojik koşullarda mitokondri birkaç metabolit ve iyon haricinde geçirimsizdir. Ancak, miyokard iskemisi gibi patolojik koşullarda oksijen ve beslenme yoksunluğu mPTP'nin non-selektif olarak açılıp depolarize olması ve oksidatif fosforilasyonun bozulması ile sonuçlanmaktadır (9). Kalp hem kontraktilitede hem de gevşemede yüksek enerji talebini karşılamak için ATP sentezi yoluyla sürekli enerji arzına ihtiyaç duymaktadır ve ATP'nin yaklaşık %95'i mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan gelmektedir (10). Oksidatif fosforilasyon bozulması sadece ATP tüketimine yol açmaz aynı zamanda mevcut ATP'nin parçalanmasına da neden olur ki sonucunda ATP hidrolizi ve mitokondriyal inorganik fosfat artışı indüklenmektedir (11). Öte yandan, iskemi süresince hücresel metabolizma anaerobik glikolize geçmektedir ve

laktat birikimi hücre içi pH'yı azaltmaktadır. ATP tüketimi ve asidoz, hücre içi proton birikimine bağlı olarak  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  iyon pompasındaki aktivasyon artışı  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  antiport sisteminin fazla  $\text{Na}^+$  uzaklaştırmasını engelleyerek hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  aşırı yükü ve mitokondriyal şişmeye neden olmaktadır (12). Hem mitokondriye  $\text{Ca}^{2+}$  akışı hem de ROS üretimde artış mPTP açılmasını desteklerken oluşan asidoz ise açılmasını engellemektedir. Reperfüzyon sonrası hızlı pH düzelmesi ile birkaç dakika içerisinde mPTP açılımı şiddetlenmektedir (13). Bu da birikmiş elektronda ani akış ve elektron kaçağıyla ilişkili artışa neden olarak ETZ'ye zarar vermektedir; hasar gören ETZ ile birlikte yalnızca mitokondri zarar görmemekte  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ve diğer ROS'ların aşırı artması sonucu hücre ölümü de meydana gelmektedir (14) (Şekil 2). Çalışmalar reperfüzyonda mPTP açılımının (mPTP iskemi sırasında kapalıdır) ve artan mitokondriyal  $\text{Ca}^{2+}$  yükünün farmakolojik inhibisyonunun veya hasar görmüş mitokondrinin zamanında uzaklaştırılmasının kalbi İ/R hasarından korumak için umut verici terapötik yollar olabileceğini göstermiştir.

Açılan mPTP'nin farmakolojik ajan olan Siklosporin A ile doğrudan (15) veya siklofilin-D ile genetik inhibisyonunun yapıldığı (16) çalışmalarda reperfüzyon sonrası oluşan miyokard hasarını hafiflettiği gösterilmiştir. Böylece mPTP inhibisyonunu hedefleyen tedavilerin kardiyoprotektif olduğu kanıtlanmıştır ve günümüzde klinik kullanım için değerlendirilmektedir (17).



**Şekil 2:** Miyokardiyal İ/R hasar mekanizmasının şeması. Miyokardiyal İ/R; ROS üretimini artırarak, NO biyoyararlanımını azaltarak ve  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  iyonlarının hücre içi dağılımını ve pH'yı bozarak mPTP açılmasını arttırıp kardiyomiyosit ölümüne ve daha sonra irreversibl miyokard hasarına neden olur.

### 3.2.2. Aşırı ROS Üretimi

Aerobik organizmaların hayatlarının devamlılığı için gereken oksijen bazı durumlarda hayati dokular için öldürücü olabilmektedir. Solunum sırasında alınan oksijenin büyük kısmı ATP üretiminde kullanılırken yaklaşık %5'lik kısmı ise mitokondride oksidatif fosforilasyon ve peroksizomlarda yağ asidi oksidasyonu sırasında metabolizma için toksik olan serbest radikallere dönüştürülür (18).  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  ve  $OH^{\bullet}$  ve singlet  $O_2$  radikalleri gibi ROS hücrel metabolizmanın yan ürünleri olarak üretilir. Fizyolojik koşullarda normal hücrel sinyal yollarına katıldıklarından (19) ve kardiyoprotektiflik sağlayan bazı müdahalelerde (iskemik ön

koşullanma (IPC - ischemic preconditioning) önemli görevleri olduğundan az miktarda üretilmesi faydalı olmaktadır (18). Ancak, miyokardiyal İ/R gibi stres koşulları, hasar görmüş mitokondride aşırı üretime neden olur bu da hücrelerin savunma kapasitesini aşarak (katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz) kardiyomiyositlere zarar verir (12). Aşırı ROS üretimi;  $Ca^{2+}$  aşırı yükü (10) (20), protein oksidasyonu sonucu kritik proteinlerin bozulması (21), ONOO<sup>-</sup> üretimi (22), lipit peroksidasyonu sonucu kolesterol içeren membranların bozulması (23), mPTP açılması (9) ve NO biyoyararlanımının azalması (24) ile sonuçlanır. Bu olgu “*oksidatif stres*” olarak adlandırılır ve sonunda hücre ölümüne neden olur.

Reperfüzyonun ilk dakikalarında artan ROS üretimi miyokardiyal İ/R hasarının altında yatan patojenik mekanizmalara katkıda bulunduğundan önleyici tedavi olarak enzimler (katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi) ve vitaminler (E, C, A ve prekürsörleri karoten gibi) kullanımı uygun bir seçenek olarak düşünülmüştür. Ancak, deneysel ve klinik çalışmalardan tutarlı sonuçlar elde edilememiştir. Örneğin vasküler hastalığı olanlarda antioksidanın yararlı etkisi gözlemlenmemiş ve uzun süreli antioksidan (vitamin E) takviyesi önemli kardiyovasküler olayları engellemediği gibi kalp yetmezliği riskini artırabilmiştir (25). Mitokondri, ROS üretiminde primer bölge olarak düşünüldüğünden spesifik antioksidanların keşfinin miyokardiyal İ/R hasarıyla mücadelede daha etkin tedavi sağlayabileceği düşünülmektedir (26).

### **3.2.3.NO Biyoyararlanımının Azalması**

NO, NOS [üç isoformu endotelial (eNOS), nöronal (nNOS) ve indüklenebilen NOS (iNOS)] tarafından oksijen varlığında L-arjininin L-sitruline dönüştürülmesi ile üretilir. Kardiyovasküler sistemde kritik bir sinyal molekülüdür,

miyokardiyal İ/R hasarına karşı en önemli savunma mekanizmalarındandır ve kardiyoprotektif müdahalelerde (IPC ve iskemik ard koşullanma (IPostC - ischemic postconditioning)) aracı molekül olarak görev yapar. NO, kardiyovasküler etkisini farklı mekanizmalarla gerçekleştirir: (1) NO'ya duyarlı guanilat siklaz ve cGMP aktivasyonu (27), (2) mitokondri içine  $Ca^{2+}$  akışının inhibisyonu (28) ve mitokondriyel  $K_{ATP}$  kanal aktivasyonu (29), (3) siklooksijenaz-2 güçlendirilmesi (30) ve (4)  $ONOO^-$  aracılı lipid radikal zincir çoğalmasının durdurulmasıdır (31). Uzun süreli miyokard iskemisinde, NO sentezi için gerekli NOS aktivitesi (öncelikle eNOS ve nNOS) oksijen arzında azalma ile yavaşladığı için NO salınımının da azalmasına neden olur. NOS aktivitesini ve NO biyoyararlanımını arttırmanın kardiyoprotektif olduğu gösterilmiştir. Miyokardiyal İ/R hasarına maruz bırakılan eNOS nakavt farelerde post-iskemik hasar artarken (32) aşırı eNOS ekspresyonunda ise post-iskemik kardiyak fonksiyonlar gelişmiştir (33). Fizyolojik NO konsantrasyonunun sürdürülmesi kardiyoprotektif etki açısından önemlidir.

#### **3.2.4. İnflamasyon**

İnflamatuvar yanıt İ/R hasarında gereklidir ve nötrofillerin hasarda tetikleyici rolleri olduğu düşünülmektedir. Hasarlı endotel hücrelerde, trombositlerden ve lökositlerden kemoatraktanlar (sitokinler, kompleman, ROS) serbest kalmaktadır. Kardiyomiyositler reperfüzyoda enfarkt bölgeye nötrofilleri çekmektedir. Aktive olan nötrofiller vasküler endotelyuma yapışır (adhezyon molekülleri ve selektinler ile) ve hücre arası boşluğa geçerler, ROS'u parçalayıp proteolitik enzimleri serbest bırakırlar ayrıca kapiller seviyede obstrüksiyon yaparlar. Mikrodolaşımda fonksiyonel kapillerde kapanma, trombozis ve no-reflow fenomeni gelişir (34). Bu

akut inflamatuvar yanıtın kardiyomiyosit ölümüyle sonuçlanıp sonuçlanmadığı belirsizdir.

### **3.3. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarları**

#### **3.3.1. Reperfüzyon Aritmileri**

İlk kez 1984’de Manning ve Hearse (35) tarafından yapılan deneylerde reperfüzyonla indüklenen ventriküler aritmi tanımlanmıştır. Reperfüze-STEMI hastalarında en çok karşılaşılan reperfüzyon aritmi çeşitleri; idioventriküler ritim, ventriküler taşikardi ve fibrilasyondur.

#### **3.3.2. Nekroz**

Nekroz rastgele hücre ölümü olarak düşünülmektedir. Kardiyomiyositlere giden kanın belirgin olarak azalması veya tamamen kesilmesi sonucunda perfüzyonun bozulmasıyla iskemiye maruz kalan dokunun belirli bir süre oksijenden yoksun kalması doku hasarı veya nekrozu ile sonuçlanmaktadır.

#### **3.3.3. Miyokardiyal Dona Kalma**

Miyokardiyal dona kalma, reperfüzyola meydana gelen reversibl kontraksiyon bozulmasıdır. Kontraksiyon aparatında oksidatif stresin etkileri ve hücre içi  $Ca^{2+}$  artışından kaynaklanmaktadır (36).

#### **3.3.4. Mikrovasküler Obstrüksiyon**

Mikrovasküler obstrüksiyon, endotel hücrelerin ve kardiyomiyositlerin ölümüyle sonuçlanan irreversibl hasardır. İlk kez Krug ve ark. (37) “iskemik kalmış bölgede reperfüzyon yetersizliği” şeklinde tanımlamıştır.

### **3.4. Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Terapötik Yaklaşımlar**

Günümüzde, İ/R hasarı için tam olarak etkili bir tedavi yoktur. Bu nedenle, kardiyoprotektif müdahalelerin geliştirilmesi İ/R hasarından kaynaklanan enfarkt boyutunu sınırlamada büyük klinik önem taşımaktadır. Çeşitli çalışmalarla kalbin İ/R stresine belirgin uyum yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir ve İ/R'deki bu moleküler esneklik altında yatan mekanizmalar terapötik kullanımına uygun olabilmesi umuduyla yoğun araştırmaların odak noktası olmuştur (38).

Miyokardın, lethal iskemi öncesinde (IPC) ya da reperfüzyonun hemen başında (IPostC) veya uzaktaki dokuda (uzaktan iskemik koşullanma (RIC - Remote ischemic conditioning)) kısa İ/R maruziyetlerine iyi adaptif yanıtlar verdiği belirlenmiştir. Koşullanmanın tüm formlarının, kalbin İ/R hasarına dayanma yeteneğini belirgin olarak geliştirdiği gösterilmiştir (38).

#### **3.4.1. Hücre Ölümünün Yeni Formları**

Kalp koşullanmasının yararlı etkilerini araştıran deneysel çalışmaların çoğu, nekroz ve/veya apoptozise bağlı kardiyomiyosit ölümünü önlemeye odaklanmıştır ve bu bakımdan mitokondri çok önemli bir rol oynamaktadır. Yakın zamanda akut İ/R hasarıyla indüklenen kardiyomiyosit ölümüyle alakalı iki başka form tanımlanmıştır; otofaji (mitofaji dahil) ve programlanmış hücre nekrozu (nekroptozis) (38).

*Otofaji*, hücrel stres koşulları altında lizozomal yollarla sitoplazmik bileşenlerin parçalanmasına aracılık eden ve evrimsel olarak korunan bir süreçtir. Otofajinin hücrenin miyokardiyal iskemiye karşı korunması için uyarlanabilir bir yanıt olabileceği öne sürülmüştür ancak reperfüzyon sırasında aktifleşmesinin zararlı olduğu düşünülmektedir (39). *Mitofaji* ise defekte mitokondrinin kaldırılmasını

sağlar ve kardiyoprotektif bir yanıt sağlayabilir. Parkin nakavt edilerek mitofajinin durdurulduğunda IPC kardiyoprotektifliğinin ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (40).

*Nekroz* daha önceleri hücre ölümünün programlanmamış formu olarak düşünülmüştür. Ancak, "*nekroptozis*" veya "*programlanmış nekroz*" olarak adlandırılan nekrotik hücre ölümünün düzenlenmiş formunun da olduğu gösterilmiştir. Nekroptozis, kaspazlardan bağımsız olarak tümör nekrozis faktör reseptörü (TNFR) ve Fas ligand aktivasyonu ile başlayıp programlı olarak gerçekleşir (41). Bu yolağın farmakolojik inhibisyonu enfarkt boyutunu sınırlamakta ve AMI sonrası istenmeyen sol ventrikül yeniden modellenmesini önlemektedir (42).

### **3.4.2. İskemik Ön Koşullanma (IPC)**

Miyokard; anjina, koroner vazospazm ve balon anjiyoplasti uygulamalarında ortaya çıkan kısa iskemi periyotlarını (15 dk'ya kadar) tolere edebilir. Ancak iskemi süresi ve şiddeti arttığında ve reperfüzyonda miyokard hasarı gelişir. Hasara karşı korunmada birkaç siklus kısa İ/R uygulamasını ilk kez Murry ve ark. (43) geliştirerek bu olguyu IPC olarak adlandırmışlardır.

IPC, akut İ/R hasarı sonrası enfarkt boyutunu sınırlamada güçlü terapötik müdahalelerden biridir. Devam eden araştırmalara rağmen, kardiyoprotektif etkiyi nasıl sağladığına dair mekanizmalar büyük ölçüde belirsizdir. Sinyal yollarının çoğunun kardiyomiyosit sarkolemmada toplandığı ve mitokondride bittiği görülmektedir. Bu nedenle son zamanlarda bu alanda yapılan araştırmaların çoğu mitokondriye odaklanmıştır. Ancak IPC, AMI'nın öngörülemeyen zamanlaması ve koroner damarlara direk müdahale gerekliliğinden dolayı kliniğe uygun olamamıştır.

#### **3.4.2.1. Olası Mekanizması**

Deneyisel çalışmalarda reperfüzyon başlangıcında mPTP açılımının inhibisyonunun IPC'nin sağladığı kardiyoprotektiflikle bağlantılı olduğu görülmüştür. Kesin mekanizma belli olmamakla birlikte RISK (reperfusion injury salvage kinase) ya da SAFE (survivor activating factor enhancement) sinyal yollarının aktivasyonunun etkili olduğu düşünülmektedir (44).

2007'den beri, mPTP'nin akut İ/R hasarındaki rolü ile ilgili birkaç önemli gelişme ortaya çıkmıştır. Son deneyisel çalışmalarda mitokondriyal ATPsentaz dimerlerinin mPTP oluşturabileceği ileri sürülmüştür (45). Bir başka önemli bulgu ise mitokondriyal  $Ca^{2+}$  uniporterin tanımlanması olmuştur ancak şaşırtıcı şekilde uniporter eksikliği olan farelerin mPTP açılımı inhibe olmasına rağmen AMI'dan korunmadığı gözlemlenmiştir (46).

#### **3.4.2.2. Klinikte Kullanımı**

IPC'nin pre-enfarkt anginada AMI'den daha iyi klinik sonuçları olduğu bilinmektedir (47). IPC girişimsel ve cerrahi revaskülarizasyon protokollerinde daha çok deneyisel olarak incelenmiştir.

Tekrarlanan balon anjiyoplasti yapılan klinik çalışmada EKG değişiklikleri, ağrı hissi, laktat üretimi ve kreatin kinaz salınımının ilk koroner oklüzyon periyodu ile hafiflediği görülmüştür (48). Koroner arter baypas greft veya kapakçık cerrahisinde IPC'nin koruyucu olduğu azalan serum biyolojik belirteçleri (CK-MB, TnI veya TnT) ile gözlemlenmiştir (49) ancak çalışmaların tamamı olumlu sonuçlar elde edilememiştir (50). Elektif kardiyak cerrahide kullanıldığı çalışmaların meta analizi aritmileri azalttığını, inotropik destek gereksinimini ve yoğun bakım ünitesinde kalışı azalttığını göstermiştir (51).

### 3.4.3. İskemik Ard Koşullanma (IPostC)

IPC'nin hasta AMI ile başvurmadan (yani sürekli miyokardiyal iskemiden) önce uygulanması gerekmektedir ve bu da klinik kullanımını kısıtlamaktadır. 2003 yılında Zhao ve ark. (52) tarafından köpeklerle yapılan bir çalışmada koroner revaskülizasyonun başında uygulanan birkaç kısa I/R döngüsü ile reperfüzyonun kesilmesinin kardiyak koruyuculuk sağladığı fark edilmiştir ve bu müdahale IPostC olarak adlandırılmıştır. IPostC'nin keşfi ile IPC'deki kısıtlılığın da üstesinden gelinmiştir ve kliniğe aktarımı ise keşfinden 2 yıl sonra gerçekleştirilmiştir (53).

#### 3.4.3.1. Olası Mekanizması:

IPostC mekanizmalarının çoğu IPC ile ortaktır. Kısacası, otakoidler prosurvival sinyal iletim yollarını aktive eder, bunların çoğu mitokondride birleşir ve reperfüzyon sırasında mPTP açılmasını önler.

**Otokoid mediyatörler:** Farmakolojik antagonistler kullanarak yapılan ilk deneysel çalışmalar adenosinin  $A_1$  reseptörü hariç (54),  $A_{2A}$  (55),  $A_{2B}$  (56) veya  $A_3$  reseptör (56) aktivasyonu yoluyla IPostC'nin anahtar mediyatörü olduğuna işaret etmiştir. Sonrasında da bradikinin (54), opioidler (57), tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (58) ve sfingozin (59) gibi çok sayıda otokoid mediyatörler tanımlanmıştır.

**Reperfüzyonda pH restorasyonunun gecikmesi:** Miyokardiyal iskemi sırasında oluşan asidik koşullar;  $Ca^{2+}$  aşırı yüklenmesine, artmış inorganik fosfata, oksidatif strese ve ATP tükenmesine neden olmasına ilaveten iskemi sırasında mPTP açılması üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahiptir. Reperfüzyonun ilk birkaç dakikasında, miyokardiyal laktatın yıkanması ve  $Na^+/H^+$  ve  $Na^+/HCO_3^-$  kotransporterinin aktivasyonu, hücre içi asidozu hızla düzeltir böylece mPTP üzerindeki inhibisyon kalkar ve sonrasında reperfüzyon süresince porların açık

kalmasına izin verir (5). Bazı deneysel çalışmalarla reperfüzyon başlangıcında fizyolojik pH restorasyonu geciktirilerek mPTP açılmasının önlenebileceği bildirilmiştir (60); ancak mekanizması net değildir.

**Mitokondri:** Deneysel çalışmalar, IPostC'nin miyokardiyal reperfüzyon hasarını önlediğini ve mPTP açılmasını inhibe ederek enfarkt boyutunu sınırladığını ileri sürmektedir (61). IPC'de olduğu gibi, mekanizması net değildir, ancak bazı potansiyel sinyal yolları önerilmiştir: 1) mPTP açılmasının inhibe olduğu reperfüzyon başlangıcında RISK, SAFE ve NO-cGMP-PKG gibi prosurvival kardiyoprotektif yolların aktivasyonu (44); 2) hücre içi pH restorasyonunda gecikme ile mPTP açılmasının inhibisyonu (60); ve 3) reperfüzyonda üretilen ROS azalması ile mPTP açılmasının önlenmesidir (62).

#### **3.4.3.2. Klinikte Kullanımı**

IPostC'nin dönüm noktası niteliğindeki ilk klinik çalışması Staat ve ark. (53) tarafından STEMI hastalarında koroner anjiyoplasti balonunun miyokardiyal reperfüzyonu kesmek için yeniden şişirilmesi şeklinde uygulanmıştır. Sonrasında yapılan farklı klinik çalışmalarda azalmış biyomarker salınımı (CK, CK-MB, TnI) ve enfarkt boyutunun azaldığı gösterilmiştir (63) ancak çalışmaların tamamında pozitif bulgular bildirilmemiştir (64). Direkt stent uygulanarak rezidüel stenoz veya koroner mikroembolizasyon olmaksızın hemen sağlanan tam reperfüzyon sonuçları, IPostC algoritmasınıninkilerle karşılaştırılmıştır ve direkt stentlemenin tüm rezidüel stenozu ortadan kaldırdığı ve sonrasında IPostC ile manipüle edildiğinde sorumlu lezyondan koroner mikroembolizasyonu önlediği gösterilmiştir (65).

#### **3.4.4. Farmakolojik Koşullanma**

Kalpte iskemik koşullanmaların altında yatan sinyal yollarının keşfi koruyuculuk için bir takım yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Bunlar, hücre membranını mitokondriye bağlayan sinyal iletim yollarındaki hedefleri ve mitokondrideki doğrudan hedefleri içermektedir. Kardiyoprotektif olarak en umut veren farmakolojik ajanlar: Siklosporin-A, metoprolol (iv), matriks metalloproteinaz (MMP) inhibitörleri, exenatide gibi glukagon-benzeri peptit 1 (GLP-1) analogları, nitrit/nitratlar, çözülebilir guanilat siklaz aktivatörleri, atriyal natriüretik peptid (ANP), glikoz-insülin-potasyum tedavisi ile metabolik modülasyon, melatonin, RGN-352 (Timozin  $\beta$ 4), sevofluran, mekasermin (rekombinant insan insülini-büyüme faktörü benzeri-1) ve klopidoğredir (38) (66).

##### **3.4.4.1. Klinik Kullanımı**

IPostC'nin koruyucu mekanizmaları hakkında artan anlayış farmakolojik ajanlarla yapılan IPostC'nin kardiyoprotektif etkilerini yeniden elde etmek üzere hedef alınabilen geniş bir mediyatör sinyal dizisi tanımlamıştır. Bu bakımdan primer PCI uygulanan STEMI hastalarında enfarkt boyutunu sınırlamak için bir takım farmakolojik yaklaşımlar araştırılmıştır. Maalesef, çalışmaların çoğu umut verici deneysel verilerine rağmen, klinik ortamda başarısız olmuştur. Bu belirgin başarısızlığın klinik gerçekliği yeterince temsil edemeyen hayvan modellerinin kullanımından (komorbiditelerin eksikliği, zayıf çalışma tasarımları) kaynaklandığı düşünülmüştür (67).

Yakın zamanlarda yapılan klinik çalışma ile birkaç farmakolojik yaklaşımın STEMI hastalarında reperfüzyon öncesi uygulanması durumunda enfarkt boyutunu

sınırladığı bildirilmiştir. Bu tedaviler arasında en umut verici olanı siklosporin-A, eksenatid ve metoprololdur, bu bağlamda siklosporin-A'nın araştırılmakta olduğu büyük çok merkezli bir klinik çalışma halen devam etmektedir (NCT 01502774).

#### **3.4.5. Uzaktan İskemik Koşullanma (RIC)**

Akut miyokardiyal İ/R hasarını sınırlamak için kullanılan terapötik müdahalelerden olan IPC ve IPostC'nin klinik kullanımlarını sınırlayan en önemli dezavantajı, kalbe doğrudan müdahale gerektirmeleridir. İlk kez 1993'de Przyklenk ve ark. (68) köpeklerde sol sirkumflex bölgeye dört siklus 5 dakika iskemiye takiben 5 dakika reperfüzyon ve ardından da 1 saat sol ön inen (LAD - left anterior descending) koroner arter oklüzyonu uyguladıklarında enfarkt boyutunda anlamlı azalma yaparak kardiyoprotektif olduğunu göstermişlerdir ve bu olguyu RIC olarak adlandırmışlardır. RIC, sonrasında kalpten daha uzak kısımlara da uygulanmaya başlanmıştır ve bu keşif büyük bir ilerleme olarak görülmüştür. Deneysel çalışmalarla RIC'nin kardiyak olmayan organ ve dokuların da akut İ/R hasarından korunmasını mümkün hale getirdiği gösterilmiştir böylece sistemik koruyucu bir form olarak kliniğe aktarılmıştır. Ancak RIC'in deneysel ortamda keşfedilen kardiyoprotektifliğinin kliniğe aktarımını kolaylaştıran majör buluş arka bacak iskelet kası dokusuna uygulanabilirliği olmuştur (69). Bunu kardiyoprotektif uyarının gönüllü insanlarda kol ya da bacağına yerleştirilen tansiyon manşonu ya da benzer bir aletin basitçe şişirilip indirilmesiyle uygulanabildiğinin keşfedilmesi izlemiştir (70). Bu bakımdan, RIC'nin akut İ/R hasarında kalbi korumada non-invaziv, endojen bir terapötik strateji sağlayabileceği düşünülmüştür.

Özetle RIC, İ/R hasarına karşı uzak bölgelerde, vasküler yatakta, doku ya da organda letal olmayan, kısa İ/R periyotlarıyla tanımlanmış bir olgudur ve ek avantajı

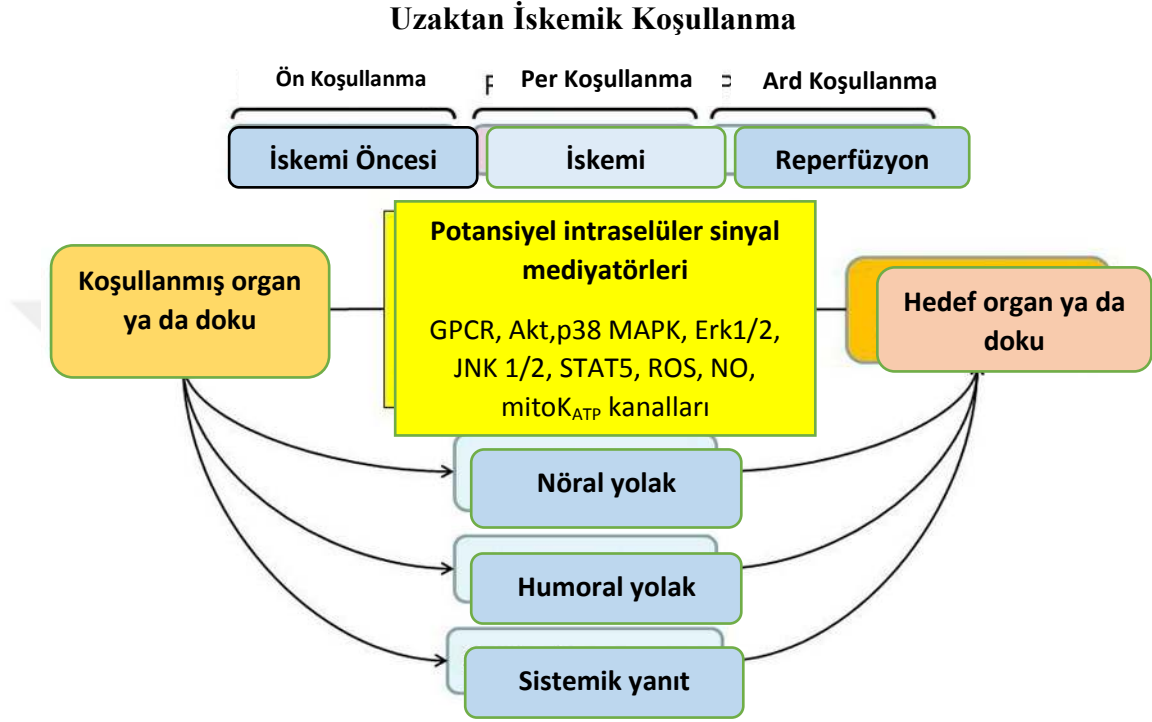
akut İ/R hasarına bağılı olarak farklı zaman noktalarında başlatıldığında kardiyoprotektiflik sağlama yeteneğidir. Miyokard iskemisinden önce (uzaktan iskemik ön koşullanma (RIPC–remote ischemic preconditioning)) (68); miyokardiyal iskeminin başında ama reperfüzyondan önce (uzaktan iskemik per koşullanma (RIPerC–remote ischemic perconditioning)) (71); miyokardiyal reperfüzyon başlangıcında (uzaktan iskemik ard koşullanma (RIPostC – remote ischemic postconditioning)) (72) (Şekil 3); hatta reperfüzyon başladıktan 15 dakika sonra (geciktirilmiş uzaktan iskemik ard koşullanma (DRIPostC – delayed remote ischemic postconditioning)) (73) uygulanabilmektedir. Böylece RIC akut İ/R hasarının farklı klinik uygulamalarına da katkıda bulunmaktadır. Dahası akut İ/R hasarı olan sıçan modelinde AMI sonrası 28 gün boyunca RIPostC tekrarının post-MI yeniden modellenmesinde yararlı olduğu bildirilmiştir (74).

1993'te keşfedilmesine rağmen, RIC'in kardiyoprotektif etkisinin asıl mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır; karakterinin belirlenmesi, olgunun kavranması ve klinikte tam potansiyelle kullanılması için önemlidir.

#### **3.4.5.1. Olası Mekanizmaları**

RIC'in selüler ve moleküler mekanizmalarının iyi anlaşılması farmakolojik olarak koruyucu etkilerinden yararlanılmasına izin verebilir. Genel olarak, mekanizmalar bağlantılı üç olay olarak kabul edilebilir: i) RIC uyarısına cevap uzak organ ya da dokuda meydana gelmektedir. Uzak organ ya da dokuya kısa İ/R uygulanmasının hedef organ ya da dokuyu hasardan koruyabilen adenosin, bradikinin ve opioidler gibi endojen otokoidler oluşturduğuna inanılır. ii) Hedef organ ya da dokuya uzak organ ya da dokudan taşınan koruyucu sinyaldir. Kardiyoprotektif sinyal beyin sapına iletilmektedir ve dolaşıma bırakılan humoral

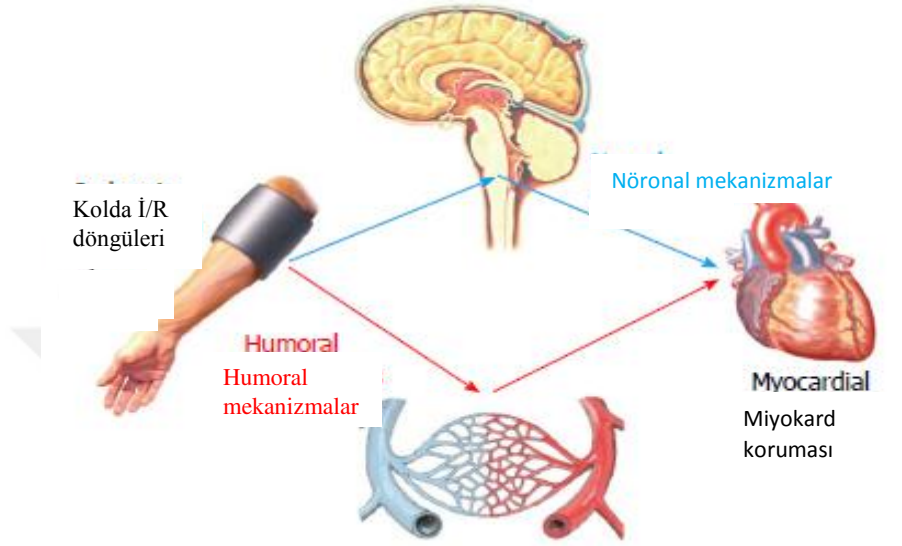
faktör(ler), nöronal mekanizmalar ve/veya sistemik yanıtlar gibi çoklu faktörler aracılığıyla etki oluşmaktadır. iii) Koruyucu etki sunan olaylar hedef organ ya da dokuda ortaya çıkmaktadır (75).



**Şekil 3:** Uzaktan iskemik koşullanmanın potansiyel mekanizmaları ve zamanlaması. Çeşitli intraselüler sinyal mediyatörleri RIC'nın koruyucu etkisine katılmaktadır. Organ ya da dokudan koruyucu sinyaller, hedef organ ya da dokuya üç ana mekanizmayla iletilir: (1) nöral yolak, (2) dolaşıma salınan humoral faktör(ler) ve (3) sistemik koruyucu etkinin aktivasyonu (anti-apoptotik ya da anti-inflamatuar yanıt gibi).

Sıçan kalbiyle yapılan çalışmada RIPC kardioprotektifliğinin iskeminin erken döneminde salınan ve kardioprotektif maddelerin potansiyel taşıyıcıları olarak işlev gören ekstraselüler veziküller aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (76). Ayrıca SDF-1 $\alpha$ /CXCR4, PKC, ROS, NO, Akt, Erk 1/2, p38 MAPK ve STAT5 gibi farklı sinyal mediyatörlerinin de etkili olduğu gösterilmiştir (75).

**Humoral hipotez ve potansiyel mediyatörler:** “Humoral hipotez” göre uzak bölgede İ/R döngüleriyle bölgesel birikimi olan mediyatörler dolaşıma salgılanır ve kalbe ulaşır (77) (Şekil 4).



**Şekil 4:** Uzaktan iskemik koşullanma mekanizmaları. Uzak kısımda (en yaygın olarak üst ekstremitte) uygulanan birçok İ/R döngüsünün kardioprotektif etkileri humoral ve/veya nöral yolağı aktivasyonuna yorulmuştur.

Hipotez hayvan modellerinde birçok veriyle desteklenmiştir. Humoral mediyatörler kana salgılandıktan sonra uzak kısımları etkileyeceğinden periferik dokulardan serbest bırakılmaları yavaş olmalıdır. Bu da RIPC uygulanan hayvanlarda ya da insanlarda humoral mediyatörlerin tanımlanmasını nispeten kolaylaştırmıştır. Tanımlanan mediyatörlerden bazıları; kallistatin (78), apolipoprotein A-I (79) ve stromal-türetilmiş faktör 1 $\alpha$ 'dır (SDF-1 $\alpha$ ) (80). Ayrıca potansiyel mediyatörler de tanımlanmıştır; bunlar arasında microRNA'lar (miR) (81), bradikinin, adenosin ve NO (82) vardır.

Bradikinin iskemik ve hasarlı dokulardan serbest kalarak afferent lifleri aktifleştirebilir. “Travmada RIPC” olarak bilinen kardiyoprotektif etkiye de katkıda bulunduğu düşünülmektedir (83).

Endojen maddelerin koşullanmış organ ya da dokuda üretilip üretilmediği ve kan dolaşımı yoluyla hasarlı organ hedefine nasıl taşındığı bilinmemektedir. Özetle, RIPC’nin humoral mekanizmalarının varlığı belirlenmesine rağmen mediyatörlerin doğası açık değildir. Aktivitelerinin kendi potansiyel mekanizmalarıyla ilgili olabileceği belirlenebilmiştir ve koşullanma ardından dolaşım düzeyleri yükselir (78). Yapılacak çalışmalarla varlıklarının ve RIC formlarındaki rollerinin tanımlanması gerekmektedir.

#### **Nöral hipotez:**

**Sempatik sistemin potansiyel rolü:** “Nöral hipotez” periferik bölgede İ/R döngülerinin, miyokard hasarına karşı koruyucu nöral refleks sonuçlarını aktive edebildiğini varsaymaktadır (Şekil 4). Hayvanlarda renal, mezenterik ya da femoral arterde İ/R döngüleri anlamlı kardiyak korumayla sonuçlanmıştır ve bütün durumlarda, afferent liflerin rezeksiyonu kardiyoprotektif etkiyi ortadan kaldırmıştır. Sıçanlarda, mezenterik arterde İ/R siklusları IPC ile sağlanana benzer kardiyoprotektiflik sağlamıştır; sistemik gangliyon inhibitörü heksametanyomun sempatik ve parasempatik gangliyonları bloke ederek etkiyi ortadan kaldırdığı görülmüştür (84).

Kingma ve ark. (85) izofluranla anestezi edilen köpeklerde, RIPC protokolüyle otomatik abluka uygulanması ya da kalbin cerrahi denervasyonunun iskemik hasara karşı güçlü koruma sağladığını rapor etmiştir ancak gözden kaçırılmaması gereken güçlü bir IPC ajanı olan izofluran kullanılmış olmasıdır.

RIPC süresince nöral afferent aktivasyonun kalsitonin-gen ilişkili peptid (CGRP), adenozin ve bradikinin gibi mediyatörlerin lokal birikmesiyle tetiklendiği gösterilmiştir (86).

**Vagal aktivasyon:** 1993’de Yao ve ark. (87) Asetilkolin (ACh) infüzyonuyla kalpte ön koşullanma yapılabildiğini göstermiştir.

Mastitskaya ve ark. (88) sıçanlarda viral gen transferi ile parasempatik boşalımın bozulmasını sağlayarak RIPC’nin miyokardiyal koruyuculuğundaki önemini onaylamışlardır. Çalışmalarında vagusun dorsal motor nükleusundaki nöronlarını selektif olarak bastırmışlardır ve RIPC’nin kardiyoprotektif etkisi ortadan kalkmıştır. Aynı nöronların seçici aktivasyonunda ise koruyucu etki yenilenmiştir ve bu yanıt atropinle önlenmiştir (88). Basalay ve ark. (73) sıçanlarla yaptıkları çalışmalarında miyokard iskemisinden önce ekstremitelere 25 dk. İ/R siklusları uygulayarak koruyuculuk sağlamışlardır, daha sonra periferik organ denervasyonu ya da bilateral vagotomi yaptıklarında ise koruyuculuğun ortadan kalktığını göstermişlerdir.

Reperfüzyon başında uygulanan İ/R sikluslarının kardiyoprotektif etkisi ilk kez 2005’de gösterilmiştir (89) ve RIPostC olarak adlandırılmıştır. Letal iskemi sırasında yapılan RIPerC ise ilk olarak 2007’de gösterilmiştir (71). RIPerC ve RIPostC’nin fizyopatolojisini belirleme üzerine sadece Basalay ve ark. (73) çalışmıştır. Sıçanlarda bölgesel İ/R sikluslarında afferent ileti durduğunda ya da her iki vagus siniri kesildiğinde RIPC ve RIPerC yanıtlarının ortadan kalktığını ama RIPostC etkisinin değişmediğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar RIPostC’de humoral mediyatörlerin RIPerC’de ise nöral mekanizmaların etkili olduğunu göstermiştir.

Ayrıca RPerC koruyuculuğunda muhtemelen parasempatik sistem aktivasyonunun kardiyoprotektiflikte daha etkili olduğu düşünülmüştür (73).

AMI boyunca iskemik alanda katekolamin konsantrasyonunun arttığı saptanmıştır. Salınım sinir uçlarının iskemik harabiyetiyle düzenlenir ve koroner oklüzyonda ekstraselüler norepinefrin (NE) normal plazma konsantrasyonunun 100-1000 katına çıkar, bu büyüklükte lokal konsantrasyonlar non-iskemik miyokartta bile nekroz oluşturabilir ve malign aritmileri artırabilir (90).

**Otonom fonksiyonlar:** İnsanlarda RIPC’de otonomik fonksiyonlar değerlendirmek için 2005’de, Loukogeorgakis ve ark. (91) tarafından yapılan çalışmada RIPC ile endotelyal İ/R hasarına karşı koruyuculuğu göstermek için kola yerleştirilen tansiyon manşonu 20 dk. 200 mmHg’ya şişirilerek iskemi oluşturulmuştur, iskemiye bağlı endotelyal hasardaki koruyuculuğu görebilmek için diğer kola da RIPC protokolü uygulanmıştır. Endotelyel korumayı değerlendirirken, iskemik hasarı gösteren FMD değeri başlangıç değeriyle kıyasladığında azalmanın anlamlı olduğu gösterilmiştir. Ancak bu kişilere otonom gangliyon blokörü *trimetafan* verildiğinde RIPC’nin koruyuculuğu ortadan kalkmıştır ve bu sonuçlardan yola çıkarak RIPC’nin endotelyal koruyuculuğunda otonomik aktivasyonun etkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte sempatik ya da parasempatik sisteme spesifik olmayan *trimetafan* koruyuculukta hangisinin etkili olduğunun ayırt edilmesini engellemiştir (91). 2011 yılında Enko ve ark. (92) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise mekanizma olarak parasempatik aktivasyonun etkili olduğu gösterilmiştir. Sol koldan üç siklus 5’er dk. İ/R’nin sağ brakiyel arterde anlamlı bir dilatasyon yaptığı ve eş zamanlı olarak kalp hızının güç spektral analizinde yüksek frekans alanıyla parasempatik çıkışın da arttığı gösterilmiştir (92).

**Sistemik yanıt:** RIC'nin post-translasyonel düzeyde ya da transkripsiyonel regülasyon boyunca immün hücrelerin modülasyonunu içeren sistemik koruyucu yanıtı sebep olduğu gösterilmiştir. Kısa, ön kol iskemisine maruz kalan sağlıklı gönüllülerden alınan kan örneklerinin mikro dizim analizleri proinflatuar proteinleri kodlayan genlerin baskılanmasını, doğal bağışıklık yanıtlarını, sitokin sentezini ve apoptozisi ortaya çıkarmıştır. Diğer yandan, hsp70 ve kalpastatin gibi anti-inflatuar genlerin up-regüle olduğu görülmüştür. Gen ekspresyon profilindeki bu değişikliklerin lökositlerin fonksiyonel değişiklikleri ile korale olduğu ve RIPC'yi takip eden 10 güne kadar etkisinin sürdüğü bulunmuştur (93). Karaciğer IPC ile P-selektini düzeyinin arttığı ve organlarda (akciğer, mide, pankreas, ince bağırsak ve kolon dahil) TNF $\alpha$  üretimini inhibe ederek nötrofil infiltrasyonunun azaldığı gösterilmiştir (94). Sonraki çalışmalarda farelerde uzva (95) ve mezenterik artere (96) uygulanan RIPC ile sitoprotektiflik, büyüme ve metabolizma, DNA onarımı ve redoks regülasyonu ile ilişkili genlerin up-regüle olduğu gösterilmiştir.

#### **3.4.5.2. Klinik Kullanımı**

Son yıllarda RIC mekanik kardiyoprotektifliğin en popüler biçimi haline gelmiştir, çünkü prosedür non-invaziv, tahmin edilebilir, hassas, güvenli ve özellikle koroner lezyonun neden olduğu manipülasyonu önleyici yapıdadır. İlk kez 2006 yılında Cheung ve ark. (97) konjenital kalp hastalığı olan çocuklarda cerrahi öncesi RIC (uyluğa yerleştirilen manşon dört kez sistolik kan basıncının 15 mmHg üzerine kadar 5'er dakika şişirilir/indirilir) uygulayarak peri-operatif hasarda (daha az TnI), inotrop gereksinimlerde ve havayolu basıncında azalma bildirmişlerdir böylece RIC'nin kliniğe aktarılmasının cerrahideki yüksek morbidite ve mortalitenin azaltılmasında yararlı olabildiğini göstermişlerdir. Bir yıl sonra, elektif KABG

geçiren yetişkin hastalarda cerrahi öncesi RIC'nin (üst kola yerleştirilen manşon üç kez 5'er dakika 200 mmHg'ya şişirilir/indirilir) peri-operatif hasarı azalttığı (%43 daha az TnT) gösterilmiştir (98).

RIPC girişimsel (99) ve cerrahi revaskülarizasyonda (100) kullanılmıştır ve tüm nedenlere bağlı mortalite de azalma olduğu gösterilmiştir. Çalışmaların tamamında serbest kalan biyomarkerlar ya da enfarkt boyutunda azalma bildirilememiştir (20) (101) (102). Negatif çalışmaların ortak özelliğinin ise anesteziye RIPC koruyuculuğunu ortadan kaldıran propofol kullanımı olabileceği gösterilmiştir.

AMI hastalarında primer PCI öncesi RIC kullanılan çalışmada miyokardiyal kurtarmanın arttığı ancak biyomarker salınımı veya enfarkt boyutunda anlamlı bir azalma olmadığı gösterilmiştir (103). Başka bir çalışmada ise alt ekstremiteye uygulanan RIPC'nin AMI geçiren hastalarda biyomarker salınımı ve enfarkt boyutunda azalma sağlayabildiği gösterilmiştir (104).

RIPC ve RIPC'nin beraber kullanıldığı bir çalışmada elektif kardiyak cerrahi geçiren hastalarda klinik yarar elde edilemediği bildirmiştir (105). Ayrıca, AMI'da primer PCI uygulanan hastalarla yapılan küçük ölçekli bir çalışmada RIPC ile beraber uygulanan lokal IPostC'nin ilave koruma sağlamadığı görülmüştür (106). Bu yüzden mortalitenin primer son nokta olduğu müdahalelerde devam eden RIC çalışmalarından ERICCA (107) (NCT 1247545), RIPHeart (NCT 01067703) ve CONDO II (NCT 01857414) gibi çok merkezli, randomize, kontrollü klinik çalışmaların sonuçları beklenmektedir böylece RIC'nin KABG cerrahisinde kliniğe gerçekten yararlı olup olmadığı daha açık hale gelecektir.

Özetle, negatif çalışma sonuçları olsa da mekanik ve farmakolojik koşullanma stratejileri, elektif veya acil koroner revaskülarizasyon uygulanacak hastalarda kardiyoprotektiflik için terapötik seçenekler sunmaktadır. Hem pozitif hem de negatif klinik çalışmaların çoğu küçük çaplıdır. Pozitif çalışmalar iyi kontrol edilen koşullar altında yürütülürken, negatif çalışmalar hasta alımı ve prosedürler açısından daha az seçicidir (anestezi, cerrahi) ayrıca koruma eksikliği hasta gruplarındaki farklı risk faktörleri, komorbiditeler ve kullanılan ilaçların yanı sıra öncesinde yapılan deneysel çalışmalarda ilaç hedeflerinin kötü seçimi ve klinik çalışmaların yetersiz tasarlanmasına bağlı olabilir (20) (38) (67).

### **3.5. Risk Faktörlerinin Kardiyoprotektif Stratejiler Üzerindeki Etkileri**

1995 yılında yapılan çalışma ile hiperlipidemi IPC kardiyoprotektifliğinin ortadan kalkmasıyla ilişkili ilk kardiyovasküler risk faktörü olarak bulunmuştur (108). O zamandan beri de hiperlipidemiye ek olarak diğer önemli risk faktörlerinin ve/veya bunları hedef alan ilaçların çoğunun, kardiyoprotektif sinyalizasyonu modifiye edebileceği, iskemik veya farmakolojik koşullanma yoluyla sağlanan kardiyak korumanın zayıflamasına yol açabileceğine ait pek çok veri elde edilmiştir (20) (Tablo 2).

**Tablo 2:** İ/R hasarında ön, ard ve uzaktan koşullanmanın koruyuculuğunda risk faktörlerinin etkisi

| Risk faktörü                                    | İ/R hasarı | Ön koşullanma | Ard koşullanma | Uzaktan koşullanma |
|-------------------------------------------------|------------|---------------|----------------|--------------------|
| Yaşlanma                                        | ↑          | ↓             | ↓              | — CL               |
| Hipertansiyon, hipertrofi ve yeniden modellenme | —          | —             | ↓              | N.D.               |
| Hiperlipidemi                                   | ↑          | ↓CL           | ↓              | N.D.               |
| Diyabet                                         | ↑          | ↓CL           | ↓              | ↓CL                |
| Üremi, böbrek yetmezliği                        | ↑          | —             | —              | N.D.               |
| Engellenmiş koroner mikrosirkülasyon            | ↑          | —↑            | ↓              | N.D.               |

CL, bazı klinik veriler mevcuttur; N.D., mevcut veri yok; ↑, artış; ↓, azalış, —, hiçbir etki görülmemiştir.

Çalışmamızda sıçanlara pinealektomi (Px) uygulayarak risk faktörlerinden bir veya daha fazlası hızlı şekilde oluşturulmuştur ve RPerC'nin koruyucu etkisinin azalıp azalmadığı ve farmakolojik olarak verilen melatoninin hem Px hem de Non-Px gruplarda kardiyoprotektifliğe etkisi incelenmiştir. Çünkü bu azalma IPC ve IPostC'de bilinmesine rağmen, RPerC için yeterince incelenmemiştir.

### 3.6. Pineal Bez

Pineal bez, varlığı çok eski zamanlardan beri bilinen bir yapıdır. İlk kez M.Ö. 3. yüzyılda Herophilus tanımlanmıştır ve yapısı Vesalius tarafından ayrıntılı olarak incelenmiştir. Hint felsefesinde de pineal beze rastlanmaktadır, daha gerçekçi ve derinlemesine görebilen üçüncü göz olarak kabul edilmiş. Descartes ise pineal bezi ruhun merkezi olarak düşünmüştür. Varlığı çok eski zamanlardan beri bilinse de temel hormonu melatoninin biyosentezi ve kimyasal yapısı çok sonraları ortaya konulabilmiştir (109).

İnsanlarda ortalama 120 - 150 mg, sıçanlarda ise 0,9 - 1,56 mg ağırlığında olan pineal bez, epiphysis cerebri, corpus pineale, glandula pinealis gibi adlarla da anılmaktadır. Pineal bezin şekli adından da anlaşılacağı gibi kozalağa benzemektedir (110).

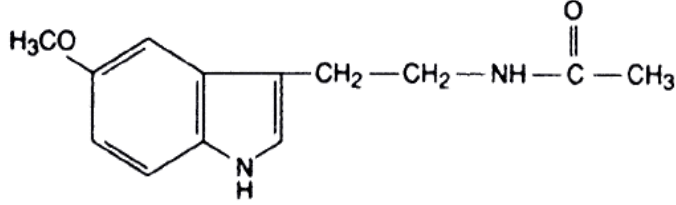
Pineal bezin (epifiz bezi) endokrin aktivitesi önemli ölçüde sinirsel inervasyonla olmaktadır ve nöroendokrin transdüser olarak elektriksel sinyalleri hormonal sinyallere çevirir. Ortamda ışık veya karanlık olmasına göre (melatonin hormonunun üretimi ışıktaki azalırken karanlıkta artmaktadır) organizmanın birçok sisteminin (başta endokrin sistem) fonksiyonunu düzenler ve hipotalamustaki suprakiazmatik nukleus (SCN) ile birlikte biyolojik saat görevi yapar böylece günün ve yılın farklı zamanlarına bağlı fizyolojik siklusları düzenler. Retinohipotalamik pineal sistem, fotoreseptörlerden retinal sinirlerle başlar ve SCN'ye iletilir, oradan servikal ganglion ve postganglionik sempatik liflerle pineal beze ulaşır. Pinealositlerden NE salınmasıyla sekretuar fonksiyonlar başlar ve günlük sentez ritmi SCN'deki "pacemaker"lar ile sağlanmaktadır (111).

### **3.6.1. Melatonin**

Pineal bezden salgılanan ve melatonin olarak adlandırılan hormonun varlığı ilk olarak 1958 yılında Lerner ve ark. (112) tarafından yapılan çalışma ile dikkatleri çekmiştir. Bu bezden salgılandığı bilinen iki grup endojen maddeden biri olan indolaminlerden, en önemlisi 232 molekül ağırlığıyla melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) hormonudur (113) (Şekil 5).

Melatonin vücudun sirkadiyan ritimleri, uyku, ruhsal durum, mevsimsel üreme fizyolojisi ve retinal fizyolojide güçlü bir biyolojik modulatördür. Ayrıca

yaşlanmayla ilgili süreçler ve hastalık durumlarında etkisini gösteren deneysel çalışmalar güçlü bir antioksidan da olduğunu göstermiştir (109) (114).

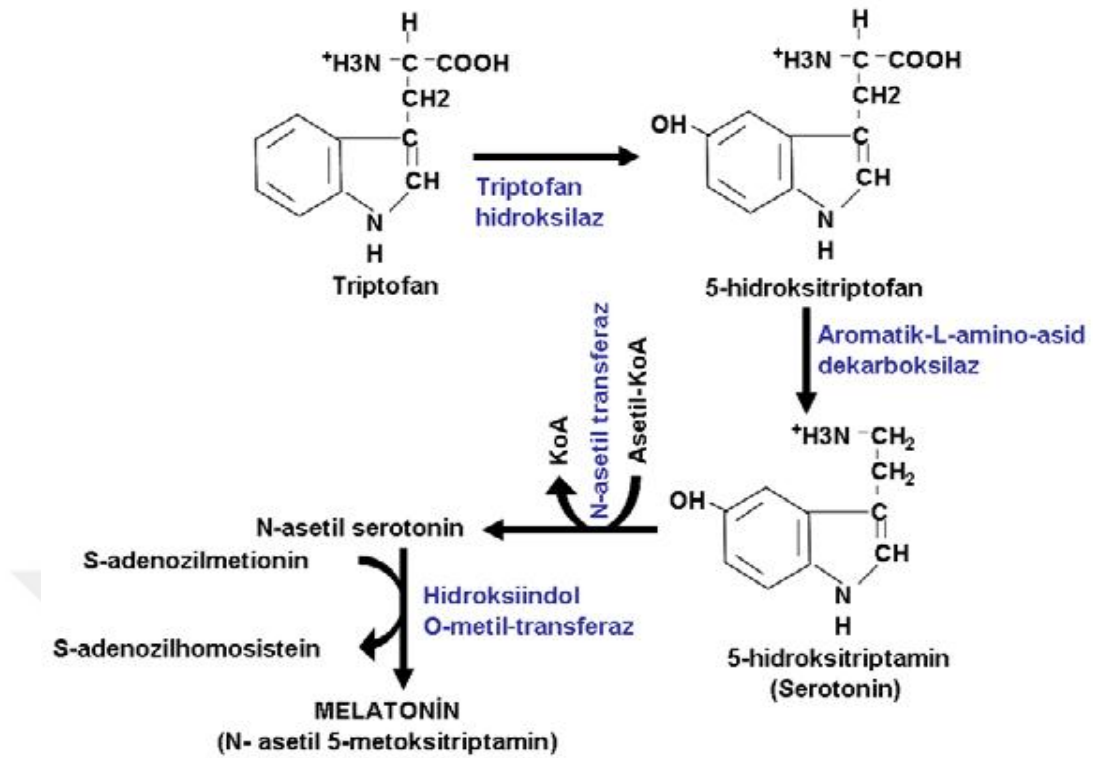


**Şekil 5:** Melatoninin kimyasal yapısı

#### 3.6.1.1. Sentezi ve Salınımı

Melatonin sentezi pineal bez tarafından sistemik dolaşımdan alınarak pinealositlere ulaştırılan esansiyel indol amino asiti L-triptofan ile başlar (111). Triptofan pinealositlerde, triptofan 5-hidroksilaz enzimi ile hidroksillenerek 5-hidroksitriptofan elde edilir. 5-hidroksitriptofan, 5-HTP dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) enzimiyle dekarboksillenir ve 5-hidroksitriptamin (serotonin) oluşur. Serotoninden serotonin-N-asetil transferaz (NAT) ile N-asetil-5-hidroksitriptamin sentezlenir ve son aşamada hidroksiindol-o-metil transferaz (HIOMT) enziminin N-asetil-5-hidroksitriptamin'i N-asetil-5-metoksitriptamin'e (melatonin) dönüştürmesiyle sentez tamamlanır (115) (Şekil 6).

Melatonin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan NAT'ın salınımı gün içi ritim gösterir ve her zaman geceleri yükselir. Işık cAMP ve NAT düzeyini düşürmektedir (115).



Şekil 6: Melatonin sentezi.

Melatonin sentezi sadece pineal bezde olmamaktadır. Px sıçanlarda düzeyinin azaldığı ancak tamamen yok olmadığı görülmüştür. Pineal bez dışında, diffüz nöroendokrin sistemin parçası olan APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) hücrelerinde, gastrointestinal kanaldaki enterokromaffin hücrelerinde de anlamlı miktarda melatonin sentezi olmaktadır. Melatonin; böbrek, karaciğer, tiroid, plasenta, timüs, solunum yolları, adrenal bezler, mast hücreleri gibi nöroendokrin karakterde olmayan hücrelerde ve natural killer (NK) hücreleri ile eozinofilik lökositlerde de tespit edilmiştir. Fakat pineal bez dışındaki melatoninin parakrin etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (116). Yapılan çalışmalarla SCN'nin de melatonin sentezlediği ancak bu sentezin sirkadiyan bir ritmi olmadığı gösterilmiştir (117).

Gündüz fazında pineal bez ve presinaptik terminallerde serotonin miktarı maksimum düzeydedir ve sürekli olarak depolanır. Karanlıkta SCN'den gelen uyarı ile postsinaptik aralıkta NE salınımı maksimum düzeye çıkar ve postsinaptik pinealosit membranında bulunan  $\beta_1$  (melatonin sentezinin %85'i) ve  $\alpha_1$  (sentezin %15'i) adrenerjik reseptörlerine NE bağlanır. Hücre membranına bağlanan NE, adenilat siklaz enzimini aktive eder ve oluşan cAMP, NAT enzimini aktifleştirir. Böylece melatonin sentezi artar. Sentezlenen melatonin depolanamaz, pinealositlerden komşu kapillere bırakılarak sistemik kan dolaşımına karışır ve amfoterik (hem lipofilik hem de hidrofilik) bir madde olduğundan BOS (beyin-omurilik sıvısı) dahil tüm doku ve sıvılara da kolayca dağılır bu nedenle plazma melatonin düzeyiyle sentezi arasında güçlü bir korelasyon bulunmaktadır (114).

NE reuptake inhibitörleri, nöroleptikler ve serotonin reuptake inhibitörleri melatonin sentezini artırırken;  $\beta$ -adrenerjik antagonistler, benzodiyazepinler, monoamin tüketen ajanlar, triptofan eksikliği ve nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ise sentezi azaltırlar (118).

#### **3.6.1.2. Sekresyonunun Düzenlenmesi**

Pinealositlerin ışığa duyarlılıkları nedeniyle aydınlıktaki supresyon karanlıkta ortadan kalkar ve salgı tekrar artar. Melatonin salınımı özel bir sirkadiyen ritime sahiptir. Bu hormon saat 21:00-22:00'de artmaya başlayarak 02:00-04:00 civarında en üst seviyesine ulaşır ve 05:00-07:00 gibi azalmaya başlar. 07:00 sonrası bazal seviyelere düşer. Melatoninin gündüz yaklaşık 0-20 pg/dl olan kan konsantrasyonu gece 50-200 pg/dl'ye (3-10 kat) kadar yükselir ve tüm gece boyunca ortalama 30 mg melatonin sentezlenir (119). Akşam saatlerinde farmakolojik melatonin alımı ise endojen melatonin salınımını erken başlatır (111).

### **3.6.1.3. Metabolizması**

Melatonin %60-70 oranında albumine bağlanarak taşınır. Karaciğer ve böbrekte metabolize edilir ancak metabolizmasının temel kısmı karaciğerde olmaktadır. Karaciğerde mikrozomal enzimler tarafından en önemli metaboliti olan 6-hidroksimelatonine dönüştürülüp böbrekte sülfat (%50-80) ve glikronik (%5-30) deriveleri şeklinde konjugasyona uğrar, %1'lik kısmı ise değişmeden atılır. Melatonin hem hidrofilik hem de lipofilik olduğundan tüm hücre membranlarını kolayca geçebilir ve idrar dışında az bir kısmı tükürük, safra, serebrospinal sıvı gibi dokulardan da atılır (120). İdrardaki başlıca metaboliti, 6-sülfotoksimelatonin'dir. Yarılanma ömrü 3-45 dakikadır (121).

N-asetil-serotonin'in de melatonin metaboliti olduğu belirlenmiştir. Bu metabolit aynı zamanda sentez aşamasındaki maddelerindendir ve metabolitin sentezde kullanılabilmesi kompleks bir feedback mekanizma olduğunu göstermektedir (122). Biyoyararlanım çalışması sonucunda, 80 mg oral melatonin alındığında gece serum konsantrasyonunun normal endojen düzeyden 10000 kat fazla olduğu bildirilmiştir (123).

### **3.6.1.4. Etki Mekanizması**

Melatonin etkisini hedef dokulardaki özgül reseptörler aracılığıyla gösterir. Retina, beyin, hipofiz bezi ve periferik dokuların çoğunda (dalak, eritrosit, lökosit, tiroid bezi, timus, plasenta, endometrium ve gastrointestinal sistem gibi) melatonin reseptörlerinin bulunduğu bildirilmiştir (124).

Melatoninle ilgili üç grup reseptör tanımlanmıştır. Bunlar G proteinine bağlanan MT1 (afinitesi yüksek (pikomolar)) ve MT2 (afinitesi düşük (nanomolar)) reseptörleri ile en son bulunan MT3 (guanin redüktaz ailesinden) reseptörleridir.

MT1 reseptör aktivasyonu hedef hücrede adenilat siklazı suprese eder, böylece cAMP düzeyinin düşmesine neden olur. Bu reseptörlerin retina fonksiyonlarından, üreme işlevlerinden, sirkadiyen ritimden ve serebral arter kontraktilitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (124). MT2 reseptörleri aktive olduğunda fosfoinozitolün hidrolizini harekete geçirir. Bu reseptörlerin dağılımı ise henüz tam olarak belirlenememiştir. Hücreye kolayca geçebilen melatonin burada yapısal proteinlerle de etkileşebilir; sitozolik kalmodüline direk bağlanarak,  $Ca^{2+}$  sinyalini etkileyebilir (125).

#### **3.6.1.5. Fizyolojik Fonksiyonlar Üzerine Etkileri:**

Yapılan çalışmalarla melatoninin çeşitli fizyolojik fonksiyonlar üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bunlardan bazıları:

- Üreme fizyolojisi üzerine etkisi (114),
- Endokrin sistemi düzenleyici etkisi (114),
- İmmün sistem üzerine hem direk hem de dolaylı etkisi (126),
- Kanseri dokunun büyümesi üzerinde direk inhibisyon etkisi (127),
- Uyku ve uykuya geçiş süresi üzerine etkisi (128)

#### **3.6.1.6. Yaşlanmanın Etkisi**

Literatüre girmiş çalışmalar göstermektedir ki fizyolojik melatonin konsantrasyonu, kişiler arasında farklılık olmakla beraber, yaş ilerledikçe %40-50 oranında düşmektedir (129). Yeni doğanlarda serum melatonin konsantrasyonu çok düşük seviyelerde seyreder (109), sirkadiyen ritme başlaması doğumdan sonra 2-3. haftayı bulmaktadır (114). 1-3 yaş arasında geceleri serum pik seviyeleri yüksek değerlere (325 pg/ml -1400 pmol/l) ulaşır. Cinsel olgunlaşma sırasında azalan plazma melatonin 500 pmol/l'nin altına düştüğünde GnRH (Gonadotropin Releasing

Hormon) salgılanması artarak puberteyi başlatır. Melatonin yetişkin düzeylerine gençlik döneminde ulaştığı, bu seviyede 35-40 yıl kadar sabit kaldığı gösterilmiştir (130) ve yetişkin plazma değeri yaklaşık 40-260 pmol/l olarak saptanmıştır (111). Sonra yavaş yavaş düşüş başlar. İlerleyen yaşla birlikte belirginleşen azalmanın yanında ritimde de bozulma meydana gelir (sağlıklı yaşlılarda azalma olmayabilir). Humbert ve Pevet (131) 60 yaşın üzerindeki kişilerde hem gündüz hem de gece melatonin seviyelerinin düştüğünü göstermişlerdir, böylece fizyolojik melatonin konsantrasyonu ile yaşlanma arasındaki ilişkiye dikkat çekmişlerdir.

Deneyisel çalışmalarla da yaşlanan hayvanların sirkadiyen ritimlerinin bozularak aydınlık ve karanlıkta ölçülen melatonin düzeylerinin neredeyse eşit hale geldiği gösterilmiştir ancak buna ait mekanizma hala tam olarak anlaşılamamıştır (114). Yaşlanma sürecindeki işlevsel ve anatomik bozulmada etkili olduğu düşünülen faktörler:

- Yaşlanma sürecinde pineal bezin  $Ca^{2+}$  kalsiyum depolarında kireç taşı oluşması sonucu bez kalsifiye olmaktadır bu da melatonin seviyesini azaltır.
- Yaşla birlikte, azalan melatonin hormonunun antioksidan kapasitesi de azalır ve serbest radikal oluşumu hasara neden olur çünkü melatonin hormonunun beyin dokusunu oksidatif hasardan koruyucu, antioksidan enzimleri uyarıcı ve lipit peroksidasyonunu azaltıcı etkisi bulunmaktadır (129).
- Yaşlanmanın pinealosit membranında bulunan  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin sayısını ve NE duyarlılığını azalttığı gösterilmiştir. Bu durumda  $\beta$ -adrenerjik reseptörler karanlık ortamda, pineal beze sempatik nöronlardan NE salgılanmasına aracılık ederek melatonin sentezini arttıran bir dizi olayı başlatamamaktadır.
- Sentezde anahtar enzim olan NAT aktivitesi, melatonin seviyesindeki azalmayla beraber azalmaktadır (132).

### **3.7. Melatonin ve İskemi-Reperfüzyon Hasarı**

İnsanlarda, melatonin reseptörlerinden MT1 ve MT2'nin kardiyomiyositler dahil olmak üzere kardiyovasküler sistemin (133) (134) çeşitli dokularında yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir (135). Koroner arterlerde, MT1 reseptör aktivasyonunun vazokonstriksiyon (133), MT2 reseptör aktivasyonunun ise vasodilatasyon yaptığı düşünülmektedir (134). Deneysel İ/R çalışmalarında melatoninin vazokonstriksiyonu ve ventriküler aritmilerin insidansını azalttığı (136), bunun yanında MT1 ve MT2 reseptörleri üzerinden koroner kan akımını ve kardiyak fonksiyonu artırdığı kanıtlanmıştır (137). Ön çalışma bulguları MT1 reseptörünün koroner arterlerde sirkadiyen ritmi olduğunu düşündürmektedir (138), ancak fonksiyonel ilgisi hakkında daha fazla araştırma yapılmalıdır.

Melatonin toksisitesine ait çalışmalarda çeşitli konsantrasyonlarda oral veya intravenöz melatonin kullanımı ile ilgili istenmeyen etki bildirilmemiştir (139). Aksine ciddi yan etkileri olan çoğu ilacın toksisitesini azalttığı gösterilmiştir (140).

#### **3.7.1. Melatonin ve Oksidatif Stres**

İ/R hasarının patogenezi, birçok farklı biyolojik mekanizma içeren çok faktörlü bir süreçtir. ROS oluşumu, özellikle  $O_2^{\bullet-}$  radikali, hücre ve ileri doku hasarına neden olan lokal inflamatuvar yanıtları başlatarak hücre hasarına neden olan mekanizmalardan biridir (18). Melatonin ve metabolitleri, serbest radikal temizleyicileri olarak uzun zamandır bilinmektedir (141) ve melatonin glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi anti-oksidatif enzimleri uyarıcı etkisiyle de dolaylı bir antioksidan olarak işlev görmektedir (142). Melatoninin OH radikali ortadan kaldıran böylece lipid peroksidasyonunu engelleyen güçlü bir antioksidan olduğu (114) ve bu radikali nötralize etme kapasitesinin GSH'dan 5,

mannitolden 15 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (143). –OH radikali ile reaksiyona giren melatonin ortamda  $O_2^-$  radikalini tutan indolil katyonuna dönüşerek antioksidan aktivite göstermektedir (144). Melatoninin yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve uzun süre kullanımında (5 yıla kadar) bile toksik etkisinin olmaması önemli bir avantajıdır. Bazı antioksidanlarda olan prooksidan aktivite melatoninde görülmemiştir. Hücre çekirdeğine girebildiğinden DNA'yı hasardan koruyabilmek gibi üstün bir özelliğe sahiptir (144). Böylece melatonin ROS'a maruz kalan dokulardaki hasarı hafifletebilir.

Non-polar yapısından dolayı, melatonin tüm hücre membranlarına penetre olabilir ve İ/R sırasında ROS'un büyük kısmının olduğu mitokondride en yüksek hücre içi konsantrasyona ulaşır (145). Dahası, reperfüzyon sırasında yıkıcı mekanizmalardan birinin mPTP açılması olduğu gösterilmiştir (10) ve çalışmalar melatoninin mPTP açılmasını inhibe ederek miyokardiyal İ/R hasarına karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir (146).

Resept rden bağımsız anti-oksidatif özellikleri yanında miyokardiyal İ/R hasarına karşı melatoninin indüklediği kardiyoprotektifliğin reseptöre de bağımlı olabileceği (147) ve yakın zamanda yapılan çalışmalarla hem kısa hem de uzun dönemde koruma sağladığı gösterilmiştir (148).

### **3.7.2. Melatonin ve İnflamasyon**

Fagositler istilacı organizmaları  vreledikten sonra inflamatuvar yanıtın başlaması ve serbest radikaller vasıtasıyla bu organizmaların tahrip edilmesi gereklidir. Fakat sepsiste ve çoklu organ yetmezliğinde olduğu gibi inflamatuvar yanıt meydana gelmezse oluşan serbest radikaller geniş doku hasarına yol açabilir (149). Melatoninin doğrudan etkiyle toksik serbest radikalleri süpürme kabiliyeti tüm

organlarda bu hasarı hafifletebilir (141). Dahası melatonin, transkripsiyon faktörünün ve nukleer faktör-kappa B'nin (NfκB) çekirdeğe translokasyonunu önleyerek interlökinler ve TNFα gibi çeşitli pro-inflamatuar sitokinleri down-regüle edebilir (150). İlaveten melatoninin polimorfonükleer lökositlerin inflamatuvar bölgelere çekilmesini ve artmış NK hücre aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (151).

Melatoninin antioksidan, anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkileri sepsis ve çoklu organ yetmezliği için uygun bir farmakolojik araç olmada umut verici hale getirmiştir, ancak patolojide aktivitesinin tam olarak anlaşılamamıştır (149).

### **3.7.3. Sirkadiyen Ritim**

Hipotalamusta bulunan SCN çeşitli döngüsel fonksiyonların ana düzenleyicisidir (152). Kardiyovasküler sistemde nabız, kan basıncı ve endotel fonksiyonları günlük ritimler sergilediği ve ritimlerin muhtemelen melatoninerjik sistem tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (153).

Retrospektif bir çalışma ile AMI hastalarında en büyük enfarktüsün sabah 6:00 ile öğlen vakti arasında (karanlıktan aydınlık periyoda geçerken) meydana geldiği gösterilmiştir, bu da enfarkt boyutunun da sirkadiyen döngüye tabi olduğunu göstermiştir (154). İ/R hasarında bu gündüz bağımlı toleransın kardiyomiyosit sirkadiyen saati aracılığıyla olduğu düşünülmüştür (155). Koroner arter hastalığında ve AMI'da nokturnal melatonin sentezinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, kardiyovasküler olaylar ve sirkadiyen ritim arasındaki muhtemel ilişki kısmen kardiyovasküler hastalıktaki sirkadyen ritim ile ilişkilendirilmiştir (156). Fakat kardiyovasküler hastalıklarda düşük melatonin seviyelerinin, serbest radikal temizleyici etkiye bağlı olarak melatonin tüketiminden mi yoksa azalmış melatonin sentezinin oksidatif stresten korumada yetersiz kalmasında mı kaynaklandığı hala

belirsizliğini korumaktadır (157). Koroner arter hastalığında sık kullanılan  $\beta$ -blokörlerin,  $\beta$ 1-adrenerjik reseptörlerini spesifik inhibisyonu yoluyla melatoninin üretimini de azalttığı bilinmektedir (158) bu da düşük melatonin düzeyleri hakkında başka bir açıklama sunabilir.

Özetle, melatonin antioksidan, anti-inflamatuar ve kronobiyotik düzenleyici fonksiyonlar sergiler ve bu fonksiyonlar melatoninin insanlarda İ/R hasarının zayıflatılması için umut verici bir madde olarak ilgi çekmesini sağlar.

### **3.8. Çalışmanın Amacı**

Literatür taraması sonucunda melatoninin RPerC üzerindeki etkilerine ve mekanizmalarına ait herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Koşullanmaların miyokardiyal İ/R hasarını azalttığı yollarda melatoninin de etkili olduğunu gösteren çalışmalar ve yaşlanma ile azalan melatonin düzeyinin birçok kardiyavasküler hastalıkla (koşullanmaların koruyuculuğunun da ortadan kalktığı) ilişkili olabileceğinden yola çıkarak bu çalışma ile;

1. RPerC'nin İ/R'ye bağlı nekroz üzerindeki muhtemel koruyuculuğunun gösterilmesi ve aracı moleküllerin ortaya konulması
2. Pinealektomi yapılarak fizyolojik melatoninin azaldığı durumlarda RPerC'nin İ/R'ye bağlı enfarkt alanı üzerindeki muhtemel koruyucu etkisinin devam edip etmediğinin ve dışardan melatonin verildiğinde RPerC'nin etkilerinin nasıl değişeceğinin belirlenmesi,
3. RPerC ve melatoninin nekrotik gen Cybb ve HIF-1 $\alpha$  üzerinde rolünün saptanması,

4. RPerC'nin olası mekanizmalarında rolü olduğunu düşündüğümüz inflamasyon mediyatörlerinden NfκB düzeylerinin ne yönde değiştiğinin belirlenmesi,
5. RPerC ve melatonin uygulamalarının İ/R'ye bağlı nekroz alanına etkileri ve moleküler mekanizması karşılaştırılarak melatoninin RPerC'nin etkilerini taklit edip edemeyeceğinin belirlenmesi,
6. İskemik kalp hastalıklarının tedavisinde (ilaç tedavisi ve kardiyak girişimler) başarının artırılmasına yönelik olarak yeni yaklaşımlar geliştirilebilmesi bakımından bilimsel birikime katkı sağlanması amaçlandı.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Deney Hayvanları ve Gruplar

Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan etik kurul onayı alınan (Karar Tarihi: 13.01.2016, Karar No: 08, Toplantı Sayısı: 2016/01) çalışmada 98 adet, 200 gr ağırlığında, 8 haftalık erkek Spraque Dawley sıçan kullanıldı. Sıçanlara 12/12 saat gün ışığı/karanlık döngüsünde, havalandırmalı, sabit ısı (21±1°C) odalarda ve ebatları uygun kafeslerde bakıldı. Beslenmeleri ad libitum olarak 8 mm'lik standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile sağlandı. Tüm deneyler 08:00 – 17:00 saatleri arasında yapıldı.

Sıçanlar öncelikle rastgele şekilde iki gruba ayrılarak 49 sıçana pinealektomi uygulandı ve böylece; (i) Pinealektomi uygulanmayan (Non-Px) grup; ve (ii) Pinealektomi (Px) uygulanan gruplar elde edildi. Bu gruplar içinden nekroz alanını değerlendirmek (n=42; Non-Px=21, Px=21) ve moleküler parametreleri analiz etmek (n=56; Non-Px=28, Px=28) için iki ana gruba ayrıldı. Daha sonra tüm sıçanlar iki aylık bekleme süresine alındı.

**Tablo 3:** Deney grupları ve uygulanacak işlemlerin tablo olarak gösterimi

#### **Nekroz değerlendirmeleri için deney grupları: 42**

---

Grup 1: Kontrol grubu olarak İ/R uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 2: İ/R ve RİPerC uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 3: İ/R ve melatonin uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 4: Px ve İ/R uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 5: Px ve İ/R ve RİPerC uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 6: Px ve melatonin, İ/R ve RİPerC uygulanan sıçanlar (n= 7)

---

## **Moleküler parametreler için deney grupları: 56**

Grup 1: Kontrol (Sham) grubu (n= 7)

Grup 2: İ/R uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 3: İ/R ve RİPerC uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 4: İ/R ve melatonin uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 5: Px uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 6: Px ve İ/R uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 7: Px ve İ/R ve RİPerC uygulanan sıçanlar (n= 7)

Grup 8: Px ve melatonin, İ/R ve RİPerC uygulanan sıçanlar (n= 7)

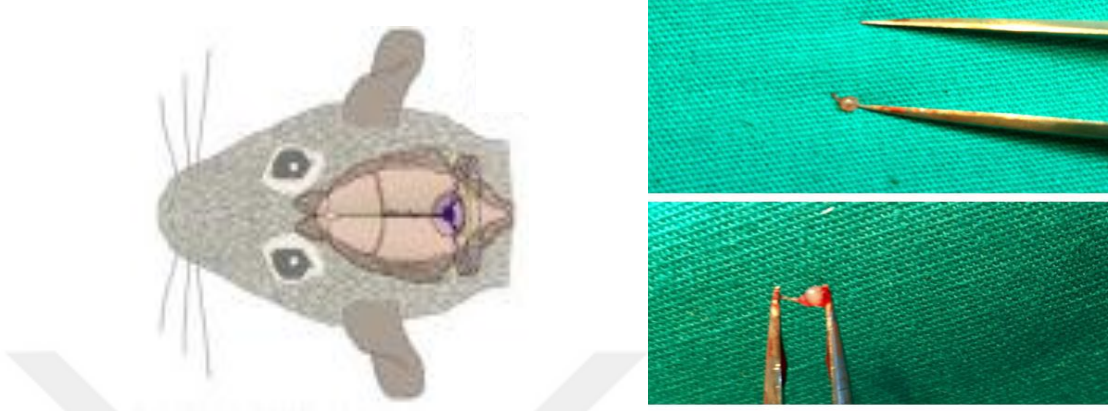
---

## **4.2. Cerrahi uygulamalar**

### **4.2.1. Pinealektomi**

Pinealektomiye başlanmadan önce anestezi olarak periton içi (ip) ketamin hidroklorid (75 mg/kg) + Xylazine (8 mg/kg) kullanıldı. Sıçanların kafası sterotaktik cihaza yerleştirilerek kafa derileri tıraşlandıktan sonra longitudinal olarak oksipital çıkıntıya uzanacak şekilde medialde 1,75 cm'lik insizyon yapıldı. Temporal kaslara ulaşınca kadar sagittal ve lambdoid sutureların bulunduğu kemiklerin periostları kazındıktan sonra dişçi turu ile rostrokaudal olarak kafatası kemiği ortalama 1,25 cm rektangular ve 0,75 cm mediolateral kesildi. Superior sagittal ven 6/0 ipek atravmatik ipele 1 mm aralıklı olarak 2 kez ligature edildi. İki ligatur arasından sagittal sinus kesilip posterior kısmı duranın diseksiyonunu izleyerek pineal bez açığa çıkana kadar geriye çekildi. Anterior taraftan ince uçlu penset yardımıyla pineal bez sap kısmından tutulup alındı. Daha sonrasında superior sagittal venin iki ucu birbirine bağlandı. Sıçanların kafa derisi 3/0 ipek iplikle dikildi. Tüm sıçanlar İ/R

alışmalarına başlanana kadar iki aylık bekleme periyoduna alındı. Pineal bezin çıkarılması dışındaki tüm cerrahi işlemler pinealektomi uygulanmayan grup üzerinde de uygulandı (159).



**Şekil 7:** Sıçan kafatasında Pineal bezin yeri ve çıkarılmış şekli.

#### **4.2.2. İskemi-Reperfüzyon Uygulaması:**

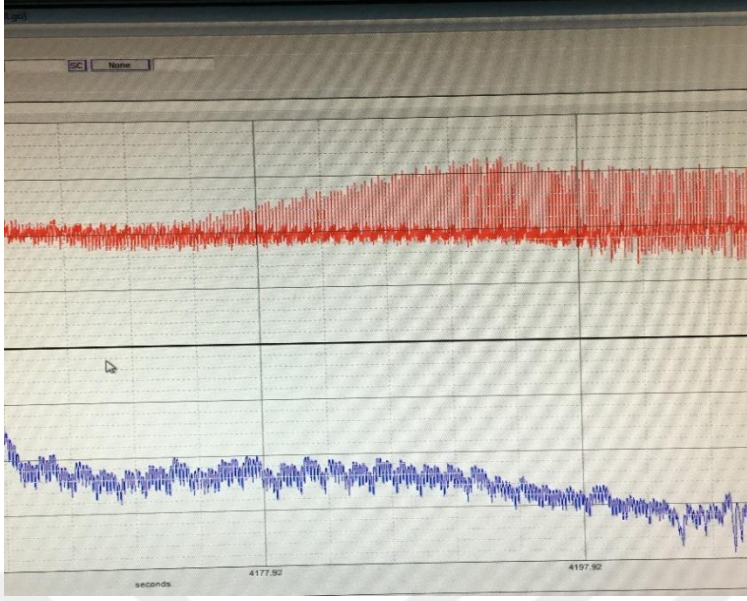
Pinealektomiden iki ay sonra, sıçanlar ip yoldan 1,2-1,4 gr/kg dozunda üretan verilerek anestezi altına alındı. Hayvanlar trakeaları kanüllenererek solunum pompasına bağlanıp yapay solunumun sağlanmasına uygun hale getirildi. Karotid artere yerleştirilen bir diğer kanülün bağlandığı transdüser (MP-36, Biopac) ve kaydedici yardımıyla kan basıncı ve EKG kaydı yapıldı. Göğsün sol tarafına 1-1,5 cm'lik kesi atıldıktan sonra cilt altı dokuları ve göğüs kasları geçilerek sternumun sol yanında dördüncü kosta kesilip sol torakotomi yapıldı. Toraks açıldığı anda vücut içindeki negatif basınç ortadan kalktığından solunum devamı ve normal pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> ve pH değerlerini korumak için ventilasyon cihazı (Harvard Animal Rodent Ventilator) ile atmosfer havası 1,5ml/100gr hacim ve 60 atım/dakika hızda verilerek pozitif basınçlı solunum uygulanmaya başlandı. Perikardiyum yavaşça ve dikkatli bir şekilde sıyrılarak kalp serbestleştirildikten sonra göğsün sağ yanına hafifçe basılıp

dışarı alınan kalbe 10 mm'lik yuvarlak uçlu iğne yardımıyla 6/0 ipek ip sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızlıca geçildi. Sonrasında kalp tekrar göğüs boşluğuna yerleştirilerek 20 dakika stabilizasyon için beklendi (Denekler, Lambeth Conventions'da belirlenen değerlendirme kriterleri göz önüne alınarak bu işlemlere bağlı herhangi bir aritmi görülmesi ya da ortalama kan basıncının oklüzyon öncesi 70 mmHg'nin altına düşmesi halinde çalışma dışı bırakıldı).

LAD etrafına yerleştirilen ipin uçları 1 mm çap ve 1 cm boyda plastik tüp içinden geçirildi ve 20 dakikalık stabilizasyon sonunda ip, plastik tüp ve klemp yardımıyla sıkıştırılarak damarın kapatılması (oklüzyon) sağlandı (Şekil 8). Oklüzyon EKG'de ST segment yükselmesine, aritmilere ve tıkalı alanda renk solukluğuna neden oldu. Nekroz değerlendirilmesi ve moleküler parametrelerin saptanması için gruplara 30 dakika iskemi uygulandıktan sonra klemp açılıp tüp içerisindeki ip gevşetilerek dokunun 120 dakika boyunca yeniden kanlanması (reperfüzyon) sağlandı. Deneye son verilmeden önce heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç, İstanbul, Türkiye) enjekte edildi ve karotid arterden kanatılarak sakrifiye edildi (159).



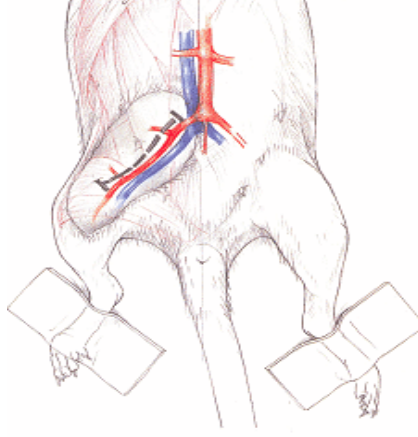
**Şekil 8:** LAD ligasyonu ve nekrotik bölgenin gösterimi.



**Şekil 9:** İskemi başladığı anda EKG ve kan basıncındaki değişimler

#### **4.2.3. Uzaktan İskemik Perkoşullanma Uygulaması**

Koşullanma uygulanacak deney gruplarında, İ/R için hazırlanan sıçanların sağ arka bacaklarında femoral arter ve ven bağ dokuları ve femoral sinirlerinden izole edildi (Şekil 10). Stabilizasyon süresi sonunda kalpte 30 dakikalık iskemi başladığında femoral arter ve ven metal damar klemp kullanılarak oklüze edildi. Koşullanma için uygulanan bu oklüzyonlar klemp kullanılarak damarın 5 dakika sıkıştırılıp 5 dakika gevşetilmesi yoluyla üç döngü şeklinde 30 dakika boyunca uygulandı. Üç döngülük oklüzyon-reperfüzyon bitince hayvanlar 120 dakikalık reperfüzyon sürecine bırakıldı (160).



**Şekil 10:** Sıçanda femoral arter ve ven.

#### **4.3. İlaç Uygulanması**

Melatonin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.) 10 mg/kg dozda olacak şekilde saf etanolde çözülerek stok solüsyon hazırlandı ve bu stok deneylerin yapıldığı süre boyunca ışık almayacak şekilde -20<sup>0</sup> C saklandı. Stok solüsyon uygulanmadan önce serum fizyolojik (% 0,9 NaCl) ile sulandırıldı. Melatonin uygulanmayacak gruplara ise aynı süre ve miktarda sadece serum fizyolojik verildi. Melatonin ve çözücünün uygulanması İ/R deneylerinden 10 gün önce başladı ve 10 gün süreyle her gün aynı saatte ip olarak enjeksiyon yapıldı, son enjeksiyon ise denek üzerinde çalışılacağı gün yapıldı.

#### **4.4. Nekroz Alanının Belirlenmesi**

Deney süresi sonlandığında sakrifiye edilen sıçanın kalbi 12 saat dondurucuda bekletilmek üzere alüminyum folyoya sarıldı. Dondurulmuş kalpler 2 mm kalınlığında dilimlenip %1'lik trifenil tetrazolyum klorid (TTC) (VWR chemicals, UK) içeren tamponda (pH=7.4) 37°C' de 15-20 dakika inkübe edildi. TTC; dokuda NADH, dehidrojenazlar ve diaforazlar bulunduğu formazan pigmentlerini indirgeyen bir boyadır ve canlı dokular bu enzimleri ve faktörleri

içerdiklerinden koyu kırmızı renkte boyanırken, enfarkt alanlarında boyanma olmaz. Boyamadan sonra kalp dilimleri aralarında 2 mm boşluk olan iki cam levha arasına konuldu. Cam levha üzerinden canlı doku ve nekrotik doku şeffaf bir asetat üzerine çizildi. Image J programı ile ölçülen enfarkt alanı kalbin yüzdesi olarak ifade edildi (159).

#### **4.5. Laboratuvar Analizleri**

Sıçanlardan alınan kalp örnekleri -80<sup>0</sup> C’de saklandı. Örnekler Cybb, HIF-1 $\alpha$  ve Nf $\kappa$ B mRNA ekspresyonlarının belirlenmesinde kullanıldı. Tüm parametreler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında bulunan Moleküler Analiz Laboratuvarında, q-Real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) yöntemiyle belirlendi.

##### **4.5.1. RNA İzolasyonu ve Spektrofotometrik Ölçümü**

30-40 g doku alınıp ependorf tüplere konularak üzerlerine 500  $\mu$ l Tri Reagent (Bioshop) eklendi. Homojenizatörde 5 dk homojenize edilip 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Tüpler içindeki homojenizatör boncukları ile birlikte 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımlar yeni tüplere aktarılacak üzere 100  $\mu$ l kloroform eklenip yaklaşık 15 sn vortekslendi. Tüpler oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildikten sonra 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra 3 faza ayrılan sıvının en üst fazı başka tüpe alınarak 250  $\mu$ l izopropil alkol eklendi. 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımlar döküldü. Pellet üzerine 500  $\mu$ l %75’lik etanol eklenip vortekslendi ve 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra etanol işlemi tekrarlandı. Süpernatant tekrar atıldı ve tüpler bir süre oda sıcaklığında

bekletilerek etanolün uçması sağlandı. Kuruyan tüplerin üzerine su eklendi ve pipetaj yapıldı. İzole edilen RNA'lar -80°C'de saklandı.

RNA ölçümü için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen/Molecular Probes) kullanıldı. RNA miktarı µg/ml olarak ölçüldü ve cDNA (complementary DNA) sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı.

#### **4.5.2. Komplementer DNA Sentezi**

cDNA sentezi için RNA örneklerinden 10 µl kullanıldı ve sentez toplam 20µl hacimde gerçekleştirildi. Sentez için 10µl RNA örneği, 2 µl 10XRT random primer, 2 µl 10XRT buffer, 0.8 µl 25XdNTP mix, 4.2 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 1µl MultiScribe™Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve 4°C'de ∞ olacak şekilde cihazda bekletildi. Oluşan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

#### **4.5.3. RT-PCR ile cDNA Amplifikasyonu:**

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında RT-PCR ile amplifiye edildi. RT-PCR 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PCR Plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 2µl kondu. Buz üzerinde her bir örnek için 5µl TaqMan Master Mix, 2.5 µl nükleaz içermeyen su ve 0.5 µl primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara kondu ve vortekslendi. Plate'deki cDNA örneklerinin üzerine 8µl hazırlanan karışımdan bırakılarak plate üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı. Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok

edilmesi amacıyla Mini plate spin cihazında 1 dakika santrifüj edildi. Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 RT-PCR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı.

#### **4.6. İstatistik**

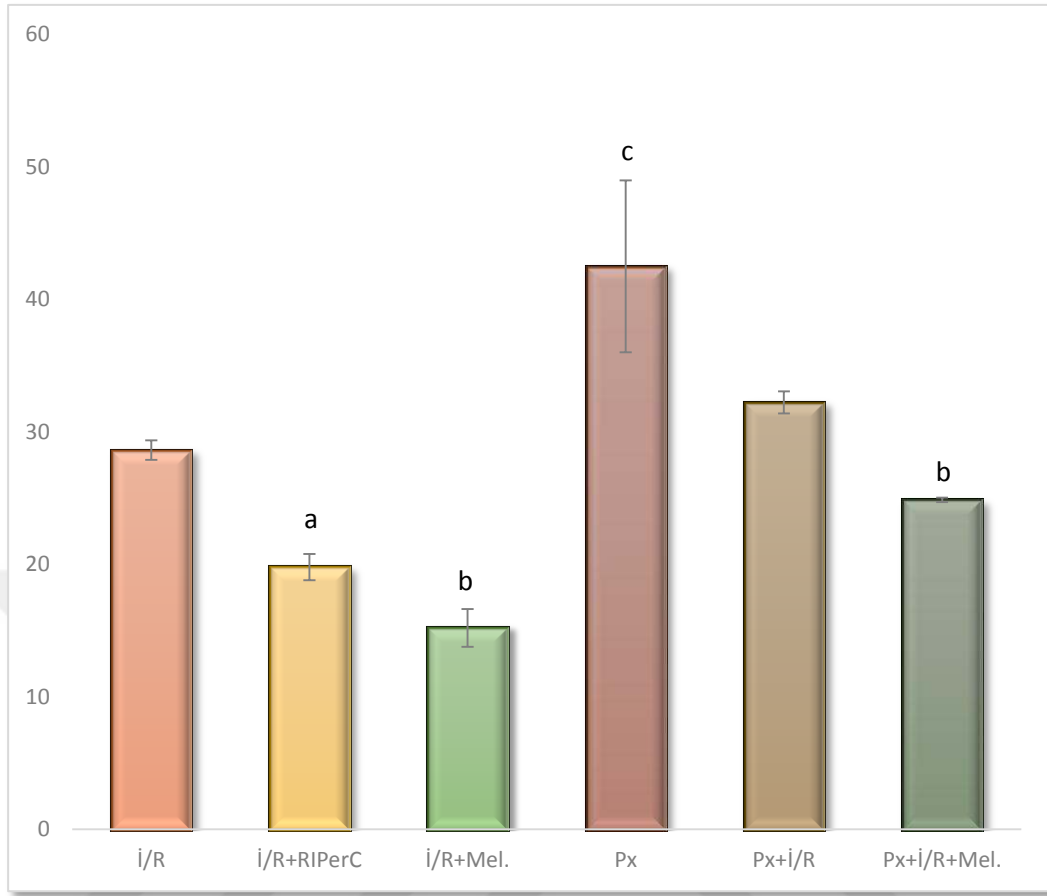
Elde edilen tüm veriler “*Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 22.0*” paket programı kullanılarak istatistiksel olarak yorumlanıp değerlendirildi. Tüm parametreler için ANOVA testi kullanılarak analiz edildi ve aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilen verilerde anlamlılık düzeyi olarak  $p < 0.05$  kabul edildi.

## 5. BULGULAR

### 5.1. İskemi-Reperfüzyon, RİPerC, Melatonin ve Pinealektominin Nekroz

#### Alanına Etkisi

İ/R'a bağlı miyokardiyal nekroz alanı RİPerC ve melatonin uygulamaları kıyaslandığında her iki durumda da anlamlı olarak azaldı (sırasıyla  $28,62 \pm 0,74$ ;  $19,80 \pm 0,99$ ;  $15,20 \pm 1,42$ ). RİPerC ve melatonin birbiriyle kıyaslandığında ise melatoninin nekroz alanını daha fazla küçülttüğü görüldü. Nekroz alanındaki artışın Px grubunda ( $42,49 \pm 6,48$ ) Non-Px grubundan daha fazla olduğu ve artışın anlamlı olduğu görüldü. Px grubunda da RİPerC nekroz alanını azalttı ( $32,22 \pm 0,83$ ) ancak bu azalma İ/R ile kıyaslandığında literatüre uygun olarak anlamlı bulunamadı. RİPerC öncesi uygulanan farmakolojik melatonin ile nekroz alanı anlamlı olarak azaldı ( $24,86 \pm 0,17$ ) (Şekil 11).



**Şekil 11:** İ/R, RPerC, melatonin ve Px'in nekroz alanları üzerine etkisi.

a: RPerC ile anlamlı farklılık, b: Melatonin uygulaması ile anlamlı farklılık c: Px ile anlamlı farklılık, d:RPerC+Melatonin ile anlamlı farklılık ( $p<0,05$ ).

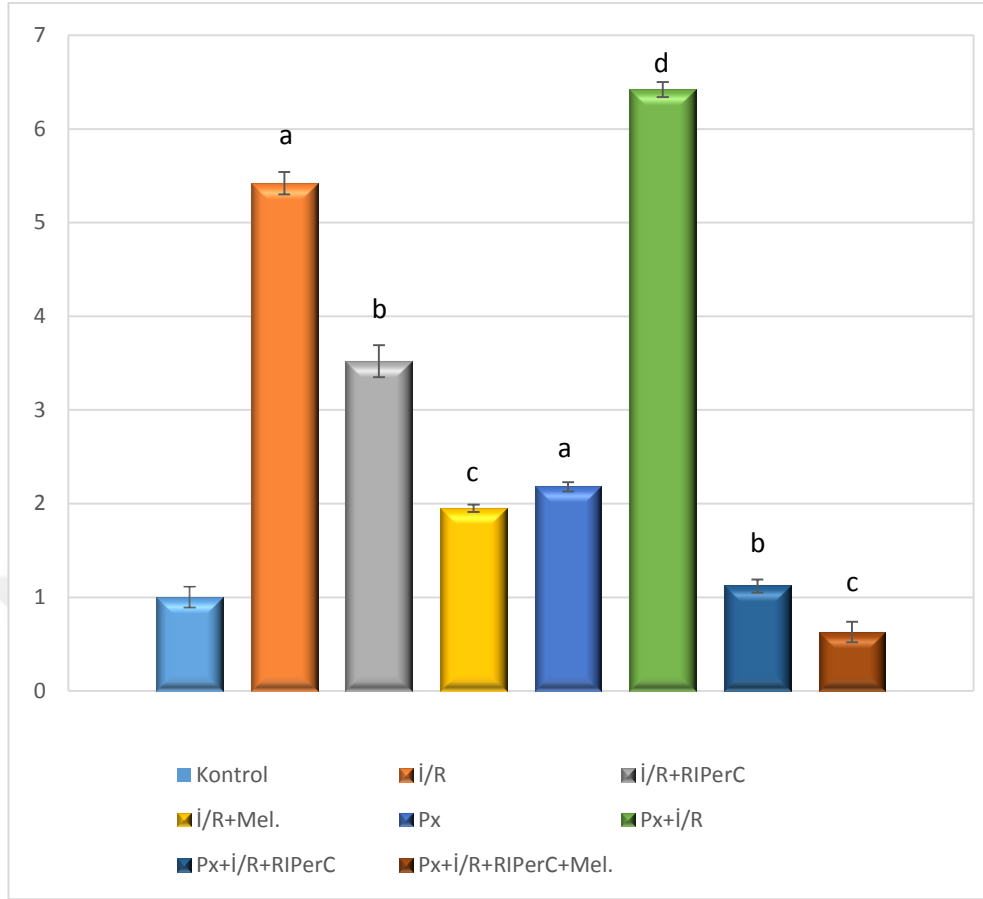
## 5.2. İskemi-Reperfüzyon, RPerC, Melatonin ve Pinealektominin Cybb Gen Ekspresyonuna Etkisi

Cybb gen ekspresyonu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda anlamlı olarak arttı (sırasıyla,  $1\pm0,11$  ve  $5,42\pm0,12$ ). Melatonin ve RPerC ise genin İ/R ile artan ekspresyonunu anlamlı olarak azalttı (sırasıyla  $1,95\pm0,04$  ve  $3,52\pm0,17$ ). Hem Px grubunda hem de Px+İ/R grubunda Cybb geninin ekspresyonu anlamlı olarak artırdı (sırasıyla  $2,18\pm0,05$  ve  $6,42\pm0,08$ ). Px gruplarına uygulanan RPerC Cybb geninin ekspresyonunu azaltırken ( $1,12\pm0,07$ ), koşullanma öncesinde uygulanan melatonin ile ekspresyon neredeyse RPerC'nin iki katı kadar azaldı ve ikiside istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $0,63\pm0,11$ ) (**Tablo 4**) (**Şekil 12**).

**Tablo 4:** İ/R, RPerC, melatonin ve Px'in Cybb düzeyleri üzerine etkisi.

|                   | Cybb (mRNA kat artışı) |
|-------------------|------------------------|
| Kontrol           | $1\pm0,11$             |
| İ/R               | $5,42\pm0,12^a$        |
| İ/R+RPerC         | $3,52\pm0,17^b$        |
| İ/R+Mel.          | $1,95\pm0,04^c$        |
| Px                | $2,18\pm0,05^a$        |
| Px+İ/R            | $6,42\pm0,08^d$        |
| Px+İ/R+RPerC      | $1,12\pm0,07^b$        |
| Px+İ/R+RPerC+Mel. | $0,63\pm0,11^c$        |

a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, b: RPerC'nin farklılığındaki anlamlılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık, d: Px grubunda İ/R'ye bağlı anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ).

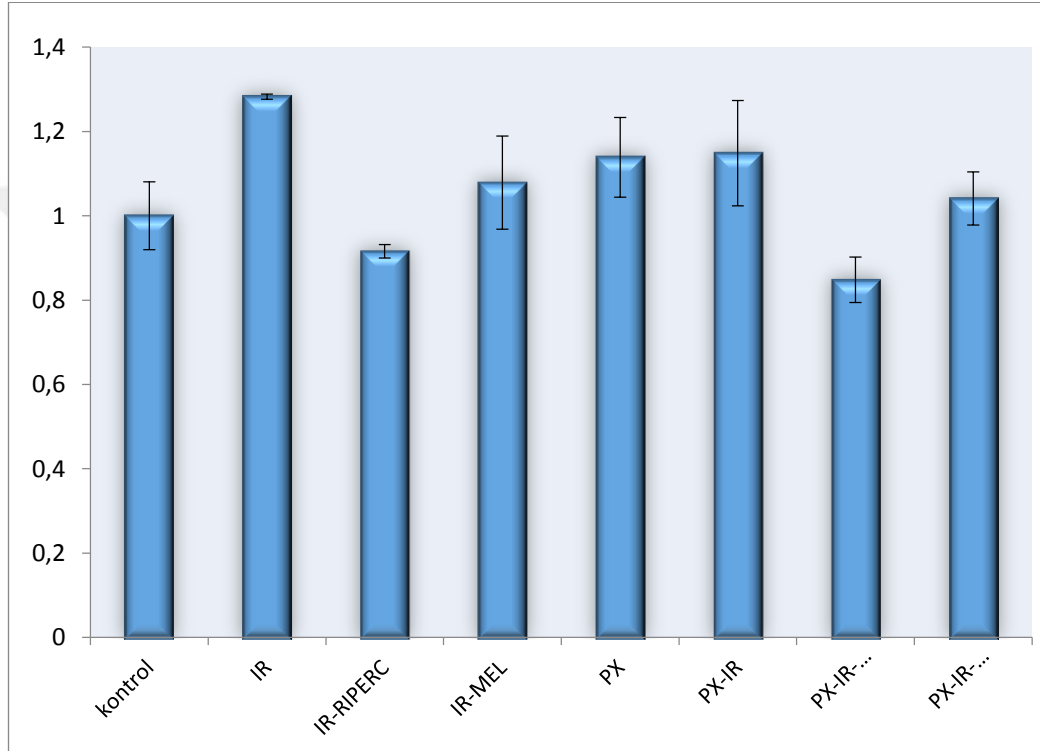


**Şekil 12:** I/R, RPerC, melatonin ve Px'in Cybb düzeyleri üzerine etkisi.

a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık. b: RPerC'ye bağlı anlamlı farklılık. c: Melatonine bağlı anlamlı farklılık. d: Px+I/R'ye bağlı anlamlı farklılık.

### 5.3. İskemi-Reperfüzyon, RPerC, Melatonin ve Pinealektominin HIF-1 $\alpha$ Ekspresyonuna Etkisi

HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda ve Px grubunda arttı (sırasıyla, %28-%14). Melatonin ve RPerC ise ekspresyonu azalttı (sırasıyla, %17,6-%30,4). Ancak veriler istatistiksel anlamlılığa ulaşamadı (Şekil 13).



Şekil 13: İ/R, RPerC, melatonin, Px'in HIF1 $\alpha$  düzeyleri üzerine etkisi.

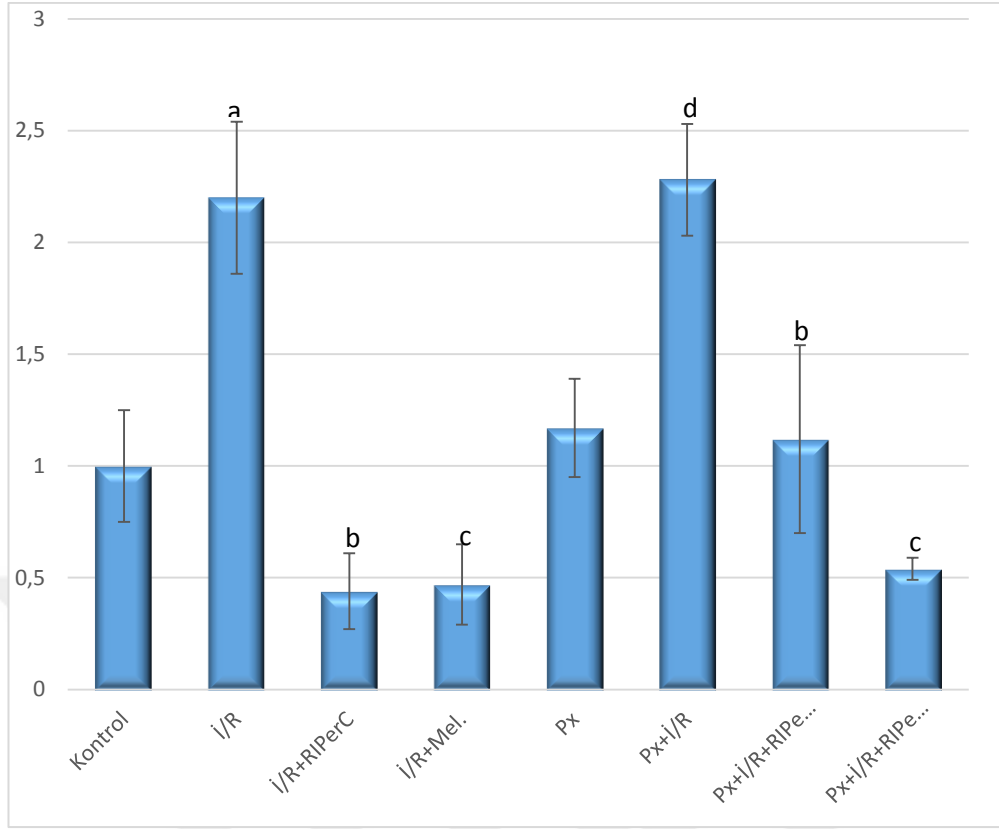
#### 5.4. İskemi-Reperfüzyon, RİPerC, Melatonin ve Pinealektominin NfκB Düzeyine Etkisi

NfκB düzeyi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda anlamlı olarak arttı (sırasıyla  $1\pm0,25$  ve  $2,20\pm0,34$ ). Melatonin ve RİPerC ise NfκB düzeylerini İ/R grubuna kıyasla anlamlı olarak azalttı ( $0,47\pm0,18$  ve  $0,44\pm0,17$ ). Px ile kıyaslandığında Px+İ/R grubunda da NfκB düzeyindeki artışın anlamlı olduğu görüldü (sırasıyla  $1,17\pm0,22$  ve  $2,28\pm0,25$ ). Px gruplarına uygulanan RİPerC ( $1,12\pm0,42$ ), NfκB düzeyini anlamlı olarak azaltırken RİPerC öncesi uygulanan melatonin ( $0,54\pm0,05$ ) ekspresyonu çok daha fazla azalttı ve istatistiksel olarak anlamlılık görüldü (Tablo 5).

**Tablo 5:** İ/R, RİPerC, melatonin ve Px'in NfκB düzeyleri üzerine etkisi.

|                    | NfκB (mRNA kat artışı) |
|--------------------|------------------------|
| Kontrol            | $1\pm0,25$             |
| İ/R                | $2,20\pm0,34^a$        |
| İ/R+RİPerC         | $0,44\pm0,17^b$        |
| İ/R+Mel.           | $0,47\pm0,18^c$        |
| Px                 | $1,17\pm0,22$          |
| Px+İ/R             | $2,28\pm0,25^d$        |
| Px+İ/R+RİPerC      | $1,12\pm0,42^b$        |
| Px+İ/R+RİPerC+Mel. | $0,54\pm0,05^c$        |

a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, b: RİPerC'ye bağlı anlamlı farklılık, c: Melatonin uygulamasına bağlı anlamlı farklılık, d: Px grubunda İ/R'ye bağlı anlamlı farklılık ( $p<0.05$ ).



**Şekil 14:** İ/R, RPerC, melatonin ve Px'in NfκB düzeyleri üzerine etkisi.

a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık. b: RPerC'ye bağlı anlamlı farklılık. c: Melatonine bağlı anlamlı farklılık. d:Px+İ/R'ye bağlı anlamlı farklılık.

## 6. TARTIŞMA

Çalışmamızda sıçanlarda in vivo kardiyak İ/R modeli ile oluşturulan hasarda RPerC'nin kardiyoprotektif etkisi ile fizyolojik ve farmakolojik melatonin konsantrasyonlarının hem İ/R hasarında hem de RPerC koruyuculuğuna olan etkileri incelendi ve moleküler mekanizmalar araştırıldı. Yapılan çalışmalarla koşullanma koruyuculuklarının yaşlanmada, komorbiditelerde (diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, obezite gibi) ve komedikasyonlarda (statin, COX inhibitörleri,  $\beta$ -blokörler gibi) ortadan kalktığı gösterilmiştir (38). Yaptığımız çalışmada Px ile yaşlandırılan ve kardiyovasküler hastalıklara predispoze olduğu düşünülen sıçanlarda RPerC etkisinin azaldığı hem nekroz alanı ölçümlerinden hem de moleküler parametrelerden alınan sonuçlarda gözlemlendi ve bu sıçanlara uygulanan farmakolojik melatoninle RPerC'nin tekrar koruyucu olduğu belirlendi.

Literatür taramalarında sadece melatonin ya da sadece RPerC'nin nekroz alanına etkisini gösteren çalışmalar olmasına rağmen ikisinin beraber etkisini gösteren bir çalışmaya henüz rastlanamadı. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre kardiyak İ/R'ye bağlı nekroz alanının RPerC ve melatonin uygulamalarında azaldığı Px sıçanlarda ise arttığı görüldü. Px sıçanlarda tek başına uygulanan RPerC nekroz alanında minimal bir azalma sağlarken koşullanma öncesi 10 gün boyunca kullanılan melatonin sonrası uygulanan RPerC ile daha fazla azalma olduğu gösterildi.

Birçok deneysel modelde melatoninin İ/R hasarını hafiflettiği gösterilmiştir (146) (161; 162). Kısa süre önce Zhai ve ark. (163) selektif SIRT3 inhibitörü kullandıkları ve kullanmadıkları farelerle yaptıkları çalışmada, miyokardiyal İ/R protokolünde reperfüzyondan 10 dakika önce intraperitoneal melatonin (20 mg/kg)

enjekte etmişlerdir ve sonuç raporlarında birçok parametredeki değişimin yanı sıra azalmış enfarkt boyutunu da göstermişlerdir. İnsanlarda melatoninin nekroz alanındaki etkisini inceleyen randomize klinik çalışmalar kısıtlıdır. İspanyol bir araştırma grubu tarafından yapılan ve hala devam eden bir araştırmada (MARIA-trial, Clinical trial identifier: NCT00640094), araştırmacılar pPCI geçiren AMI hastalarını rastgele seçerek total intravenöz dozu 11.61 mg olacak şekilde melatonin (yaklaşık 166 µg/kg) ya da plasebo uygulamışlardır ve ön çalışma sonuçlarına göre LDH1'in aktivitesini gösteren alfa-hidroksibutirat dehidrojenazın (Alfa-HBDH) kümülatif salınımını (eğri altındaki alan: 0 - 72 saat değerlendirilmiştir) belirleyerek enfarkt boyutundaki küçülmeyi göstermişlerdir (164).

Liu ve ark. (165) tarafından yapılan bir çalışmada sıçanlara koroner arter oklüzyonu öncesi intraperitoneal 2,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg dozlarda melatonin uygulamışlardır ve 10 mg/kg melatoninin diğer fizyolojik fonksiyonları etkilemeksizin miyokardiyumu etkili şekilde koruyabildiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda, İ/R uygulamadan önce Px ve Non-Px gruplarında 10 gün boyunca 10 mg/kg kullanılan melatoninin Non-Px grubunda tek başına koruyucu olabildiği ve Px grubunda da koşullanmanın azalan koruyuculuğunu tekrar artırabildiği belirlendi.

RIPerC'yi ilk kez 2007 yılında Schmidt ve ark. (71) deneysel çalışmalarında göstermişlerdir ve domuzlarda LAD'nin lethal iskemisi ile aynı zamanda alt ekstremiteye yerleştirdikleri turnikeyi dört siklus 5 dk sıkıp 5 dk gevşetme şeklinde uyguladıklarında miyokard enfarkt boyutunun azaldığını, sistolik ve diyastolik fonksiyonların korunduğunu ve K<sub>ATP</sub>-bağımlı mekanizma sayesinde reperfüzyon fazı boyunca kalbin aritmiden korunduğunu göstermişlerdir. Sonrasında RIPerC'nin kardiyak İ/R hasarını hafiflettiğine dair çalışmalar ile bulgular desteklenmiştir (166)

(167) (168) (169). Bromage ve ark. (170) sistemik bir incelemede 650'den fazla hayvanın değerlendirerek RIPC, RIPC ve RIPC'nin enfarkt boyutunu azaltmadaki etkilerinin anlamlı olduğunu göstermişlerdir ve çalışmalarının sonuç raporunda RIPC ile RIPC'nin kliniğe daha uygun olduğunu belirtmişlerdir.

RIPC'nin kliniğe aktarıldığını gösteren çalışma sayısı ise nispeten azdır (171). İlki Li ve ark. (172) tarafından kapak replasmanı yapılan yetişkin hastalarda alt ekstremiteden RIPC protokolü uyguladıkları çalışmadır ve bu çalışmanın sonucunda cTnI düzeyinin koşullanma ile düştüğünü, defibrilasyon insidansı azaldığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da literatüre uygun olarak RIPC'nin enfarkt boyutunu küçülterek koruyuculuk sağladığı görüldü.

Koşullanmalar kardiyoprotektiflikte önemli bir keşif olmuştur ancak bazı durumlarda koruyuculuğun ortadan kalktığı gösterilmiştir. IPC ve IPC'de koruyuculuğun ortadan kalktığı durumları ve neden olan sinyal yollarını tanımlamak için pek çok çalışma olsa da (38) RIPC için günümüzde hala sınırlı sayıdadır. Bu amaçla yapılan çalışmalardan birinde Lu ve ark. (173) spontane hipertansif sıçanlar kullanmışlardır ve hipertansiyonda RIPC'nin koruyuculuğunun ortadan kalktığını, olmesartan kullanımıyla ise bu etkinin düzeltilebildiğini göstermişlerdir. Bir diğer çalışmayı ise Baranyai ve ark. (160) öncesinde diyabetli olmayan sıçanlarla yapmıştır ve bu çalışmada kuyruk veni yoluyla %50'lik dekstrozu infüzyonu yaparak oluşturdukları akut hiperglisemi modelinde RIPC'nin koruyuculuğunun ortadan kalktığını göstermişlerdir. Çalışmada normaglisemik sıçanlarla karşılaştırılan akut hiperglisemik sıçanların enfarkt boyutlarındaki artışın anlamlı olmadığı ancak aritmi insidansları ve sürelerindeki artışın anlamlı olduğu gösterilmiştir (160).

Diğer koşullanma türlerinde koruyuculuğun ortadan kalktığını gösterebilmek için yapılan çalışmalarla hiperkolestroleminin (174) ve spontan hipertansiyonun (175) (176) IPostC koruyuculuğunu anlamlı olarak azalttığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise diyabetik sıçanlarda IPostC kardiyoprotektifliğinin azaldığı gösterilmiştir (177).

Yaşlı farelerin kullanıldığı çalışmada farmakolojik ard koşullanma ajanı sevofluranın koruyuculuğunun azaldığı gösterilmiştir (178). Melatoninin fizyolojik konsantrasyonunun yaş ilerledikçe %40-50 oranında düştüğü (129) ve bu düşüşün de hipoksi ve oksidatif stresi arttırdığı düşünülmektedir. Lee ve ark. (179) tarafından yapılan invivo çalışmada intravenöz melatonin uygulamasının enfarkt boyutunu azalttığı, ventriküler taşikardi, ventriküler fibrilasyon ve prematüre ventriküler kontraksiyonu engelleyebildiği gösterilmiştir. Başka bir çalışma da ise karanlıkla beraber artan melatoninin kan basıncını ve kalp hızını düşürerek tansiyonu dengelediği bildirilmiştir (180). Streptozotosin ile oluşturulan deneysel diyabette, karaciğer dokusundaki glikoz metabolizmasıyla ilgili enzimlerde melatoninin koruyucu etkisi gösterilmiştir (181). Kardiyotoksik olduğu bilinen doksorubisinin kullanıldığı çalışmada Px ve Non-Px sıçanlarda ilaç verilmeden önce ve sonra melatonin uygulandığında MDA düzeyinin anlamlı olarak azalmıştır ve hem fizyolojik hem de farmakolojik melatonin konsantrasyonunun kalbin korunmasında önemli olduğu gösterilmiştir (182). Bölümümüzde Şahna ve ark. (183) yaptıkları deneyde Px modeli olan sıçanlarda miyokardiyal İ/R'nun nekrotik alanı genişlettiğini göstermişlerdir, bu durum ile endojen melatoninin kardiyoprotektif etkisi belirlenmiştir. Yaptığımız deneysel çalışmada RPerC'nin sağladığı koruyuculuğun Px sıçanlarda azaldığı görüldü bununla birlikte bu sıçanlara İ/R öncesi 10 gün

süreyle farmakolojik melatonin uygulandığında RPerC tekrar koruyuculuk sağlayabildi.

Nekrozun göstergesi olarak kullandığımız diğer parametre ise Cybb genidir. Yaptığımız çalışmada Cybb ekspresyon düzeyinin kontrolle kıyaslandığında İ/R grubunda artarken bu gruba RPerC ve melatonin uygulandığında azaldığını belirledik. Px ve İ/R uygulanan Px sıçanlarda gen ekspresyonunun Non-Px göre daha fazla arttığını bu sıçanlara sadece RPerC uygulandığında anlamlı düşüş sağlayabilsek de melatoninle kombine RPerC ile çok daha fazla düşüş elde edebildiğimizi gözlemledik.

Cybb (sitokrom b-245 beta zinciri) p91<sup>phox</sup> (Nox2 olarak da bilinen) proteinini kodlayan gendir. Nox2, NADPH oksidaz enzim kompleksinin bir alt birimidir. Bu kompleks içinde, beta zincirinin yanısıra bir de alfa zinciri vardır (Cyba) ve kompleksin işlevsel olabilmesi için her iki zincire de gereksinim duyulmaktadır. NADPH oksidaz enzim kompleksinin, kalpte O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikallerinin temel kaynağı olduğu ve kardiyomiyositlerin büyümesinin ve ölümünün regülasyonunda önemli rolleri olduğu görülmüştür (184). Nox2 nakavt çalışmalarda sol ventrikül yeniden modellenmesinin etkilenmediği (185) ve fonksiyonel Nox2 taşımayan farelerde oksidatif stresin ve mortalitenin göstergesi olarak lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı belirtilmiştir (186). Ancak başka bir çalışmada murin koroner arter ligasyon modelinde Nox2'nin istenmeyen kardiyak yeniden modellenmesi ve kontraktil fonksiyon bozukluğuna anlamlı olarak katkıda bulunduğu saptanmıştır (187). Enfarktüs veya İ/R sonrası, diğer Nox izoformlarının miyokardiyal disfonksiyona katkısı hakkındaki veriler eksiktir. Nox proteinlerinin IPC'de yer aldığı ve Nox2'nin deneysel miyokard İ/R modellerinde IPC'nin koruyucu etkisi için

gerekli olduğu gösterilmiştir (188) (189). Fakat IPC yapılmadan Nox2'nin eksik olması durumunda enfarkt boyutunun etkilenmediği görülmüştür (185). Literatür taramalarında RPerC'nin Nox2'yi kodlayan Cybb gen ekspresyonunu nasıl değiştirdiğine ait bir çalışmaya rastlanamadı ve hem Px hem de Non-Px gruplarında RPerC'nin Cybb ekspresyonunu azalttığı ilk kez bu çalışma ile gösterildi.

Kardiyoprotektif olarak melatonin uygulandığında, Nox2 değişimini gösteren bir çalışma bulunmaktadır. İzole sıçan kalpleriyle yapılan bu çalışmada günlük melatoninin uygulamasının (10 mg/kg) kardiyak dokularda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında NADPH oksidaz alt birimlerinin (p22 ve Nox2) ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (190). Çalışmamızda literatüre uygun olarak melatonin uygulanan Non-Px - İ/R grubunda gen ekspresyonundaki düşme gösterildi ve bu çalışmanın daha önce yapılandan farklılaştığı noktalardan biri in vivo protokol kullanılması, diğeri ise Px sıçanlarda da çalışılması oldu. Kontrolle kıyaslandığında Px grubunda, İ/R ile kıyaslandığında Px-İ/R grubunda gen ekspresyonunun arttığı ve bu sıçanlarda genin hem RPerC hem de melatonin sonrası uygulanan RPerC'de anlamlı olarak azaldığı görüldü.

Çalışmamızda HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun İ/R ve Px ile arttığını, RPerC ve melatonin uygulamaları ile azaldığını belirledik. Artış ve azalışlar literatüre uygundur ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Nox izoformlarının supresyonu spesifik olarak aşırı ROS aktivasyonunu önleyebilir. Fakat İ/R'da kalbin HIF-1 $\alpha$ -PPARa ile tetiklenen korunma mekanizması için Nox2 veya Nox4'ten türetilen bir miktar ROS'a ihtiyacının olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, Nox2 veya Nox4, İ/R hasarının tedavisinde hedef olabilse de fizyolojik fonksiyonun korunabilmesi için minimum düzeyde Nox aktivite göstermesi

gereklidir (184). HIF-1 $\alpha$  oksijen hemostazının sürdürülmesi için gerekli gen ekspresyonunun regülasyonunda temel transkripsiyon faktörüdür ve AMI gibi iskemi oluşan durumlarda strese karşı miyokard hücrelerinde oluşan ilk adaptif cevaptır. Hücreye yeterli oksijen verildiğinde, sitoplazmada bulunan HIF-1 $\alpha$  bozunur. Fakat hipoksik koşullar altında, stabilize HIF-1 $\alpha$  çekirdekte HIF-1 $\beta$  ile heterodimer oluşturur. Bu heterodimer, eritropoietin, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve NO gibi hipoksiye hücrel adaptasyon ile ilişkili birkaç genin transkripsiyonunu sağlar (191). Bu nedenle, HIF-1 $\alpha$ 'nın modülasyonu, doku hipoksi seviyesine sıkı bir şekilde bağlıdır. Fakat aşırı ekspresyonu nöronal hücre ölümüne yol açabilir (192). Kısacası HIF-1 $\alpha$  aşırı salımı sonrası artmış ROS, oksidatif streste meydana gelen hipertrofinin kompanse edildiği faz boyunca koruyucu olabilse de son evre yetmezlik patolojisine katkıda bulunabilmektedir (193).

RIPerC'de HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun değişime ait tek bir çalışma vardır. Lu ve ark. (173) kronik olmesartan tedavisi altında olan spontan hipertansif sıçanlarda RIPerC koruyuculuğunun tekrar düzeltilebildiğinin belirteçlerinden biri olarak HIF-1 $\alpha$ 'yı kullanılmışlardır ve çalışmanın sonucunda koşullanmanın etkinliğinin artmasını HIF-1 $\alpha$ 'ya bağlamış olsalar da gerekli olup olmadığını tam olarak netleştirememişlerdir (173).

Literatürde kardiyak İ/R hasar modelinde melatoninin HIF-1 $\alpha$  düzeylerine etkisine ait deneysel ya da klinik herhangi bir çalışmaya rastlanamadı. Ancak Park ve ark. (194) tarafından farelerde yapılan bir retina iskemisi deneyinde melatonin tedavisinin, iskemik retinada artmış HIF-1 $\alpha$  ve GFAP ekspresyonunu inhibe ettiği, inhibisyonun olası mekanizmasının melatoninin antioksidan etkisinden kaynaklanabileceği ve HIF-1 $\alpha$  inhibisyonu ile hipoksik yanıtların engellenmesinin,

iskemik retinada artmış RGC sağkalımı ile sonuçlanabileceğini gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada hem RPerC hem de farmakolojik melatonin uygulamasının artmış HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunu azalttığı saptandı. Ancak düşüş istatistiksel anlamlılığı yakalayamadı.

Çalışmamızda inflamatuvar mediyatörlerden Nf $\kappa$ B seviyelerini ölçüldü. Elde edilen verilere göre İ/R, Nf $\kappa$ B ekspresyonunu kontrole kıyasla anlamlı olarak artırırken RPerC ve melatonin yaklaşık olarak aynı oranda düşürdü. Px gruplarında ise sadece RPerC uygulanan gruptaki azalmanın melatonin uygulandıktan sonra yapılan RPerC'nin iki katından fazla olduğu görüldü.

Nf $\kappa$ B, İ/R hasarı sırasında sitokinlere, kemokinlere, immünoresptörlere ve hücre adhezyon moleküllerine ait genlerin erken ekspresyonuna aracılık eden transkripsiyon faktörüdür (195). Çok sayıda çalışmada Nf $\kappa$ B'nin inhibisyonunun İ/R hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Nf $\kappa$ B'nin erken aktivasyonunu inhibe ederek sitokinlere bağlı inflamatuvar cevabı baskıladığından intersellüler adhezyon moleküllerinin gen ekspresyonunu azaltarak İ/R hasarında koruyucu etki oluşturabilmektedir (196) (197). Bir araştırmada Nf $\kappa$ B inhibisyonu ile mTOR aktivitesinin sınırladığı belirtilmiştir (198). Huang ve ark. (199) tarafından sıçanlarla yapılan çalışmada mTOR ile etkileşen Nf $\kappa$ B'nin inhibisyonu ile indüklenen otofajiyle ilişkili genlerin miyokardiyal İ/R hasarını azaltmada hayati rol oynayabileceği gösterilmiştir.

Melatonin, Nf $\kappa$ B'nin çekirdeğe translokasyonunu önleyerek, interlökinler ve TNF $\alpha$  gibi çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin up-regülasyonunu azaltabilir (150).

Çeşitli çalışmalardan elde edilen veriler kalpte NF $\kappa$ B'nin ikili rolü olduğunu göstermiştir. İ/R sırasında zararlıdır, ancak RIPC ile iskemiye adaptasyon sırasında

anahtar bir faktördür. Li ve ark. (200) tarafından yapılan çalışmada farelerde arka bacaklardan RIPC uygulandıktan 1-2 saat sonra hem kalpte hem de koşullanma yapılan iskelet kasında NfκB saptanmıştır ancak NfκB p105 nakavt farelerde koşullanmanın geç dönem koruyuculuğunun ortadan kalktığını gözlemlemişlerdir ve NfκB sinyalizasyonunun geciktirilmiş kardiyoprotektiflikte önemli rolü olduğunu bildirmişlerdir, bununla birlikte bu çalışmada uzak koşullanmalardan ön koşullanmanın uygulanması, RIPC'den sonra yaygın iskeminin in vitro yapılması ve geciktirilmiş NfκB düzeyinin ölçülmesi ile yaptığımız deneyden farklılığın nedeni olarak görülmektedir. Çalışmamızda reperfüzyondan hemen sonra aldığımız kalpler üzerinde belirlenen NfκB düzeyi literatüre uygun olarak azaldı.

Tilstra ve ark. (201) farelerle yaptığı çalışmada çeşitli dokularda yaşlanma ve yaşlanmayla ilişkili dejeneratif hastalıklarda NfκB transkripsiyonel aktivitesinde artış olduğu, inhibisyonunun yaşla ilişkili semptomların ve patolojilerin oluşmasını geciktirdiği böylece memelilerin sağlıklı olma sürelerinin uzatılması için olası terapötik hedef olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışma ile sinyal yolağının sadece yaşlanmada aktive olmadığını ama yaşla ilişkili patolojilere direk olarak katkıda bulunduğunu belirlemişlerdir. Bu bulgular çalışmamızla uyumludur ve çalışmamızda İ/R, Px ve Px-İ/R'de NfκB ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Bu artışın da RIPC ve melatonin kullanımıyla anlamlı olarak azaldığı saptandı.

### ***Sonuç ve öneriler;***

NADPH oksidaz enzim sisteminin (Nox2 altbirimi) aktivasyonunu gösteren Cybb gen düzeyleri İ/R hasarında, melatonin ve RPerC'nin koruyuculuğunda önemli bir rol oynayabilir. Fizyolojik melatoninin azaldığı durumlarda artmış Cybb geninin RPerC ve farmakolojik melatonin uygulamalarında azalması, gen üzerinde bu protokollerin etkisine bağlı olabilir.

RPerC ve melatoninin koruyuculuğunda pro-inflamatuar mediyatör NfκB seviyelerindeki düşüşün önemli rol oynadığı düşünülebilir.

Hipoksi durumunda ilk etapta koruyucu olan ama dokuda varlığı sürdükçe patolojiye neden olan HIF-1α seviyelerinin İ/R grubunda artıp melatonin ve RPerC'de (istatistiksel anlamlılığı yakalayamasa da) düşmesi mekanizmada rol oynadığının göstergesi olabilir.

Hasara bağlı lokal ve sistemik etkilerin organ transplantasyonu, AMI, serebrovasküler hastalıklar, majör cerrahi girişimler, trombolitik tedavi, hemorajik şok ve resüsitasyon gibi birçok klinik durumda ortaya çıkan yüksek morbidite ve mortaliteye katkıda bulunduğu düşünüldüğünden RPerC, melatonin ve bunların kombinasyonu ile sağlanabilecek koruyuculuk klinik olarak da test edilebilir.

Fizyolojik melatoninin azaldığı durumlarda RPerC'nin koruyuculuğunun ortadan kalktığı, melatonin replasmanı ile bu etkinin geri çevrilebildiği görülmüştür. Melatoninin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonları RPerC'nin koruyuculuğunda önemli olabilir. Melatoninin endojen ritmini korumak için yaşam modifikasyonu ile kardiyak korunma sağlanabilir ve yaşlılık ya da melatonin seviyesinin azalmasının eşlik ettiği kalp hastalıkları için predispose durumlarda toksisitesi düşük rapor edilen melatonin replasmanı önerilebilir.

Melatonin, deęerlendirdiđimiz parametreler açısından RPerC'ye benzer oranda koruyuculuk (nekroz oranı) saęlayabildiđinden farmakolojik kořullanma yapabilen bir ajan olarak dūřunūlebilir.

IPC ve IPostC klempleme-deklempleme işlemleri sırasında kardiyak lezyon oluşumu gibi yan etki profiline sahip girişimsel bir uygulama olarak dūřunūlebilir. Yanı sıra IPC'de AMI zamanlamasının rlebilir olmaması da klinik kullanımını kısıtlayan ekstra bir dezavantajı olabilir. RPerC ise İ/R hasarına karşı uzak bölgelerde, vasküler yatak, doku ya da organda kol ya da bacağa non invaziv tarzda yerleştirilen tansiyon manşonu ya da benzer bir aletin basitçe şişirilip indirilmesiyle uygulanabildiğinden ve hastaların hastaneye gelmeleri çoğunlukla iskemiye denk geldiğinden klinik kullanımda da terapötik strateji sağlayabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:15-26.
2. Botto F, Alonso-Coello P, Chan MT, et al. Myocardial injury after noncardiac surgery: a large, international, prospective cohort study establishing diagnostic criteria, characteristics, predictors, and 30-day outcomes. *Anesthesiology* 2014;120: 564–578.
3. Ginks WR, Sybers HD, Maroko PR, et al. Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion. *J Clin Invest* 1972;51:2717–2723.
4. Johnson AP, Parlow JL, Whitehead M, et al. Body mass index, outcomes, and mortality following cardiac surgery in Ontario, Canada. *J Am Heart Assoc* 2015;4:002140.
5. Yellon DM and Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007;357:1121–1135.
6. Özcan O, Erdal H, Yondem Z. İskemi-reperfüzyon hasarı ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakış. *Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg* 2015;6(23):27-33.
7. Collard CD and Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-1138.
8. Crompton M and Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca<sup>2+</sup>, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca<sup>2+</sup> overload. *Eur J Biochem* 1988;178:489–501.
9. Hausenloy DJ and Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 2013;123:92–100.
10. Halestrap AP and Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2015;78C:129–141.
11. Di Lisa F, Canton M, Carpi A, et al. Mitochondrial injury and protection in ischemic pre- and postconditioning. *Antioxid Redox Signal.*, 2011; 14:881–91.
12. Di Lisa F and Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res* 2006;70:191–199.
13. Halestrap AP. Mitochondria and reperfusion injury of the heart—a holey death but not beyond salvation. *J Bioenerg Biomembr* 2009;41:113–121.
14. O'Rourke B, Cortassa S, Aon MA. Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:303–315.
15. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010;24:85–87.

16. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005; 434:658-662.
17. Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, et al. TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;333:696–706.
18. Braunersreuther V and Jaquet V. Reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury: from physiopathology to therapeutic approaches. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13:97-114.
19. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res.* 2004; 61:461–70.
20. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007;59:418–458.
21. Takano H, Zou Y, Hasegawa H, et al. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:789–794.
22. Mao X, Wang T, Liu Y, et al. N-acetylcysteine and allopurinol confer synergy in attenuating myocardial ischemia injury via restoring HIF-1 $\alpha$ /HO-1 signaling in diabetic rats. *PloS One* 2013;8:e68949.
23. Peterson TE, Poppa V, Ueba H, et al. Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circ Res* 1999;85:29–37.
24. Xia Z and Vanhoutte PM. Nitric oxide and protection against cardiac ischemia. *Curr Pharm Des* 2011;17:1774–1782.
25. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005;293:1338–1347.
26. Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2005;19:1088–95.
27. Hamid SA, Totzeck M, Drexhage C, et al. Nitric oxide/cGMP signalling mediates the cardioprotective action of adrenomedullin in reperfused myocardium. *Basic Res Cardiol* 2010;105:257–266.
28. Kanai A, Epperly M, Pearce L, et al. Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H13–21.

29. Zhang DM, Chai Y, Erickson JR, et al. Intracellular signalling mechanism responsible for modulation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels by nitric oxide in ventricular cardiomyocytes. *J Physiol* 2014;592:971–990.
30. Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, et al. Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res* 2002;90:602–608.
31. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994;269:26066–26075.
32. Kanno S, Lee PC, Zhang Y, et al. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation* 2000;101:2742–2748.
33. Brunner F, Maier R, Andrew P, et al. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 2003;57:55–62.
34. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004;61:481–497.
35. Manning AS and Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16:497–518.
36. Bolli R and Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999;79:609–634.
37. Krug A, Du Mesnil dR, Korb G. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res* 1966;19:57–62.
38. Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *Pharmacol Rev.* 2014;66:1142–1174.
39. Giricz Z, Mentzer RM Jr, Gottlieb RA. Autophagy, myocardial protection, and the metabolic syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012;60:125–132.
40. Huang C, Andres AM, Ratliff EP, et al. Preconditioning involves selective mitophagy mediated by Parkin and p62/SQSTM1. *PLoS ONE* 2011;6:e20975.
41. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 2013;38:209–223.
42. Oerlemans MI, Liu J, Arslan F, et al. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Res Cardiol* 2012;107:270.

43. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-1136.
44. Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:893–907.
45. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, et al. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:5887–5892.
46. Pan X, Liu J, Nguyen T, et al. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol* 2013;15:1464–1472.
47. Rezkalla SH and Kloner RA. Ischemic preconditioning and preinfarction angina in the clinical arena. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2004;1:96–102.
48. Heusch G. Nitroglycerin and delayed preconditioning in humans: yet another new mechanism for an old drug? *Circulation* 2001;103:2876–2878.
49. Amr YM and Yassin IM. Cardiac protection during on-pump coronary artery bypass grafting: ischemic versus isoflurane preconditioning. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2010;14:205–211.
50. Jebeli M, Esmaili HR, Mandegar MH, et al. Evaluation of the effects of ischemic preconditioning with a short reperfusion phase on patients undergoing a coronary artery bypass graft. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2010;16:248-252.
51. Walsh SR, Tang TY, Kullar P, et al. Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and metaanalysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34:985–994.
52. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H579-H588.
53. Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112:2143–2148.
54. Xi L, Das A, Zhao ZQ, et al. Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice. *Circulation* 2008;118(14):S32–S37.
55. Morrison RR, Tan XL, Ledent C, Mustafa SJ, Hofmann PA. Targeted deletion of A2A adenosine receptors attenuates the protective effects of myocardial postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2523–H2529.
56. Philipp S, Yang XM, Cui L, et al. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res* 2006;70:308–314.

57. Zatta AJ, Kin H, Yoshishige D, et al. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H1444-1451.
58. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res* 2009;84:201–208.
59. Vessey DA, Li L, Kelley M, Karliner JS. Combined sphingosine, S1P and ischemic postconditioning rescue the heart after protracted ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;375:425–429.
60. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation* 2007;115:1895–1903.
61. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005;111:194–197.
62. Clarke SJ, Khaliulin I, Das M, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circ Res* 2008;. 102:1082–1090.
63. Mewton N, Thibault H, Roubille F, et al. Postconditioning attenuates no-reflow in STEMI patients. *Basic Res Cardiol* 2013;108:383.
64. Dwyer NB, Mikami Y, Hilland D, et al. No cardioprotective benefit of ischemic postconditioning in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Interv Cardiol* 2013;26:482–490.
65. Heusch G. Reduction of infarct size by ischaemic post-conditioning in humans: fact or fiction? *Eur Heart J* 2012;33:13–15.
66. Santillo E, Migale M, Postacchini D, Balestrini F, Incalzi RA. Cardioprotection by Conditioning Mimetic Drugs. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2016;15(1):15-30.
67. Hausenloy DJ, Bøtker HE, Condorelli G, et al. Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the working group of cellular biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2013;98:7-27.
68. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993;87:893–899.
69. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol* 1997; 273:H1707–H1712.
70. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 2002;106:2881–2883.

71. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, et al. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism; first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(4):H1883–H1890.
72. Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, et al. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart* 2007;93:749–752.
73. Basalay M, Barsukevich V, Mastitskaya S, et al. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning - similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Exp Physiol* 2012;97:908-917.
74. Wei M, Xin P, Li S, et al. Repeated remote ischemic postconditioning protects against adverse left ventricular remodeling and improves survival in a rat model of myocardial infarction. *Circ Res* 2011;108:1220-1225.
75. Hausenloy DJ and Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 2008; 79:377–386.
76. Giricz Z, Varga ZV, Baranyai T, et al. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *J Mol Cell Cardiol* 2014;68:75–78.
77. Heusch G, Bøtker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65:177-195.
78. Helgeland E, Breivik LE, Vaudel M, et al. Exploring the human plasma proteome for humoral mediators of remote ischemic preconditioning--a word of caution. *PLoS One* 2014;9:e109279.
79. Hibert P, Prunier-Mirebeau D, Beseme O, et al. Apolipoprotein a-I is a potential mediator of remote ischemic preconditioning. *PLoS One* 2013;8:e77211.
80. Przyklenk K. 'Going out on a limb': SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 signaling as a mechanism of remote ischemic preconditioning? *Basic Res Cardiol* 2013;108:382.
81. Li J, Rohailla S, Gelber N, et al. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2014;109:423.
82. Küntscher MV, Kastell T, Altmann J, et al. Acute remote ischemic preconditioning II: the role of nitric oxide. *Microsurgery* 2002;22:227-231.
83. Gross GJ, Baker JE, Moore J, Falck JR, Nithipatikom K. Abdominal surgical incision induces remote preconditioning of trauma (RPCT) via activation of bradykinin receptors (BK2R) and the cytochrome P450 epoxide pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011;25:517-522.
84. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996;94:2193-2200.

85. Kingma JG, Simard D, Voisine P, Rouleau JR. Role of the autonomic nervous system in cardioprotection by remote preconditioning in isoflurane-anaesthetized dogs. *Cardiovasc Res* 2011;89:384-391.
86. Tang ZL, Dai W, Li YJ, Deng HW. Involvement of capsaicin sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999;359:243-247.
87. Yao Z, Gross GJ. Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264:H2221-H2225.
88. Mastitskaya S, Marina N, Gourine A, et al. Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurones. *Cardiovasc Res* 2012; 95:487-494.
89. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, et al. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol*. 2005; 100:404-412.
90. Schömig A. Catecholamines in myocardial ischemia. Systemic and cardiac release. *Circulation* 1990; 82:II13-II22.
91. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, et al. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemiareperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *Am Coll Cardiol* 2005;46:450-456.
92. Enko K, Nakamura K, Yunoki K, et al. Intermittent arm ischemia induces vasodilatation of the contralateral upper limb. *J Physiol Sci* 2011; 61:507-513.
93. Saxena P, Newman MA, Shehatha JS, Redington AN, Konstantinov IE. Remote ischemic conditioning: evolution of the concept, mechanisms, and clinical application. *J Card Surg* 2010; 25:127–134.
94. Peralta C, Fernandez L, Panes J, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in therat. *Hepatology* 2001; 33:100–113.
95. Konstantinov IE, Arab S, Li J, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130:1326–1332.
96. Huda R, Chung DH, Mathru M. Ischemic preconditioning at a distance: altered gene expression in mouse heart and other organs following brief occlusion of the mesenteric artery. *Heart Lung Circ* 2005; 14:36–43.
97. Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac

surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:2277–2282.

98. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370:575–579.
99. Sloth AD, Schmidt MR, Munk K, et al. infarction, CONDI Investigators. Improved longterm clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2014; 35:168–175.
100. Thielmann M, Kottenberg E, Kleinbongard P, Wendt D, Gedik N, Pasa S, Price V, Tsagakis K, Neuhäuser M, Peters J, et al. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass. surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2013; 382:597–604.
101. Prasad A, Gössl M, Hoyt J, et al. Remote ischemic preconditioning immediately before percutaneous coronary intervention does not impact myocardial necrosis, inflammatory response, and circulating endothelial progenitor cell counts: a single center. randomized sham controlled trial. *Catheter Cardiovasc Interv* 2013; 81:930–936.
102. Kottenberg E, Musiolik J, Thielmann M, et al. Interference of propofol with signal transducer and activator of transcription 5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc. Surg* 2014; 147:376–382.
103. Bøtker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 2010; 375:727–734.
104. Crimi G, Pica S, Raineri C, et al. Remote ischemic post-conditioning of the lower limb during primary percutaneous coronary intervention safely reduces enzymatic infarct size in anterior myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JACC Cardiovasc Interv* 2013; 6:1055–1063.
105. Hong DM, Lee EH, Kim HJ, et al. Does remote ischaemic preconditioning with postconditioning improve clinical outcomes of patients undergoing cardiac surgery? Remote Ischaemic Preconditioning with Postconditioning Outcome Trial. *Eur Heart J* . 2014; 35: 176–183.
106. Prunier F, Angoulvant D, Saint Etienne C, et al. The RIPOST-MI study, assessing remote ischemic preconditioning alone or in combination with local ischemic postconditioning in ST-segment elevation myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2014; 109:400.

107. Hausenloy DJ, Candilio L, Laing C, et al. ERICCA Trial Investigators. Effect of remote ischemic preconditioning on clinical outcomes in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery (ERICCA): rationale and study design of a multicentre. randomized double-blinded controlled clinical trial. *Clin Res Cardiol.* 2012; 101:339–348.
108. Szilvassy Z, Ferdinandy P, Szilvassy J, et al. The loss of pacing-induced preconditioning in atherosclerotic rabbits: role of hypercholesterolaemia. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:2559–2569.
109. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin-An emerging mystery. *Biochemical Pharmacology* 1998; 56:1265-1272.
110. Calvo L, Boya J. Ultrastructure of the rat pineal stalk, *Acta Anatomica.* 1985; 123: 172-177.
111. Ölmez E, Şahna E, Ağkadir M, Acet A. Melatonin: Emeklilik yaşı 80 olur mu? *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 2000; 7(2):177-187.
112. Lerner AB, Case JD, Mori W, Wright MR. Melatonin in peripheral nerve. *Nature* 1959; 27:183:1821.
113. Erlich SS, Apuzzo ML. The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *J Neurosurg* 1985;63(3):321-41.
114. Turgut M, Baka M, Yurtseven M. Pineal gland'dan salgılanan bir nörohormon olan melatoninin etkileri. *Arşiv*, 2002; 11:453-470.
115. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, et al. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 1996;137(7):3033-3045.
116. Baltacı AK. Melatonin, immun sistem ve çinko, *S.Ü. Tıp Fak Derg*; 2001; 17:267-272.
117. Hamada T, Ootomi M, Horikawa K, et al. The expression of the melatonin synthesis enzyme: Arylalkylamine N-Acetyltransferases in the suprachiasmatic nucleus of rat brain, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 258:772-777.
118. Şener G. Karanlığın hormonu: melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi*, 2010;14:112-20.
119. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005; 9:11-24.
120. Pardridge WM, and Mietus LJ. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 1980;34:1761-3.
121. Macchi MM, and Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25:177-195.

122. Leone RM, and Silman RE. Melatonin can be differentially metabolized in the rat to produce N-acetylserotonin in addition to 6-hydroxy-melatonin. *Endocrinology* 1984; 114(5):1825-32.
123. Waldhauser F, Waldhauser M, Lieberman HR et al. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology* 1984;39:307-13.
124. Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: Biochemical and structural mechanisms. *Life Sciences* 2003; 72:2183-2198.
125. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 18;269(46):28531-28534.
126. Hotchkiss AK, Nelson RJ. Melatonin and immune function: hype or hypothesis? *Crit Rev Immunol* 2002;22:351-71.
127. Anisimov VN. The role of pineal gland in breast cancer development, *Clinical Reviews in Oncology/Hematology*. 2003; 46:221-234.
128. MacFarlane JG, Cleghorn JM, Brown GM, Streiner DL. The effects of exogenous melatonin on the total sleep time and daytime alertness of chronic insomniacs: a preliminary study. *Biol Psychiatry*, 1991;30:371-376.
129. Mollaoğlu H, Özgüner MF. Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005; 12:52-56.
130. Cornelissen G, Halberg F, Burioka N, et al. Do plasma melatonin concentrations decline with age? *Am J Med* 2000; 109:343-345.
131. Humbert W and Pevet P. The decrease of pineal melatonin production with age, *Ann NY Acad Sci* 1994; 719:43–61.
132. Touitou Y. Human aging and melatonin. *Clinical Relevance, Experimental Gerontology*. 2001; 36:1083-1100.
133. Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, et al. Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J Recept Signal Transduct Res* 2001;21:85-91.
134. Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, et al. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *J Pineal Res* 2003;35:40- 4.
135. Dubocovich ML, and Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005;27:101-10.
136. Bertuglia S, and Reiter RJ. Melatonin reduces ventricular arrhythmias and preserves capillary perfusion during ischemia-reperfusion events in cardiomyopathic hamsters. *J Pineal Res* 2007;42:55-63.

137. Grossini E, Molinari C, Uberti F, et al. Intracoronary melatonin increases coronary blood flow and cardiac function through beta-adrenoreceptors, MT1/MT2 receptors, and nitric oxide in anesthetized pigs. *J Pineal Res* 2011;51:246-57.
138. Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C et al. 24h variation in the expression of the mt1 melatonin receptor subtype in coronary arteries derived from patients with coronary heart disease. *Chronobiol Int* 2001;18:973-85.
139. Nickkholgh A, Schneider H, Sobirey M et al. The use of high-dose melatonin in liver resection is safe: first clinical experience. *J Pineal Res* 2011;50:381-8.
140. Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM et al. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* 2002;54:1299-321.
141. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* 2013;54:245-57.
142. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004;36:1-9.
143. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, et al. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 1993; 70: 65–71.
144. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
145. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P. Myocardial ischemia-reperfusion injury: possible role of melatonin. *World J Cardiol* 2010;2:233-6.
146. Petrosillo G, Colantuono G, Moro N et al. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:1487-93.
147. Genade S, Genis A, Ytrehus K et al. Melatonin receptormediated protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of its anti-adrenergic actions. *J Pineal Res* 2008;45:449-58.
148. Lochner A, Genade S, Davids A et al. Short- and longterm effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery. *J Pineal Res* 2006;40:56-63.
149. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW et al. Melatonin in septic shock: some recent concepts. *J Crit Care* 2010;25:656.
150. Chuang JI, Mohan N, Meltz ML et al. Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biol Int* 1996;20:687-92.
151. Guerrero JM, and Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002;2:167-79.
152. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993;49:654-64.

153. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Sanchez- Sanchez JJ et al. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. *J Pineal Res* 2010;49:14-22.
154. Suarez-Barrientos A, Lopez-Romero P, Vivas D et al. Circadian variations of infarct size in acute myocardial infarction. *Heart* 2011;97:970-6.
155. Durgan DJ, Pulinilkunnil T, Villegas-Montoya C et al. Ischemia/reperfusion tolerance is time-of-daydependent: mediation by the cardiomyocyte circadian clock. *Circ Res* 2010;106:546-50.
156. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia MJ et al. Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction. *J Pineal Res* 2002;33:248-52.
157. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Clinical aspects of melatonin in the acute coronary syndrome. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7:367-73.
158. Brismar K, Hylander B, Eliasson K et al. Melatonin secretion related to side-effects of beta-blockers from the central nervous system. *Acta Med Scand* 1988;223:525-30.
159. Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, Acet A. Protective Effects of Melatonin on Myocardial Ischemia/Reperfusion Induced Infarct Size and Oxidative Changes. *Physiol Res* 2005; 54:491-495.
160. Baranyai T, Nagy CT, Koncsos G, et al. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning, *Cardiovascular Diabetology* 2015;14:151.
161. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ et al. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. *J Pineal Res* 1998;25:184-91.
162. Yang Y, Duan W, Jin Z et al. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Pineal Res* 2013;55:275-86.
163. Zhai M, Li B, Duan W, et al. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res* 2017;63(2):1-18.
164. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez MJ et al. A unicenter, randomized, doubleblind, parallel-group, placebo-controlled study of Melatonin as an Adjunct in patients with acute myocardiAl Infarction undergoing primary Angioplasty The. Melatonin Adjunct in the acute myocardiAl Infarction treated with Angioplasty (MARIA) trial: study design and rationale. *Contemp Clin Trials* 2007;28:532-9.
165. Liu LF, Qin Q, Qian ZH, et al. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion induced myocardial damage and hemodynamic recovery in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014;18(23):3681-3686.

166. Hausenloy DJ, Iliodromitis EK, Andreadou I, et al. Investigating the signal transduction pathways underlying remote ischemic conditioning in the porcine heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012; 26(2):87-93.
167. Grall S, Prunier-Mirebeau D, Tamarelle S, et al. Endoplasmic reticulum stress pathway involvement in local and remote myocardial ischemic conditioning. *Shock* 2013;39(5):433-9.
168. Zhu SB, Liu Y, Zhu Y, et al. Remote preconditioning, perconditioning, and postconditioning: a comparative study of their cardio-protective properties in rat models. *Clinics (Sao Paulo)* 2013;68(2):263-8.
169. Sachdeva J, Dai W, Gerczuk PZ, Kloner RA. Combined remote perconditioning and postconditioning failed to attenuate infarct size and contractile dysfunction in a rat model of coronary artery occlusion. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014;19(6):567-73.
170. Bromage DI, Pickard JM, Rossello X, et al. Remote ischaemic conditioning reduces infarct size in animal in vivo models of ischaemia-reperfusion injury: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Res* 2017; 113(3):288-297.
171. McLeod SL, Iansavichene A, Cheskes S. Remote Ischemic Perconditioning to Reduce Reperfusion Injury During Acute ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc* 2017; 17;6(5).
172. Li L, Luo W, Huang L, et al. Remote perconditioning reduces myocardial injury in adult valve replacement: a randomized controlled trial. *J Surg Res* 2010;164(1):e21-6.
173. Lu X, Bi YW, Chen KB. Olmesartan restores the protective effect of remote ischemic perconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Clinics (Sao Paulo)* 2015;70(7):500-7.
174. Iliodromitis EK, Zoga A, Vrettou A, et al. The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits. *Atherosclerosis* 2006; 188(2): 356-62.
175. Wagner C, Ebner B, Tillack D, Strasser RH, Weinbrenner C. Cardioprotection by ischemic postconditioning is abrogated in hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2013; 61(1): 35-41.
176. Penna C, Tullio F, Moro F, et al. Effects of a protocol of ischemic postconditioning and/or captopril in hearts of normotensive and hypertensive rats. *Basic research in cardiology* 2010; 105(2):181-192.
177. Zhu SG, Xi L, Kukreja RC. Type 2 diabetic obese db/db mice are refractory to myocardial ischaemic post-conditioning in vivo: potential role for Hsp20, F1-ATPase delta and Echs1. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012; 16(4): 950-8.

178. Li H, Zhou C, Chen D, et al. Failure to protect against myocardial ischemia-reperfusion injury with sevoflurane postconditioning in old rats in vivo. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 2013; 57(8):1024-1031.
179. Lee YM, Chen HR, Hsiao G, et al. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J Pineal Res* 2002; 33:72-80.
180. Yildiz M, Akdemir O. Assessment of the effects of physiological release of melatonin on arterial distensibility and blood pressure. *Cardiol Young* 2009; 19:198-203.
181. Yüzüak H, Aybak M. Streptozotosin ile oluşturulan deneysel diyabette melatonin'in olası koruyucu etkisinin araştırılması. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2014; 5 (4): 592-598.
182. Sahna E, Parlakpınar H, Ozer MK, et al. Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *J Pineal Res*. 2003; 35(4): 257-61.
183. Sahna E, Olmez E, Acet A. Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: can the incidence of sudden cardiac death be reduced? *J. Pineal Res*. 2002; 32(3): 194-8.
184. Matsushima S, Tsutsui H, Sadoshima J. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends Cardiovasc Med* 2014;24(5):202-205.
185. Kahles T and Brandes RP. Which NADPH Oxidase Isoform Is Relevant for Ischemic Stroke? The Case for Nox 2. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 20;18(12):1400-17.
186. Frantz S, Brandes RP, Hu K, et al. Left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice with targeted deletion of the NADPH oxidase subunit gp91PHOX. *Basic Res Cardiol* 2006; 101:127–132.
187. Looi YH, Grieve DJ, Siva A, et al. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* 2008;51: 319–325.
188. Bell RM, Cave AC, Johar S, et al. Pivotal role of NOX-2-containing NADPH oxidase in early ischemic preconditioning. *FASEB J* 2005; 19:2037–2039.
189. Thirunavukkarasu M, Adluri RS, Juhasz B, et al. Novel role of NADPH oxidase in ischemic myocardium: a study with Nox2 knockout mice. *Funct Integr Genomics*, 2011. [Epub ahead of print].
190. Yeung HM, Hung MW, Lau CF, Fung ML. Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *J Pineal Res* 2015;58(1):12-25.
191. Semenza GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:551–578.

192. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008;283:10892–10903.
193. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol.* 2014;76:39–56.
194. Park SW, Lee HS, Sung MS, Kim SJ. The effect of melatonin on retinal ganglion cell survival in ischemic retina. *Chonnam Med J* 2012; 48(2):116-22.
195. Zhu F, Yue W, Wang Y. The nuclear factor kappa B (NF-kappaB) activation is required for phagocytosis of staphylococcus aureus by RAW 264.7 cells. *Exp Cell Res*, 2014; 327(2),256-263.
196. Zhou T, Chuang CC, Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomed Res Int* 2015;864946.
197. Burma O, Onat E, Uysal A, et al. Effects of rosuvastatin on ADMA, rhokinase, NADPH oxidase, caveolin-1, hsp 90 and NFkB levels in a rat model of myocardial ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc J Afr* 2014;25(5):212-6.
198. Okamoto T, Ozawa Y, Kamoshita M, et al. The Neuroprotective Effect of Rapamycin as a Modulator of the mTOR-NF-kappaB Axis during Retinal Inflammation. *PLoS One*, 2016; 11(1),e0146517.
199. Huang WQ, Wen JL, Lin RQ, Wei P, Huang F. Effects of mTOR/NF-κB signaling pathway and high thoracic epidural anesthesia on myocardial ischemia-reperfusion injury via autophagy in rats. *J Cell Physiol* 2017; 5.
200. Li G, Labruto F, Sirsjo A, et al. Myocardial protection by remote preconditioning: the role of nuclear factor kappa-Bp105 and inducible nitric oxide synthase. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 26:968–973.
201. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF-κB in Aging and Disease. *Aging Dis* 2011; 2(6):449-65.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılından Elazığ'da doğdum. İlköğretimimi Elazığ Namık Kemal İlk Öğretim okulunda, orta öğretimimi Elazığ Orta Okulunda ve lise öğretimimi Elazığ Mehmet Akif Ersoy Lisesinde tamamladım. Ankara Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde lisans eğitimimi tamamladım ve 2015 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. 2007 yılından beri de serbest eczacılık yapmaktayım.

