

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Biyofizik Anabilim Dalı**

**İZOPROTERENOL İLE OLUŞTURULAN KARDİYAK  
HASARA KÜKÜRT DİOKSİTİN ETKİSİNİN  
ELEKTROFİZYOLOJİK PARAMETRELERLE  
İNCELENMESİ**

**Uğur DALAMAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2014**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Biyofizik Anabilim Dalı**

**İZOPROTERENOL İLE OLUŞTURULAN KARDİYAK  
HASARA KÜKÜRT DİOKSİTİN ETKİSİNİN  
ELEKTROFİZYOLOJİK PARAMETRELERLE  
İNCELENMESİ**

**Uğur DALAMAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Nazmi YARAŞ**

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
Tarafından Desteklenmiştir. ( Proje No:2012.02.0122.009)**

**“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir.”**

**Antalya, 2014**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir. 03 Ocak 2014

**Tez Danışmanı : Doç.Dr. Nazmi YARAŞ**

Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı



**Üye : Prof.Dr. Piraye YARGIÇOĞLU AKKİRAZ**

Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı



**Üye : Prof.Dr. Narin DERİN**

Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı



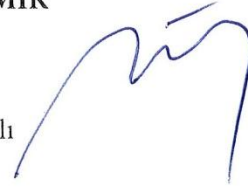
**Üye : Prof.Dr. Mutay AYDIN ASLAN**

Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



**Üye : Doç.Dr.Semir ÖZDEMİR**

Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı



**ONAY:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun ..... / ..... / ..... tarih ve ..... / ..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

**Prof.Dr.İsmail ÜSTÜNEL**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Uzun yıllardır toksik etkileri bilinen ve bu doğrultuda araştırılan karbon monoksit (CO), nitrik oksit (NO), hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) ve kükürt dioksit (SO<sub>2</sub>) moleküllerinin, son yıllarda insan vücudu tarafından da üretildiği ve fizyolojik süreçlerde görevli moleküller olduğu anlaşılmıştır. Aynı zamanda bu moleküllerin fizyolojik koşulların dışında, patofizyolojik koşullarda da etkili oldukları fark edilmiştir. Bu çalışmamızda sıçanlarda oluşturulan hipertrofik patolojinin etiyojisi üzerine SO<sub>2</sub> molekülünün rolünün elektrofizyolojik yöntemlerle incelenmesi ve işlevinin anlaşılmasına yönelik bilgilerin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla bir haftalık isoproterenol uygulaması sonucunda kardiyak hasar oluşturularak SO<sub>2</sub> donorü etkileri kardiomyosit düzeyinde gözlemlenmiştir. Bununla birlikte antioksidan karışım uygulamasıyla da, SO<sub>2</sub> molekülünün olası etkilerinin antioksidan mekanizmayla ilişkisi açıklığa kavuşturulmuştur.

Öncelikle kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranı incelenerek, izoproterenol uygulaması sonucunda hipertrofinin olduğu ve uygulanan moleküllerin bu süreci durdurmadığı tespit edilmiştir. Bu hastalık modelinin aksiyon potansiyeli depolarizasyon süresinde bir uzamaya neden olduğu ve SO<sub>2</sub> uygulamasının bu uzamayı geri döndürdüğü tespit edilmiştir. Ayrıca bu uzamaya antioksidan karışımın paralel bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu uzamanın nedeninin başka çalışmalarda gösterildiği üzere geç sodyum akımlarından (*I*<sub>NaL</sub>) dolayı gerçekleştiği söylenebilir. Bununla birlikte izoproterenolün Ca<sup>2+</sup> akımlarını azalttığı ancak SO<sub>2</sub> uygulamasıyla birlikte Ca<sup>2+</sup> akımlarının kontrol seviyelerine geri döndüğü görülmüştür. Antioksidan karışımın ise hipertrofik modelde gözlenen Ca<sup>2+</sup> akımlarının azalışına her hangi bir etkisinin olmadığı fark edilmiştir. Bu bilgilerin dışında SO<sub>2</sub>'nin elektriksel parametrelerde düzelmelere sebep olsa da mekanik parametrelerde olumsuz değişikliklere neden olduğu fark edilmiştir. Bunun nedeninin ise yapılan diğer çalışmaların da gösterdiği üzere Ca<sup>2+</sup> duyarlılığında gözlenen artışa bağlı olarak diyastolik fonksiyon bozukluklarının gerçekleşmesidir. SO<sub>2</sub> molekülünün bu etkisinin antioksidan sistemle her hangi bir ilişkisinin bulunup bulunmadığını anlayabilmek için biyokimyasal parametreler de incelenmiştir. Bu incelemenin sonucunda kardiyak hasarın protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonuna neden olmadığı saptanmış ve SO<sub>2</sub> molekülünün etkilerinin bu sistem üzerinden olamayacağı sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte tek başına SO<sub>2</sub> uygulamasının protein karbonil değerlerini artırarak oksidatif hasara neden olduğu belirlenmiştir. Bu çerçevede SO<sub>2</sub> molekülünün fizyolojik koşullarda oksidatif bir etki yaratırken, koşulların değişmesine bağlı olarak sistem üzerinde farklı etkilerin olabileceği yorumu yapılmıştır.

Sonuç olarak SO<sub>2</sub> molekülünün patolojik durumlarda kardiyovasküler sistem üzerine olumlu etkilerinin olduğu konusunda verilere ulaşılmıştır. Bu etki mekanizmasının net bir şekilde anlaşılabilmesi amacıyla daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kalp, İzoproterenol, Antioksidan Sistem, SO<sub>2</sub>, Elektrofizyoloji

## ABSTRACT

Cardiac hypertrophy is an initial adaptive response to several types of cardiovascular stress and can precede the decompensatory phase of heart failure. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) remains poorly understood, despite the fact that the genetic alterations are well defined. In this sense, many intracellular signaling molecules and pathways has been tested. Among these, the most interesting ones are gasotransmitters referred to as the carbon monoxide (CO), nitrogen monoxide (NO) and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) respectively. These molecules have been identified as primary contaminants of the environment, but the understanding of the production pathways and mechanisms physiological role draw the attention. In addition to these substances, sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) is the one that still investigated in the same way. SO<sub>2</sub> is toxic and allergic agent and metabolic removal processes is also known for a long time. Recent studies regarding the heart muscle beside other organs, SO<sub>2</sub> is endogenously produced and possible intercellular signaling molecule. However, several articles were discussing that subsidence of SO<sub>2</sub> is histologically effective in the formation of hypertrophic signal. However, the influence on heart's electrical and mechanical functions is unknown. Based on these reasoning, the study designed to investigate the effect of SO<sub>2</sub> on cardiomyocytes' excitation-contraction coupling in HCM model.

This study was designed to uncover the potential role of SO<sub>2</sub> in rat model of HCM generated by excessive  $\beta$ -adrenergic stimulation was used. Single cells have been obtained by enzymatically from hearts of rats given  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol subcutaneously to generate HCM and/or SO<sub>2</sub> donor sodium metabisulfite (*i.p*) for 7 days.

It has been found that SO<sub>2</sub> and antioxidant mixture do not effect that isoproterenol application caused hypertrophy by examining heart weight/tibia length ratio. It is observed that appeared pathology model caused lengthening at repolarization phase of action potential and SO<sub>2</sub> application reversed this process. Moreover, antioxidant mixture does have an parallel effect on this lengthening. In other studies, this lengthening explained as it took place due to the  $I_{Na-L}$  currents. Although isoproterenol reduced Ca<sup>2+</sup> current, Ca<sup>2+</sup> current was lessened to control levels with application of SO<sub>2</sub>. It have been noticed that antioxidant mixture does not have any effect on the Ca<sup>2+</sup> currents. Apart from this information, it is noticed that leads to adverse changes in mechanical parameters, even though SO<sub>2</sub> causes improvement in the electrophysiological parameters. A number of studies showed that diastolic dysfunction appeared because of occurred Ca<sup>2+</sup> sensitivity. The main reason of this interpretation is that shortening in the resting sarcomere length along with decreasing contraction amplitude. In order to understand that the relation between antioxidant system and effects of SO<sub>2</sub> molecule mentioned above, biochemical parameters are also studied. As a result of this study, it is found that cardiac damage did not caused protein oxidation and lipid peroxidation and it is emphasized that possible effects of SO<sub>2</sub> molecules cannot be out of this system. However, it is determined that SO<sub>2</sub> application does not increase protein carbonyl values. In this context, while SO<sub>2</sub> molecule creates oxidative stress in physiological conditions, different effects on the system can be revealed depending on the changing conditions

Consequently, the obtained data have implications for the understanding of cardiovascular system pathology and positive effect of SO<sub>2</sub> molecule. In order to fully understand of this effect, detailed studies should required

**Key words;** Heart, Isoproterenol, Antioxidant System, SO<sub>2</sub>, Electrophysiology

## TEŞEKKÜR

Dünyaya geldiğim ilk andan bugüne kadar her türlü maddi ve manevi desteği sağlayarak bana destek olan sevgili aileme huzurlarınızda çok teşekkür ederim.

Akademik kariyerime başladığım andan itibaren hem teorik anlamda eğiten hem de bir akademisyenin nasıl olması gerektiği hususunda fikirlerimin oluşmasını ve olgunlaşmasını sağlayan danışmanım Doç. Dr. Nazmi YARAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarımızın diğer sorumlu öğretim üyesi Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR'e ve mesai arkadaşlarım Araş. Gör. Nihal ÖZTÜR ERBOĞA'ya, Araş. Gör. Yusuf OLĞAR'a, Araş. Gör. Hasan Özdoğan'a, Kamil SAVAŞ'a ve Murat Cenk ÇELEN'e en sıkıntılı süreçlerde bana verdikleri desteklerden ve yardımlardan dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim sırasında her türlü desteğini sunan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Mutay AYDIN ASLAN'a saygılarımı sunarım.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline, sunmuş oldukları olanak ve yardımlardan dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xiii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>xv</b>
<b>GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Kalp Kasının Yapısı</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Kalp Kasının Elektrofizyolojik Düzenlenmesi</b>	<b>2</b>
<b>2.2.1. Kalpte Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi</b>	<b>2</b>
2.2.2. Kalpte Aksiyon Potansiyelinin Oluşması	<b>2</b>
<b>2.2.3. Hücreiçi Ca<sup>2+</sup> Düzenlenmesi</b>	<b>4</b>
<b>2.2.4. Kasılma Mekanizması</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Kükürt dioksit</b>	<b>6</b>
<b>2.3.1. Kükürt Dioksitin Endojen Olarak Üretimi ve Metabolizması</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2. Kükürt Dioksitin Toksisitesi</b>	<b>8</b>
<b>2.3.3. Kükürt Dioksitin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri</b>	<b>8</b>
<b>2.3.4. Kükürt Dioksitin Kalp Elektrofizyolojisi Üzerine Etkileri</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Adrenerjik Sistem</b>	<b>10</b>

2.5. Kalbin Oksidatif Mekanizması	13
<b>MATERYAL VE METOD</b>	<b>15</b>
3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Grupların Oluşturulması	15
3.2. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu	15
3.3. Voltaj Kenetleme Tekniği	17
3.3.1. L-tipi $Ca^{2+}$ Kanal Akımı Ölçümü	17
3.3.2. $K^+$ Kanal Akımları Ölçümü	17
3.4. Aksiyon Potansiyeli ölçümü (Akım Kenetleme Yöntemi)	18
3.5. Geçici Hücre içi $Ca^{2+}$ Değişimi ( $Ca^{2+}$ Transient) Ölçümü	18
3.6. Kontraktıl Parametre Ölçümü	18
3.7. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	18
3.7.1. Miyositlerde Süperoksit Anyon Radikali Ölçümü	18
3.7.2. Protein Karbonil Gruplarının Ölçümü	19
3.7.3. Redükte Glutatyon (GSH) Miktarının Ölçümü	19
3.7.4. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivite Tayini	19
3.7.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	19
3.7.6. Lipid Peroksidasyon Seviyelerinin Ölçümü	19
3.7.7. Ksantin Oksidaz Miktarı Ölçümü	20
3.8. İstatistiksel Yöntem	20
<b>BULGULAR</b>	<b>21</b>
4.1. Hayvanların Genel Durumları	21
4.2. Aksiyon Potansiyeli İle İlgili Bulgular	23
4.3. Potasyum Akımlarıyla İle İlgili Bulgular	25
4.4. Kalsiyum Akımlarıyla İlgili Bulgular	26



4.5. Hücreiçi Geçici Kalsiyum Değişimi İle İlgili Bulgular	27
4.6. Mekanik (Kontraktıl) Parametreleri	27
4.7. Biyokimyasal Bulgular	31
<b>TARTIŞMA</b>	<b>34</b>
<b>SONUÇLAR</b>	<b>39</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>40</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>49</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AP</b>	: Aksiyon Potansiyeli
<b>APD</b>	: Aksiyon Potansiyeli Süresi
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin Monofosfat
<b>[Ca]<sub>i</sub></b>	: İntraselüler Kalsiyum
<b>CICR</b>	: Kalsiyum İndüklü Kalsiyum Salınımı
<b>LTCC</b>	: L tipi Kalsiyum Kanalı
<b>SOD</b>	: Superoksit Dismutaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>GST</b>	: Glutasyon S-transferaz
<b>PKA</b>	: Protein Kinaz A
<b>AC</b>	: Adenilat Siklaz
<b>SR</b>	: Sarkoplazmik Retikulum
<b>RyR</b>	: Riyanodin reseptörü
<b>SERCA</b>	: Sarkoplazmik Retikulum Kalsiyum ATPaz
<b>CAMKII</b>	: Kalsiyum bağımlı Kalmodulin Kinaz II
<b>β-ARs</b>	: Beta Adrenerjik Reseptörler
<b>CO</b>	: Karbon Monoksit
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>H<sub>2</sub>S</b>	: Hidrojen Sülfür
<b>SO<sub>2</sub></b>	: Kükürt Dioksit
<b>ISO</b>	: İzoproterenol Uygulanan Deney Grubu
<b>K</b>	: Kontrol Deney Grubu
<b>ISO+SO<sub>2</sub></b>	: İzoproterenol ve Kükürt Dioksit Uygulanan Deney Grubu
<b>SO<sub>2</sub></b>	: Kükürt Dioksit Uygulanan Deney Grubu
<b>ISO+VİT</b>	: İzoproterenol ve Antioksidan Uygulanan Deney Grubu
<b>Na<sup>+</sup></b>	: Sodyum İyonu
<b>I<sub>Na</sub></b>	: Sodyum İyon Akımı
<b>K<sup>+</sup></b>	: Potasyum İyonu
<b>I<sub>K</sub></b>	: Potasyum İyon Akımı

<b>Ca<sup>2+</sup></b>	: Kalsiyum İyonu
<b>I<sub>Ca</sub></b>	: Kalsiyum İyon Akımı
<b>I<sub>CaL</sub></b>	: L-Tipi Kalsiyum Akımları
<b>NCX</b>	: Sodyum-Kalsiyum Değiştokuşçusu
<b>I<sub>NCX</sub></b>	: Sodyum-Kalsiyum Değiştokuşçusu Pompa Akımı
<b>I<sub>t0</sub></b>	: Geçici dışa Doğru Potasyum Akımı
<b>I<sub>K1</sub></b>	: İçeri Doğrultucu Potasyum Akımı
<b>I<sub>ss</sub></b>	: Potasyum
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz</b>	: Sodyum-Potasyum ATPaz
<b>Tn-I</b>	: Troponin I
<b>Tn-C</b>	: Troponin C
<b>CDO</b>	: Sistein Dioksijenaz
<b>SOX</b>	: Sülfite Oksidaz
<b>SO<sub>3</sub><sup>-2</sup></b>	: Sülfite
<b>SO<sub>4</sub><sup>-2</sup></b>	: Sülfat
<b>HSO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	: Bisülfite
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>GSH</b>	: Redükte Glutatyon
<b>GSSG</b>	: Okside Glutatyon
<b>·O<sub>3</sub>SOO</b>	: Peroksil Radikali
<b>·O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süper Oksit Anyon Radikali
<b>·SO<sub>3</sub><sup>-2</sup></b>	: Sülfite Radikali
<b>MCT</b>	: Monokrotalin
<b>MI</b>	: Miyokardiyal Enfarktüs
<b>µM</b>	: Mikro Molar
<b>GTP</b>	: Guanozin Trifosfat
<b>GDP</b>	: Guanozin Difosfat
<b>GTPaz</b>	: Guanozin Trifosfataz
<b>XO</b>	: Ksantin Oksidaz
<b>XDG</b>	: Ksantin Dehidrogenaz
<b>MgATP</b>	: Magnezyum Adenozin Trifosfat
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	: Kadmiyum Klorür
<b>NaHSO<sub>3</sub></b>	: Sodyum Meta Bisülfite
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Potasyum Fosfat

<b>KCl</b>	: Potasyum Klorür
<b>NaCl</b>	: Sodyum Klorür
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	: Demir
<b>NOX</b>	: Nikotin Amid Adenin Dinukleotid Fosfat Oksidaz
<b>NADPH</b>	: Nikotin Amid Adenin Dinukleotid Fosfat
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribozomal Nükleik Asit
<b>SR</b>	: Sarkoplazmik Retikulum
<b>ER</b>	: Endoplazmik Retikulum
<b>EKG</b>	: Elektrokardiyografi
<b>CHF</b>	: Konjenital Kalp Rahatsızlığı
<b>DAG</b>	: Diaçilgliserol
<b>IP3</b>	: İnozitol-3-fosfat
<b>PIP2</b>	: Fosfotidilinozitol-2-fosfat
<b>PLA2</b>	: Fosfolipaz-A-2
<b>PLD</b>	: Fosfolipaz D
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>ECC</b>	: Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Kardiyak Dokuda Ventriküler Aksiyon Potansiyelinin Fazları ve Bu Fazlardan Sorumlu İyon Akımları [12].	3
2.2. Kardiyak Dokuda Ventrikül Miyosit Hücrelerinin $Ca^{2+}$ Düzenlenmesi.	5
2.3. En Temel Kasılma Ünitesi Olarak Miyofibrillerin Şematik İfadesi.	5
2.4. Kükürt İçerikli Gaz Moleküllerinin Metabolik Süreçlerini Özetleyen Şematik Anlatım.	7
2.5. Adrenerjik Reseptörlerin Sınıflandırılması	10
2.6. $\beta$ -ARs'lerin Sinyal Yolakları.	11
2.7. Kardiyomiyositlerde ROS Kaynakları ve Etkileri	14
3.1. Kardiyomiyosit Eldesi İçin Sıçan Kalbinin İzolasyonu	16
4.1. Deney Gruplarının Kalp Ağırlığı/Vücut Ağırlığı ve Kalp Ağırlığı/Tibia Uzunluğu Oranları.	22
4.2. Akım Kenetleme Yöntemiyle Kardiyomiyositlerden Elde Edilen Aksiyon Potansiyeli Parametreleri ve Örnek Veriler.	24
4.3. Voltaj Kenetleme Yöntemiyle Kardiyomiyositlerden Elde Edilen ve Membran Potansiyellerine Bağlı Olarak Değişen $K^+$ Akımları ve Örnek Veriler	25
4.4. Voltaj Kenetleme Yöntemi Kullanılarak Kardiyomiyositlerden Elde Edilen A) $Ca^{2+}$ Akım-Voltaj Karakteristikleri ve B) Örnek Veriler.	26
4.5. Elektriksel Alan İle Uyarılan Kardiyomiyosit Hücrelerinden Elde Edilen Sarkomer Boyu Kısalma Ölçümü Analiz Sonuçları.	29
4.6. Fura-2 am Yükleme ve Elektriksel Alan Uyarımı Sonucunda Fluorometrik Olarak Ölçülen ve Kardiyomiyosit Hücrelerinden Elde Edilen Hücre İçi Geçici $Ca^{2+}$ (Transient) değişimleri.	30

- 4.7.** Oksidasyon Parametreleri-1. Biyokimyasal Yöntemlerle Deney Gruplarından Ölçülen A) Protein Karbonil Değerleri, B) TBARS Değerleri, C) Redükte Glutatyon/Okside Glutatyon Oranı, D) GPx Enzim Aktivitesi Sonuçları. **32**
- 4.8.** Oksidasyon Parametreleri-2. Biyokimyasal Yöntemlerle Deney Gruplarından Ölçülen A) Süperoksit Anyon Salınımı, B) SOD Enzim Aktivitesi, C) XO ve D) XDG Enzim Aktiviteleri Sonuçları. **33**

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>4.1. Hayvanlarla İlgili Genel Parametreler</b>	<b>24</b>

## GİRİŞ

Miyokardiyal hipertrofi birçok kardiyak rahatsızlıkta gözlenen yaygın bir durumdur [1]. Bu mekanizma içerisinde miyokardiyal hiperaktiviteden ve koroner hipotansiyondan dolayı hipoksi, aşırı kalsiyum yüklenmesi, enerji kaynaklarının tüketilmesi ve katekolaminlerin oksidatif metabolizmasından kaynaklanan aşırı serbest oksijen radikali üretiminin olduğu öngörülmektedir. Katekolaminlerin oksidatif ürünleri mitokondri, sarkotubuler sistem ve kasılma elemanları üzerinde hasar yaratmasını takiben kardiyak miyosit membranlarına etki etmekte ve kardiyak kasılma aktivitesini baskılamaktadır. Geçmiş çalışmalar izoproterenol ile indüklenen kardiyotoksitenin, serbest oksijen radikallerinin formasyonu ve çeşitli oksidatif ürünlerin vasıtasıyla oluşan sülfidril reaktivitesiyle ilişkili olduğunu sunmuştur [2]. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonunu artırarak membran geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Bu durumun da kardiyak hasarın oluşmasına yol açtığı düşünülmektedir [3]. Ancak oksijen radikallerinin, hasarın oluşumunda ne kadar payı olduğu kesin bir şekilde aydınlatılamamıştır.

Kükürt Dioksit (SO<sub>2</sub>) uzun yıllardır sadece çevre kirletici bir molekül olarak düşünülmüştür. Bu nedenle yakın zamana kadar SO<sub>2</sub>'nin biyolojik rolü ayrıntılı olarak incelenmemiştir. Çevresel kirletici etkisini açıklamak için yapılan çalışmalar bu molekülün miktarı ile kardiyovasküler nedenli morbidite ve mortalite arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir [4]. Bu durum SO<sub>2</sub> gazının insan sağlığı açısından tehlikeli bir molekül olduğunu işaret etmiş ve daha detaylı araştırmaların yapılmasına yol açmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda endojen kaynaklı SO<sub>2</sub>'nin olası bir hücre içi sinyal molekülü olarak fizyolojik süreçlerde modülatör etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır [5, 6]. Ekzojen ve endojen kaynaklı SO<sub>2</sub>'nin hayati etkilerini kardiyovasküler sistem üzerine gösterdiği, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur [7-10]. Ancak metabolik süreçlerin karmaşıklığı ve kükürt içerikli diğer moleküllerin (H<sub>2</sub>S vb.) fizyolojik süreçlerde etkin role sahip olmaları, SO<sub>2</sub>'nin olası modülatör etkilerinin aydınlatılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, yapılan çalışmalar SO<sub>2</sub>'nin fizyolojik etkilerini kesin bir biçimde ortaya koymak için yeterli olmasa da bu olguyu aydınlatmaya yönelik ipuçlarını sağlamaktadır. Dolayısıyla endojen SO<sub>2</sub>'nin olası etkilerini ortaya koymak kardiyovasküler rahatsızlıkların mekanizmasını açıklayabilmek için önemli bilgiler sağlayacaktır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamız, β-adrenerjik reseptör agonisti olan izoproterenol ile oluşturulacak kardiyak hasar üzerine SO<sub>2</sub> molekülünün etkisini, mekanik ve elektrofizyolojik veriler yardımıyla açıklamayı hedeflemektedir. Bununla birlikte bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmanın antioksidan kapasiteyle ilişkisini irdeleyerek, SO<sub>2</sub>'nin ventrikül hücrelerinin işlevi üzerine olası modülatör etkilerinin mekanizmasını aydınlatmayı planlamaktadır.



## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kalp Kasının Yapısı

Kalp dolaşım sisteminin merkezi organı olup, kendisine gelen kanı kasılarak damarlar vasıtasıyla dokulara pompalayan bir organdır. Göğüs boşluğu içerisinde iki akciğer arasında mediastinum medius denilen boşlukta, pericardium adı verilen fibroseröz bir kesenin içerisinde yer alır. Kalp duvarı epikardiyum, miyokardiyum ve endokardiyum olmak üzere 3 ana tabakadan meydana gelmektedir. Kalp kasının 3 ana tipi olan atriyum kası, ventrikül kası ve özelleşmiş uyarıcı ve iletici kas lifleri miyokardiyum tabakasında bulunur. Miyokardiyumun kalp-kası hücreleri birbirine sıkıca bağlanmış tabakalar halinde düzenlenmiş olup, kanın bulunduğu odacıkları bütünüyle sararlar. Bu tabakayı meydana getiren hücreler birbirlerine interkale diskler aracılığıyla bağlanmışlardır. Bunların içinde hücreleri bir arada tutan ve miyofibrillerin de bağlandığı desmozomlar vardır. Kalp kasında uyarı sinoatriyal düğüm denilen özelleşmiş atriyal miyositlerde başlar ve atriyoventriküler düğümüne iletilir. Bu durumu takiben sinyal, atriyoventriküler düğüm aracılığıyla purkinje liflerine ve his demetlerine iletilerek ventriküller uyarılmış olur. Uyarının iletimi gap junction denilen hücreler arası bağlantılar yoluyla hızlı bir şekilde gerçekleşir. Bu sayede kalp, atriyumlar ve ventriküller birbirlerini takip edecek şekilde miyositlerin senkronize olarak kısılması sonucunda kasılır.

### 2.2. Kalp Kasının Elektrofizyolojik Düzenlenmesi

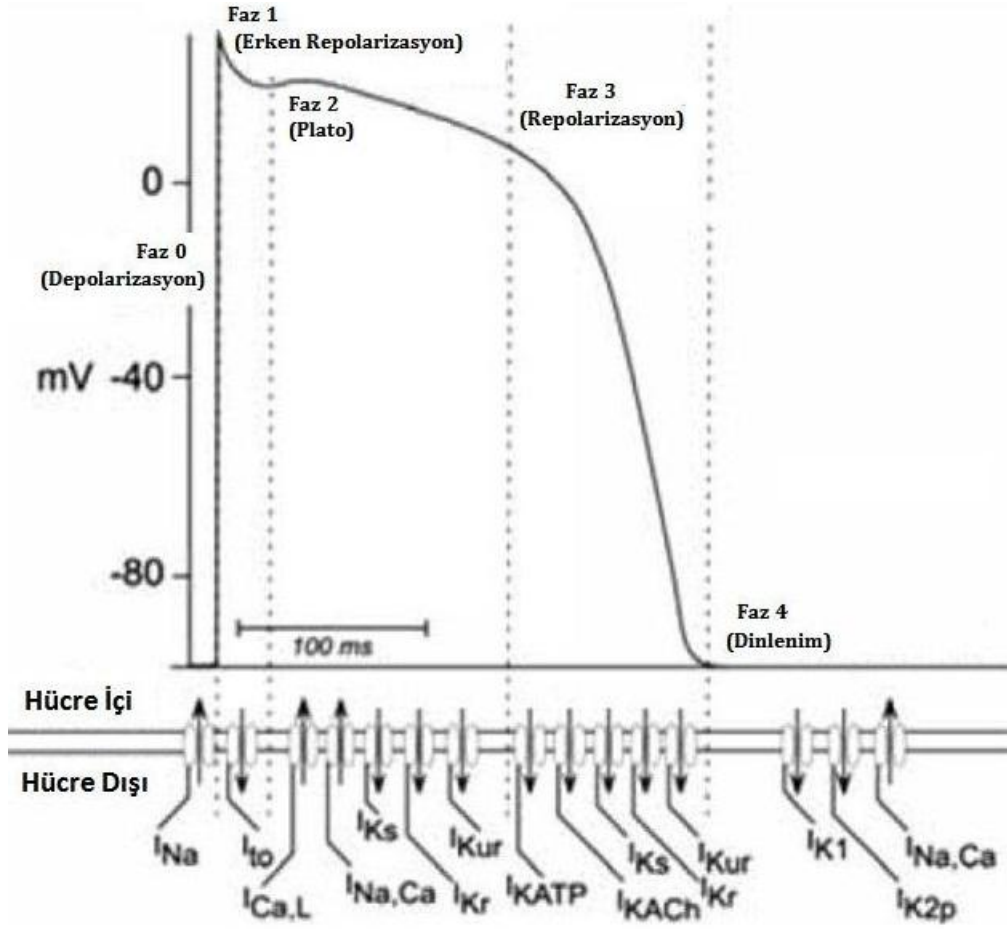
#### 2.2.1. Kalpte Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

Kardiyak dokuda gerçekleşen uyarılma-kasılma çiftlenimi elektriksel uyarıyı mekanik yanıtı dönüştüren fizyolojik süreci tarif etmektedir. Bu süreç kardiyomiyositleri saran hücre zarının elektriksel uyarılması sonucu oluşan depolarizasyonla başlayan ve akabinde miyositin dolayısıyla kalbin kasılmasıyla sonuçlanan olaylar dizisidir. Hücreler arası sıkı bağlantılar (gap junction) sayesinde aksiyon potansiyeli (AP) ve iyon içeriği hızlı bir şekilde bir hücreden diğer hücreye aktarılabilir. Bu yapı ve aktarım sayesinde kasılma senkronize bir şekilde gerçekleşmektedir.

#### 2.2.2. Kalpte Aksiyon Potansiyelinin Oluşması

Kalbin uyarılma-kasılma çiftlenimi kalpte özelleşmiş bir hücre topluluğu olan sinoatriyal nodda bulunan hücrelerde başlar. Kalbin kasılmasıyla sonuçlanan sürecin başlamasını sağlayan ilk AP bu bölgelerde bulunan hücrelerin depolarizasyonu sonucu oluşmaktadır. Daha sonra tüm kalp hücrelerine özelleşmiş iletim sistemiyle yayılan AP, kalbin senkronize bir şekilde kasılmasını sağlamaktadır [11].

AP'nin oluşması kardiyomiyositleri saran sarkolemanın iyonlara karşı geçirgenliğindeki değişimlerden kaynaklanmaktadır.



Şekil 2.1. Kardiyak dokuda ventriküler aksiyon potansiyelinin fazları ve bu fazlardan sorumlu iyon akımları [12].

Kardiyak dokuda ventrikülde bulunan kardiomyositlerin AP'ini 5 fazda incelenmektedir ve her bir fazdan sorumlu iyonlar Şekil 2.1'de görüldüğü üzere birbirlerinden farklıdır. Bu temel 5 fazı şu şekilde sınıflandırabiliriz;

- 1) Faz 0; AP'nin sıçrama fazı
- 2) Faz 1; AP'nin erken repolarizasyon fazı
- 3) Faz 2; AP'nin plato fazı
- 4) Faz 3; AP'nin asıl repolarizasyon fazı
- 5) Faz 4; Dinlenme potansiyeli fazı

Faz 0 evresi olarak adlandırılan AP oluşumunun başlangıcı sodyum iyon ( $\text{Na}^+$ ) akımlarına bağlıdır ve AP'nin sıçrama fazı olarak da adlandırılmaktadır.  $\text{Na}^+$  iyonunun aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri oldukça hızlıdır. Bu iyon birkaç ms içerisinde tepe değerine ulaşabilmektedir. Sonrasında oluşan kendiliğinden azalışta aktivasyonu kadar hızlıdır. Hücre zarının dinlenme durumuna göre çok küçük bir depolarizan etkiye maruz kalmasıyla birlikte zarında bulunan  $\text{Na}^+$  kanalları açılmaya başlar. Bu kanalların açılmasını takiben elektrokimyasal gradiyente bağlı olarak

hücre içerisine  $\text{Na}^+$  geçişinde artış gözlenir. Bu artış hücre zarını daha fazla depolarize edecek ve bu duruma bağlı olarak da daha fazla  $\text{Na}^+$  kanalının açılmasına ve içeriye daha da fazla  $\text{Na}^+$  iyonunun girmesine yol açacaktır.

$\text{Na}^+$  akımlarının sayesinde AP'nin hızlı çıkışını oluşturan faz 0 evresinin ardından erken repolarizasyon evresi olarak adlandırılan faz 1 evresi gelmektedir. Depolarizasyon sonucunda açılan potasyum iyonu ( $\text{K}^+$ ) kanallarına ve bu kanallardan geçici bir şekilde dışa doğru iyon geçişiyle meydana gelen akımlara ( $I_{to}$ ) bağlı olarak meydana gelen bir evredir.

Faz 2 ya da plato evresi olarak bilinen kısım erken repolarizasyon evresini takiben oluşmakta ve membran potansiyelinin göreceli olarak değişmediği süreci kapsamaktadır. Kalp kasında gözlenen uzun AP'nin nedenidir. Bu durum içeri doğru pozitif akımların (L-tipi  $\text{Ca}$  kanallarından içeri doğru  $\text{Ca}^{2+}$  girişi), dışarı doğru pozitif akımları (gecikmiş doğrultucu  $\text{K}^+$  akımları) görece olarak dengelemesi sonucunda gerçekleşmektedir. Bunun dışında normalde yokuş yukarı olarak çalışan ve hücre dışına attığı her  $\text{Ca}^{2+}$  için hücre içine 3 adet  $\text{Na}^+$  alan sodyum-kalsiyum değiştokuşçusu (NCX), bu evrede ileri yönde çalışarak hücre içerisine daha fazla  $\text{Ca}^{2+}$  iyon geçişi sağlamakta ve plato safhasına katkıda bulunmaktadır [13].

Platoyu takip eden faz 3 asıl repolarizasyondan sorumlu evredir.  $\text{Ca}^{2+}$  iyon kanallarının inaktivasyon sürecine girmelerinden dolayı zamana bağlı olarak  $\text{Ca}^{2+}$  iyon akımlarında bir azalma söz konusudur.  $\text{Ca}^{2+}$  akımının azalışıyla birlikte yavaş aktive olan  $\text{K}^+$  akımları artar ve zar potansiyelini  $\text{K}^+$ 'nin dinlenme membran potansiyeline doğru yaklaştırır [11].

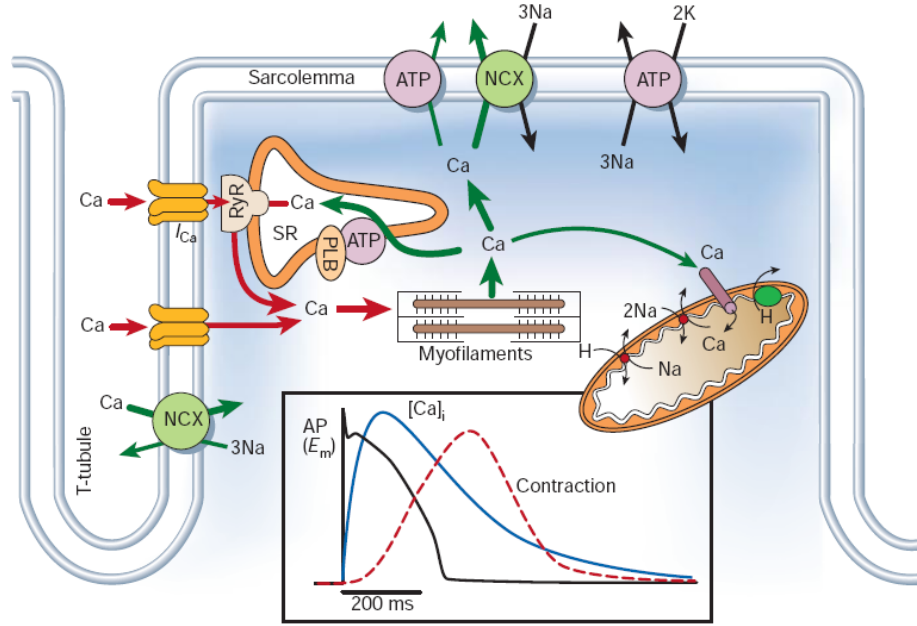
AP'nin son fazı dinlenme evresidir. Hücre membranı  $\text{K}^+$  karşı yeniden daha fazla geçirgenlik göstermeye başlar ve dinlenme membran potansiyeli bu iyonun değerliğine yakın bir potansiyele ulaşır. Şekil 2.1'de de gözüktüğü üzere bu fazdan 3 akım sorumlu iken baskın olan akım içeri doğrultucu akım olarak adlandırılan  $I_{K1}$ 'dir [11].

AP'nin oluşmasına hücre zarında bulunan kanalların dışında yine zar da bulunan başka yapılarda katkı sağlamaktadır. Bu katkıyı sağlayan yapılar içerisinde en fazla etkiye sahip iki yapı dikkati çekmektedir. Bunlar; Sodyum-potasyum ATPaz ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz) ve (NCX)'dir. Elektrojenik olarak çalışan  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pompasının işlevi iyonik gradiyentin korunmasını sağlayarak AP'nin meydana gelmesine olanak sağlamaktır. NCX ise AP'nin plato safhasında ileri (forward) yönde çalışarak hücre içerisine daha fazla  $\text{Ca}^{2+}$  iyonunun girmesini sağlayarak platonun oluşmasına yardımcı olmaktadır [13].

### 2.2.3. Hücreiçi $\text{Ca}^{2+}$ Düzenlenmesi

Sarkolemmmanın iyon geçirgenliğinin değişmesine bağlı olarak gerçekleşen depolarizasyon sonucunda hücre içerisine doğru  $\text{Ca}^{2+}$  iyon geçişinde artma gözlenmektedir.  $\text{Ca}^{2+}$  iyonları bu geçişi L-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalları aracılığıyla gerçekleştirir. L-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarından görece olarak az giren  $\text{Ca}^{2+}$  iyonları kardiyomiyosit sitoplazmasında bulunan sarkoplazmik retikulum (SR)'dan Şekil 2.2'de görüldüğü üzere  $\text{Ca}^{2+}$  salınmasına yol açar. Sarkoplazmik retikulumdan  $\text{Ca}^{2+}$

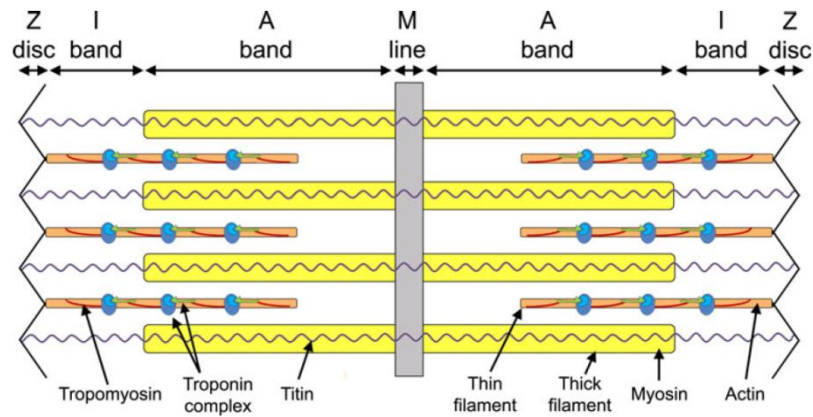
salınımını organelin membranında bulunan ryanodin reseptörleri (RYR) sağlar. Gerçekleşen bu olaya kalsiyum indüklü kalsiyum salınımı (CICR) denilmektedir [14]. Depolarizasyonun meydana gelmesiyle beraber L-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarından giren  $Ca^{2+}$ , hücrenin diyastolik serbest  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunda ( $[Ca^{2+}]_i$ ) önemli bir değişime sebep olmaz ( $\sim 100nM$ ). Kalsiyum indüklü kalsiyum salınımı aracılığıyla  $1\mu M$  düzeylerine hızlı ve ciddi bir artış gözlenir ve bu artış sayesinde kasılma mekanizmasının istenilen düzeyde çalışmasını sağlayacak olan  $Ca^{2+}$  elde edilmiş olur [11, 15].



Şekil 2.2. Kardiyak dokuda ventrikül miyosit hücrelerinin  $Ca^{2+}$  düzenlenmesi [11].

#### 2.2.4. Kasılma Mekanizması

Kalp kasılması, kalp kasının kısalması ve tekrar eski haline geri dönmesidir. Kasın kısalmasını şekil 2.3’de görüldüğü üzere en küçük kontraksiyon ünitesi olan miyofibriller gerçekleştirir.



Şekil 2.3. En temel kasılma ünitesi olarak miyofibrillerin şematik ifadesi [16].

Kalsiyum indüklü kalsiyum salınımı sayesinde sitoplazmada yeterli düzeyde  $[Ca^{2+}]_i$  bulunmasıyla birlikte kasılma işinin gerçekleşmesi adına uygun ortam sağlanmış demektir. Ortamda konsantrasyonu artan  $Ca^{2+}$  dinlenim halindeki kasda Şekil 2.3’de de görüldüğü üzere troponini oluşturan ve 3 alt birimden biri olan troponin c (Tn-C) ile etkileşime geçer.  $Ca^{2+}$  ile etkileşime geçen (Tn-C) troponin ile tropomiyozin kompleksini belli bir bölgede sabit bir şekilde tutan troponin I (Tn-I) da konformasyonel değişime neden olur. Böylece aktinlerde bulunan miyozin bağlayıcı bölgeler açığa çıkmış olur. Daha sonra miyozin başları bu aktin filamentlerinde kayarak ilerlerler ve aktin filamentlerini birbirlerine doğru çekiştirerek I bandını oluşturan mesafeyi azaltırlar. Böylece miyofilament boyu kısalmış olur. Bu kısalmanın aynı anda ve tüm miyofilamentlerde senkronize bir şekilde gerçekleşmesiyle kalp kasılır [16].

Kasılma mekanizması iki evreden oluşmaktadır. Birincisi yukarıda da anlatıldığı üzere kasın kısalmasıyla alakalıdır. İkinci basamak ise kasın gevşemesi ya da dinlenim durumundaki haline geri dönmesidir. Kısalma işleminin hemen arkasından Tn-C ve  $Ca^{2+}$ ’nın birleşmesiyle oluşan kompleksden  $Ca^{2+}$  ayrılır. Bu ayrılmanın nedeni sitoplazmada bulunan serbest  $[Ca^{2+}]_i$  azalmadır.  $[Ca^{2+}]_i$  azalma hem SR yüzeyinde bulunan ve bir  $Ca^{2+}$  pompası olan sarkoplazmik retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPaz (SERCA) hem de sarkolemmada bulunan NCX pompasının çalışması sonucunda gerçekleşmektedir.  $Ca^{2+}$ ’un ayrılması troponin ve tropomiyozin kompleksinin eski konformasyonel durumuna geri dönmesini sağlar. Bu durumu takiben aktin bölgelerinde bulunan miyozin bağlayıcı bölgelerde inaktif duruma geçer. Böylece miyofibriller dinlenim durumuna geri dönmüş olur. Böylece  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu diyastolik düzeye indirilmiş olur ve gevşeme gerçekleşir [11, 15].

### 2.3. Kükürt dioksit

Hava kirliliği insan sağlığını tüm dünyada giderek artan boyutlarda tehdit eden bir sorun olmaya devam etmektedir [17, 18]. Bu sorunun tanımlanması için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar içerisinde kirliliğe neden olan birçok molekülle birlikte karbon monoksit (CO), azot monoksit (NO), hidrojen sülfür ( $H_2S$ ) ve kükürt dioksit ( $SO_2$ ) gibi gaz moleküllerde bulunmaktadır. Bu moleküllerin insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkilerinin öğrenilmesi için çalışmalar yapılırken ilginç verilerle karşılaşılmiştir. Bu gaz moleküllerinin insan vücudu tarafından üretildiği de gözlenmiştir [19-22]. İlerleyen çalışmalarda bu gaz moleküllerinin, fizyolojik koşullarda hücrel faaliyetlerin gerçekleşmesi ve sürdürülebilmesi için gerekliliği anlaşılmıştır [21, 23, 24]. Gazotransmitter olarak adlandırılan CO, NO ve  $H_2S$  moleküllerinin fizyolojik durumların yanında patofizyolojik durumlarda da varlığını gösterdiği belirlenmiştir [25, 26]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar dahilinde  $SO_2$ ’nin de diğer moleküller gibi etkilerinin olabileceğine dair düşüncelerin oluşmasını sağlayan veriler elde edilmiştir [6, 7, 27].



### 2.3.2. Kükürt Dioksitin Toksikitesi

Ekzojen olarak da alınsa endojen olarak da üretilse  $SO_2$ ,  $SO_3^{-2}$  ve bisülfid ( $HSO_3^-$ ) olarak metabolize olmaktadır. Oluşan  $SO_3^{-2}$  vücutta aşırı miktarda bulunduğu takdirde toksik etki göstermektedir [32, 33]. Bu toksik etkinin oluşmaması için mitokondriyal bir enzim olan SOX devreye girer ve  $SO_4^{-2}$  dönüştürülerek  $SO_3^{-2}$ 'nin detoksifikasyonu gerçekleştirilir [32, 34]. Ancak bazı durumlarda bu reaksiyon çok verimli olarak çalışmaz. Enzim eksikliğinde ve aşırı  $SO_3^{-2}$  birikiminde molekülün toksik etkisi yoğun bir şekilde gözlenmeye başlar. Biriken  $SO_3^{-2}$  düşük molekül ağırlıklı bir tiyol olan okside glutatyon (GSSG) ile sülfitolizis reaksiyonuna girer ve s-sülfonatları meydana getirir [32, 35]. Bir s-sülfonat olan s-sülfoglutasyon, karaciğerde detoksifikasyon işlerinde aktif bir molekül olarak görev yapan glutatyon s-transferaz enzimini inhibe eder ve bu şekilde vücutta toksik madde birikimini arttırır [36]. Aşırı birikme ve enzim eksikliğinde karşılaşılabilecek bir diğer tehlikeli durumda  $SO_3^{-2}$ 'nin  $H_2O_2$  ile reaksiyona girmesidir [37]. Bu reaksiyon sonucunda sülfid ( $\cdot SO_3^-$ ) radikali meydana gelir. Bu molekül toksik etkisi çok fazla olan peroksil radikalini ( $\cdot O_3SOO$ ) oluşturacak olan reaksiyonu tetikler [37]. Bunun sonucunda başta metiyonin ve triptofan olmak üzere amino asit ve dolayısıyla protein kaybı,  $\beta$ -karoten tahribatı, lipid peroksidasyonunda artma ve membranlarda hasarlar oluşur. Bu derece önemli ve zarar verici etkinin dışında en önemli toksik etkisini  $\cdot O_2^-$  radikalinin detoksifikasyonu sırasında gerçekleştirir. Süper oksit anyon radikali ( $\cdot O_2^-$ ) süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla  $H_2O_2$ 'ye dönüşür. Oluşan  $H_2O_2$  glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) enzimi sayesinde suya dönüşür. Ancak bu reaksiyon sırasında bir  $e^-$  alış verişinin olması gerekir. Bu  $e^-$  kaynağını da GSH'ın GSSG'ye dönüşümü sırasında serbest kalan  $e^-$  oluşturur. İşte aşırı biriken  $SO_3^{-2}$  GSH'ın GSSG'ye dönüşümünü baskılar ve  $H_2O_2$ 'nin dönüşümü için gerekli olan  $e^-$  kaynağını yoke der ve vücutta önce  $H_2O_2$  birikimi, ardından da  $\cdot O_2^-$  birikimi artar [37-40].

### 2.3.3. Kükürt Dioksitin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

$SO_2$  ister ekzojen yollarla alınsın isterse de endojen olarak üretilsin sistemik bir ajandır [4]. Kolay bir şekilde kana geçebildiği için bütün dokularda bulunabilmekte ve etkisini göstermektedir.  $SO_2$ 'nin vasküler sistem üzerine etkileri akut ve subkronik olarak incelenmiştir. Akut etkisi üzerine yapılan çalışmada doz bağımlı olarak kan basıncı üzerine bir etkisinin olduğu gözlenmemiştir. Ancak yüksek doz kullanımlarında diğer sonuçların dışında kan basıncını düşürücü etkisi olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Subkronik etkileri açıklayabilmek için yapılan çalışmada ise düşük ve orta dozlarda 2. ve 3. günden sonra kan basıncı üzerine düşürücü etkisi gözlenirken, yüksek dozda uygulamanın gerçekleştiği andan itibaren düşüş fark edilmiştir. Bu verilerin ışığında  $SO_2$  doz bağımlı olarak ve süreç bağımlı olarak kan basıncı seviyesinin düşürebildiği gösterilmiştir [41].

Kan basıncını düşürebildiği tespit edilen  $SO_2$  molekülünün önemli bir hastalık olan ve birçok önemli kardiyovasküler sistem rahatsızlığının da patogeneğinde önemli rol alan hipertansiyona nasıl bir etki yapabileceği araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda monokrotalin (MCT) ile hipertansiyon oluşturulmuş ve molekülün etkilerinin bu durum üzerine olan etkileri incelenmiştir. Hipertansiyonun en önemli belirtilerinden biri damar hücrelerinin yeniden modellenmesidir. Bu modellenme sonucunda damar lümeni normal boyuta nazaran daralmış ve bu daralma sonucunda

damar direnci artmış ve hipertansiyon gelişmiştir. SO<sub>2</sub> uygulandığında ise yeniden modellemenin azaldığı ve damar direncinde artma olmadığı tespit edilmiştir. Mevcut azalmanında antioksidan kapasitenin artmasıyla gerçekleştiği ileri sürülmüştür [42].

Bir başka hipertansiyon çalışmasında spontan hipertansiyon modeli üzerinde yapılmıştır. Spontan hipertansiyonun patogenezi içerisinde kan basıncının artması ve arteriyel damar duvarında anormal kollajen birikmesidir. SO<sub>2</sub> verildiğinde ise bu patogenezlere azalma gözlenmiştir. Bu durumla ilgili bir başka patolojide serum SO<sub>2</sub> düzeylerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. SO<sub>2</sub> verildiğinde serum konsantrasyonu bu duruma bağlı olarak artmış ve akabinde de antioksidan düzeyinde arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak SO<sub>2</sub> etkisinin antioksidan kapasitenin artmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir [43].

Günümüzde hala en önemli ölüm sebebi olarak miyokardiyal infarktüs (MI) gösterilmektedir. İskemik durumlarda lipid peroksidasyonu artar, GSH düzeyi azalır, dokudaki sülfid miktarı artar, sol ventrikül içi basıncı düşer. SO<sub>2</sub> verildiğinde ise patolojik durumların şiddetli bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç SO<sub>2</sub> molekülünün MI da toksik bir etki yarattığını işaret etmektedir [10]. Ancak son yapılan çalışmalarda, SO<sub>2</sub>'nin önden verilmesiyle birlikte oluşturulan MI modellerinde beklenen hasarların meydana gelmediği, bu durumda antioksidan kapasitenin artması ve ER'de oluşacak stresin baskılanması sayesinde gerçekleştiği bilgisine ulaşılmıştır [44, 45].

#### **2.3.4. Kükürt Dioksitin Kalp Elektrofizyolojisi Üzerine Etkileri**

SO<sub>2</sub> ile ilgili elektrofizyolojik çalışmalar yeterli olmasa da temel etkileri hakkında bilgi edinebileceğimiz bazı verileri sunmaktadır. K<sup>+</sup> iyon akımları üzerine yapılan çalışmada SO<sub>2</sub> verilen grupta I<sub>0</sub> ve I<sub>K1</sub> değerleri kontrol grubuna nazaran artarken, I<sub>SS</sub> değerinde bir değişiklik görülmemiştir. Aktivasyon kinetiğini daha negatif, inaktivasyon kinetiğini ise daha pozitif kaydırmıştır. Bu durum kanalların daha uzun süre açık kalmasını sağlamaktadır. İnaktivasyondan dönüş kinetiğinin ise süresini kısaltmıştır. Bu da bize kanalın kapalı kaldığı sürenin kısaldığını ve bunu takiben hücrenin daha uzun süre uyarılara maruz kaldığını göstermektedir [46, 47]. Na<sup>+</sup> iyon akımları üzerine yapılan çalışmada SO<sub>2</sub> doz bağımlı olarak uygulanmış ve doz artışına bağlı olarak I<sub>Na</sub> akımlarının arttığı bulgusuna ulaşılmıştır. İnaktivasyonun daha pozitiflere doğru kaydığı, aktivasyonun ise daha negatif potansiyellere doğru çekildiği belirtilmiştir. Bu durum kanalın daha uzun süre açık kaldığını göstermektedir. Akım voltaj ilişkisinin karakteristiğini anlatan duruma göre doza bağımlı olarak kontrole nazaran sodyum akımlarının tepe noktası değeri artmıştır [48]. Kalsiyum akımları incelendiğinde ise tam bir fikir birliğinin olmadığı görülmektedir. İki farklı çalışma iki farklı sonuca işaret etmektedir. 2006 yılında Nie ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SO<sub>2</sub>'nin I<sub>Ca</sub> akımlarını uyardığını bulmuşken, 2011 yılında ise Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SO<sub>2</sub>'nin I<sub>Ca</sub> üzerine baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşmıştır [49, 50]. Hücre zarında bulunan bir pompa olan sodyum kalsiyum değiştokuşcusu sodium gradiyentini kullanarak hücre içi kalsiyum miktarının kontrolünü sağlayan bir mekanizma oluşturmaktadır. SO<sub>2</sub> bu proteinin düzgün çalışmasını engelleyerek kanal aktivitesini inhibe edip hücre içi kalsiyum birikmesine neden olduğu bilinmektedir [51]. Bu

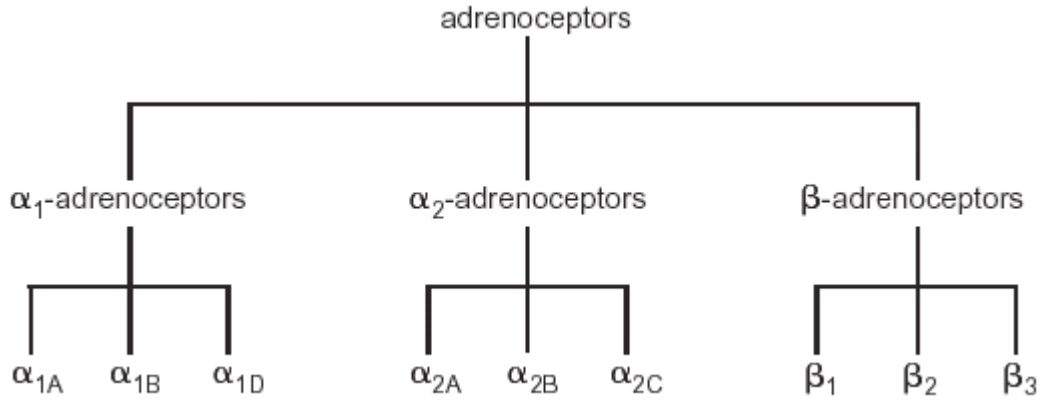


durumunda kasılmanın artması ve organın hipertrofiye doğru gitmesinin nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir.

#### 2.4. Adrenerjik Sistem

Primer adrenal medullar hormon ve merkezî nörotransmitter olan epinefrin (adrenalin) ve primer sempatik nörotransmitter olan norepinefrin (noradrenalin) içi özelleşmiş reseptör grubunun oluşturduğu sistemdir. Bu reseptörler kan basıncının kontrolünde, miyokardiyal kasılma hızında (chronotropy), miyokardiyal kuvvet (inotropy), miyokardiyal gevşeme (lusitropy), hava yolu reaktivasyonu ve lipolizis gibi çeşitli anahtar hücresele fonksiyonlara aracılık yapmaktadırlar. Bu reseptörlere adrenerjik (ARs) reseptörler denir ve integral transmembran proteinlerinin bir parçasıdır. Adrenerjik reseptörler etkilerini hücre içerisine, sıkı bir ilişki içerisinde oldukları guanin nükleotid düzenleyici proteinler (G-proteini) aracılığıyla iletirler. Bu reseptörlerin temel amacı ekstraselüler ortamdaki uyarıcıların tanımlanmasıdır [11, 52, 53].

Moleküler biyoloji tekniklerinin (agonist ve antagonistlerin radyoaktif etiketleme yöntemi ile işaretlenmesi vb.) gelişmesiyle birlikte farmakolojik olarak 3 alt tipe sınıflandırılmıştır. Bunlar  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ve  $\beta$ 'dir. Şekil 2.5.'de gösterildiği üzere herbir 3 alt tipte kendi içerisinde 3'er alt tipe ayrılmıştır [54, 55].



Şekil 2.5. Adrenerjik reseptörlerin sınıflandırılması

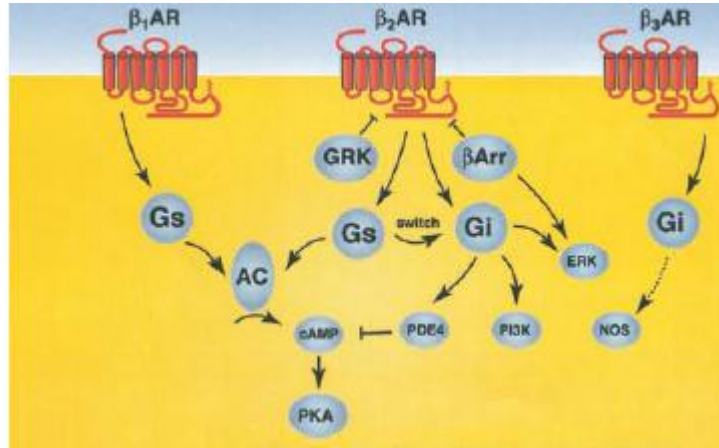
Adrenerjik reseptörler hücre içerisine etkilerini G-proteini aracılığıyla göstermektedirler. G-proteinleri heterotrimerik yapıda bulunan ve hücreiçi sinyal yollarında ikincil haberci olarak görev yapan 3 alt birimden meydana gelen bir yapıdır. Bu alt birimler;  $\alpha$  alt birimi (39-46 kDa),  $\beta$  alt birimi (37 kDa) ve  $\gamma$  alt birimi (8 kDa)'dır. Günümüzde 10 farklı  $\alpha$  alt birimi, 5  $\beta$  alt birimi ve 10  $\gamma$  alt birimi tespit edilebilmiştir(ref). Bu denli farklı alt birimin bulunmasından dolayı çok fazla çeşitte ve farklı işlevleri yerine getirebilecek G-proteinleri meydana gelmektedir. G-proteinini oluşturan bu üç alt tipten  $\alpha$  alt tipi esas katalitik etkiyi gösteren alt birimdir. Buna karşılık  $\beta$  ve  $\gamma$  alt birimleri birbirlerine yapışık olarak bulunmakta ve çok nadir de olsa katalitik etki gösterebilmektedirler [56, 57].

$G\alpha$  alt birimi 4 farklı alt ünitelerden meydana gelmektedir. Bunlar;  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  ve  $G\alpha_{12}$  alt üniteleridir.  $G\alpha$  alt birimi guanin nükleotidine bağlanır ve kendi

içerisindeki GTPaz aktivitesi aracılığıyla guanozin trifosfatı (GTP) guanozin difosfata (GDP) hidrolize eder. GDP molekülü heterotrimerik G-proteinine bağlandığında protein inaktif hale geçer ve sinyal iletimi durur. Ancak GDP ile GTP yer değiştirdiğinde protein tekrardan aktif hale geçer ve sinyal iletimi gerçekleşir. GTP ile bağ kuran  $G\alpha$  alt ünitesi bağlı olduğu  $\beta$  ve  $\gamma$  alt ünitelerinden ayrılır ve iki parçada birbirlerinden bağımsız olarak katalitik etkilerini gösterebilmektedirler [57-59].

Kardiyak dokuda adrenerjik reseptörlerin 3 alt tipi bulunmaktadır. Her bir alt tipi kardiyak doku üzerine farklı etkileri mevcuttur. Farklı etkilerine paralel olarak farklı G-protein sinyal yollarını kullanmaları beklenmedik bir durum değildir.  $\alpha_1$ -ARs  $G_{\alpha q}$  ile etkileşime geçerek efektör fosfolipaz c'yi aktive eder. Gerçekleşen bu dönüşüm membran inozitol fosfolipitlerinin (PIP2; fosfotidil inozitol difosfat) hidrolize olmasının önünü açar. PIP'nin hidrolize olması sonucunda birer ikincil mesajcı olan inozitol-3-fosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) meydana gelir. IP3 SR'dan kalsiyum salınmasına neden olarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu etkileyebilen en önemli faktörlerden biridir. DAG ise protein kinaz C'nin izoformlarını aktive ederek hücresel hedeflerin fosforillenmesini ve düzenlenmesini kuvvetlenmesini sağlar.  $\alpha_1$  ARs'ler ayrıca fosfolipaz A2 (PLA2), fosfolipaz D (PLD) ve kalsiyum kanallarını içeren 3 farklı sinyal yolağında etkileyebilmektedir [60-62].

$\alpha_2$ -ARs'in temel görevi  $G_{\alpha i}$  proteini ile etkileşerek adenilat siklazı (AS) inhibe etmektir. Adenilat siklaz hücre içi sinyal yollarının büyük bir kısmında başlatıcı rolü oynayan cAMP'yi üretmektedir [52].



Şekil 2.6.  $\beta$ -ARs'lerin sinyal yolları.

Beta adrenerjik reseptörlerin 3 alt tipide Şekil 2.6'da görüldüğü üzere  $G_{\alpha s}$  proteini üzerinden etkisini göstermektedir.  $G_{\alpha s}$  AS'yi uyararak cAMP düzeyinin artmasını sağlamaktadır. Artan cAMP düzeyide cAMP bağımlı protein kinaz olan protein kinaz A'yı (PKA) aktive ederek, fosfolamban, kalsiyum kanalları ve kasılma proteini içeren protein gruplarının fosforillenmesine yol açmaktadır. Bazı özel durumlarda  $\beta_2$  ve  $\beta_3$  alt tipleri  $G_{\alpha i}$ 'yi aktive ederek AC'nin inhibisyonunuda sağlamaktadır. Bu paradoksal durum konjestif kalp rahatsızlığı (KKY) gibi patolojik durumların meydana gelmesini sağlayabilmektedir [52, 63, 64].

Agonistlerin kendi reseptörleriyle etkileşime geçmelerinin sonucunda birbirine zıt iki fizyolojik süreç gelişmektedir. Bu durum 1) reseptör aktivasyonu ve 2) reseptör desensitizasyon (duyarsızlaşma) olarak adlandırılabilir. Reseptör duyarsızlaşması fizyolojik süreçler içerisinde olması gereken bir düzenleyici süreçtir. Aynı tip uyarının etkisiyle aynı tip hücrel cevabın birikmesini engelleyerek hücrenin fizyolojik koşulların dışına çıkması engellenmektedir. Bunun yanında ileriki zamanlarda da aynı tip uyarının hücrel cevabının aynı düzeyde oluşabilmesini sağlamak için olması gereken bir süreçtir. Reseptör duyarsızlaşması 3 başlık altında toplanabilmektedir; 1) uncoupling (birbirinden ayrılma) 2) sequestration (ayrılma) ve 3) down regulation (reseptör sayısını azaltarak düzenleme) [65-68]. Birbirinden ayrılma olarak adlandırılan durum G-protein aktivasyonunun kaybolmasıyla karakterizedir. Bu olgu çok hızlı bir şekilde gerçekleşmekte ve spesifik düzenleyici kinazların reseptörü fosforillemesi sonucunda gerçekleşmektedir [65, 68].

Ayrılma hücre yüzeyinde bulunan reseptör proteinlerinin ortadan kalmasıyla tanımlanmaktadır. İlgili reseptörlerin bulunduğu plazma membranının hücre içine doğru invaginasyonda bulunması ve bu durumu takiben bir veziküle dönüşerek hücre yüzeyinden uzaklaştırılması şeklinde gerçekleşmektedir. Daha sonra vezikül hızlı bir şekilde döngüye girerek tekrardan fonksiyonunu gösterebilmesi için plazma membranıyla birleşerek ilgili reseptörlerin hücre yüzeyinde bulunmasını sağlamaktadır [65, 68].

Reseptör sayısının azalması birbirinden ayırmaya nazaran çok daha yavaş gerçekleşen ve duyarsızlaşma olgusu içerisinde en yüksek yüzdeyle gözlenen durumdur. Bu durum proteolizis tarafından reseptör parçalanmasını ve mRNA sentezinin azalmasına bağlı olarak reseptör sentezinin düşmesini kapsamaktadır [65, 68].

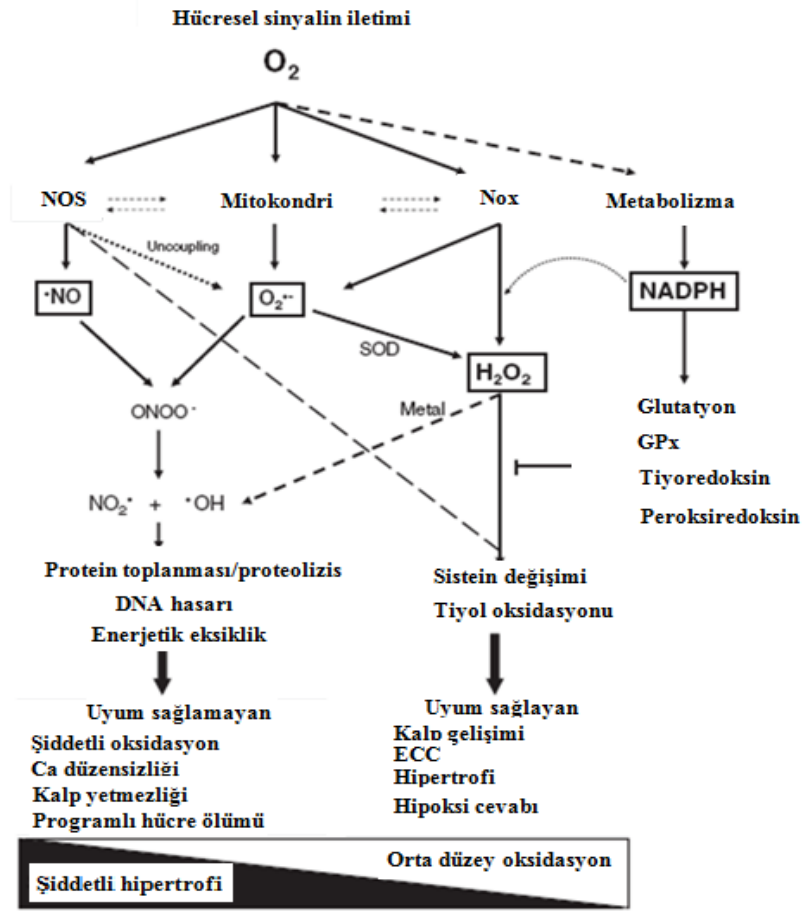
Tüm bu ARs'ler içerisinde belirgin bir şekilde kardiyak doku üzerine en etkili olan tip  $\beta$ -ARs'lerdir. Fizyolojik koşullarda kardiyak dokuda gerçekleşen uyarılma-kasılma çiftlenimine  $\beta$ -ARs'lerde katkı sağlamaktadır [11]. Şekil 2.7'de görüldüğü üzere  $\beta$ -ARs'ler (özellikle  $\beta_1$ ) G-proteini üzerinden hücre içi sinyal yolağını tetiklemekte, G $\alpha$ s'ın AC'yi aktifleştirilmesiyle süreç işlemeye devam etmektedir. AS ATP'den cAMP sentezini gerçekleştirir. Konsantrasyonu artan cAMP PKA'nın aktifleşmesini sağlayarak özellikle RYR ve SERCA'nın fosforillenmesini gerçekleştirerek, Ca<sup>2+</sup>'nın SR'dan salınımını sağlarken aynı zamanda da SR içerisine alınımı engelleyerek [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> arttırmaktadır. Kalbin uyarılma-kasılma çiftleniminde önemli bir yere sahip olan bu sistemdeki değişikliklerde haliyle işleyişin fizyolojik koşulların dışına çıkmasına neden olabilir. PKA'nın sentezinde değişikliklere neden olup RYR, fosfolamban, Ca<sup>2+</sup> kanal proteinlerine etki ederek uyarılma-kasılma çiftlenimine etki edebileceği gibi, Ca<sup>2+</sup> kanal kinetiklerinde farklılıklara neden olarak hücre içi Ca<sup>2+</sup> homeostazisine ve bu duruma bağlı diğer fizyolojik süreçlerde müdahalede bulunabilmektedir. Bu değişikliklerin sonucunda hipertrofik kardiyomiyopatiden, aritmilere kadar uzanan geniş bir yelpazede kalp rahatsızlıklarının meydana gelmesinde etkili rol oynayabilmektedir [11, 59, 69].

Bu yolların aktivasyonu yardımıyla hipertrofik hasar oluşturulan hayvan modeli uzun süredir kullanılmaktadır [70-72]. Bu hasarı yaratmak amacıyla genel  $\beta$ -ARs agonisti olarak isoproterenol sıklıkla kullanılmaktadır. Litaretür, uygulanan izoproterenolün dozuna bağlı olarak etkisini 3 sınıfa ayırmıştır [73]. 1) düşük doz (0,3-6 mg/kg/gün) isoproterenol uygulaması kan basıncını düşürmezken [74], fibröz ve nekrotik alan oluşumunu ve artışını sağlayarak hipertrofinin gerçekleşmesine [75-77], EKG sinyalinde değişikliklere neden olarak etkisini gösterebilmektedir [78]. 2) Orta doz (10-85 mg/kg/gün) izoproterenol uygulaması geçici de olsa sistolik ve diyastolik kan basıncını düşürürken uzun süreli uygulamada kan basıncı üzerine etkisi gözlenmemiştir [79, 80]. Ayrıca mitokondri matriksinin homojenliğinin artmasına, krista sayısının azalmasına ve organelin şişmesine neden olmuştur [81-83]. Ek olarak SR T-tübüllerinin dilatasyonuna, enerji ihtiyacının artmasına ve oksijen içeriğinin azalmasına neden olmuştur [81]. Yüksek doz (85-300 mg/kg/gün) izoproterenol uygulaması ise akut miyokardiyal iskemiye [84], sol ventrikül dilatasyonu ile birlikte hipertrofiye, ventrikül duvar kalınlığının artmasına ve fibröz doku miktarının artmasına [71, 85, 86], sistolik ve diyastolik fonksiyon bozukluklarına neden olduğu gösterilmiştir [87].

## 2.5. Kalbin Oksidatif Mekanizması

Normal fizyolojik koşullar içerisinde metabolik süreçlerin sonunda birer yan ürün olarak elde edilen reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan moleküller bu fizyolojik süreçlerin işleyişinde ve devamlılığında Şekil 2.7'de gösterildiği gibi görev alan moleküller olarak da bilinmektedir. Bu moleküller için bir denge durumunun olması gerekmektedir. Dengenin bozulması durumunda pozitif geri besleme mekanizması gibi çalışarak patofizyolojik etkinin artmasına katkıda bulunur. Bu süreç söz konusu olduğunda devreye ROS'ların etkisini ortadan kaldırmakla görevli olan antioksidan savunma sistemi devreye girmektedir. Antioksidan savunma sistemini süperoksit dismutaz (SOD), yağda çözünen vitaminlerden A ve E, suda çözünen vitaminlerden C, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon (GSH) gibi moleküller oluşturmaktadır [88-91].

Hücrel redoks dengesi kardiyomiyositlerin de içerisinde bulunduğu birçok hücre grubunun kök hücrelerden farklılaşmasına ve büyümesine katkı sağlamaktadır [92-95]. NADPH'dan elektron transferi sonucu süperoksit anyon radikali oluşturan (NADPH-oksidad)'ın eksikliğinde embriyonik kök hücrelerden kardiyomiyosit oluşumunda azalma olduğu gözlenmiştir [94, 96, 97]. Bu durumla ilişkin bir başka çalışmada ise akut olarak gerim indüklü NADPH-oksidad aktivasyonunun normal uyarılma-kasılma çiftlenimi (ECC)'de  $Ca^{2+}$  salınımını sağlayarak kardiyomiyositte kasılma kuvvetinin oluşmasında katkısı olduğu gözlenmiştir [98]. Dengenin bozulmasıyla birlikte fonksiyon tersine dönmektedir. Fonksiyon bozukluğu olan RYR'ler aracılığıyla SR'dan diyastolik safhada  $Ca^{2+}$  sızması, SR  $Ca^{2+}$  içeriğinin ve  $Ca^{2+}$  transientlerinin azalmasına neden olmaktadır. Bu durumun sonucunda da diyastolik  $Ca^{2+}$  da artma, aritmi ve sistolik kuvvette azalmaya neden olmaktadır [99, 100]. Bu bozukluğa neden olan durum RYR'nin aşırı fosforillenmesinin sonucunda oluşmuştur. Oksidasyonun artması PKA/kalmodulin kinaz (CAMKII) aktivasyonun artmasına, bu durumda fosforillenmenin artmasına neden olmuştur [101-103].



Şekil 2.7. Kardiyomiyositlerde ROS kaynakları ve etkileri

Hücrelerde metabolik olaylar sırasında yada sonrasında meydana gelen ROS'ların toksik etkisini ortadan kaldırabilmek için antioksidan kapasite devreye girmektedir. Bu enzimler yada vitaminler sitoplazmik, mitokondriyal veya hücre dışı kaynaklı olabilirler [104].

Süperoksit dismutaz oksidatif strese karşı en önemli savunma mekanizmalarından bir tanesidir. Aktivitesi çok fazla olan bu enzim hem kendi başına çok etkili bir reaktif olan hem de radikal üretiminde önemli bir yere sahip olan  $O_2^{\cdot-}$  zararsız  $H_2O_2$ 'ye ve moleküler  $O_2$ 'ye dönüştürmektedir. Bu sayede radikal üretimi kontrol altına almaktadır [105, 106]. Bir peroksidaz olan CAT  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$  ve moleküler  $O_2$ 'ye dönüştürerek hüresel düzeyde peroksit konsantrasyonunu kontrol altında tutmaktadır.[106, 107] Peroksitlere karşı etkili bir başka enzimde GPx'dir. GPx özellikle hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayarak reaktif türlerin üretimini kontrol etmektedir. Sistein, glutamik asit ve glisin amino asitlerinden meydana gelen GSH sistein amino asitinde bulunan tiyol grubu sayesinde anti oksidan özellik gösterir. GSH  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  ve  $H_2O_2$ 'yi indirgeyerek oksidatif hasarın gerçekleşmesini engeller. Bunun dışında yükseltgenmiş olarak bulunan vitamin türevlerinin indirgenmesini ve  $Fe^{2+}$ 'nin bu düzeyde bulunmasını sağlayarak protein ve enzimlerin gereksiz yere inaktivasyona uğramasını engellemektedir [108, 109].

## MATERYAL VE METOD

### 3.1. DeneY Hayvanlarının Hazırlanması ve Grupların Oluşturulması

DeneYlerde 250-350 gr arasında vücut ağırlıkları olan 3 aylık 100 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. DeneYlerin gerçekleştirildiği süre boyunca hayvanlar bir kafes içerisinde 4 tane bulunacak şekilde yerleştirilmiş ve bu süre zarfında su ve yem kısıtlaması olmaksızın beslenmeleri sağlanmıştır.

Bu çalışmada hipotez doğrultusunda 5 adet deneY grubu tasarlanmıştır. Bu gruplar;

- 1) Kontrol grubu (K)
- 2) İzoproterenol grubu (ISO)
- 3) İzoproterenol ve kükürt dioksit grubu (ISO+SO<sub>2</sub>)
- 4) Kükürt dioksit grubu (SO<sub>2</sub>)
- 5) İzoproterenol ve vitamin grubu (ISO+VİT)

Kontrol gruplarında bulunan hayvanlara her hangi bir madde uygulaması yapılmamış ve plan dahilinde deneYe alınarak gerekli işlemler gerçekleştirilmiştir. Hipertrofik kardiyomiyopati modelini oluşturmak için sempatik sistem agonisti olan izoproterenol 7 gün boyunca 20 mg/kg/gün şeklinde subkutan olarak enjeksiyonla verilmiş ve ISO, ISO+SO<sub>2</sub> ve ISO+VİT gruplarında hipertrofik kardiyomiyopati modeli oluşturulmuştur. ISO+SO<sub>2</sub> ve SO<sub>2</sub> gruplarında kükürt dioksitin etkisini gözlemleyebilmek için bir kükürt dioksit donörü olan sodyum meta-bisülfid (NaHSO<sub>3</sub>) 7 gün boyunca günde 85 mg/kg dozda gavajla verilmiştir. ISO+VİT grubunda ise hipertrofik kardiyomiyopati modeline antioksidan sistemin etkisini gözleyebilmek için quercetin günde 10 mg/kg ve alfa-tokoferol günde 10 mg/kg olacak şekilde süspansiyon halinde 7 gün boyunca gavaj yoluyla uygulanmıştır. Vitamin E molekülü genel bir antioksidan olarak sitoplazmik süpürücü şeklinde işlev gösterdiği bilinmektedir ve bu doğrultuda kullanılmıştır. Quercetin ise mitokondri özelinde işlevi bulunan ve burada üretilen ROS'ları süpüren bir antioksidan moleküldür. Çalışmada bu doğrultuda kullanılmıştır.

Tüm alışmalar Akdeniz Üniversitesi Etik Kurulu ilkeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiş ve uygulamalar süresince deneY hayvanları 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık döngüsüne tutulmuş ve 23±1 °C sıcaklığında yaşamaları sağlanmıştır.

### 3.2. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu

Bu deneysel çalışmada kardiyomiyosit eldesi kollajenaz ve proteaz karışımından oluşan bir enzimatik solüsyonla gerçekleştirilmiştir. şekil 3.1'de

görüldüğü biçimde deneyin başlangıcında hayvanlar 50 mg/kg sodyum pento barbital uygulamasıyla hafif anestezi altına alınmıştır. Bu işlemi takiben hayvanın göğüs kafesi açılmış ve kalbi hızlı bir şekilde çıkarılmıştır. Çıkarılan kalp çevresinde bulunabilecek olan fazla dokulardan temizlenmiş ve dikkatli bir şekilde Langendorff sistemine aorttan bağlanarak perfüze olması sağlanmıştır.

Langendorff sistemine asılmış kalbi perfüze eden solüsyon laboratuvarımızda rutin bir şekilde uzun zamandan beri kullanılan, 137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,8 mM HEPES ve 20 mM glukoz ihtiva eden hidrojenin gücü 7,2 de sabitlenmiş kalsiyum içermeyen bir solüsyondur. Bu dengenin sağlanabilmesi için solüsyon % 100 O<sub>2</sub> ile kalp perfüzyon sistemine takılmadan 10 dakika önceden gazlanmıştır. Kardiyak dokudan ilk önce 5 dakika boyunca bu solüsyon ters perfüzyon yardımıyla geçirilmiş ve kalp tüm kan ve doku sıvısından arındırılmıştır.

Bu işlemin arkasından kalp 15-30 dakika arasında bir süreyle kollajenaz (0,7-1 mg/ml) ve proteazdan (0,03-0,06 mg/ml) oluşan enzim solüsyonuna maruz bırakılmıştır. Enzimatik solüsyonla kollajen dokusunun parçalanması sağlandıktan sonra kalp atriumlar uzaklaştırılarak kalsiyum içermeyen solüsyonun bulunduğu uygun bir kaba alınmıştır. Burada sağ ventrikülün uzaklaştırılmasından sonra makas yardımıyla mekanik parçalanmaya tabi tutulmuş ince ve küçük parçalara ayrılmıştır.



Şekil 3.1. Kardiyomiyosit eldesi için sıçan kalbinin izolasyonu

### 3.3. Voltaj Kenetleme Tekniği

Bütün akımlar voltaj kenetleme tekniğinin tam hücre konfigürasyonunda kaydedilmiştir. Bunun için hücrenin gigaohm ( $G\Omega$ ) düzeyinde bir direnç oluşturacak şekilde elektrot ucuna yapışması (gigaseal) sağlandıktan sonra 900 mV' luk bir puls uygulanarak yada ağız yoluyla uygun basınç değişiminin oluşması sağlanarak hücre zarı kırılmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım değerleri hücrelerin büyüklük değişimlerinden kaynaklanabilecek sapmaları önlemek amacıyla ölçüm yapılan hücrenin ölçülen sığasına (kapasitans) bölünerek değerlendirilmiştir. Tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja (pA/pF) göre değişimi olarak verilmiştir.

#### 3.3.1. L-tipi $Ca^{2+}$ Kanal Akımı Ölçümü

L-tipi  $Ca^{2+}$  kanal akımları ( $I_{CaL}$ ) 1,5-2,0  $M\Omega$ 'luk elektrotlar kullanılarak alınacaktır. Bu ölçümlerde kullanılan pipet solüsyonun içeriği 110 mM Cs-aspartat; 120 mM CsCl; 5mM MgATP; 120mM L-aspartat 10mM NaCl; Kanalların inaktivasyon 10 mM HEPES; 0,4 mM GTP'den meydana gelmektedir. Kayıt protokolünde -70 mV düzeyinde kenetlenen hücrelere 500 ms'lik -45 mV'luk eğimli bir puls uygulaması yapılarak  $Na^+$  akımlarının inaktivasyonu sağlanmıştır. Bu sayede elde edilen kayıttın yalnızca  $Ca^{2+}$  iyonları tarafından oluşturulduğu düşünölmektedir. Eğimli voltaj uygulamasından sonra -50 mV'tan 10 mV'luk ve 300ms'lik artışlarla +80 mV'a depolarize edici pulslar uygulanarak 14 farklı voltaj seviyesinde  $Ca^{2+}$  akımları kaydedilmiştir. Bilgisayara aktarılan akım kayıtları clampfit programınca analiz edilmiştir. Negatif tepe değerleri ölçölüp sonundaki kuyruk akımları çıkarılarak  $I_{CaL}$  elde edilmiştir. Sonrasında hücre kapasitansına bölerek akım yoğunluğuna ulaşılmış ve akım-voltaj karakteristiğine göre değerlendirmeler yapılmıştır.

#### 3.3.2. $K^+$ Kanal Akımları Ölçümü

$K^+$  kanal akımları 1,5-2  $M\Omega$ 'luk elektrotlar kullanılarak alınmıştır. Bu ölçümlerde kullanılan pipet solüsyonu 120mM K-aspartat; 20 mM KCl; 10 mM NaCl; 5 mM MgATP; 10 mM Na-HEPES'den oluşmaktadır. Hücrelerin çalışıldığı banyo solüsyonunda da izolasyonda da "tyrode" olarak adlandırılan solüsyon kullanılmıştır. Yalnız  $Ca^{2+}$  akımlarını engelleyebilmek için solüsyona 250  $\mu M$ 'lık  $CdCl_2$  eklenmiştir. Voltaj kenetleme yöntemiyle tam hücre düzeyinde  $G\Omega$  düzeyine getirilen hücrenin zar potansiyeli - 70 mV seviyesine getirildi. 200 ms boyunca eğimli bir puls uygulanarak hücrenin düzeyi - 45 mV seviyesine getirilir. Bu geçiş  $Na$  akımlarının inaktivasyonunu gerçekleştirmiş, sonra 1000 ms'lik pulslar 10 mV'luk basamaklar halinde -120 mv'dan 70 mV düzeyine kadar 20 defa uygulanmıştır. Bilgisayara aktarılan akım kayıtları clampfit programında analiz edilmiştir. Akım kayıtlarının sonunda bulunan kuyruk akımları( $I_{SS}$ ), pozitif tepe noktalarından çıkarılmış ve geçici dışa doğrultucu potasyum akımları ( $I_0$ ) elde edilmiştir. Kuyruk akımlarının içerisinde bulunan içeriye doğrultucu potasyum akımları olarak adlandırılan bir başka potasyum akımında -120mV ile -50 mV arasındaki değerlere karşılık gelen akımlar olarak analiz edilmiştir. Bütün potasyum akımları sonunda hücre kapasitansına bölünerek akım yoğunlukları hesaplanmış ve akım-voltaj karakteristiğine göre değerlendirmeler yapılmıştır.



### **3.4. Aksiyon Potansiyeli ölçümü (Akım Kenetleme Yöntemi)**

İlk önce voltaj kenetleme tekniği kullanılarak hücrenin  $G\Omega$  düzeyinde bir direnç oluşturacak şekilde elektrotla yapışması sağlanmıştır. Sıkı bir şekilde yapışmanın oluşturulmasından sonra düşük potansiyellerde puls uygulayarak ya da ağızla uygun basınç değişimlerini sağlayarak hücre zarının kırılması sağlanmıştır. Hücre zarı kırıldıktan sonra akım kenetleme moduna geçilerek hücreler eşik değerin üzerinde akım uygulanarak uyarılmıştır.

### **3.5. Geçici Hücre içi $Ca^{2+}$ Değişimi ( $Ca^{2+}$ Transient) Ölçümü**

İzole edilen kardiyomiyositler, 4  $\mu M$  fura 2-AM ile 60 dakika boyunca inkübe edildikten sonra 340 ve 380 nm'de uyarılarak edilerek 510 nm'de floresan emisyonları alınmıştır. Geçici hücre içi  $Ca^{2+}$  değişiminin ölçülmesinde banyo solüsyonu olarak izolasyonda da kullanılan tyrode solüsyonu kullanılmıştır. Ölçüme başlamadan önce banyonun hücre bulunmayan bir bölgesine odaklanılmış ve burada belli bir süre kayıt alınmıştır. Sonra iki ucuna elektrot yerleştirilmiş banyo içerisine alınan hücrelerden uyarılabilir olanları seçilerek kayıt ekranı içerisine alınmıştır. 30-60 ms boyunca bazal  $Ca^{2+}$  seviyesi ölçülmüştür. Sonrasında hücrelere 5-30 V'luk pulslar uygulanarak hücre içi  $Ca^{2+}$  değişimleri elde edilmiştir. İlk önce hücre bulunmayan ortamdan alınan sinyaller sonradan alınan sinyallerden çıkarılmıştır. Böylece banyo ortamının floresansından kaynaklanan gürültü ortadan kaldırılmıştır. Bilgisayara kaydedilen bu sinyaller ion wizard programında analiz edilmiştir.

### **3.6. Kontraktıl Parametre Ölçümü**

İzole edilen kardiyomiyositler iki ucuna elektro yerleştirilen banyoda tyrode solüsyonu içerisinde 1 Hz frekansında 5-30 V arasında bir potansiyelde uyarılarak sarkomerik kısalma kayıtları alınmıştır. Alınan sinyaller ion wizard programında analize edilmiştir.

### **3.7. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü**

Bu çalışmada oluşturulan hipotez doğrultusunda elektrofizyolojik parametreler ölçülmüştür. Ölçülen bu parametreler oluşturulan patolojik model ve uygulanan kimyasalların hücre düzeyinde elektrofizyolojik değişikliklerini göstermiştir. Hücre düzeyindeki bu değişiklikleri daha iyi açıklayabilmek ve uygulanan maddelerin doku ve akabinde canlı sistem üzerine etkilerini aydınlatılabilmek için biyokimyasal yöntemlere de başvurulmuştur. Biyokimyasal ölçümler bu çalışma çerçevesinde iki şekilde sınıflandırılabilir. İlk sınıf her izolasyon sonrasında direkt canlı hücre ortamından ölçülen süper oksit anyon radikali salınımıdır. Diğer bütün parametreler ise kalp dokusunun canlı sistemden çıkarılmasından sonra sıvı nitrojenle muamele edilip dondurulan dokulardan ölçülen parametrelerdir. Bu parametreler; ksantin oksidaz miktarı ölçümü, protein karbonil gruplarının ölçümü, redükte glutatyon (GSH) miktarının ölçümü, glutatyon peroksidaz enzim (GPx) aktivite tayini, süperoksit dizmutaz (SOD) enzim aktivite tayini ve lipid peroksidasyon seviyelerinin ölçümüdür.

#### **3.7.1. Miyositlerde Süperoksit Anyon Radikali Ölçümü**

Süperoksit anyon salınımı, CuZn SOD ile inhibe edilebilen sitokrom c redüksiyon ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Salınan  $O_2^-$  miktarı redükte

sitokrom c'nin 550 nm'deki extinction coefficienti ( $2.1 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplanmıştır.

### **3.7.2. Protein Karbonil Gruplarının Ölçümü**

Protein oksidasyonunun en yaygın ve genel göstergesi protein karbonil miktarıdır. Demir ve bakır gibi kolay indirgenen ve oksitlenen iyonlar proteinlerde kation bağlayıcı bölgelere bağlanıp, hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve superoksit anyonu ( $\text{O}_2^-$ ) ile reaksiyona girebilirler. Bu reaksiyon sonucunda lizin, arginin, prolin ve histidin gibi aminoasitlerin amin yan zincirlerini karbonillere dönüştürmektedir. Doku örneklerinde karbonil miktarını belirleyip ölçmek için en uygun yöntem, protein karbonilleri ile 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) arasında reaksiyon oluşturmaktır. Son ürün olarak gösterilen protein hidrazon 360-385 nm'de absorbans vererek spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

### **3.7.3. Redükte Glutasyon (GSH) Miktarının Ölçümü**

Doku örneklerinde bulunan redükte glutasyon (GSH) 2-vinylpyridine ile konjuge edilmiştir. Daha sonra ortalama glutasyon redüktaz enzimi ilave edilip okside glutasyon (GSSG) GSH'ya dönüştürülmüştür. GSH'da bulunan sülfidril grubu 5',5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid ile (DTNB-Ellman reaktifi) reaksiyona sokularak sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoic asid (TNB) oluşturulmuş ve bu reaksiyonun tümünde TNB'nin oluşum miktarından GSSG'nun total miktarı tayin edilmiştir.

### **3.7.4. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivite Tayini**

Glutasyon peroksidaz enzimi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  dahil tüm hidroperoksitlerin redüksiyonunu sağlar. Bu işlevi sırasında da redükte glutasyonu kullanır. Oluşan okside glutasyon, glutasyon redüktaz enzimi ile tekrar indirgenir. Bu indirgenme sırasında NADPH kullanılır ve  $\text{NADP}^+$  oluşur. NADPH'nin reaksiyon ortamından kaybı 340nm'de absorbans azalmasına neden olur ve bu azalmanın miktarından GPx enzim aktivitesi tayin edilir. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin hesaplanması, NADPH'nin 340 nm'deki extinction coefficient ( $0,00622 \mu\text{M}^{-1}$ ) değerinden yapılmıştır. Bir ünite GPx aktivitesi, 1 dakikada kullanılan  $\mu\text{mol}$  NADPH olarak hesap edilmiştir.

### **3.7.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini**

Süperoksit dismutaz enzim aktivite tayini, kompetitif inhibisyon yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntemde reaksiyon ortamında, sürekli olarak süperoksit anyonu oluşturan ksantin oksidaz-hipoksantin sistemi mevcuttur. Bu sistemin açığa çıkardığı süperoksit anyonları, reaksiyon ortamına ilave edilen kromojeni indirger ve 450 nm'de ölçülebilen renk oluşumuna neden olur. Alınan örneklerde ne kadar SOD enzimi varsa, renk oluşumu o kadar az olur.

### **3.7.6. Lipid Peroksidasyon Seviyelerinin Ölçümü**

Bu metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonun son ürünleri, 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin butanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.

1 ml distile su içeren tüpe 350 µl doku süpernatantı konduktan sonra 1 ml thiobarbitürik asit eklenmiştir. Tüp yeterli derecede vortkslendikten sonra 25 µl HCl ve 3.5 ml n-bütanol eklenerek faz ayrımı sağlanmıştır. Bütanol ekstratının floresansı, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofotometrede okunmuştur.

### **3.7.7. Ksantin Oksidaz Miktarı Ölçümü**

Ksantin dehidrogenaz enzimi (XDH) proteolitik parçalanma veya moleküller arası disülfid bağı oluşumu ile ksantin oksidaz formuna dönüşmektedir. Bu çalışmada XDH/XO aktivite oranına bakılmıştır. XDH/XO ölçümleri için alınan miyositler soğuk homojenizasyon tamponu [50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 80 mM leupeptin, 2,1 mM pefabloc SC, 1mM fenilmetilsülfonil florid, 1µg/ml aprotinin (pH: 7,4)] içerisinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 23000 g'de 40 dk +4 °C'de santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlar da ksantin oksidaz aktiviteleri şekilde florometre kullanılarak kinetik olarak belirlenmiştir. Protein konsantrasyonu ise 595 nm'de Coomassie reaktifi kullanılarak belirlenmiş ve standart olarak da serum albumin kullanılmıştır.

### **3.8. İstatistiksel Yöntem**

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ONE WAY ANOVA ile analiz edilmiş ve posthoc olarak da TUKEY yöntemi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık p<0.05 olarak seçilmiştir.

## BULGULAR

### 4.1. Hayvanların Genel Durumları

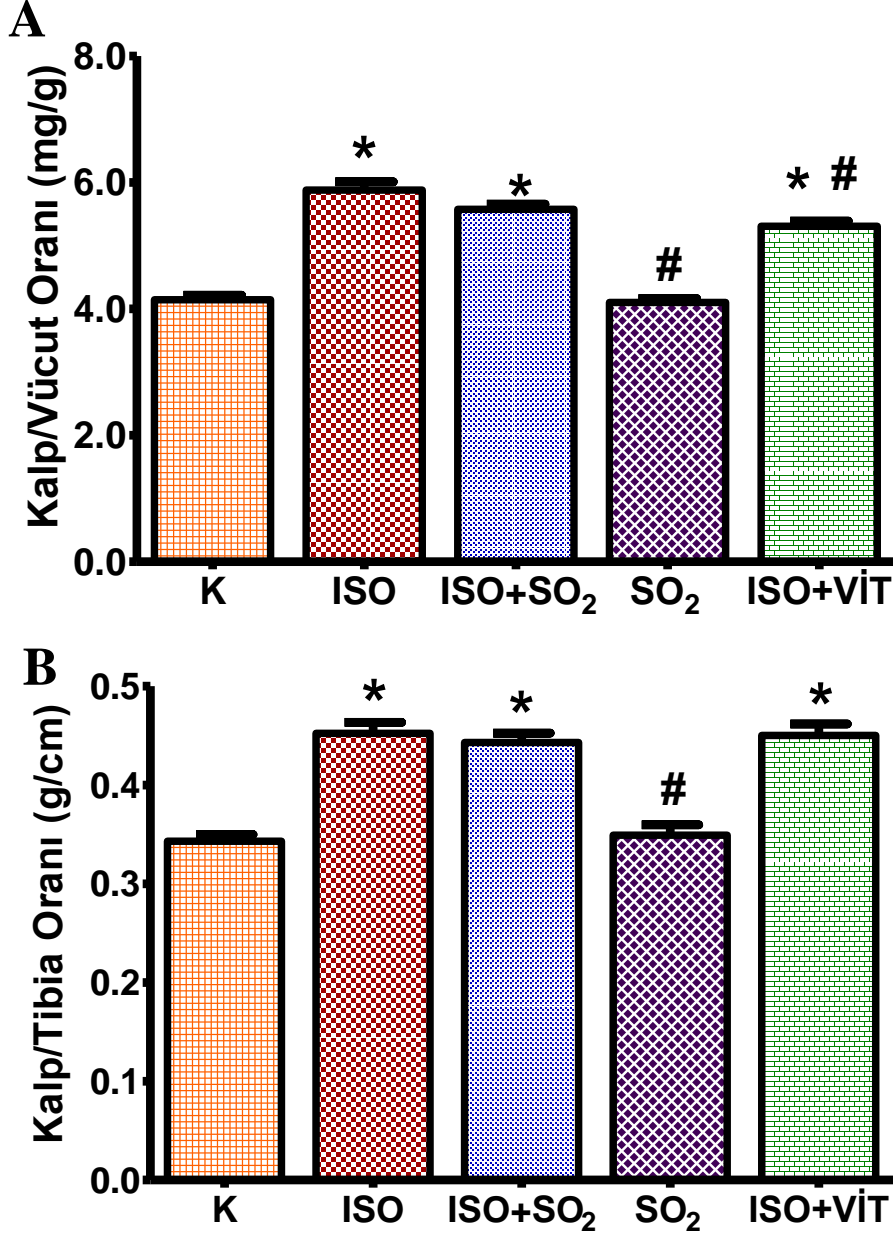
Çalışmada kullanılan hayvanlar ortalama 300-400 gr ağırlığındaki Wistar ratlarda gerçekleştirilmiştir. Deneye dahil edildiklerindeki ilk kiloları ve uygulamalar bitimindeki son kiloları değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Bu durumun dışında izoproterenol ile oluşturulan kardiyak hasar sonucunda gözlenmesi beklenen hipertrofinin gelişip gelişmediğini anlayabilmek için kalp ağırlıkları ve tibia uzunluklarında ölçülmesini takiben kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı ile kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranları ölçülmüş ve deney grupları birbirleri ile kıyaslanmıştır. Bahsedilen bu veriler Tablo 4.1’de gösterilmektedir.

**Tablo 4.1.** Hayvanlarla ilgili genel parametreler; \*p<0.05vs K, #p<0.05 ve ISO

Deney Grupları	Vücut Ağırlığı (g)		Kalp Ağırlığı (g)	Tibia Boyu (cm)	Kalp ağı./Vücut ağı.	Kalp ağı./Tibia
	İlk	Son				
<b>Kontrol (n=32)</b>	312.3 ± 8.4	324.2 ± 8.6	1.34 ± 0.03	3.91 ± 0.02	4.1 ± 0.07	34.31 ± 0.65
<b>Iso (n=32)</b>	338.5 ± 11.4	298.2 ± 6.7	1.73 ± 0.05	3.86 ± 0.04	5.8 ± 0.1 *	45.23 ± 1.08 *
<b>Iso+SO<sub>2</sub> (n=31)</b>	320.0 ± 8.4	301.9 ± 8.9	1.67 ± 0.04	3.84 ± 0.03	5.5 ± 0.08 *	44.31 ± 0.92 *
<b>SO<sub>2</sub> (n=30)</b>	315.0 ± 11.1	324.5 ± 10.8	1.33 ± 0.05	3.84 ± 0.04	4.1 ± 0.06 #	34.91 ± 1.03 #
<b>Iso+Vit (n=17)</b>	379.4 ± 11.5	338.9 ± 10.6	1.80 ± 0.06	3.98 ± 0.04	5.3 ± 0.07 * #	45.0 ± 1.13 *

Yukarıdaki tabloda da görüldüğü üzere deney grupları arasından izoproterenol uygulaması yapılan gruplarda bariz bir kilo kaybının söz konusu olduğu gözlenmektedir. Özellikle ISO ve ISO+VİT gruplarında bu fark daha

belirgindir. Beslenme ve uygun ortamda barınma koşullarının aynı düzeyde tutulduğunu düşünürsek bu değişimin nedeninin iso uygulaması olduğu yorumu yapılabilmektedir.



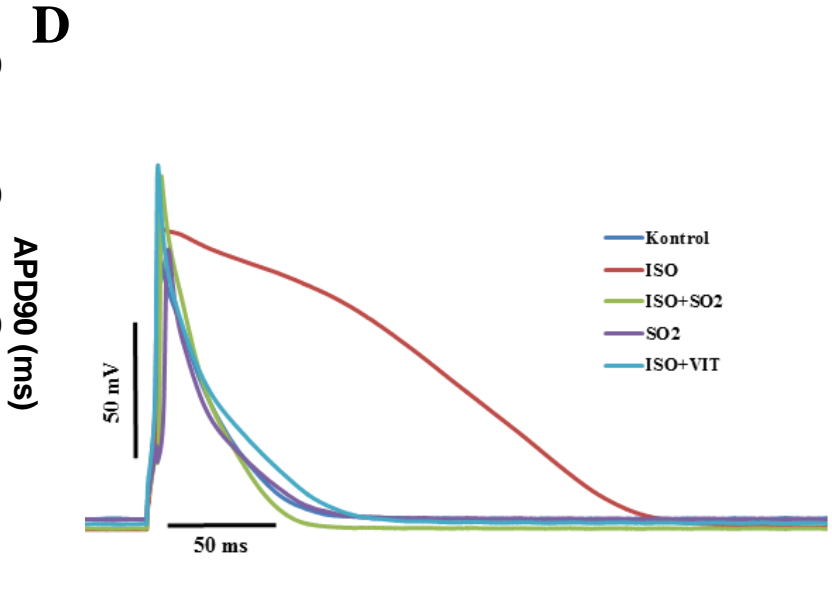
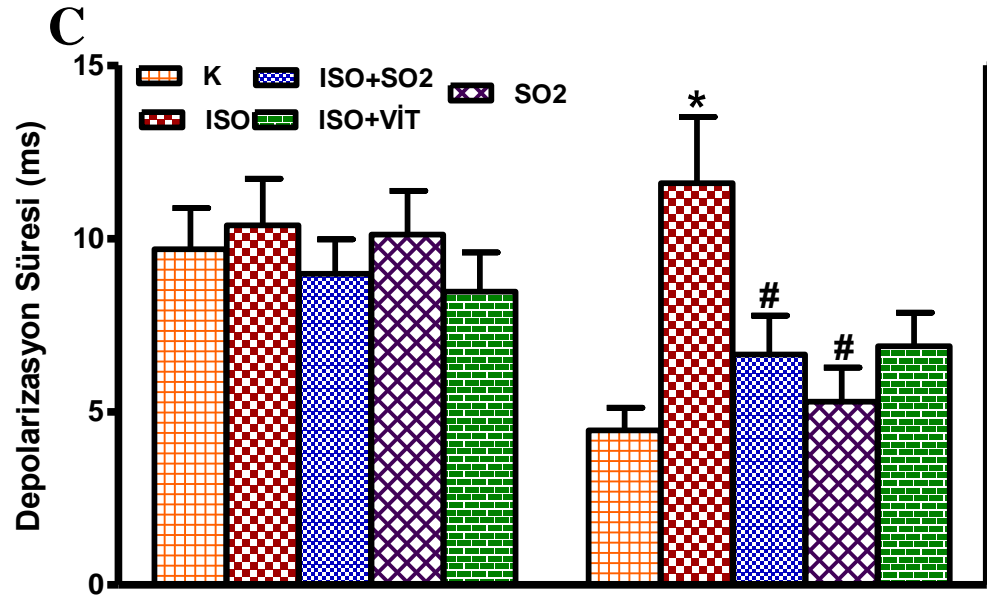
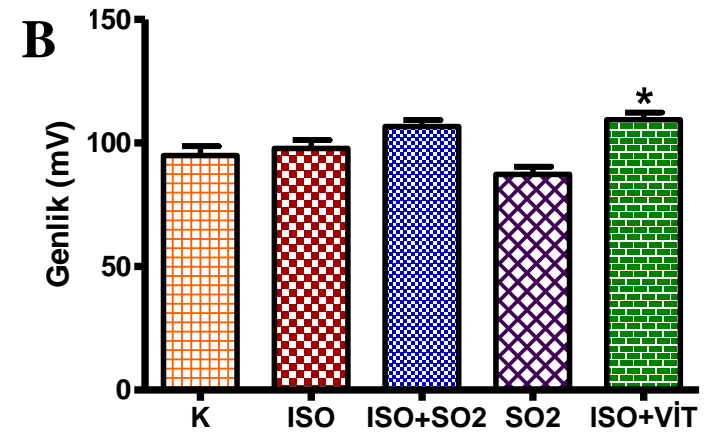
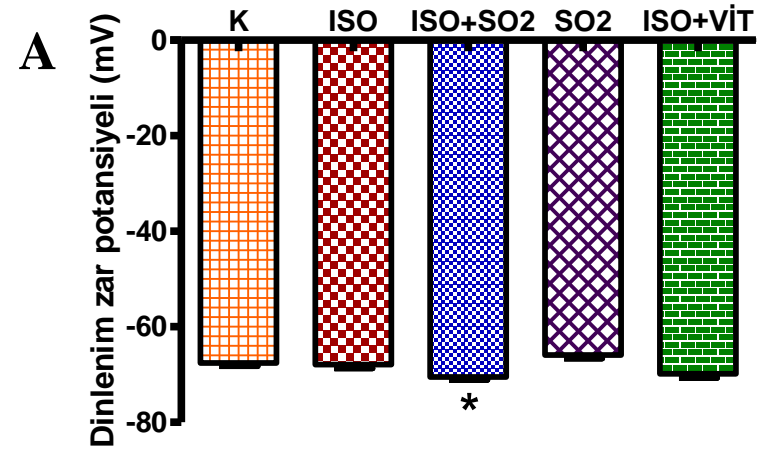
Şekil 4.1. Deney gruplarının kalp ağırlığı/vücut ağırlığı ve kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranları. A) Kalp ağırlığı/vücut ağırlığı, B) Kalp ağırlığı/tibia uzunluğu. \*p<0.05 vs K, #p<0.05 vs ISO.

İzoproterenol uygulamasının beklenen hipertrofi durumunun oluşup oluşmadığını gözlemlemek için kalp ağırlığı son vücut ağırlığı ile oranlanmış ve gruplar birbirleri ile kıyaslanmıştır. Şekil 4.1A'da görüldüğü üzere izoproterenol uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla bu oran artmıştır. Buna karşın SO<sub>2</sub> grubunda hipertrofik indekste artış gözlenmemektedir. İzoproterenol uygulanan gruplardaki bu artış kalp ağırlığını arttırdığı ve buna bağlı olarak da hipertrofinin geliştiği yönünde bir yorum yapılmasına olanak sağlamaktadır. Ancak ISO+VIT

grubunda ise hem iso hem de ISO+SO<sub>2</sub> grubuna göre anlamlı bir azalış görülmektedir. Ancak Tablo 4.1’de de görüldüğü üzere aşırı kilo kaybı bu yorumun doğruluğuyla ilgili sorular oluşturmaktadır. Çünkü bu oranlardaki değişimlerin beslenme fazlalığından mı yoksa büyümeyle mi alakalı olduğu sonucuna direkt yönlendirilememektedir. Bu yorumun daha sağlıklı yapılabilmesi için hayvanlardan elde edilen kalp ağırlıkları hayvanların yaşlarına paralel olarak değişen ve hemen hemen her hayvanda aynı oranda farklılaşan tibia uzunluğuyla oranlanmış ve sonuçlar değerlendirmeye alınmıştır. Şekil 4.1B’de de görüldüğü üzere gruplar arasındaki değişimlerde ISO+VİT grubu dışında bir farklılık gözlenmemiştir. ISO+VİT grubunda ise ISO grubuna göre olan farklılık ortadan kalkmıştır. Bu parametrede kullanılan hayvan sayısına ve uygulanan diğer maddelerin etkileri göz önünde tutulduğunda iso uygulamasını takiben hipertrofinin geliştiği ve uygulanan diğer moleküllerin bu duruma herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

#### **4.2. Aksiyon Potansiyeli İle İlgili Bulgular**

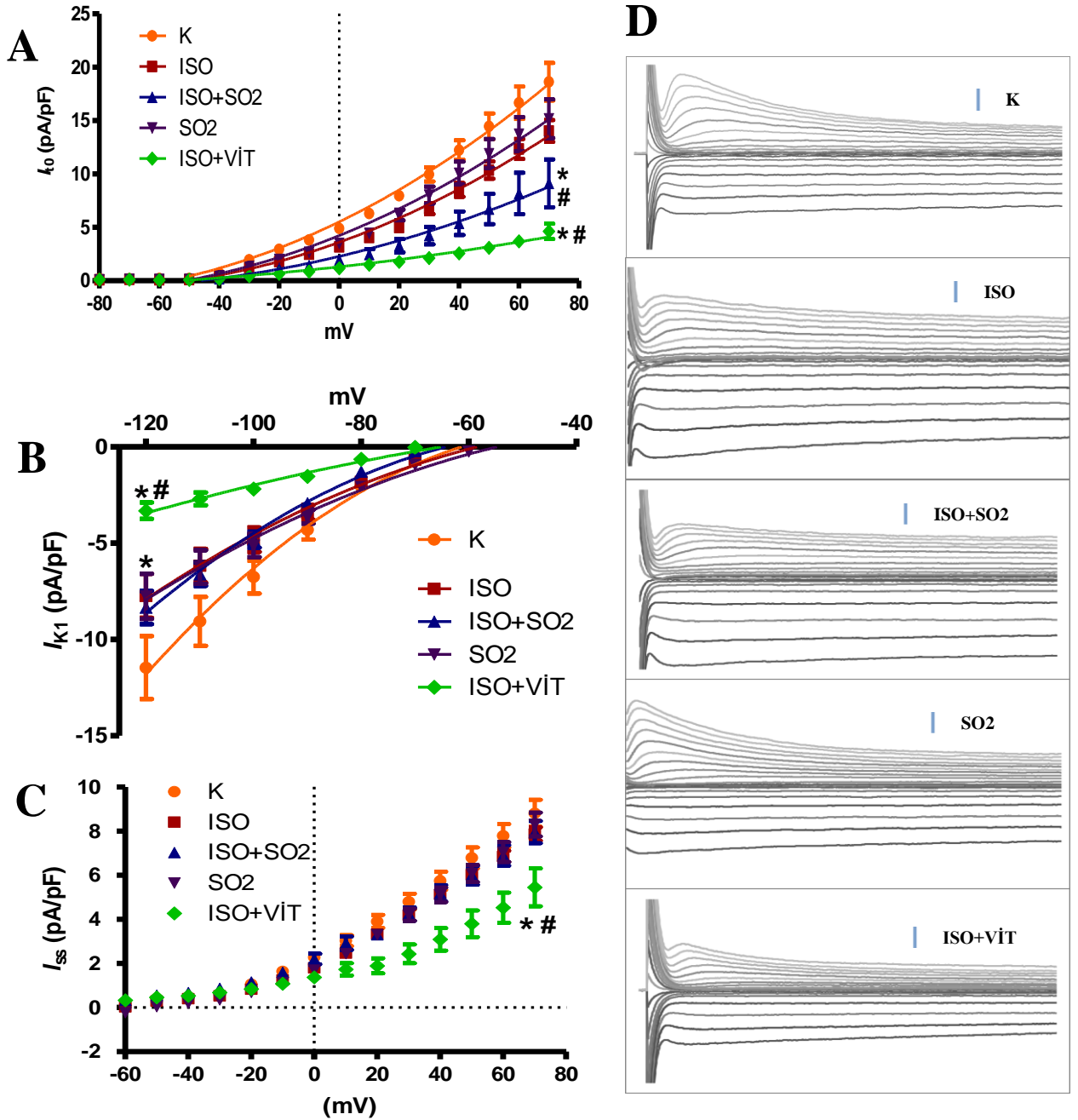
Uyarılma-kasılma çiftlenimini başlatan, hem birçok hücrel olayları etkileyen hem de birçok hücre altı olaydan etkilenebilen aksiyon potansiyeli açısından izoproterenol uygulamasının yarattığı durumlara, SO<sub>2</sub> donörü olarak düşünülen bisülfid moleküllerinin etkisi incelenmiş ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Zarın dinlenme durumu membranın uyarılabilirliğini belirlerken aynı zamanda değişen fizyolojik durumlara göre de modifiye olabilen bir yapıdadır. Deneysel uygulamaların sonucunda ISO+SO<sub>2</sub>’nin dinlenme membran potansiyelinin kontrole nazaran azaldığı yani daha repolarize bir hal aldığı görülmüştür. Diğer izoproterenol uygulanan gruplarda kontrole göre bir farklılık oluşmamıştır. Sadece SO<sub>2</sub> verilen deney grubunda ise ISO+SO<sub>2</sub> grubunda gözlenen artışa nazaran zar potansiyelinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gerçekleştiği fark edilmiştir. Na<sup>+</sup> kanallarının öncülüğünde meydana gelen Faz 0 evresi aynı zamanda AP’nin genliği hakkında da bilgi vermektedir. AP genlik açısından analiz edildiğinde bütün izoproterenol verilen gruplarda az da olsa birer artış söz konusu iken sadece ISO+VİT grubunda bu farklılık anlamlıdır. ISO+SO<sub>2</sub> grubunda kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmesede SO<sub>2</sub> grubunda genlik, ISO+SO<sub>2</sub>’ye kıyasla azalım göstermiştir. Dinlenme zar potansiyelinde ve genlikte gerçekleşen bu değişimlere karşın depolarizasyon süresinde 5 deney grubu içinde herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. Ancak asıl dikkat çekici değişimler AP’nin repolarizasyon fazında görülmektedir. APD 90 açısından ISO kontrole göre uzamıştır. Buna ilaveten ISO+SO<sub>2</sub> ve SO<sub>2</sub> de ise ISO’da gerçekleşen bu artış anlamlı bir şekilde azalmıştır. Diğer izoproterenol uygulamasına tabi olan ISO+VİT de ise kontrol grubuna göre bir farklılık mevcut değildir.



Şekil 4.2. Akım kenetleme yöntemiyle kardiyomiyositlerden elde edilen aksiyon potansiyeli parametreleri ve örnek veriler. A) Dinlenim zar potansiyeli, B) AP'nin genliği, C) AP'nin depolarizasyon süresi (sol eksen) ve AP'nin repolarizasyon süresi (sağ eksen) ve D) örnek AP kayıtları. \* $p < 0.05$  vs K, # $p < 0.05$  vs ISO.

### 4.3. Potasyum Akımlarıyla İle İlgili Bulgular

İyon kanallarında iyonların geçişine bağlı olarak meydana gelen akımlar uyarılma-kasılma çiftlenmi üzerine aksiyon potansiyelinden, kontraktıl makinenin çalışmasına kadar çok geniş bir yelpazede katkı sağlamaktadır. Hücre düzeyinde bu etkilere sahip iyon akımlarından bir tanesi  $K^+$  iyon akımlarıdır. Şekil 4.3'de de görüldüğü üzere  $K^+$  iyon akımları temel 3 ana başlık altında toplanmıştır. Bunlar geçici dışa doğru akımlar ( $I_{t0}$ ), içe doğrultucu akımlar ( $I_{K1}$ ) ve kararlı durum akımları ( $I_{s-s}$ ) olarak adlandırılmaktadır. Bu bağlamda  $I_{t0}$  akımları incelendiğinde SO2 ve ISO'da gözlenen azalmaların anlamlılık ifade etmediği, özellikle 20 mV'da ki akımdan itibaren ISO+SO2 grubunda bir azalma olduğu gözlenmiştir. ISO+VİT grubunda ise bütün gruplara nazaran akım yoğunluğunda belirgin bir düşüş fark edilmiştir. Aksiyon potansiyelinin plato ve asıl repolarizasyon evrelerinde etkin bir role sahip olan  $I_{K1}$  akımı ölçümlerinde ISO+VİT grubunda bütün gruplara karşı azalış gözlenmiştir.

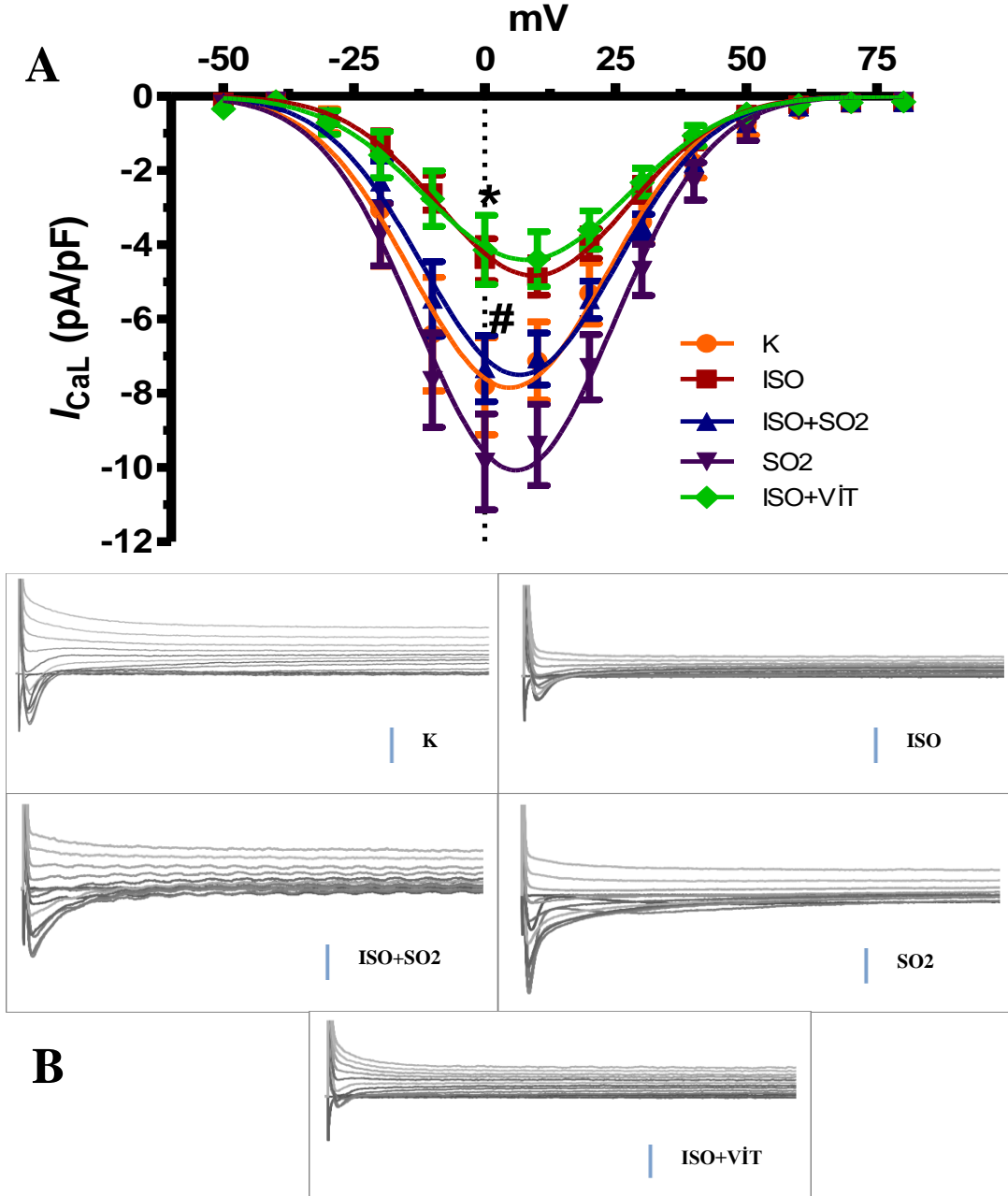


Şekil 4.3. Voltaj kenetleme yöntemiyle kardiyomiyositlerden elde edilen ve membran potansiyellerine bağlı olarak değişen A)  $I_{t0}$  akım yoğunlukları, B)  $I_{K1}$  akım yoğunlukları, C)  $I_{ss}$  akım yoğunlukları ve D) örnek veriler.\*;  $p < 0.05$  vs K, #;  $p < 0.05$  vs ISO



#### 4.4. Kalsiyum Akımlarıyla İlgili Bulgular

Uyarılma-kasılma çiftleniminin başlangıcındaki AP'nin oluşumuna katkısından, CICR mekanizmasıyla kontraktıl makinanın işlevini yerine getirmesine ve birçok hücre içi sinyal yolağında en önemli ikincil habercilerden biri olan  $Ca^{2+}$  akımları üzerine, deneysel uygulamaların etkisi incelenmiştir. Deneysel gruplarının  $Ca^{2+}$  akım-voltaj karakteristikleri Şekil 4.4'de gösterilmiştir. ISO ve ISO+VİT gruplarının 0mV'da gözlenen maksimum akım yoğunlukları kontrol grubuna göre ciddi bir azalma göstermektedir. Diğer izoproterenol uygulamasına tabi tutulan grup olan ISO+SO<sub>2</sub> grubunda ise kontrol verilerine göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. SO<sub>2</sub> verilen grubunda 0 mV'da gözlenen maksimum akım yoğunluğu kontrole göre anlamlı olarak artmıştır.



Şekil 4.4. Voltaj kenetleme yöntemi kullanılarak kardiyomiyositlerden elde edilen A)  $Ca^{2+}$  akım-voltaj karakteristikleri ve B) örnek veriler. \*,  $p < 0.05$  vs K, #,  $p < 0.05$  vs ISO

#### 4.5. Hücreiçi Geçici Kalsiyum Değişimi İle İlgili Bulgular

Kardiyomiyositlerde  $[Ca^{2+}]_i$  değişimi hem kalbin mekanik aktivitesini düzenleyen hem de hücreiçi sinyal yollarında ikincil haberci olarak önemli bir yere sahiptir. Bu bağlamda hücreiçi  $[Ca^{2+}]_i$  değişiminin incelenmesi kasılma ve hücre içi sinyal iletimiyle ilgili bilgimizi arttırmakla beraber karşılaşılan problemlere karşıda çözüm üretmemizi de kolaylaştırmaktadır. SR'dan CICR vasıtasıyla salınan ve  $Ca^{2+}$  transienti olarak adlandırılan bu geçici  $Ca^{2+}$  miktarının ölçümü, hem  $[Ca^{2+}]_i$  hakkında hem de SR'ın yapısı ve fonksiyonu hakkında bilgi vermektedir. Diyastolik durumdaki serbest  $Ca^{2+}$  açısından deney grupları arasında bir farklılık bulunmamaktadır.  $Ca^{2+}$ 'un genliği yani uyarıyla birlikte SR'dan dökülen  $Ca^{2+}$  miktarı açısından olaya bakıldığında, şekil 4.6'da görüldüğü üzere sadece ISO+SO<sub>2</sub> grubundaki artış kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. % genlik olarak bakıldığında ise yine kontrole göre tek anlamlı artış ISO+SO<sub>2</sub> grubunda gözlenirken, bu durumla birlikte yine bu grupta ISO grubuna göre de istatistiksel olarak kayda değer bir artış olduğu fark edilmiştir. Uyarının bitmesiyle birlikte ortamdan depoya  $Ca^{2+}$  alınımını ifade eden ve zaman sabiti olarak adlandırılan parametre nazarında transientler analiz edildiğinde 4 grupta da kontrole göre bir azalış olduğu gözlenmiştir. Ancak ISO+SO<sub>2</sub> ve ISO+VİT grubunda karşılaşılan değişiklikler anlamlıdır. Uyarının gelmesiyle birlikte RyR'den  $Ca^{2+}$  salınımı ve bunu takiben oluşan tranzientin çıkış evresinin alansal değerlendirmesi yapıldığında kontrole göre anlamlı değişim sadece ISO+SO<sub>2</sub> grubunda gözlenmiştir. Uyarının sonlanmasıyla oluşan ve  $Ca^{2+}$ 'un geri alınımını ifade eden düşüşün altında kalan alan açısından ise gruplar arasında hiçbir farklılık bulunmamıştır. ISO+SO<sub>2</sub>'de bir artış mevcuttur ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir.

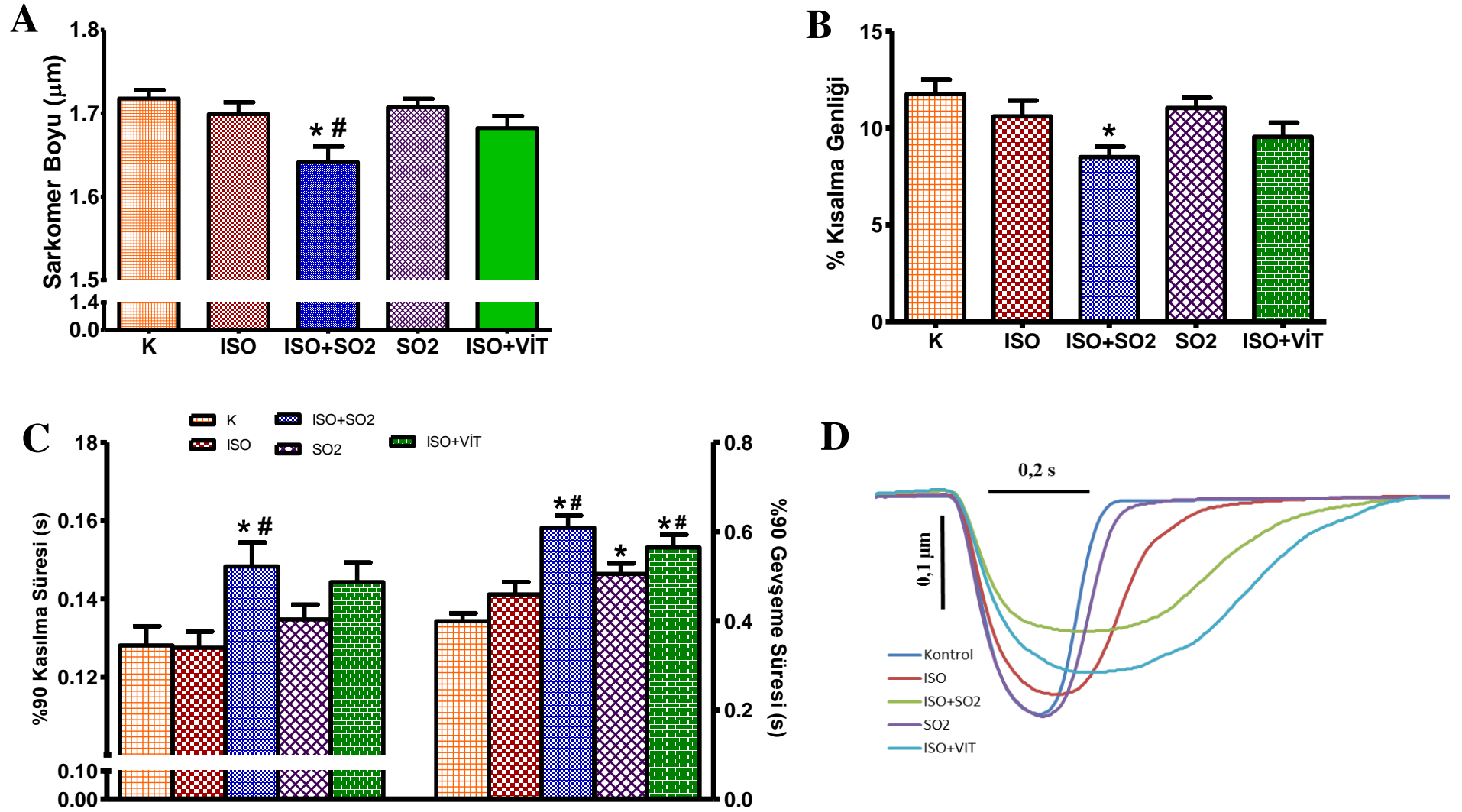
#### 4.6. Mekanik (Kontraktıl) Parametreleri

İzoproterenol uygulamasının ve izoproterenolün oluşturduğu durumlara, uygulanan diğer moleküllerin sıçan kardiyomiyositlerinde uyarılma-kasılma çiftleniminin bir parçası olan kontraktıl parametreler üzerine etkilerini incelemek adına tek hücre sarkomer boyu kısalma yanıtlarına bakılmıştır. Herhangi bir uyarı olmadan sarkomerin dinlenim durumdaki boyu göz önüne alındığında izoproterenol uygulanan gruplardan ISO ve ISO+VİT gruplarında kontrole nazaran istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bu verilerin aksine izoproterenolle birlikte SO<sub>2</sub> uygulaması yapılan grupta hem kontrole göre hem de ISO grubuna göre sarkomer boyunda bir kısalma saptanmaktadır. Tek başına SO<sub>2</sub> uygulanan deney grubunda ise ISO+SO<sub>2</sub> grubuna göre sarkomer boyunda bir uzama gözlenmiştir. Uyarının gelmesiyle başlayan kontraksiyon işlemi sarkomer boyunda kısalma ve bu durumu takiben oluşan gevşeme olgusuyla ifade edilmektedir. Kısalmanın ne kadar kuvvetli olabileceğini sarkomerin ilk boyu/son boyu ( $l/l_0$ ) olarak nitelendirilen % genlik parametreleriyle açıklamak mümkündür. Bu çerçevede yapılan analizlerde hiçbir deney grubunda farklılık gözlenmezken, ISO+SO<sub>2</sub> grubunda kontrole göre bir azalma dikkat çekmektedir.

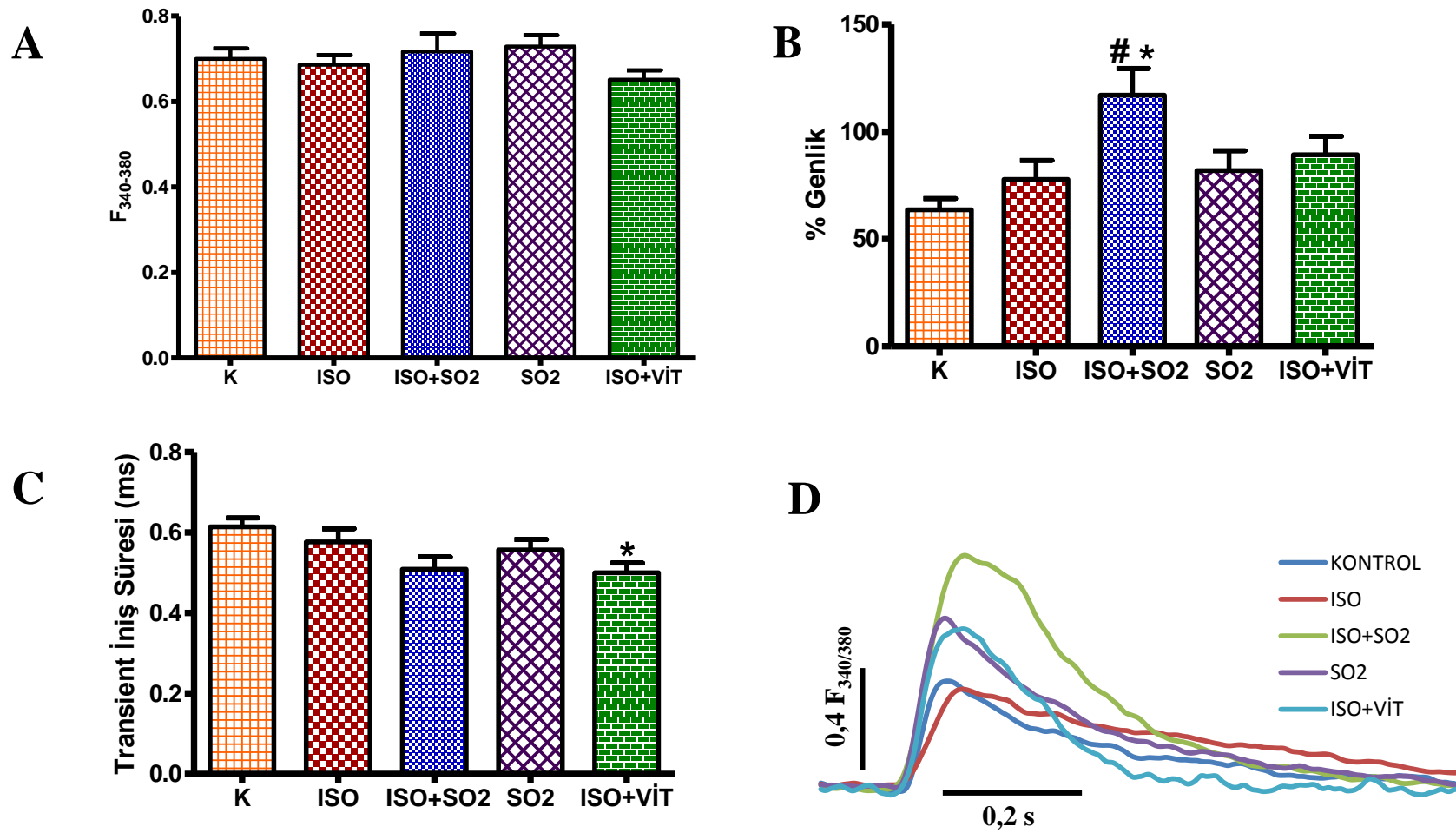
Sarsı işlemi yukarıda da bahsedildiği gibi kasılma ve gevşeme süreçleri arasında dinamik olaydır. Bu da her iki sürecin belirli zaman aralığında ve buna bağlı olarak da belirli bir hızda gerçekleştiğini vurgular. Kısalma hızı açısından durum değerlendirildiğinde, ISO+SO<sub>2</sub> grubunun kontrol grubuna göre kasılma hızının yavaşladığı ancak diğer deney gruplarında farklılık gözlenmediği Şekil 4.5'de görülmektedir. Hızdaki bu değişimin ardından kısaltmaların süreleri karşılaştırıldığında izoproterenolün ve SO<sub>2</sub>'nin birlikte uygulandığı ISO+SO<sub>2</sub> grubunda % 90 kısalma sürelerinde kontrole kıyasla bir artma söz konusuysen, diğer izoproterenol uygulanan deney gruplarında bir değişim olmamıştır. Buna ilaveten ISO+SO<sub>2</sub> grubunun % 90 kısalma süresinde ISO grubuna göre bir artış da gözlenmiştir.

Kasılmayı takiben gerçekleşen gevşeme olgusu dinamik olan bu döngünün devamlılığı ve kontraksiyonun verimliliği açısından önemlidir. Gevşeme hızı karakteristiğinde deney grupları incelendiğinde kontrole göre 4 deney grubunda da hızda azalma gözlenmiştir. Bu durumun yanı sıra izoproterenol uygulanmış gruplar içerisinde ISO+SO<sub>2</sub> ve ISO+VİT, gevşeme hızlarında ISO grubuna göre azalma gözlenmiş ancak sadece ISO+SO<sub>2</sub> grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlılık yaratmıştır. Gevşeme hızındaki bu değişimin sıkı bir etkileşim içerisinde olduğu zaman sabiti üzerinde bir etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve Şekil 4.5C'de gösterilmiştir. ISO grubunda bir artışın olduğu ancak istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği gözlenirken diğer izoproterenol uygulaması olan gruplarda kontrol ve ISO grubuna nazaran artışları olduğu tespit edilmiştir. SO<sub>2</sub>'in tek başına uygulandığı grubun kontrol ve ISO grubundan bir farklılığı bulunmamaktadır.

Gevşeme olgusunun zamansal özellikleri göz önüne alındığında izoproterenol uygulamasının tek başına bir farklılık yaratmadığı anlaşılmıştır. Ancak hem %50'de hem de %90'da ISO+SO<sub>2</sub> ve ISO+VİT grupları, kontrol ve ISO grubuna kıyasla artış göstermiştir. Aynı tutarlılık sadece SO<sub>2</sub> uygulanan deney grubunda gözlenmemiştir. %50 gevşeme süresini ISO'ya göre arttırırken, %90 gevşeme süresinde kontrole göre süreyi uzatmanın yanında, ISO+SO<sub>2</sub>'ye göre de sürede bir azalmaya sebep olmuştur. Bu verilere ek olarak kısalma ve gevşeme alanları da hesaplanmıştır. Gevşeme alanında deney grupları arasında herhangi bir farklılık gözlenmezken, kısalma alanında SO<sub>2</sub> uygulaması yapılan grupta hem ISO'ya hem de ISO+SO<sub>2</sub>'ye göre bir artış söz konusudur.



**Şekil 4.5.** Elektriksel alan ile uyarılan kardiyomyosit hücrelerinden elde edilen sarkomer boyu kılisma ölçümü analiz sonuçları. Deney gruplarından elde edilen sonuçların A) Dinlenme durumu sarkomer boyu, B) % kılisma genliği, C) kılisma süresi (sol eksen) ve gevşeme süresi (sağ eksen) verilerin grafik gösterimleri ve D) örnek kayıtlar. \* $p < 0.05$  vs K, # $p < 0.05$  vs ISO.



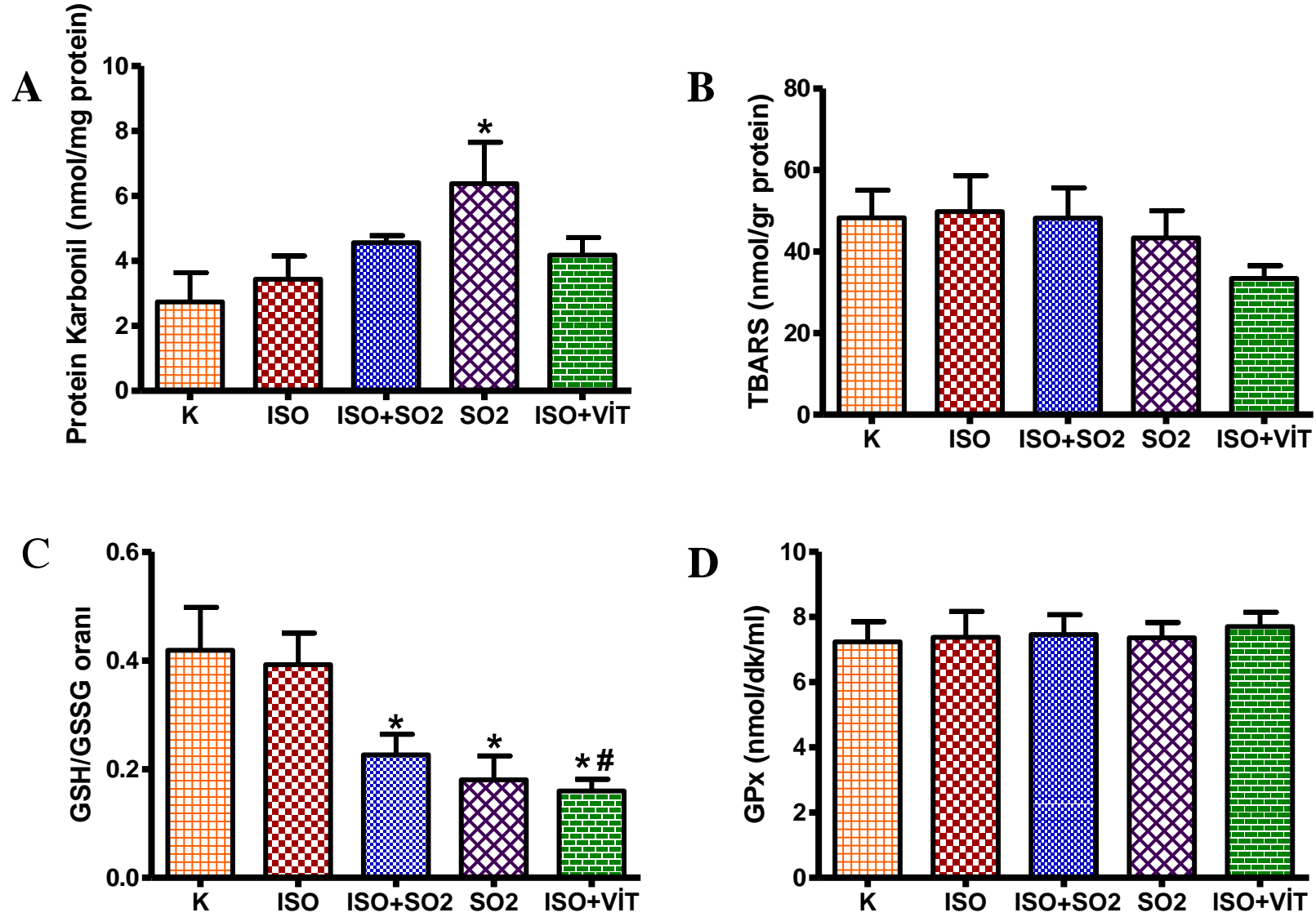
**Şekil 4.6.** Fura-2 AM yüklemesi ve elektriksel alan uyarımı sonucunda fluorometrik olarak ölçülen ve kardiyomyosit hücrelerinden elde edilen hücre içi geçici  $Ca^{2+}$  (transient) değişimleri. A) Dinlenme durumundaki serbest  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu, B) % genlik C) Transientin iniş süresi ve D) Örnek kayıtlar. \* $p < 0.05$  vs K, # $p < 0.05$  vs ISO.

#### 4.7. Biyokimyasal Bulgular

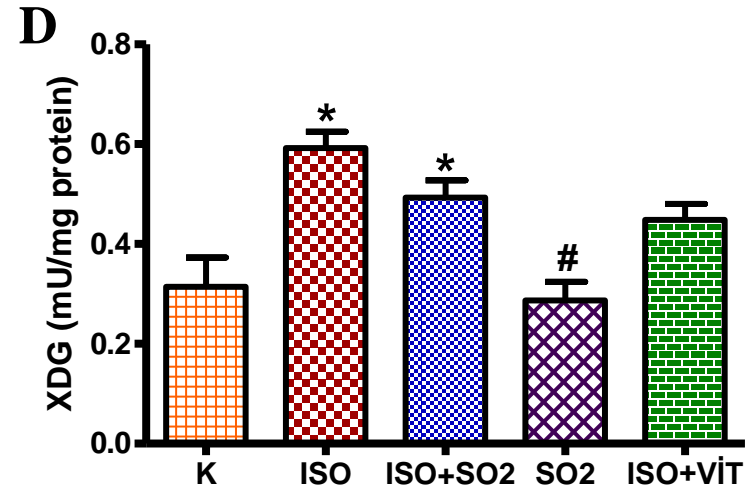
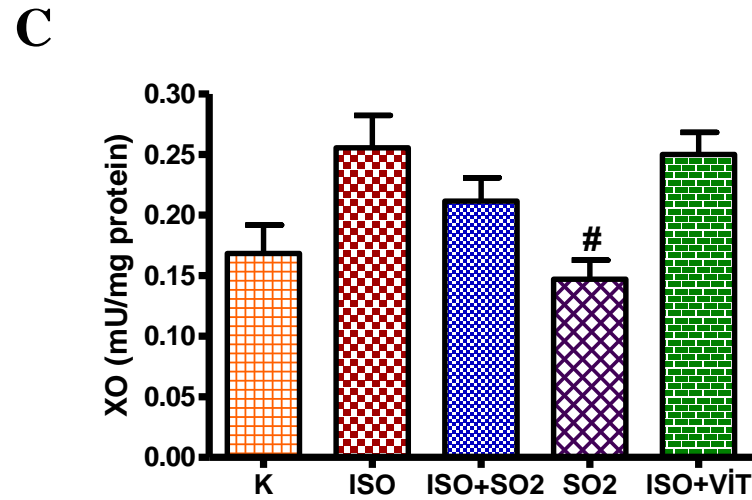
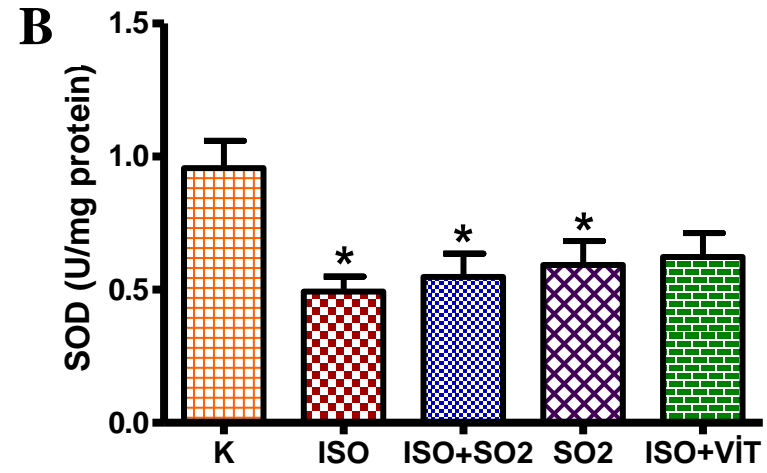
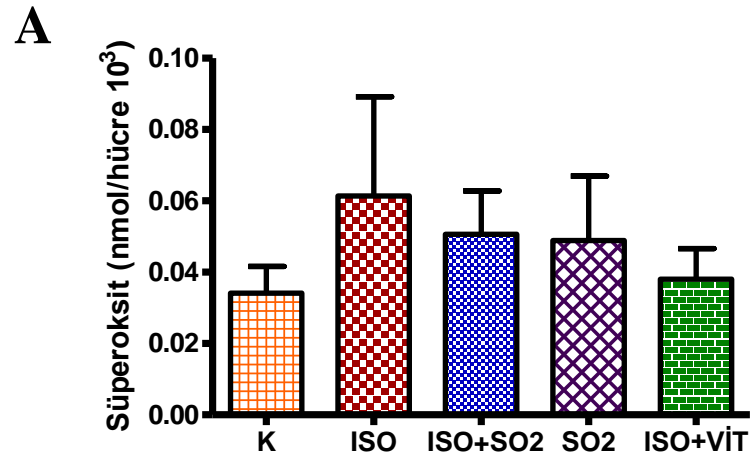
Yapılan deneysel uygulamalar sonucunda oksidatif stresde herhangi bir değişikliğin olup olmadığını, eğer olduysa bu değişikliklerin çeşitli oksidatif ve antioksidan parametreleri nasıl etkilediğine dair biyokimyasal incelemeler yapılmıştır. Hücre düzeyinde oksidan hasarın en anlamlı belirleyecilerinden olan lipit peroksidasyonunda gruplar arasında her hangi bir farklılık gözlenmemiştir. Diğer önemli bir belirleyici olan ve protein oksidasyonunu ifade eden protein karbonil datası dahilinde bütün gruplarda kontrole nazaran gözükten artış sadece SO<sub>2</sub> grubunda anlamlıdır.

Hücredeki birçok oksidatif yolağın başlamasını tetikleyen ve kendi başınada belirli bir etki gücüne sahip olan O<sub>2</sub><sup>-</sup> açısından deney grupları arasında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalini su ve moleküler oksijene dönüştürerek hücrenin önemli korunma mekanizmalarından olan SOD enziminde ise değişiklikler gözlenmiştir. ISO, ISO+SO<sub>2</sub> ve SO<sub>2</sub> gruplarında enzim aktivitesi kontrole nazaran azalmıştır. ISO+VİT’de ise azalışın istatistiksel anlamlılığı bulunmamıştır. Oksidatif stres ve antioksidan kapasite sürekli birbirini tetikleyen ve kontrol eden dinamik bir döngüye sahiptir. Az miktarda bulunması, hücrenin fizyolojik süreçler için gerekli olan ksantin oksidaz, eğer konsantrasyonunda bir artış yaşarsa bu sefer oksidatif stresi artıran bir işleve dönüşmektedir. ksantin oksidazın öncülü olan ve hipoksantinden ksantin oluşumu sırasında ksantin oksidaza dönüşen enzim olan ksantin dehidrogenaz enzimi, hücresel düzeyde ksantin oksidaz konsantrasyonunu belirlemede önemli bir yere sahiptir. Bu bağlamda gerçekleştirilen ölçümler dahilinde izoproterenol uygulanan gruplarda kontrole göre oluşan artışlar anlamlı farklılık oluşturmamaktadır. Ancak SO<sub>2</sub> grubunda kontrole göre XO enzim aktivitesinde gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Buna karşın XDG enzim aktivitesinde ISO ve ISO+SO<sub>2</sub> gruplarında, kontrole göre bir artış fark edilmiştir. Buna ilaveten SO<sub>2</sub>’de, bu artışların tam tersi yönde bir değişiklik mevcuttur.

Yapısında bulunan tiyol grubu sayesinde antioksidan özelliği bulunan glutatyon molekülü, hücrenin ROS kontrolünün önemli adımlarından biridir. Bu molekölün okside (GSSG) ve redükte (GSH) formlarında antioksidan etkinin devamlılığını sağlamaktadır. Yapılan ölçümlerde GSH düzeyinin, ISO grubunda kontrole göre anlamlı olmayan bir artış bulunmuştur. Ancak SO<sub>2</sub> ve ISO+VİT gruplarında kontrole göre değil ama ISO grubuna göre anlamlı bir azalış gözlenmiştir. GSH/GSSG oranında ise ISO+SO<sub>2</sub> ve ISO+VİT gruplarında kontrole göre belirgin bir azalış gözlenirken, bunun yanında ISO+VİT grubu için bir azalışda ISO’ya kıyasla gerçekleşmiştir. Hücreyi oksidatif hasardan, GSH’1, glutatyon disülfid ve suya dönüşebilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’ye dönüştürerek koruyan ve antioksidan enzimlerden bir tanesi olan GPx molekülünde ise hiçbir grupta farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.7. Oksidasyon parametreleri-1. Biyokimyasal yöntemlerle deney gruplarından ölçülen A) Protein karbonil değerleri, B) TBARS değerleri, C) Redükte glutatyon/okside glutatyon oranı, D) GPx enzim aktivitesi sonuçları.\*p<0.05 vs K ve #p<0.05 vs ISO



Şekil 4.8. Oksidasyon parametreleri-2. Biyokimyasal yöntemlerle deney gruplarından ölçülen A) süperoksit anyon salınımı, B) SOD enzim aktivitesi, C) XO ve D) XDG enzim aktivite sonuçları. \*p<0.05 vs K, #p<0.05 vs ISO



## TARTIŞMA

SO<sub>2</sub> atmosferde doğal olarak çok küçük miktarlarda bulunan keskin, tahriş edici ve çürük kokusu veren toksik bir gazdır. Özellikle sanayinin yoğun olduğu bölgelerde çevre kirliliğine olan etkisiyle dikkat çeken ve yapılan çalışmalar sonucunda önemli derecede toksik etkisi olduğu tespit edilen bir moleküldür [17, 32, 33, 110-112]. SO<sub>2</sub>'nin özellikle solunum sisteminde, astım ve alerjik reaksiyonların gelişmesinde ciddi etkilerinin olduğu birçok çalışmayla gösterilmiştir [32, 110, 113-115]. Bu nedenle SO<sub>2</sub> molekülü insan sağlığını doğrudan etkileyebilen bir molekül olarak algılanabilmektedir. Bu algı kapsamında molekülün etkilerinin, sistem üzerine zararlı olduğuna dair bir kabullenme oluşmuştur. Ancak bu molekülle yapılan çalışmaların ilerleyen süreçlerinde SO<sub>2</sub>'nin canlı organizmalar tarafından metabolik süreçler içerisinde üretildiği tespit edilmiştir [5, 7, 116]. SO<sub>2</sub>'nin yanısıra zamanında toksik etkisi olduğu düşünülen ve üzerlerinde yapılan çalışmalar sonucunda fizyolojik süreçlerin devamlılığında ve belirli yolların düzgün bir şekilde işlevini yerine getirebilmesinde CO, NO ve H<sub>2</sub>S moleküllerinin gerekli olduğu sonucuna ulaşılmıştır [5, 19-22, 117, 118]. Şu anda literatür bu 3 molekülü gazotransmitter olarak bir başlık altında toplamakta [5, 119, 120] ve hem hücresel düzeyde hem de doku düzeyinde önemli fizyolojik süreçlere katkı sağlamaktadır. Bu nedenle SO<sub>2</sub> molekülünün de canlı organizmalar üzerine bu tip etkilerinin olup olmadığı merak edilmiş ve yapılan çalışmalar sonucunda çelişkili sonuçlara ulaşılmıştır. Fizyolojik koşullarda sistemik bir ajan olan SO<sub>2</sub> uygulamasının oksidatif stresi arttırdığı ve organizma için zarar verici bir molekül olduğu gösterilmiştir [121, 122]. Bununla birlikte SO<sub>2</sub> damarları vazodilatasyona uğratarak hipotansiyona neden olurken [41, 123, 124], kardiyak dokuda da koroner kan akışında bozukluklarla birlikte ciddi negatif inotropik (kasılma kuvveti) etkilere sebep olmuştur [9]. Fizyolojik durumlar dahilinde yukarıda bahsedilen olumsuz etkilere sahip olmasına rağmen, patofizyolojik durumlarda ise tam tersi etkilerinin söz konusu olduğu fark edilmiştir [8, 42, 125-129]. Özellikle kardiyovasküler sistem üzerinde yapılan çalışmalarda patoloji sonucu oluşan damarsal yeniden modellemeleri geri döndürebildiği, antioksidan kapasiteyi artırarak oksidan moleküllerine karşı bir savunma mekanizması şeklinde görev yapabildiği gösterilmiştir [42, 127]. Bu bilgilere ilaveten sistolik kan basıncını ve ortalama pulmoner arter basıncını düşürerek anti hipertansif [8, 125], endotelial hücrelerde NF-κB ve hücreler arası yapışma molekülü-1'in konsantrasyonunu azaltarak anti inflamatuvar [8, 126] ve damar tıkanıklığında oluşan lezyon alanında azalmaya sebep olup, düşen GPx ve SOD aktivitelerini artırarak damar tıkanıklığı üzerine olumlu etkileri [127] görülen bir ajan olarak işlevinin bulunduğu vurgulanmaktadır.

Hipertrofik kardiyomiopati büyümüş bir kalple karakteristiktir. Bu durum tek başına da ciddi problemlere yol açabilecek bir patolojiyken, aynı zamanda birçok kardiyak hasarın gelişmesine elverişli bir ortam hazırlayabilen bir ara basamak olarak da işlev gösterebilmektedir [130-132]. Hipertrofik hasarın etiolojisi çok farklı nedenlere dayanmakla birlikte başat rolü adrenerjik sistemin üstlendiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [133-135]. Sempatik-adrenerjik sistem fizyolojik koşullarda hücresel düzeyde fonksiyonel olguların düzenlenmesinde etkin görev alan bir sistemdir. Kardiyomiyositlerde bu sistem özellikle β-adrenerjik reseptörler aracılığıyla varlığını göstermektedir. Ventrikül

miyosit hücrelerinde uyarılma-kasılma çiftleniminde anahtar ve  $Ca^{2+}$  homeostazisinin düzenlenmesinde etkin bir rol oynamaktadır [11]. Bu etkisini ağırlıklı olarak G-proteini ve PKA aracılığıyla SR üzerinde bulunan RYR ve SERCA kanal proteinlerini fosforilleyerek gösterir [11, 69, 136]. Kalp kasının işlevini yerine getirmesinde bu denli önemli bir role sahip olan bir yapının bozulması, beraberinde ciddi problemler getirmektedir. Kardiyak dokuda hasar oluşturabilmek için uzun zamandır kullanılan ve genel bir  $\beta$ -AR agonisti olan izoproterenol molekülü deney hayvanlarına uygulanmıştır [1, 76, 79, 137-143]. Yapılan çalışmalarda uygulanan izoproterenolün dozuna ve süresine bağlı olarak işlevsel ve elektrofizyolojik etkisinin değiştiği gözlenmiştir. İzoproterenol ile oluşturulan miyokardiyal rahatsızlıkların sonucunda, hücre düzeyinde sarkolemma, kasılma, mitokondri ve diyadik bölgelerde değişimin oluşabileceği bilinmektedir. Bu değişimlerin kalsiyum, kasılma ve mitokondriyal enerji üretimlerinin sinyal yollarındaki değişimlerle yakın ilişki içerisinde bulunduğu, oluşabilecek değişikliklerin de bu durumlarda anormalliklere neden olabileceği anlamına gelmektedir. Değişikliklerin meydana gelmesi sonucunda morfolojik farklılıkların yanında kardiyak fonksiyonlarında farklılaşacağı ve miyokardiyal hipertrofinin kalp yetmezliğine doğru bir yönlenimde bulunacağı net bir şekilde anlaşılmaktadır [73]. Bu çalışmada kullandığımız 20 mg/kg/gün'lük doz orta düzeydeki sınıflandırmanın içerisinde bulunmaktadır. Litaretürde bu dozla yapılan çalışmalarda, izoproterenol uygulaması sonucunda oluşturulan kardiyak hasarda  $SO_2$  içeriğinin düştüğü sonucuna ulaşılmıştır. Ulaşılan bu sonuca dayanarak, ekzojen  $SO_2$  donörü uygulamasının  $SO_2$  içeriğinin artmasına paralel olarak hasarda gerilemenin olduğu bilgisine ulaşılmıştır [1, 144]. Bu sınıflandırma içerisinde yukarıda sayılan bu değişikliklere neden olmasının yanında oksidatif stresin artmasına sebep olduğu bilgileri mevcuttur [1, 145, 146]. Bu verilerden yola çıkılarak planlanan çalışma iki temel hipotezin aydınlatılmasını amaçlamaktadır: 1)  $SO_2$  molekülünün izoproterenol yardımıyla oluşan hipertrofik hasarda elektrofizyolojik ve fonksiyonel değişikliklerin mekanizması üzerine etkili olup olmadığı. 2) Litaretürde sürekli olarak antioksidan sistemle ilişkisi kurulan bu molekülün, etkilerini bu sistem aracılığıyla oluşturup oluşturmadığı.

Birçok çalışmayla uyumlu olarak izoproterenol uygulaması yapılan deney gruplarında kalp ağırlığının hem vücut ağırlığına oranı hem de tibia uzunluğuna oranında ki artışla oluşturmak istediğimiz hipertrofik hasarın meydana geldiği anlaşılmaktadır (Tablo.1 ve Şekil 4.1). Ancak izoproterenol uygulamasına tabi tutulan deney gruplarında vücut ağırlığında deney sürecinde azalma gözlenmiştir. Bu azalışın deney grupları arasında farklı düzeylerde olması nedeniyle vücut ağırlığı kullanılarak oluşturulan indeksin hatalı yorumlara neden olacağı izlenimi uyandırmıştır. Bu sorunun ortadan kaldırabilmesi için deney hayvanının yaşıyla uyumlu olarak değiştiği ve kısa süreli kronik etkilerden etkilenmediği bilinen tibia uzunluğunun, kalp ağırlığıyla oranlanması sonucu ortaya çıkan veriler değerlendirilmiştir. Ortaya çıkan verilerle, kullanılan benzer model ve  $SO_2$  türevi uygulaması yapılan üç farklı çalışmanın verileri karşılaştırıldığında da çelişkili sonuçlara ulaşılmaktadır. Bu yayınlarda ekokardiyografik verilere dayanarak kalbin yapıları incelenmiş olup ulaşılan sonuçlar birbirlerinden farklıdır. Bu çalışmaların ikisinde izoproterenol uygulaması ile sol ventrikülün arka yüzünün hem sistol hem de diyastol durumlarında kalınlaştığı, ancak  $SO_2$  verildiğinde kalınlaşmanın engellendiği gözlenirken, diyastol durumunda ön yüzde duvar kalınlığının arka yüzdeki gibi geri gelebileceği bulgusuna ulaşılmamasına rağmen sistol durumunda  $SO_2$ 'nin ön yüzde oluşan kalınlığa her hangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır [1, 147, 148]. Bunun yanında uygulanan  $SO_2$  ve antioksidan olarak düşünülen maddelerin ise oluşan hipertrofiyi geriletecek her hangi bir

etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.1B). Bütün olarak incelendiğinde ne antioksidan uygulamasının ne de SO<sub>2</sub> uygulamasının hipertrofinin gelişimine engel olabilecek bir etkisi bulunmamaktadır.

Ventrikül miyositlerinin fonksiyonu, uyarılma-kasılma çiftleniminin gerçekleşmesiyle birlikte kanın sistemik dolaşıma pompalanmasıdır. Bu pompalamayı sağlayan kasılma işlevi sarkomerik kısalma-gevşeme ve [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> parametrelerine bağlıdır [149, 150]. Subkronik olarak düşünülen isoproterenol uygulaması sonucunda oluşan kardiyak hasarın kısalma ve [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> cevaplarında her hangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Değişik hipertrofik yetmezlik modellerinde yapılan çalışmalarda kontraktilite ve [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> geçici cevaplarında hasarın safhasına göre farklı bulguların olabileceği vurgulanmıştır. Hasarın ilk safhalarında bu cevapların arttığı, hipertrofinin ileri safhalarında ise kasılma ve Ca<sup>2+</sup> düzenlenmesinde bozuklukların ortaya çıktığı belirtilmiştir. Ancak bu uygulamanın [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de bir değişikliğe neden olmamasına rağmen I<sub>CaL</sub> azalmaya sebep olmuştur. Akım yoğunluğunda gözlenen azalışa karşı tranzient genliğinde anlamlı olmasa da artışın olması kalsiyum aracılı kalsiyum salınım kazancının arttığını dolayısıyla hasara karşı kompensatif bir mekanizmanın devreye girdiğini göstermektedir. Bunlarla birlikte oluşturulan hipertrofik modelde APD'nin işlevsel mekanizmayı etkileyecek derecede uzadığına dair bulgularımızı, Toischer ve arkadaşlarının farklı modelde yaptığı çalışmayı desteklemektedir [151]. AP sürecinde etkin olan I<sub>CaL</sub>'nin düşmesi ve I<sub>K</sub>'da değişim gözlenmemesi artan repolarizasyon süresinin farklı akımlardan kaynaklandığını düşündürmektedir. Tüm bu verilerin ışığında izoproterenol uygulamasının yarattığı patolojik durumun elektrofizyolojik süreçlerde değişiklik meydana getirdiği ve bu değişikliğe paralel olarak homeostazisin bozulduğu söylenebilmektedir.

Metabolik süreçler sonucunda vücudun üretebildiği SO<sub>2</sub> molekülünün hücrel fonksiyonların işleyişine etki ettiği, bu etkinin ise fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda farklılık gösterebileceğine dair literatürde çelişkili bulgular bulunmaktadır [8, 32, 33, 42, 43, 121, 122, 129]. SO<sub>2</sub> molekülünün mekanik parametreler açısından kısalma ile ilgili verilerle anlamlı değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Ancak gevşeme hızında ve süresinde kontrole göre farklılıklar oluşturmuştur. Bunun nedeninin Ca<sup>2+</sup> transienlerinin geri dönüş hızının yavaşlaması ve genlikte meydana gelebilecek artışla bir ilişkisi olabileceği düşünülmekle birlikte bu parametrede istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir. Relaksasyonda gözlenen bu uzamanın kasılma mekanizmasında rol alan protein yapıların fosforilasyon durumlarında oluşan değişikliklere bağlı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [152, 153].

Hypertrofi koşullarının gelişimine bağlı olarak SO<sub>2</sub> molekülünün etkisini ortaya koymak için oluşturulan ISO+SO<sub>2</sub> grubunda diğer gruplarda gözlenmeyen kasılma mekanizması üzerine olumsuz etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Dinlenim durumu sarkomer boyu, kasılmanın genliği ve hızı azalmıştır. Bu bulguyla çelişkili olarak ISO+SO<sub>2</sub> grubunda diastolik [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fark gözlenmezken, geçici cevapların genliğinin ISO ve SO<sub>2</sub> grubuna göre arttığı dikkati çekmektedir. Mekanik parametreler üzerine bu değişiklikleri gerçekleştirirse de izoproterenol uygulaması sonucu artan AP süresini ve azalan I<sub>CaL</sub>'i kontrol seviyelerine geri döndürmüştür. ISO+SO<sub>2</sub> grubunda tranzient genliğinin artmasının altında yatan mekanizma olarak kazancın izoproterenol uygulamasıyla artmasının yanında SO<sub>2</sub>'nin I<sub>CaL</sub>'yi normalize etmesinin sinerjetik etkisinin olduğu söylenebilir. Diğer yandan, aritmik durumlara neden olabilecek AP süresindeki değişimlerin SO<sub>2</sub> tarafından fizyolojik

sınırlar içerisinde çekilmesi, bu molekülünün patolojik durumlarda olumlu bir etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Elektrofizyolojik parametrelerde gözlenen olumlu sonuçlar ve geçici  $Ca^{2+}$  cevaplarında ki artışa rağmen (Şekil 4.3, 4.6), patolojik durumda  $SO_2$  uygulaması kasılmayı bozan bir etki göstermiştir (Şekil 4.5). Bunun nedeninin kasılma işlevinin gerçekleşmesini sağlayan TnC'nin  $Ca^{2+}$  duyarlılığındaki artış ile beraber diyastolik sarkomer uzunluğunun kısalması olduğu bazı çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu durumun sonucunda tam anlamıyla bir gevşemenin oluşmayacağı ve akabinde diyastolik fonksiyon bozukluklarının meydana geleceği söylenebilir [152]. Sistol durumunda ISO+ $SO_2$ 'nin transientlerinin artması RYR'lerin aktivitesinde yada açık kalma sürelerinde bir artışa neden olduğunu işaret etmektedir. Bu artışa rağmen yüzde kısalma genliğindeki azalış  $Ca^{2+}$ 'un TnC ile etkileşime geçemediğini belirtmektedir. Bu durumun kinazlar aracılığıyla yapılan fosforilleme işleminde bir farklılık olduğunu ve  $Ca^{2+}$  artışına rağmen kısalma genliğinin artmadığını gösterebilmektedir. Nitekim hipertrofik myopati çalışmalarında farklı kinaz sistemlerinin bağımsız veya birbirlerini tetikleyen şekilde aktivasyonu sonucunda diastolik işlev bozukluğunun gerçekleştiğini bildirilmiştir [154-156]. ISO ve  $SO_2$  uygulamalarının ayrı ayrı yapıldığı gruplarda böyle bir etki gözlenmezken, beraber uygulandıklarında farklı yada aynı yollardan kinazlar üzerine etki ederek bu etkiyi meydana getirdikleri düşünülmektedir.

Şimdiye kadar yapılan birçok çalışmada,  $SO_2$ 'nin patolojik durumlardaki olumlu etkilerinin antioksidan sistem aracılığıyla ilgili olduğuna dair yorumlar yapılmış ancak durum net bir şekilde ifade edilememiştir. Bu belirsizliğin ortadan kalkabilmesi için çalışmamız dahilinde  $SO_2$ 'nin gerçekleştirdiği bu olası etkilerin antioksidan sistemle bir alakasının bulunup bulunmadığının anlaşılması da hedeflenmiştir. Bunun içinse oluşturulan patoloji modeli üzerine antioksidan bir karışım olan genel bir oksidan süpürücü vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) ve mitokondri oksidan süpürücü olarak etki gösteren quercetin karışımı verilmiştir. Birçok parametrede farklılığa neden olmazken, geçici  $[Ca^{2+}]_i$  cevaplarının hücre içi depolara alınım süresinde azalışa ve gevşeme verilerinde ISO+ $SO_2$  ile aynı yönde ve paralel etkilere neden olmuştur (Şekil 4.6). Ayrıca kanal akımları üzerine de etkileri tespit edilmiş  $I_{CaL}$  akımlarında ISO ile eşit düzeyde azalışa neden olurken, AP'nin repolarizasyon süresini görece olarak azaltmıştır. Bunun yanında  $I_K$  üzerinede ciddi baskılayıcı etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Antioksidan olarak düşünülen quercetin özellikle  $K^+$  ve  $Ca^{2+}$  kanal blokörü olarak etki göstermesi nedeniyle antioksidan etkisi ile ilgili elektrofizyolojik etkileri yorumlanamamıştır. Ancak etkinin mekanizmasını belirleyebilmek için biyokimyasal parametrelerde incelenmesi  $SO_2$ 'nin oksidan sistem ile ilişkisini ortaya çıkarmada önemli bilgiler sunmuştur. İzoproterenol uygulamasının temel oksidatif göstergelere (lipid ve protein oksidasyonu) değişikliğe neden olmaması (Şekil 4.8) oluşan kardiyak hasarın oksidatif bir stres meydana getirmediğini göstermektedir.  $SO_2$ 'nin tek başına uygulanmasıyla protein karbonil artışı fizyolojik durumlarda negatif bir etkisinin olduğu yönünde bulgularımız literatürde bulunan yayınları desteklerken [157], oluşan patolojik durumda olumsuz bir davranışının olmaması dikkatten kaçmamalıdır.

Ulaşılan bulgular bütün olarak değerlendirildiğinde de  $SO_2$  donörünün fizyolojik durumlarda bazı parametreler üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu ancak koşulların farklılaşmasına bağlı olarak etki kapsamının da değiştiğini vurgulamaktadır. Ayrıca bu kapsamın değişiminin antioksidan sistemle sıkı bir ilişki içerisinde olmadığı gözlenmiştir. Bu yorumun daha net yapılabilmesi için oksidatif stres parametreleri biyokimyasal olarak incelenmiştir. İncelemeler sonucunda oluşturulan kardiyak hasarın oksidatif stres kaynağı

olmadığı ancak SO<sub>2</sub> molekülünün normal koşullarda protein oksidasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Bu bağlamda oluşan patoloji kapsamında oksidatif stresde her hangi bir artış olmamasına ve patolojinin oluşturduğu elektrofizyolojik parametrelerin SO<sub>2</sub> uygulamasıyla birlikte düzelmesinde antioksidan sistemin bir etkisinin olmadığı, SO<sub>2</sub> molekülünün bu etkisinin farklı yollarla gerçekleştirebildiği düşünülmektedir. SO<sub>2</sub> molekülünün bu etkisini de kanal aktivasyonunu etkileyen hücre içi sinyal yollarıyla ya da doğrudan kanallar üzerine gösterdiği tahmin edilmektedir. Bu olgunun netleştirilebilmesi için yapılan tahminler üzerine çalışmaların yoğunlaştırılması gerekmektedir.

## SONUÇLAR

İzoproterenol uygulaması sonucunda hipertrofinin oluştuğu ancak ne SO<sub>2</sub>'nin ne de antioksidan karışımının uygulanmasının hipertrofiyi geriletecek bir etkisinin olmadığı bulunmuştur.

İzoproterenol ile SO<sub>2</sub> molekülünün birlikte uygulanması sonucunda dinlenme durumundaki sarkomer boyunda ve kasılma genliğinde azalma gözlenirken, %90 kasılma ve gevşeme süresinde de artış görülmüştür. Gevşeme parametresi açısından incelendiğinde ise SO<sub>2</sub> ve antioksidan uygulamasının paralellik gösterdiği bulunmuştur.

Uyarılma-kasılma çiftleniminin ateşleyicisi olan AP'nin izoproterenol uygulaması sonucunda APD90 parametresinde uzatıcı etkisi olduğu gözlenmiştir. SO<sub>2</sub> uygulamasıyla birlikte bu süredeki uzamanın kontrol seviyelerine çekildiği bilgisine ulaşılmıştır.

Diyastolik [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> seviyesinde deney grupları arasında hiçbir farklılık bulunmazken, sistolik [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> düzeyinde ISO+SO<sub>2</sub> grubunda bir artış bulunmuştur. Zaman sabitinde ise hem ISO+SO<sub>2</sub>'de hem de ISO+VİT'de kontrole nazaran bir azalış gözlenmiştir.

K<sup>+</sup> akımları açısından antioksidan olarak düşünülen maddeler verildiğinde diğer gruplara göre bir azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalışın quercetin'in K<sup>+</sup> kanalları üzerine olan inhibitör etkisinden olduğu düşünülmektedir.

Ca<sup>2+</sup> akımları incelendiğinde izoproterenol uygulamasının Ca<sup>2+</sup> akım yoğunluğunu azalttığı antioksidan uygulamasının hiçbir etkisinin olmadığı ancak SO<sub>2</sub> uygulamasıyla birlikte Ca<sup>2+</sup> akım yoğunluğunun kontrol seviyelerine çekildiği gözlenmiştir.

İzoproterenol uygulamasının ne protein oksidasyonuna ne de lipit peroksidasyonuna her hangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. SO<sub>2</sub> uygulamasının ise prooksidan olarak davranarak protein oksidasyonunu arttırdığı bilgisine ulaşılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Liang, Y., et al., *Endogenous sulfur dioxide protects against isoproterenol-induced myocardial injury and increases myocardial antioxidant capacity in rats*. Lab Invest, 2011. **91**(1): p. 12-23.
2. Singal, P.K., et al., *Influence of reducing agents on adrenochrome-induced changes in the heart*. Arch Pathol Lab Med, 1981. **105**(12): p. 664-9.
3. Noronha-Dutra, A.A., E.M. Steen-Dutra, and N. Woolf, *Epinephrine-induced cytotoxicity of rat plasma. Its effects on isolated cardiac myocytes*. Lab Invest, 1988. **59**(6): p. 817-23.
4. Meng, Z., et al., *DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice*. Mutagenesis, 2004. **19**(6): p. 465-8.
5. Li, X., et al., *Amino acids and gaseous signaling*. Amino Acids, 2009. **37**(1): p. 65-78.
6. Liu, D., et al., *Sulfur dioxide: a novel gaseous signal in the regulation of cardiovascular functions*. Mini Rev Med Chem, 2010. **10**(11): p. 1039-45.
7. Du, S.X., et al., *Endogenously generated sulfur dioxide and its vasorelaxant effect in rats*. Acta Pharmacol Sin, 2008. **29**(8): p. 923-30.
8. Sun, Y., et al., *Effects of sulfur dioxide on hypoxic pulmonary vascular structural remodeling*. Lab Invest, 2010. **90**(1): p. 68-82.
9. Zhang, Q. and Z. Meng, *The negative inotropic effects of gaseous sulfur dioxide and its derivatives in the isolated perfused rat heart*. Environ Toxicol, 2012. **27**(3): p. 175-84.
10. Zhang, S., et al., *Endogenous sulfur dioxide aggravates myocardial injury in isolated rat heart with ischemia and reperfusion*. Transplantation, 2009. **87**(4): p. 517-24.
11. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
12. Wolf, C.M. and C.I. Berul, *Molecular mechanisms of inherited arrhythmias*. Curr Genomics, 2008. **9**(3): p. 160-8.
13. Janvier, N.C. and M.R. Boyett, *The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(1): p. 69-84.
14. Fabiato, A. and F. Fabiato, *Use of chlorotetracycline fluorescence to demonstrate Ca<sup>2+</sup>-induced release of Ca<sup>2+</sup> from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells*. Nature, 1979. **281**(5727): p. 146-8.
15. Bracken, N., et al., *Mechanisms Underlying Contractile Dysfunction in Streptozotocin-Induced Type 1 and Type 2 Diabetic Cardiomyopathy*, in *Atherosclerosis, Hypertension and Diabetes*, G. Pierce, et al., Editors. 2003, Springer US. p. 387-408.
16. England, J. and S. Loughna, *Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(7): p. 1221-39.
17. Gold, D.R. and J.M. Samet, *Air pollution, climate, and heart disease*. Circulation, 2013. **128**(21): p. 003988.

18. Peters, A., et al., *Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia*. Epidemiology, 2000. **11**(1): p. 11-7.
19. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical*. Circ Res, 1987. **61**(6): p. 866-79.
20. Abe, K. and H. Kimura, *The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator*. J Neurosci, 1996. **16**(3): p. 1066-71.
21. Wu, L. and R. Wang, *Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 585-630.
22. Wang, R., *Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter?* Faseb J, 2002. **16**(13): p. 1792-8.
23. Wang, J.Q., et al., *Modulation of ionotropic glutamate receptors and Acid-sensing ion channels by nitric oxide*. Front Physiol, 2012. **3**(164): p. 00164.
24. Olson, K.R., *The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **301**(2): p. 4.
25. Peter, E.A., et al., *Plasma free H<sub>2</sub>S levels are elevated in patients with cardiovascular disease*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(5): p. 000387.
26. Chung, K.F., *Hydrogen sulfide as a potential biomarker of asthma*. Expert Rev Respir Med, 2013. **2**: p. 2.
27. Wang, X.B., et al., *The biological effect of endogenous sulfur dioxide in the cardiovascular system*. Eur J Pharmacol, 2011. **670**(1): p. 1-6.
28. Cresenzi, C.L., J.I. Lee, and M.H. Stipanuk, *Cysteine is the metabolic signal responsible for dietary regulation of hepatic cysteine dioxygenase and glutamate cysteine ligase in intact rats*. J Nutr, 2003. **133**(9): p. 2697-702.
29. Stipanuk, M.H., *Metabolism of sulfur-containing amino acids*. Annu Rev Nutr, 1986. **6**: p. 179-209.
30. Stipanuk, M.H., *Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine*. Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 539-77.
31. Cabre, F., et al., *Occurrence and comparison of sulfite oxidase activity in mammalian tissues*. Biochem Med Metab Biol, 1990. **43**(2): p. 159-62.
32. Gunnison, A.F. and D.W. Jacobsen, *Sulfite hypersensitivity. A critical review*. CRC Crit Rev Toxicol, 1987. **17**(3): p. 185-214.
33. Lester, M.R., *Sulfite sensitivity: significance in human health*. J Am Coll Nutr, 1995. **14**(3): p. 229-32.
34. Feng, C., G. Tollin, and J.H. Enemark, *Sulfite oxidizing enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2007. **5**: p. 527-39.
35. Kagedal, B., M. Kallberg, and B. Sorbo, *A possible involvement of glutathione in the detoxication of sulfite*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **136**(3): p. 1036-41.
36. Leung, K.H., G.B. Post, and D.B. Menzel, *Glutathione S-sulfonate, a sulfur dioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase*. Toxicol Appl Pharmacol, 1985. **77**(3): p. 388-94.
37. Mottley, C. and R.P. Mason, *Sulfate anion free radical formation by the peroxidation of (Bi)sulfite and its reaction with hydroxyl radical scavengers*. Arch Biochem Biophys, 1988. **267**(2): p. 681-9.
38. Cohen, H.J., et al., *Molecular basis of the biological function of molybdenum: the relationship between sulfite oxidase and the acute toxicity of bisulfite and SO<sub>2</sub>*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(12): p. 3655-9.



39. Karoui, H., et al., *Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxyxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies.* J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6000-9.
40. Langley-Evans, S.C., G.J. Phillips, and A.A. Jackson, *Sulphur dioxide: a potent glutathione depleting agent.* Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1996. **114**(2): p. 89-98.
41. Meng, Z., et al., *Blood pressure of rats lowered by sulfur dioxide and its derivatives.* Inhal Toxicol, 2003. **15**(9): p. 951-9.
42. Jin, H.F., et al., *Effects of endogenous sulfur dioxide on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.* Acta Pharmacol Sin, 2008. **29**(10): p. 1157-66.
43. Zhao, X., et al., *[Effect of sulfur dioxide on vascular collagen remodeling in spontaneously hypertensive rats].* Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2008. **46**(12): p. 905-8.
44. Jin, H., et al., *Sulfur dioxide preconditioning increases antioxidative capacity in rat with myocardial ischemia reperfusion (I/R) injury.* Nitric Oxide, 2013. **32**: p. 56-61.
45. Wang, X.B., et al., *Effect of sulfur dioxide preconditioning on rat myocardial ischemia/reperfusion injury by inducing endoplasmic reticulum stress.* Basic Res Cardiol, 2011. **106**(5): p. 865-78.
46. Nie, A. and Z. Meng, *Sulfur dioxide derivative modulation of potassium channels in rat ventricular myocytes.* Arch Biochem Biophys, 2005. **442**(2): p. 187-95.
47. Zhang, Q. and Z. Meng, *The vasodilator mechanism of sulfur dioxide on isolated aortic rings of rats: Involvement of the K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels.* Eur J Pharmacol, 2009. **602**(1): p. 117-23.
48. Nie, A. and Z. Meng, *Study of the interaction of sulfur dioxide derivative with cardiac sodium channel.* Biochim Biophys Acta, 2005. **10**: p. 1-2.
49. Nie, A. and Z. Meng, *Modulation of L-type calcium current in rat cardiac myocytes by sulfur dioxide derivatives.* Food Chem Toxicol, 2006. **44**(3): p. 355-63.
50. Zhang, R.Y., et al., *Sulfur dioxide derivatives depress L-type calcium channel in rat cardiomyocytes.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011. **38**(7): p. 416-22.
51. Nie, A. and Z. Meng, *Sulfur dioxide derivatives modulate Na/Ca exchange currents and cytosolic [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat myocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(3): p. 879-84.
52. Brodde, O.E. and M.C. Michel, *Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart.* Pharmacol Rev, 1999. **51**(4): p. 651-90.
53. Strosberg, A.D., *Structure, function, and regulation of the three beta-adrenergic receptors.* Obes Res, 1995. **3**(4): p. 501S-505S.
54. Bond, R.A. and D. Girdlestone, *Romancing receptor research at Verona classification meeting:* Trends Pharmacol Sci. 1996 Mar;17(3):85-9.
55. Link, R., et al., *Cloning of two mouse genes encoding alpha 2-adrenergic receptor subtypes and identification of a single amino acid in the mouse alpha 2-C10 homolog responsible for an interspecies variation in antagonist binding.* Mol Pharmacol, 1992. **42**(1): p. 16-27.
56. Cotecchia, S., et al., *Discrete amino acid sequences of the alpha 1-adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolysis.* J Biol Chem, 1992. **267**(3): p. 1633-9.
57. Hamm, H.E., *The many faces of G protein signaling.* J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 669-72.
58. Woo, A.Y. and R.P. Xiao, *beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside.* Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(3): p. 335-41.

59. Brum, P.C., et al., *Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors*. An Acad Bras Cienc, 2006. **78**(3): p. 485-503.
60. Milano, C.A., et al., *Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 10109-13.
61. Cotecchia, S., et al., *Regions of the alpha 1-adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(8): p. 2896-900.
62. Adams, J.W., et al., *Prostaglandin F2 alpha stimulates hypertrophic growth of cultured neonatal rat ventricular myocytes*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 1179-86.
63. Zheng, M., Q.D. Han, and R.P. Xiao, *Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance*. Sheng Li Xue Bao, 2004. **56**(1): p. 1-15.
64. Xiang, Y.K., *Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes*. Circ Res, 2011. **109**(2): p. 231-44.
65. Tilley, D.G. and H.A. Rockman, *Role of beta-adrenergic receptor signaling and desensitization in heart failure: new concepts and prospects for treatment*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2006. **4**(3): p. 417-32.
66. Hamdani, N. and W.A. Linke, *Alteration of the beta-adrenergic signaling pathway in human heart failure*. Curr Pharm Biotechnol, 2012. **13**(13): p. 2522-31.
67. Brodde, O.E., H. Bruck, and K. Leineweber, *Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance*. J Pharmacol Sci, 2006. **100**(5): p. 323-37.
68. Hata, J.A., M.L. Williams, and W.J. Koch, *Genetic manipulation of myocardial beta-adrenergic receptor activation and desensitization*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(1): p. 11-21.
69. Lohse, M.J., S. Engelhardt, and T. Eschenhagen, *What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?* Circ Res, 2003. **93**(10): p. 896-906.
70. Rona, G., *Catecholamine cardiotoxicity*. J Mol Cell Cardiol, 1985. **17**(4): p. 291-306.
71. Rona, G., et al., *An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat*. AMA Arch Pathol, 1959. **67**(4): p. 443-55.
72. Raab, W., *Key position of catecholamines in functional and degenerative cardiovascular pathology*. Am J Cardiol, 1960. **5**: p. 571-8.
73. Nichtova, Z., et al., *Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol*. Gen Physiol Biophys, 2012. **31**(2): p. 141-51.
74. Lijnen, P.J., V.V. Petrov, and R.H. Fagard, *Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1)*. Mol Genet Metab, 2000. **71**(1-2): p. 418-35.
75. Rona, G., D.S. Kahn, and C.I. Chappel, *Study on the healing of cardiac necrosis in the rat*. Am J Pathol, 1961. **39**: p. 473-89.
76. Suzuki, M., et al., *Altered inotropic response of endothelin-1 in cardiomyocytes from rats with isoproterenol-induced cardiomyopathy*. Cardiovasc Res, 1998. **39**(3): p. 589-99.
77. Meszaros, J. and G. Levai, *Ultrastructural and electrophysiological alterations during the development of catecholamine-induced cardiac hypertrophy and failure*. Acta Biol Hung, 1990. **41**(4): p. 289-307.
78. Kralova, E., et al., *Electrocardiography in two models of isoproterenol-induced left ventricular remodeling*. Physiol Res, 2008. **57**(2): p. 28.

79. Leenen, F.H., R. White, and B. Yuan, *Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(6): p. H2410-6.
80. Zhang, G.X., et al., *Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 230-8.
81. Chagoya de Sanchez, V., et al., *Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study*. Can J Physiol Pharmacol, 1997. **75**(12): p. 1300-11.
82. Dudnakova, T.V., et al., *Alterations in myocardial ultrastructure and protein expression after a single injection of isoproterenol*. Mol Cell Biochem, 2003. **252**(1-2): p. 173-81.
83. Rajadurai, M. and P.S. Prince, *Preventive effect of naringin on cardiac mitochondrial enzymes during isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: a transmission electron microscopic study*. J Biochem Mol Toxicol, 2007. **21**(6): p. 354-61.
84. Feng, W. and W. Li, *The study of ISO induced heart failure rat model*. Exp Mol Pathol, 2010. **88**(2): p. 299-304.
85. Teerlink, J.R., J.M. Pfeffer, and M.A. Pfeffer, *Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats*. Circ Res, 1994. **75**(1): p. 105-13.
86. Ribeiro, D.A., et al., *Ascorbic acid prevents acute myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: role of inducible nitric oxide synthase production*. J Mol Histol, 2009. **40**(2): p. 99-105.
87. Grimm, D., et al., *Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(1): p. 91-100.
88. McMurray, J., et al., *Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans*. Eur Heart J, 1993. **14**(11): p. 1493-8.
89. Murdoch, C.E., et al., *NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 208-15.
90. Sawyer, D.B., et al., *Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(4): p. 379-88.
91. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 500-8.
92. Go, Y.M. and D.P. Jones, *Redox compartmentalization in eukaryotic cells*. Biochim Biophys Acta, 2008. **11**(90): p. 26.
93. Yanes, O., et al., *Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(6): p. 411-7.
94. Sauer, H., et al., *Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells*. FEBS Lett, 2000. **476**(3): p. 218-23.
95. Gurusamy, N., et al., *Inhibition of ref-1 stimulates the production of reactive oxygen species and induces differentiation in adult cardiac stem cells*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(3): p. 589-600.
96. Sauer, H., et al., *Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells*. Exp Cell Res, 2004. **294**(2): p. 313-24.

97. Sharifpanah, F., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists enhance cardiomyogenesis of mouse ES cells by utilization of a reactive oxygen species-dependent mechanism*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 64-71.
98. Morad, M. and Y.J. Suzuki, *Redox regulation of cardiac muscle calcium signaling*. Antioxid Redox Signal, 2000. **2**(1): p. 65-71.
99. Marx, S.O., et al., *PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts*. Cell, 2000. **101**(4): p. 365-76.
100. Kubalova, Z., et al., *Abnormal intrastore calcium signaling in chronic heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 14104-9.
101. Anderson, M.E., *Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias*. Pharmacol Ther, 2005. **106**(1): p. 39-55.
102. Zissimopoulos, S. and F.A. Lai, *Redox regulation of the ryanodine receptor/calcium release channel*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 919-21.
103. Gyorke, S. and C. Carnes, *Dysregulated sarcoplasmic reticulum calcium release: potential pharmacological target in cardiac disease*. Pharmacol Ther, 2008. **119**(3): p. 340-54.
104. Santos, C.X., et al., *Redox signaling in cardiac myocytes*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(7): p. 777-93.
105. Lavoie, J.C., C. Lachance, and P. Chessex, *Antiperoxide activity of sodium metabisulfite. A double-edged sword*. Biochem Pharmacol, 1994. **47**(5): p. 871-6.
106. Dalton-Bunnow, M.F., *Review of sulfite sensitivity*. Am J Hosp Pharm, 1985. **42**(10): p. 2220-6.
107. Gunnison, A.F. and E.D. Palmes, *Persistence of plasma S-sulfonates following exposure of rabbits to sulfite and sulfur dioxide*. Toxicol Appl Pharmacol, 1973. **24**(2): p. 266-78.
108. Yu, B.P., *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. Physiol Rev, 1994. **74**(1): p. 139-62.
109. Al-Turk, W.A., et al., *Changes in glutathione, glutathione reductase and glutathione-S-transferase as a function of cell concentration and age*. Pharmacology, 1987. **34**(1): p. 1-8.
110. Ciccone, G., F. Faggiano, and P. Falasca, *[SO<sub>2</sub> air pollution and hospital admissions in Ravenna: a case-control study]*. Epidemiol Prev, 1995. **19**(62): p. 99-104.
111. Goldberg, M.S., et al., *The association between daily mortality and ambient air particle pollution in Montreal, Quebec. 2. Cause-specific mortality*. Environ Res, 2001. **86**(1): p. 26-36.
112. Stone, V., *Environmental air pollution*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(2 Pt 2): p. S44-7.
113. Obtulowicz, K., *Environmental pollutants and allergy diseases*. Przegl Lek, 2001. **58**(4): p. 204-7.
114. Ohtoshi, T., *[Allergy due to air pollutants (SPM, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, etc)]*. Ryoikibetsu Shokogun Shirizu, 2000. **31**: p. 632-5.
115. Kodavanti, U.P., et al., *The combination of elastase and sulfur dioxide exposure causes COPD-like lesions in the rat*. Chest, 2000. **117**(5 Suppl 1): p. 299S-302S.
116. Luo, L., et al., *Endogenous generation of sulfur dioxide in rat tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(1): p. 61-7.

117. Li, L., P. Rose, and P.K. Moore, *Hydrogen sulfide and cell signaling*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2011. **51**: p. 169-87.
118. Pun, P.B., et al., *Gases in the mitochondria*. Mitochondrion, 2010. **10**(2): p. 83-93.
119. Wang, R., *Shared signaling pathways among gasotransmitters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(23): p. 8801-2.
120. Olson, K.R. and J.A. Donald, *Nervous control of circulation--the role of gasotransmitters, NO, CO, and H<sub>2</sub>S*. Acta Histochem, 2009. **111**(3): p. 244-56.
121. Meng, Z., *Oxidative damage of sulfur dioxide on various organs of mice: sulfur dioxide is a systemic oxidative damage agent*. Inhal Toxicol, 2003. **15**(2): p. 181-95.
122. Meng, Z., et al., *Oxidative damage of sulfur dioxide inhalation on lungs and hearts of mice*. Environ Res, 2003. **93**(3): p. 285-92.
123. Meng, Z., et al., *Vasodilator effect of gaseous sulfur dioxide and regulation of its level by Ach in rat vascular tissues*. Inhal Toxicol, 2009. **21**(14): p. 1223-8.
124. Wang, Y.K., et al., *Sulfur dioxide relaxes rat aorta by endothelium-dependent and -independent mechanisms*. Physiol Res, 2009. **58**(4): p. 521-7.
125. Zhao, X., et al., *[Effects of sulfur dioxide, on the proliferation and apoptosis of aorta smooth muscle cells in hypertension: experiments with rats]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2008. **88**(18): p. 1279-83.
126. Tian, Y., et al., *[Effect of sulfur dioxide on pulmonary vascular structure of hypoxic pulmonary hypertensive rats]*. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2008. **46**(9): p. 675-9.
127. Li, W., et al., *Regulatory effects of sulfur dioxide on the development of atherosclerotic lesions and vascular hydrogen sulfide in atherosclerotic rats*. Atherosclerosis, 2011. **215**(2): p. 323-30.
128. Huang, X.L., et al., *[Ameliorative effects of exogenous sulfur dioxide on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats]*. Sheng Li Xue Bao, 2009. **61**(5): p. 499-503.
129. Arts, J.H., E.J. Jacobs, and C.F. Kuper, *Pre-exposure to sulfur dioxide attenuates most allergic reactions upon trimellitic anhydride challenge in sensitized Brown Norway rats*. Inhal Toxicol, 2010. **22**(3): p. 179-91.
130. Gao, X.J., et al., *Mid-ventricular obstructive hypertrophic cardiomyopathy with apical aneurysm and sustained ventricular tachycardia: a case report and literature review*. Chin Med J, 2011. **124**(11): p. 1754-7.
131. Lin, X., et al., *Electromechanical relationship in hypertrophic cardiomyopathy*. J Cardiovasc Transl Res, 2013. **6**(4): p. 604-15.
132. Okayama, S., et al., *Rare concurrence of apical hypertrophic cardiomyopathy and effusive constrictive pericarditis*. Open Cardiovasc Med J, 2011. **5**: p. 99-102.
133. Vidal, M., et al., *beta-Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a Gbetagamma/Erk-dependent pathway*. Cardiovasc Res, 2012. **96**(2): p. 255-64.
134. Bristow, M.R., et al., *Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts*. N Engl J Med, 1982. **307**(4): p. 205-11.
135. Brodde, O.E., *Beta-adrenoceptors in cardiac disease*. Pharmacol Ther, 1993. **60**(3): p. 405-30.
136. Hoffmann, C., et al., *Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004. **369**(2): p. 151-9.
137. Benjamin, I.J., et al., *Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis*. Circ Res, 1989. **65**(3): p. 657-70.

138. Brooks, W.W. and C.H. Conrad, *Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates*. *Comp Med*, 2009. **59**(4): p. 339-43.
139. Campos, E.C., et al., *Isoproterenol induces primary loss of dystrophin in rat hearts: correlation with myocardial injury*. *Int J Exp Pathol*, 2008. **89**(5): p. 367-81.
140. Mitsuyama, S., et al., *Left ventricular mechanical and energetic changes in long-term isoproterenol-induced hypertrophied hearts of SERCA2a transgenic rats*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **59**: p. 95-106.
141. Yue, Y., et al., *Full-length dystrophin expression in half of the heart cells ameliorates beta-isoproterenol-induced cardiomyopathy in mdx mice*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(15): p. 1669-75.
142. Yunge, L., et al., *Perturbation of the sarcolemmal membrane in isoproterenol-induced myocardial injury of the rat. Permeability and freeze-fracture studies in vivo and in vitro*. *Am J Pathol*, 1989. **134**(1): p. 171-85.
143. Hara, H., *Experimental study on the effect of CoQ-10 administration to isoproterenol-induced cardiomyopathy of rats*. *Kurume Med J*, 1981. **28**(2): p. 125-35.
144. Chen, S., et al., *Sulfur dioxide inhibits excessively activated endoplasmic reticulum stress in rats with myocardial injury*. *Heart Vessels*, 2012. **27**(5): p. 505-16.
145. Andersson, D.C., et al., *Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the beta-adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes*. *J Physiol*, 2011. **589**(Pt 7): p. 1791-801.
146. Bovo, E., S.L. Lipsius, and A.V. Zima, *Reactive oxygen species contribute to the development of arrhythmogenic Ca(2)(+) waves during beta-adrenergic receptor stimulation in rabbit cardiomyocytes*. *J Physiol*, 2012. **590**(Pt 14): p. 3291-304.
147. Chen, S., et al., *Sulfur dioxide restores calcium homeostasis disturbance in rat with isoproterenol-induced myocardial injury*. *Histol Histopathol*, 2012. **27**(9): p. 1219-26.
148. Jin, H., et al., *The role of sulfur dioxide in the regulation of mitochondrion-related cardiomyocyte apoptosis in rats with isopropylarterenol-induced myocardial injury*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(5): p. 10465-82.
149. Hamdani, N., et al., *Sarcomeric dysfunction in heart failure*. *Cardiovasc Res*, 2008. **77**(4): p. 649-58.
150. ter Keurs, H.E., *The interaction of Ca<sup>2+</sup> with sarcomeric proteins: role in function and dysfunction of the heart*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **302**(1): p. 21.
151. Toischer, K., et al., *Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **61**: p. 111-22.
152. Fraysse, B., et al., *Increased myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(6): p. 1299-307.
153. Tong, C.W., et al., *Roles of phosphorylation of myosin binding protein-C and troponin I in mouse cardiac muscle twitch dynamics*. *J Physiol*, 2004. **558**(Pt 3): p. 927-41.
154. Schlossarek, S., G. Mearini, and L. Carrier, *Cardiac myosin-binding protein C in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic opportunities*. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. **50**(4): p. 613-20.

155. Carrier, L., *Cardiac myosin-binding protein C in the heart*. Arch Mal Coeur Vaiss, 2007. **100**(3): p. 238-43.
156. Barefield, D. and S. Sadayappan, *Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(5): p. 866-75.
157. Elmas, O., et al., *The prooxidant effect of sodium metabisulfite in rat liver and kidney*. Regul Toxicol Pharmacol, 2005. **42**(1): p. 77-82.

## ÖZGEÇMİŞ

Uğur DALAMAN, 1984 yılında Antalya’da dünyaya geldi. 2002 yılında liseden mezun oldu ve aynı yıl Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim bölümünü kazandı. 2004 yılında bu bölümden ayrılarak, aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2009 yılında bu bölümden mezun oldu. 2011 yılında şu anda görev yaptığı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizcedir.