

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



METEORİN BENZERİ OLARAK BİLİNEREN YENİ BİR
HORMONUN KALP İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINDAKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğçe YAKINBAŞ

2018

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

TIBBİ BİYOLOJİ
Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi

olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ

Dr. Öğr. Üyesi. Deniz ŞEN



ETİK BEYAN

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

Adı Soyadı: Tuğçe YAKINBAŞ

Tarih: 08.08.2018

İmza

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'T' followed by a series of loops and a long horizontal stroke.

Danışman: Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Aanabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

ELAZIG

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel ve akademik tecrübesiyle bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a, tezimin her aşamasındaki yardımlarından dolayı Sayın Araş. Gör. Ahmet TEKTEMUR'a ve tüm bölüm asistan arkadaşlarıma,

Deneysel aşamalarda desteklerini esirgemediklerinden dolayı Tıp Fakültesi Fiziyojji Anabilim Dalı'ndan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emine KAÇAR'a, Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif ONAT'a,

Tezime sağladığı finansmandan dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne,

Ayrıca beni bu günlere getiren, eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim canım aileme,

Son olarak tez çalışmam boyunca sabrını, güvenini, desteğini hiç esirgemeyen biricik eşime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. ÖZET	xvi
2. ABSTRACT	xvi
3. GİRİŞ	1
3.1. Kardiyovasküler Sistem	1
3.1.1. Kalp ve Anatomisi	1
3.1.2. Kalbin Histolojisi	3
3.1.2.1. Endokardiyum	3
3.1.2.2. Miyokardiyum	4
3.1.2.3. Perikardiyum	4
3.2.1. Koroner Arter Hastalığı (KAH)	4
3.2.1.1. Koroner Arter Hastalığının İnsidansı Ve Prevalansı	6
3.2.2. Angina Pektoris (AP)	6
3.2.3. Konjestif Kalp Yetmezliği	6
3.2.4. Aritmi	7
3.2.5. Akut Miyokard İnfarktüsü (AMI)	7
3.2.5.1. Akut Miyokard İnfarktüsünde (AMI) Risk Faktörleri	8
3.2.5.1.1. Sabit Faktörler	9
3.2.5.1.1.1. Yaş	9
3.2.5.1.1.2. Cinsiyet	9
3.2.5.1.1.3. Aile Öyküsü	9
3.2.5.1.2. Değiştirilebilir Major Risk Faktörleri	9

3.2.5.1.2.1. Sigara	9
3.2.5.1.2.2. Hipertansiyon	10
3.2.5.1.2.3. Obezite	10
3.2.5.1.2.4. Diyabet (Diabetes Mellitus)	10
3.2.5.1.2.5. Genetik Faktörler	10
3.3. Akut Miyokard İnfarktüsu'nün Etyopatogenezinde Görev Alan İnflamatuar Süreçler	11
3.3.1.AMI'yı Takiben İnflamatuar Sürecin Başlaması	11
3.3.2. Sitokinler	13
3.3.2.1. Proinflamatuar Sitokinler	14
3.3.3. Kemokinler	16
3.3.4. Lökositler	16
3.3.5. Monositler	17
3.3.6. Lenfositler	17
3.3.7. Plateletler	17
3.4. İnflamasyon Üzerine Egzersizin Etkileri	19
3.5. Egzersizin MI Patogenezindeki Rolü	20
3.5.1. Egzersiz Çeşitleri	21
3.5.1.1. Aerobik (Endurance) Egzersizleri	21
3.5.1.2. Üst Ekstremit ve Omuz Kuşağı Egzersizleri	21
3.5.1.3. Solunum (Ventilatuvar) Kasları Egzersizleri	22
3.6. MI Etyopatogenezinde Mitokondriyal Biyogenez	22
3.7. Mitokondriyal Biogenez ve Egzersiz	27
3.8. Meteorin-Like (METRNL)	30
3.9. Sıçanda AMI Modeli Olarak İskemi/Reperfüzyon Modelleri	32
4. GEREÇ VE YÖNTEM	35
4.1. İnsan Üzerinde Yapılan Çalışmalar	35
4.1.1. Çalışmaya Alınma Kriterleri	35
4.1.4. Kontrol Grubu Seçim Kriterleri	36
4.1.6. İnsanda ELİSA Analizleri	37
4.1.7. ELİSA Testi ile METRNL Seviyesinin Tayini Protokolü	37
4.2. Deney Hayvanları Üzerinde Yapılan Çalışmalar	38
4.2.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler	38
4.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	39

4.2.3. Deney Hayvanları Gruplandırılması	41
4.2.3.1. Kontrol Grubu (K)	41
4.2.3.2. Egzersiz Grubu (E)	41
4.2.3.3. İskemi/Reperfüzyon Grubu (I/R)	41
4.2.3.4. İskemi/reperfüzyon+Egzersiz (IR+E) Grubu	42
4.2.3.5. İskemi-reperfüzyon+METRNL (IR+M) Grubu	42
4.2.3.6. İskemi-reperfüzyon+Egzersiz+METRNL (IR+E+M) Grubu	42
4.2.3.7. Kantitatif Real-Time PCR Analizleri	43
4.2.3.8. RNA Ölçümü	44
4.2.3.10. Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu	45
4.2.4. ELISA Analizleri	47
4.2.4.1. Sıçan CK-MB (Creatine Kinase MB Isoenzyme) ELİSA Kit Protokolü	48
4.2.4.2. METRNL, IL-4 ve ATP ELİSA Kitleri Protokolü	49
4.2.5. Histopatolojik İncelemeler	50
4.2.5.1. Hematoksilen Eozin Boyama	50
4.2.5.2. METRNL İmmünohistokimyasal Boyanması	51
4.2.6. İzole Organ Banyosu Deneyi	52
4.2.8. İstatistiksel Analizler	55
5. SONUÇLAR	56
5.1. MI'lı Hastalarda Serum METRNL Analiz Sonuçları	56
5.2. qRT-PCR Verilerinin Değerlendirilmesi	58
5.2.1. Kalp Dokusunda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi	58
5.2.2. Kas Dokusunda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi	60
5.2.4. Damar Dokuda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi	63
5.3. ELISA Testi Verilerinin Değerlendirilmesi	65
5.3.1. ATP'nin Serum, Kalp, Kas Düzeylerinde Değerlendirilmesi	65
5.3.2. METRNL'nin Serum Düzeylerinde Gruplara Göre Değerlendirilmesi	67
5.3.3. IL-4'ün Serum, Kalp, Kas Düzeylerinde Gruplara Göre Değerlendirilmesi	68
5.3.4. CK-MB'nin Serumda Gruplara Göre Değerlendirilmesi	70
5.4. Histolojik Bulgular	71
5.4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular	73
5.5. Elektrokardiyografi (EKG) Bulguları	78
5.6. İzole Organ Banyosu Deneyi Sonuçları	82

5.6.1. SNP Gevşeme Protokolü Sonuçları	82
5.6.2. ACH Gevşeme Protokolü Sonuçları	82
5.6.3. FNP Kasılma Protokolü Sonuçları	83
6.TARTIŞMA	84
7. ÖNERİLER	103
8.KAYNAKLAR	104



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Mitokondriyal Biyogenezde Görevli Genler	23
Tablo 2: Haftalara Göre Treadmill Egzersiz Uygulamaları	42
Tablo 3. cDNA karışım miktarı (20µl'lik reaksiyon) (The High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit, Applied Biosystems, Katalog No: 4387406).	45
Tablo 4. cDNA sentezi PCR programı	45
Tablo 5. qRT-PCR'da Kullanılan Primerler (Qiagen, Almanya).	45
Tablo 6. RT-PCR İçin Kullanılan Bileşikler	46
Tablo 7. RT-PCR Programı	47
Tablo 9. Krebs Solusyonu İçeriği mM/L	52
Tablo 10. Hasta ve Kontrol Grubunda Serum METRNL Konsantrasyonlarının Cinsiyetlere Göre Dağılımı	56
Tablo 11. Hastaların Demografik, Klinik ve Biyokimyasal Karakteristikleri	57
Tablo 12. Hasta Grubu İçinde Biyokimyasal ve Demografik Verilerle Serum METRNL Düzeyleri Arasındaki İlişki	58
Tablo 13. Kalp Dokusunda Analiz Edilen Genlerin mRNA Kat Değişimleri.	58
Tablo 14. Kas Dokusunda Analiz Edilen Genlerin mRNA Kat Değişimleri.	60
Tablo 15. BY Dokusunda Analiz Edilen Genlerin mRNA Kat Değişimleri.	62
Tablo 16. Damar Dokusunda Analiz Edilen Genlerin mRNA Kat Değişimleri	64
Tablo 17. Kalp Dokuda METRNL Histoskorları.	73
Tablo 18. Kas Dokuda METRNL Histoskorları.	75
Tablo 19. Yağ Dokuda METRNL Histoskorları.	76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Sol Ventrikül (karıncık), Sağ Ventrikül (sağ karıncık) ve Sağ Atriumun (sağ kulakçık) Ön Kısımları Çıkarıldıktan Sonra Kalbin Ön Taraftan Görünümü.	2
Şekil 2. Kalbin Ön Taraftan Görünümü.	2
Şekil 3. Kalbin Dış Yüzü (3).	3
Şekil 4. Kalbin Yapısı (3).	3
Şekil 5. Damarda Aterosklerotik Plakların Yarattığı Darlıklar (6).	5
Şekil 6. Angina Pektoris ve Miyokard İnfarktüsü (18).	8
Şekil 7. MI Sonrası İnflamatuvar Cevap (58).	18
Şekil 8. Mitokondriyal Biyogenezin Şematik Gösterimi (68).	26
Şekil 9. Egzersizi İndükleyen PGC-1 α Ekspresyonunu ve Aktivitesini Düzenleyen Sinyal Yolaklarının Yanı Sıra Sonraki PGC-1 α İle İndüklenen Mitokondriyal Biyogenezin Basitleştirilmiş Genel Görünüşü (80).	29
Şekil 10. İskemi/reperfüzyon basamakları (97).	34
Şekil 11. İzole Organ Banyosu Deney Düzenegi.	53
Şekil 12. Kalp Dokuda qRT-PCR İle Analiz Edilen Genlerin Clustergram Haritalaması.	59
Şekil 13. Kas Dokuda qRT-PCR İle Analiz Edilen Genlerin Clustergram Haritalaması.	61
Şekil 14. BY Dokuda qRT-PCR İle Analiz Edilen Genlerin Clustergram Haritalaması.	63
Şekil 15. Damar Dokuda qRT-PCR İle Analiz Edilen Genlerin Clustergram Haritalaması.	64
Şekil 16. ATP ELİSA Serum, Kalp, Kas Düzeyleri.	66
Şekil 17. METRNL ELİSA Serum Düzeyleri.	68
Şekil 18. IL-4 ELİSA Serum, Kalp, Kas Düzeyleri.	69
Şekil 20. Kalp Dokularının Hematoksilen Eozin İle Boyanması.	72
Şekil 21. Kalp Dokuda METRNL İmmünohistokimyasal Boyanması.	74

Şekil 22. Kas Dokuda METRNL immünohistokimyasal Boyanması.	75
Şekil 23. Yağ Dokuda METRNL İmmünohistokimyasal Boyanması.	77
Şekil 24. QT İntervali Elektrokardiyografi Grafiği.	78
Şekil 25. ST İntervali Elektrokardiyografi Grafiği.	79
Şekil 26. PR İntervali Elektrokardiyografi Grafiği.	81
Şekil 27. SNP Gevşeme Grafiği.	82
Şekil 28. ACH Gevşeme Grafiği.	82
Şekil 29. FNP Kasılma Grafiği.	83



KISALTMALAR LİSTESİ

MI	: Miyokart İnfarktüsü
AMI	: Akut Miyokart İnfarktüsü
KR	: Kalp Rahatsızlığı
BKİ	: Beden kitle indeksi
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
IL	: İnterlökin
DAMP	: Damaged Associated Molecular Patters (Hasarla İlişkili Moleküler Matriks)
TLR	: Toll-Like Receptor
MIF	: Migrasyon İnhibe Edici Faktör
PG	: Proteoglikanlar
METRNL	: Meteorin-Like (Meteorin-benzeri)
IR	: İskemi-Reperfüzyon
E	: Egzersiz
BY	: Beyaz Yağ
MB	: Mitokondriyal Biyogenez
MtDNA	: Mitokondriyal DNA

ROS	: Reaktif Oksijen Türü
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
AP	: Angina Pektoris
qRT-PCR	: Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction (Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
ATP	: Adenozin tri fosfat
mRNA	: Mesajcı RNA
tRNA	: Transfer RNA
rRNA	: Ribozomal RNA
TFAM	: Mitokondriyal Transkripsiyon Faktörü A
NRF-1	: Nükleer Respiration Factor (Nükleer Solunum Faktörü)
PGC-1α	: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator 1-Alpha (Peroksizom Proliferatör İle Aktive Edilen Reseptör- Γ Ortak Aktifleştirici-1 α)
p38MAPK	: p38 mitogen-activated protein kinases (p38 Mitojen İle Aktive Olan Kinaz)
ERRα	: Estrogen Related Receptor-A (Östrojen İle İlişkili Reseptör-A)
EKG	: Elektrokardiyografi
PTCA	: Percutaneous transluminal coronary angioplasty (Perkütan Translüminal Koroner Anjiyoplasti)

1. ÖZET

Miyokart infarktüsü (MI), yüksek mortalite ve morbidite oranına sahip bir kalp rahatsızlığıdır (KR). Egzersizin MI üzerinde koruyucu etkileri olduğu bilinmesine rağmen bu süreçte görev yapan aracı moleküller tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda kalp ve kas dokuda sentezlendiği bilinen METRNL'nin kalp iskemi hasarındaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

İnsan kontrol ve MI serum örneklerinde (n=200) METRNL düzeyi ELİSA analizi kullanılarak değerlendirildi. Wistar albino sıçanlar; kontrol, I/R, egzersiz (E), I/R+E, I/R+M ve I/R+E+M olmak üzere her grupta 6 sıçan olacak şekilde 6 gruba ayrıldı (n=6). Egzersiz için 6 hafta treadmill koşu uygulaması yapıldı. Sıçan in vivo iskemi/reperfüzyon modeli oluşturuldu. Kalp, kas, beyaz yağ (BY) doku ve damar dokusunda mitokondriyal biyogenez (MB) ile ilişkili genlerin ifadenme düzeyleri qRT-PCR ile yapıldı. Kalp, kas ve serum örneklerinde METRNL, IL-4, CK-MB ve ATP düzeyleri ELİSA ile değerlendirildi. METRNL'nin damar kasılmaları üzerine etkisinin belirlenmesi için izole organ banyosu uygulandı.

Kontrol ile karşılaştırıldığında insan serum METRNL düzeylerinin MI hastalarında değişmediği tespit edildi. Kontrol grubuna göre, I/R grubunda kalp METRNL ifadesinin anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. Kalp METRNL düzeylerinin egzersiz yapan tüm gruplarda normaleştiği belirlendi. Kontrole göre diğer gruplarda, kalp ve kas dokularında MB ile ilişkili gen ifadelerinin anlamlı olarak değişim gösterdiği saptandı. METRNL verilen gruplarda TFAM düzeylerinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. İzole organ banyosu deneyinde

METRNL'nin 12,5 µg/ml dozunda vasküler kontraksiyonları önemli ölçüde arttırdığı bulundu.

Mevcut çalışmanın, egzersizin I/R'deki koruyucu özelliğinin MB ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. METRNL'in I/R hasarında azaldığı ve egzersizin bu azalmayı normalleştirdiği bulundu. METRNL'in sıçan kalp I/R modelinde TFAM seviyelerini artırarak, EKG bulguları iyileştirerek ve vasküler kontraksiyonları artırarak koruyucu özelliklere sahip olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Miyokard İnfarktüsü, Egzersiz, İskemi-Reperfüzyon, Mitokondriyal Biyogenez, Meteorin-benzeri

2. ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE ROLE IN THE HEART ISCHEMIA AND REPERFUSION INJURY OF A NEW HORMONE KNOWN AS METEORIN-LIKE

Myocardial infarction (MI) is a heart disease with a high mortality and morbidity rate. Although it is known that exercise has protective effects on MI, the mediating molecules acting in this process are not known precisely. In our study, it is aimed to investigate the role of METRNL, which is known to be synthesized in heart and muscle tissue, in cardiac ischemic injury.

METRNL levels in human control (n=200) and MI serum samples (n = 200) were assessed using ELISA assay. Wistar albino rats were divided into six groups as control, I/R, exercise (E), I/R + E, I/R + M and I/R+ E+M as six animals in each group. A 6-week treadmill running exercise was performed for the exercise groups. Expression levels of METRNL and MB related genes in heart and muscle tissues were evaluated by qRT-PCR. METRNL, IL-4, CK-MB and ATP ELISA levels in heart, muscle and serum samples were performed using ELISA. The effect of METRNL on vascular contractions was determined by an isolated organ bath experiment.

Human serum METRNL levels did not change in MI patients compared to the control. According to the control group, heart METRNL expression decreased significantly in the I/R group. Heart METRNL levels were normalized in all exercise groups. In the other groups according to the control, MB-related gene expressions in heart and muscle tissues were found to show significant changes. TFAM levels were significantly increased in the METRNL-treated groups. In the

isolated organ bath experiment, METRNL significantly increased the vascular contractions at 12.5 µg / ml dose.

In the present study, it was observed that the protective feature of exercise in I/R was associated with MB. It was found that METRNL decreased in I/R damage and that the exercise normalized this decrease. METRNL is thought to have protective properties by increasing TFAM levels, improving ECG findings and increasing vascular contractions in the rat cardiac I /R model,

Keywords: Myocardial Infarction, Exercise, Ischemia-Reperfusion, Mitochondrial Biogenesis, Meteorin-like

3. GİRİŞ

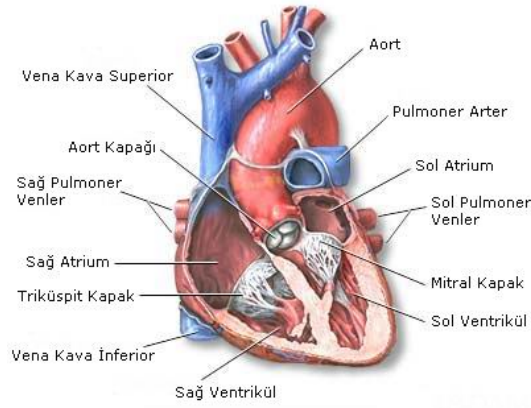
3.1. Kardiyovasküler Sistem

Kalp, atardamar, toplardamar ve kılcal damarlardan oluşan kardiyovasküler sistemin temel görevi dokuların ihtiyacı olan maddeleri (oksijeni) ilgili dokulara ulaştırmak ve oluşan atık maddeleri (karbondioksit) ise ilgili dokudan uzaklaştırmaktır. Böylelikle kanın vücut içindeki dolaşımını sağlamaktadır (1).

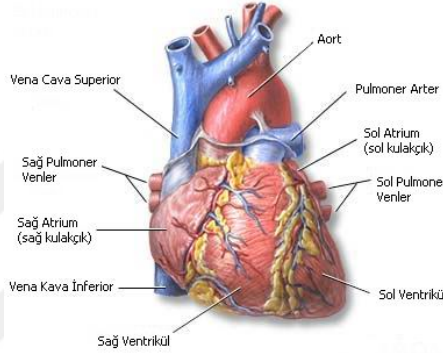
3.1.1. Kalp ve Anatomisi

Kalp, kanı ritmik hareketlerle pompalayarak kanın damarlar vasıtasıyla hücrelere ulaşmasını sağlamaktadır. Vücudun ihtiyacına bağlı olarak kalp, dakikada 5-35 litre arasında kan pompalamaktadır. Yetişkin ağırlığı bir kadında ortalama 200-280 gram yetişkin bir erkekte ise 250-390 gram arasındadır. Çizgili kastan yapılı içi boş hayati öneme sahip bir organ olan kalp diğer çizgili kaslardan farklı olarak istemsiz çalışmaktadır. Anatomik olarak kalp göğüs boşluğunda iki akciğer arasında göğsümüzün tam ortasından geçen kemiğin arkasında diyafram kasının üzerinde dördüncü, beşinci ve altıncı kaburgaların arka yüzeyinde üçte ikisi orta çizginin solunda üçte biri sağında yer alacak şekilde yerleşmiştir.

Kalp anatomisinin iç yapısı dört odacıktan oluşmaktadır. Bunlar; sağ kulakçık, sol kulakçık, sağ karıncık ve sol karıncıktır. Kalbin sağ ve sol yanı bir duvar aracılığı ile ayrılır (2). Sağdaki kulakçık ve karıncığı triküspit kapak; soldaki kulakçık ve karıncığı ise mitral kapak ayırır (3). Sağ kulakçık ve sağ karıncık beraber sağ kalbi, sol kulakçık ve sol karıncık ise sol kalbi oluşturmaktadır. Sol kalpte oksijence zengin temiz kan bulunmaktadır (Şekil 1 ve 2).



Şekil 1. Sol Ventrikül (karıncık), Sağ Ventrikül (sağ karıncık) ve Sağ Atriumun (sağ kulakçık) Ön Kısımları Çıkarıldıktan Sonra Kalbin Ön Taraftan Görünümü.

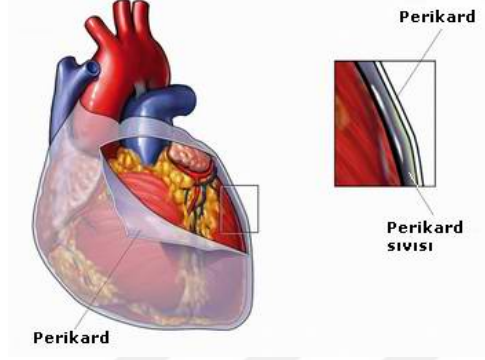


Şekil 2. Kalbin Ön Taraftan Görünümü.

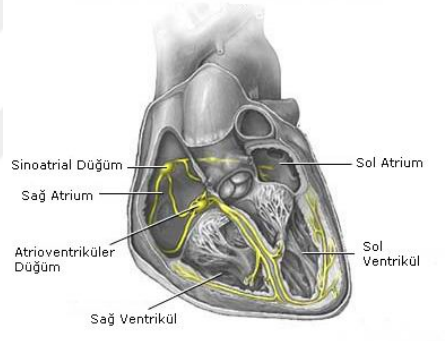
Bir kalp atımı, kalbin sağ kulakçığının üst taraflarında bulunan ve sinoatrial (veya sinüs) düğüm adı verilen özelleşmiş bir hücre demetinden oluşan bölgenin elektriksel bir uyarı çıkarması ile başlamaktadır. Bu bölge kalbin doğal pili olarak bilinmektedir (Şekil 3).

İnsanda en büyük atardamar olan aort kalbin sağ sistemine tüm vücuttan gelen kanı toplayan damarlara (vena cava inferior ve vena cava superior) açılmaktadır. Bu kan akciğer atardamarı (Pulmoner arter) ile sağ sistemden ayrılarak, akciğerlerden akciğer toplar damarları (pulmoner venler) ile dönen kan, sol kulakçık ve sol karıncığı dolaşarak aort damarları ile tüm vücuda pompalanmaktadır.

Kalbin dış yüzeyi perikard denilen bir zar tarafından kaplanmıştır. Bu zar ile kalp arasında, kalbin çalışırken rahat hareket edebilmesi için çok az miktarda kayganlaştırıcı sıvı bulunmaktadır (Şekil 4) (3).



Şekil 3. Kalbin Dış Yüzü (3).



Şekil 4. Kalbin Yapısı (3).

3.1.2. Kalbin Histolojisi

Kalp histolojik olarak içten dışa doğru endokardiyum, miyokardiyum ve perikardiyum olarak üç tabakaya ayrılır.

3.1.2.1. Endokardiyum

Atrium ve ventriküllerin içini döşeyen ince bir membrandan oluşmaktadır. Endokard atriumlarda (özellikle sol atrium) kalın, ventriküllerde ise incedir. Endokard; endotel, subendotel ve subendokard olmak üzere üç hücre tabakasından

oluşmaktadır. Endotel tabaka tek katlı yassı hücrelerden oluşmaktadır. Endotel ve subendotelde kan damarı bulunmaz. Subendokard içinde purkinje demetleri, sinirler ve kan damarları bulunur (4). Sinir hücreleri tarafından taşınan elektriksel uyarıyı iletmek için özelleşmişlerdir.

3.1.2.2. Miyokardiyum

Çizgili kas dokusundan oluşan bu tabakadaki hücreler iki gruba ayrılır. Bunlar; kontraktıl hücreler ve impuls üreten ve ileten hücrelerdir. Myokard kalınlığı atriumda en ince ventrikülde ise en kalındır. Elastik fibriller atriumdaki kas fibrilleri arasında bol miktarda bulunurken ventriküllerdeki kas fibrilleri arasında az miktarda bulunmaktadır (4). Özel yapılı çizgili kas dokusundan oluştuğu için myokardiyum asıl kalbin kasılmasından sorumlu kısımdır.

3.1.2.3. Perikardiyum

Kalbi dıştan sarar ve bağ dokudan oluşur. Epikard perikardın visseral yaprağıdır ve seröz bir membrana sahip olan perikardın dış kısmı tek sıra epitelle döşenmiştir. Subepikardiyum kan damarları ve sinirleri içeren bağ dokusu tabakasıdan oluşmaktadır. Perikardın pariyetal yaprağı da visseral (epikardiyum) yaprağı gibi seröz bir membrandır (4).

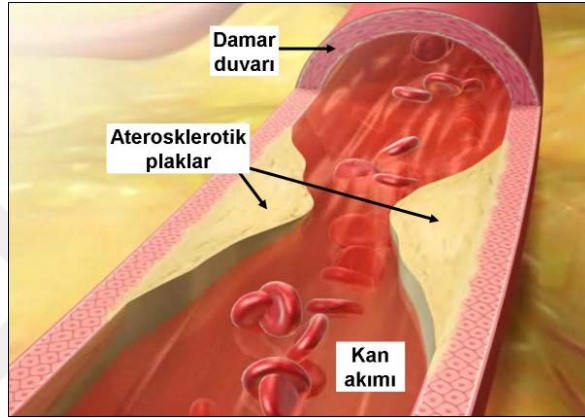
3.2. Kardiyovasküler Hastalıklar (Kalp-Damar Hastalıkları)

Kardiyovasküler hastalıklar içerisinde koroner arter hastalığı, angina pectoris, aritmi ve akut miyokard infarktüsü yer almaktadır.

3.2.1. Koroner Arter Hastalığı (KAH)

Kalbi besleyen atardamarlar koroner arterler olarak adlandırılmaktadır. Koroner arterler, kalpten çıkan aort damarının ilk dallarıdır (5).

Koroner Arter Hastalığı (KAH) kalbi besleyen koroner arterlerin kalbin ihtiyacı olan yeterli kanı taşıyamaması koroner arterlerin daralması veya tıkanması ile kan akımının kısmi yada tam kesilmesine bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklara verilen isimdir. Bu hastalığın en önemli özelliği ileri evrelerde hayatı tehdit edebilen kalp krizine yol açabilmesidir. Ana nedeni halk arasında damar sertliği olarak bilinen aterosklerozdur (5).



Şekil 5. Damarda Aterosklerotik Plakların Yaratdığı Darlıklar (6).

Aterosikleroz damarların içinde yağ içeren tabakaların (plaklar) oluşumu, damarın daralması ve sertleşmesi ile karakterize bir durumdur. Patologlar tarafından yapılmış olan morfolojik incelemeler doğrultusunda üç tip aterosklerotik plak tarif edilmiştir.

Aterosklerozda büyük ve orta boy arter koroner tıkanıklıklarının açılması için yaygın olarak kullanılan cerrahi olmayan tedavilerden birisi Perkütan Translüminal Koroner Anjiyoplasti (PTCA) 'dir. PTCA, bloke koroner arterleri açmak için minimal invaziv bir işlemdir ve kanın kalp kasılmasını engellenmeden dolaşımına izin verir (7).

3.2.1.1. Koroner Arter Hastalığının İnsidansı Ve Prevalansı

Koroner arter hastalığı (KAH), dünya çapında kardiyovasküler mortaliteye ve gelişmekte olan ülkelerde 4,5 milyonun üzerinde insanın ölümüne neden olmaktadır (8, 9). Ülkemizde koroner kalp hastalığının prevalansı hakkındaki bilgiler TEKHARF çalışmasının 1990 kesit taramasında, insidansı da 1998 yılına kadar geçen zamanda araştırılmıştır. 1990 yılındaki taramada sağlanan veriler ülkemizde 1.050.000 koroner kalp hastasının bulunduğunu ortaya koymaktadır (10).

3.2.2. Angina Pektoris (AP)

Koroner kalp akımının zaman zaman yetersiz bir duruma düşmesi yüzünden retrosternal bölgede yerleşen ve yeri, karakteri, hareketle olan ilgisi ve süresi bakımından farklı özellikler gösteren ağrılı ve ağır prognozlu bir klinik hastalıktır. Angina, boğulma sıkışma anlamlarına gelir. Angina pectoris (AP)'in en önemi bulgusu ağrıdır. Bu ağrı sternal bölgenin ortasında ve yukarısında yer alır. Kolun ve göğsün soluna ve çene altına doğru ağrının yayılması görülmektedir. AP'de göğüs ağrısı kısa süreli olmakla birlikte 5-10 dk yı geçmemektedir. Eforla ortaya çıkan AP ağrısı eforun cinsi ya da süresi hastadan hastaya ve zamanına göre değişkenlik göstermektedir. Bir yere yetişme çabası, aniden soğuk havaya çıkmak, rüzgara karşı yokuşa tırmanmak ve bolca yemek yemek en sık rastlanan nedenlerindendir. Efordan sonra en önemli etken heyecandır (11).

3.2.3. Konjestif Kalp Yetmezliği

Kalp vücuttaki kan akımını sağlamakla görevlidir. İstirahat halide dahil her an kan akımının devam etmesi gerekmektedir. Kalp debisinin dokuların ihtiyacını

karşılayamaması kalp yetmezliği olarak bilinmektedir. Konjestif kalp yetmezliği, farklı nedenlere bağlı olarak gelişebilmektedir. Her yaşta görülmekle birlikte daha çok yaşlılarda rastlanmaktadır. Her iki cinsiyette de aynı sıklıkta görülmektedir. Konjestif kalp yetmezliğinin en sık nedeni koroner arter hastalığı ve akut miyokard infarktüsüdür. Vücudun tüm organlarını ilgilendiren bir durumdur (11).

3.2.4. Aritmi

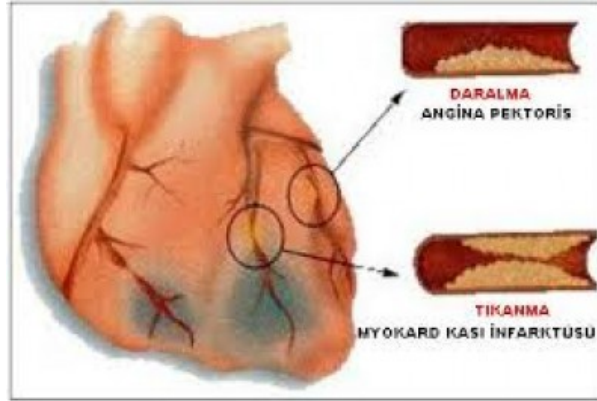
Kalbin ritmik çalışmasının bozulması sonucu meydana gelen bir hastalıktır. Doğuştan gelen bozukluklara bağlı olarak gelişebileceği gibi sonradan da oluşabilmektedir. Doğuştan gelen aritmilerin çoğunluğunda bir kulakçık ve karıncıktan başka normal iletim sistemine ek olarak başka bir iletim yolunun bulunması sonucunda meydana gelmektedir (11, 12).

3.2.5. Akut Miyokard Infarktüsü (AMI)

Kalbi besleyen koroner atardamarlardan birinin ya da birden fazlasının pıhtıyla tıkanması sonucunda kalp kasının (miyokart) bir bölümünün beslenemeyerek ölmesi olayı iskemi olarak bilinir ve genellikle iskemi oluşumundan hemen sonra AMI gelişir (13). Koroner damarlardan başka diğer damarlardanda kopan plak parçaları pıhtı oluşturarak damarları tıkayabilir (14).

İskemi sırasında miyokardın oksijen ihtiyacının artması ve bu ihtiyacın karşılanamaması ile doku beslenmesi bozulmakta ve miyositlerde geri dönüşümsüz hasar meydana gelmektedir (15,16).

Miyokart infarktüsü hayat boyunca ilerleyici olarak artmaktadır. 45 ve 54 yaşlar arasında, erkeklerde, kadınlara oranla MI gelişme olasılığı 4-5 kat daha fazladır. İskemik kalp hastalığı riski 80 yaşından sonra her iki cinsde eşit olarak görülmektedir (17).



Şekil 6. Angina Pectoris ve Miyokard İnfarktüsü (18).

3.2.5.1. Akut Miyokard İnfarktüsünde (AMI) Risk Faktörleri

Türk Erişkinlerinde Koroner Arter Hastalığı Risk Faktörleri (TEKHARF) çalışması verilerine göre ülke genelinde tüm nedenlere bağlı ölümlerin %42'si KKH (koroner kalp hastalığı)'na bağlıdır. 2010 yılı itibariyle yaklaşık olarak 3.5 milyon koroner arter hastası bulunmaktadır. Ülkemizde her yıl yaklaşık 65 bin kişi koroner arter hastalığına bağlı ani ölümlerden kaybedilmektedir. İlk kez 1977 yılında Gruentzig ve arkadaşları tarafından koroner arter hastalığının tedavisinde balon anjioplasti yöntemi kullanılmıştır. 1986 yılında yılında Puel ve arkadaşları girişimsel koroner arter hastalığı arter hastalığı tedavisinde en önemli ikinci buluş olan intrakoroner stent implantasyonunu gerçekleştirmişlerdir (19, 20).

AMI nedenleri arasında birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar sabit (değiştirilemeyen) faktörler ve majör değiştirilebilen risk faktörleri olmak üzere iki başlıkta toplanmıştır.

3.2.5.1.1. Sabit Faktörler

3.2.5.1.1.1. Yaş

Akut miyokard infarktüsünün insidansının güçlü bir şekilde yaşa bağımlı olduğu bilinmektedir. Yaşın erkeklerde 45 ve üzeri, kadınlarda ise 55 ve üzeri veya erken menapoz olması koroner kalp hastalığı için risk oluşturmaktadır (21).

3.2.5.1.1.2. Cinsiyet

Hastalığın erkeklerde kadınlara göre 10–15 yıl daha erken başladığı görülmüştür (21). Cinsiyetin koroner arter hastalığı riski üzerindeki çarpıcı etkisinin kolesterole bağımlı olduğu bildirilmiştir (22).

3.2.5.1.1.3. Aile Öyküsü

Birinci derece akrabalarda koroner arter hastalığı yüksek risk oluşturmaktadır. Özellikle genç yaşlarda başlayan koroner arter hastalığı olan bireylerin birinci derece akrabalarında risk fazladır. Aile öyküsü olan kişilerde daha erken dönemde risk araştırması yapılması gerekmektedir (23).

3.2.5.1.2. Değiştirilebilir Major Risk Faktörleri

3.2.5.1.2.1. Sigara

Sigara en büyük risk faktörlerden biridir. Sigara içme patogenetik olarak kolesterole bağlı bir risk faktörüdür ve diğer risk faktörleriyle sinerjistik yönde etki ederek AMI riskini arttırmaktadır. Ülkemizde de sigara alışkanlığı oldukça yaygındır ve birçok hastalıkta tetikleyici etkendir (24). Türkiye, Avrupa ülkeleri arasında sigara tüketiminde üçüncü, dünya ülkeleri arasında ise yedinci sıradadır (25).

3.2.5.1.2.2. Hipertansiyon

Erişkinde sistolik kan basıncının 140 mmHg ve üzeri olması, diyastolik basıncın 90 mmHg ve üzeri olması hipertansiyon olarak kabul edilmektedir. Koroner kalp hastalığı hipertansiflerde normotansiflere göre 2-3 kat daha fazladır (26). Hipertansiyon kadın ve erkeklerde AMI riskini 2-3 kat arttırmaktadır (27).

3.2.5.1.2.3. Obezite

Obezite toplumumuzda sıklığı giderek artan bir risk faktörüdür. Beden kitle indeksi (BKİ) ölçütüyle Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan sınıflamada 18.8-24.9 normal, 25-29.9 kilo fazlalığı, >30 obezite, >40 ileri derecede obezite olarak tanımlanmaktadır. BKİ'deki bir birimlik artış koroner kalp hastalığının mortalitesinde %4-5 artışa neden olmaktadır (28, 29).

3.2.5.1.2.4. Diyabet (Diabetes Mellitus)

Diyabet, pankreasın yeterli insulin üretememesi veya vücudun ürettiği insülini etkili bir şekilde kullanamaması sonucu oluşan hayat boyunca devam eden kronik bir hastalıktır. Yapılan istatistiklere göre diyabetli hastalarda AMI'a bağlı ölüm oranı diyabetli olmayanlara göre fazladır (30).

3.2.5.1.2.5. Genetik Faktörler

Koroner kalp hastalıklarında MI'da dahil olmak üzere genetik risk faktörleri etkilidir. Yapılan çalışmalarda elde edilen verilere göre Tümör Nekroz Faktör (Tumor Necrosis Factor; TNF), Transforming Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor; TGF), İnterlökin-1 (İnterleukin-1; IL-1), farklılaşma kümesi-14 (cell differentiation; CD14) ve adezyon proteinlerinin gen polimorfizmleri ile MI arasında ilişki bulunmaktadır (30).

MI'da ki en güçlü genetik etkilerden biri 9p21.3 kromozom kısmıdır. Kromozomun ilgili bölgesi protein kodlayan gen içermemesine karşın birçok çalışmada etkisi olduğu doğrulanmıştır (31).

3.3. Akut Miyokard İnfarktüsü'nün Etyopatogenezinde Görev Alan İnflamatuar Süreçler

Akut miyokard infarktüsü, akut bir inflamatuvar cevap başlatır. Bu cevap kalbn tamir edilmesi için gereklidir. Bununla beraber, artmış bir inflamatuvar cevap kötü sol ventriküler iyileşme ve kalp yetmezliğine neden olmaktadır. Miyokardiyumdaki lokal inflamasyona ilaveten artmış sistemik inflamatuvar cevabın varlığı, AMI'li hastalarda rapor edilmiştir. Artmış sistemik inflamasyon dolaşımdaki artmış inflamatuvar sitokinler, kemokinler, hücre adezyon molekülleri, çeşitli immün hücrelerin ve kompleman sistemin aktivasyonu ile karakterizedir. Sistemik inflamatuvar cevapta görevli moleküller tekrarlayıcı kalp krizi, AMI'li hastalarda kalp yetmezliği ve ölüm gibi kötü klinik seyirlerin göstergesidir. İnflamasyon birçok kardiyovasküler hastalığın gelişiminde ve komplikasyonlarında merkezi bir role sahiptir. C-Reaktif Protein (CRP) ve Serum Amiloid A (SAA) kardiyovasküler hastalıkların tanımlanmasında kullanılabilen klinik parametrelerdendir (32, 33).

3.3.1.AMI'yı Takiben İnflamatuar Sürecin Başlaması

Akut miyokardiyal nekroz ve hasarla ilişkili moleküler matriks (damaged associated molecular patterns; DAMP) olarak bilinen endojen alarm sinyalleri salınır. DAMP'lar kompleman kaskadını aktive eder ve TLR\IL-1 sinyallerini uyarırlar. Bu uyarımlar sonucu nükleer faktör kappa hafif zindir artırıcı aktif B

hücreleri (nüklear factor kappa light chain enhancer of activated B cell; NF-kB)'nin aktivasyonu ve sitokin, kemokin, adezyon molekülleri sentezi uyarılır. Damarın endotel hücreleri üzerinde bulunan kemokinler ve hücre adezyon molekülleri ile lökositler üzerinde bulunan reseptörleri arasında meydana gelen etkileşimle nötrofil ve mononükleer hücrelerin infarktlı myocardial bölgede damarın dışına çıkması ve birikimi gerçekleşir. AMI'yı takip eden inflamatuvar cevap yarayı temizlemek, iyileştirmek ve skor oluşumunu kolaylaştırmakta görevlidir. Ama aşırı inflamatuvar cevap kalp yetersizliğine neden olur.

TLR (Toll -Like Receptor)'ler doğuştan gelen bağışıklık sistemi de tanıma reseptörleri olarak görev yaparlar (34). TLR ailesinden olan TLR4 (Toll-Like Receptor 4), infarktüsli kalpteki inflamatuvar yanıtı aracılık etmekte anahtar bir reseptör olarak rol almaktadır. İnfarktüsli miyokarttaki sinyaller toll benzeri reseptör sinyalini etkinleştirirken, kompleman aktivasyonu ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi sitokin ve kemokinin yukarı yönlü olarak düzenlenmesini başlatır. TLR4, gram-negatif patojenlere ait lipopolisakkarit'e doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinde bir sinyal reseptörüdür (35, 36). Aynı zamanda non-infeksiyon doku yaralanmasına cevapta DAMP's leride tanımakta ve bir stres faktörü olarak rol oynamaktadır. TLR 4 delesyonunun aynı zamanda TNF- α , IL-1 β ve IL-6 serum düzeylerinde belirgin bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (37). Bu nedenle, TLR4, AMI'de lokal ve sistemik inflamatuvar cevaba aracılık eden önemli bir moleküldür.

AMI'de doku hasarıyla tetiklenen inflamatuvar cevapda inflamasonlar aracılık etmektedir. İnflamasonlar, kaspaz-1'i aktifleştirmek ve IL-1 β 'yı serbest bırakmak için moleküler platformlar olarak görev yapan birden fazla sitoplazmik

protein kompleksleridir (38, 39). IL-1 β , inflamasyonun bir anahtarı olarak, MI'da inflamatuvar yanıt için erken ve belirgin bir aracıdır (40). TNF, MI sonrası serbest bırakılır ve infarktüs hasarını teşvik edebilir ve infarktüslü miyokarda kemokin ve yapışma molekülü sentezini uyarabilir (41, 42). TNF, oldukça pleiotropik bir arabulucu olarak, kardiyomiyositleri apoptozdan da koruyabilmektedir (43). TNF reseptörleri 1 ve 2 aracılığıyla oluşan etkiler infarktüslü kalbin yeniden şekillenmesini düzenleyebilmektedir (44).

3.3.2. Sitokinler

Sitokinlerin aktiviteleri ilk kez 1926' da Zinsser ve Tamiya tarafından tanımlanmış ve bunların lökositlerden salgılanan çözünebilir ürünler oldukları, damar duvarı fonksiyonlarını etkiledikleri bildirilmiştir (45). Son 20 yılda yapılan çalışmalarda sitokinlerin monosit, makrofaj ve lenfositleri de içeren immün sistem hücreleri dışında fibroblastlar, dendritik hücreler, parietal hücreler, osteoblastlar, düz kas hücreleri, hepatositler, çizgili kas ve sinir hücresi fonksiyonlarında da önemli düzenleyici görevler üstlendiği ortaya konmuştur (46). Peptit ve glikoprotein yapıda olan sitokinler; inflamasyon, hücre büyümesi, hücre iyileşmesi ve yaralanmaya karşı sistemik yanıtı da içine alan bağışıklık ve inflamatuvar olayları düzenleyen kimyasal ileti molekülleridir (47).

Sitokinlerin, günümüzde çeşitli bozuklukların tedavisinde klinik kullanımları bulunmaktadır (48).

Sitokinlerden lenfosit kökenli olanlara **lenfokinler**, monosit ve makrofaj kökenli olanlara **monokinler** ve lökosit kökenli olanlara **interlökinler** denir (49). Sitokinler ayrıca inflamasyondaki rollerine göre proinflamatuvar sitokinler ve antiinflamatuvar sitokinler olmak üzere ikiye ayrılır. Sitokinlerin sentez ve

fonksiyonunu artıran sitokinlere proinflamatuvar, azaltanlara ise antiinflamatuvar sitokinler denir.

3.3.2.1. Proinflamatuvar Sitokinler

Kemokinler ve adezyon moleküllerini uyarır ve doğal ve adaptif bağışıklık sistemini harekete geçirirler (50). Genel olarak interlökin (IL) IL-4, IL-6, IL-9, IL-17 ve tümör nekroz faktörü- α 'nın (TNF- α) proinflamatuvar sitokinler olduğu kabul edilir.

Son yıllarda egzersizde, iskelet kasının interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-10 (IL-10) gibi, miyokin adı da verilen bazı sitokinleri ürettiği saptanmıştır. (IL-6), özellikle yanık, travma ve diğer doku yaralanmalarında inflamasyon yanıtını uyaran, makrofaj ve T hücreleri tarafından salgılanan bir proinflamatuvar sitokindir (51). IL-4, AMİ'ü tedavi etmek için potansiyel bir biyolojik maddedir. Etkilerini Tip 1 ve Tip 2 TNF- α reseptörleri aracılığıyla gösteren 26 kDa ağırlığında bir transmembran proteindir. TNF α , tüm akut faz reaksiyonlarını uyaran, sitokinler grubunun bir üyesi ve sistemik inflamasyonla ilişkili bir sitokindir. TNF- α adipoz doku tarafından üretilen ve salgılanan bir proinflamatuvar sitokindir. Aynı zamanda enfeksiyonda, inflamasyon yanıtının başlaması içinde önemlidir (52).

İnterlökin-23 (IL-23), inflamatuvar yanıtları ve oksidatif stres reaksiyonu artırarak miyokardiyal iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarını desteklemektedir. Reperfüzyon tedavisi, perkütan koroner girişim (PCI) tedavisi olarak, miyokard enfarktüsü için en etkili yöntemdir. Ancak reperfüzyon, miyokard apoptozu ve nekroz ile kötüleşebilir. Buda miyokardiyal I/R yaralanması olarak adlandırılır (53).

Apoptozis, miyokard I/R 'de kardiyomyosit nekroza yol açan önemli bir mekanizmadır. IL-23'ün, kardiyomyosit apoptozisi kötüleştirdiği belirtilmiştir.

Proinflamatuvar sitokinler kemokinleri ve adezyon moleküllerini uyarmaktadır ve doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemini aktive etmektedir. Çeşitli çalışmalarda farklı sitokin ve kemokinlerin plazma düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir. (TNF)- α ve IL-6 seviyeleri de AMI hastalarında mortalite ve istenmeyen sonuçların belirleyicisidir. IL-1 β , inflamasyonun bir belirleyicisi olarak, MI'da inflamatuvar yanıt için erken ve belirgin bir arabulucudur.

IL-6 nakavt farelerdeki deneysel araştırmalar, IL-6 kaybının, reperfüzyon uygulanmayan bir infarktüs modelinde kardiyak fonksiyonu ve yeniden modellemeyi etkilemediğini göstermiştir (54).

3.3.3. Kemokinler

Kemokinler, hücre adezyon molekülleri ve immün sistem hücreleridir. İnflamatuvar hücrelerin AMI'yı takiben infarktlı myokardial bölgeye gelmesi inflamatuvar cevabın başlamasında kritik bir aşamadır. CC kemokinler ve monosit kemoatraktan protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) mononükleer fagositlerin infiltrasyonunu indükler. CXC kemokinlerden olan IL-8 ve C5a ise nötrofillerin infarkt alanına infiltrasyonunda aracıdır. Selektinler içeren hücre adezyon molekülleri ve immünoglobulin süper ailesi (ICAM-1, VCAM-1) endotel hücrelerin lökositlerin ve plateletlerin aktivasyonunun göstergeleridir.

3.3.4. Lökositler

Lökositoz, AMI'lı hastalarda inflamatuvar reaksiyonların bir ayırıcı özelliğini gösterir (55). 1980 ve 1990'larda deneysel çalışmalar, reperfüzyonlu miyokard infarktüsünde lökosit aracılı inflamasyonun hedeflenmesiyle infarktın boyutunu belirgin bir şekilde azalttığını ve böylece iskemik kardiomyosit hasarının uzamasını engellediğini ortaya koymuştur.

Lökositler, AMI hastalarında inflamatuvar reaksiyonların bir işaretçisidir. AMI'lı hastalarda belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Lökositlerin, aynı zamanda, MI hastalarında inflamatuvar genlerin transkripsiyonunda daha aktif olduğu kanıtlanmıştır.

AMI'da makrofaj migrasyon inhibe edici faktörün (macrophage migration inhibitory factor; MIF) rolü bulunmaktadır. MIF inflamatuvar ve bağışıklık tepkisinin önemli bir düzenleyicisidir (56, 57).

Aktifleştirilmiş endotel hücreleri ve bunların iltihaplı hücreler üzerindeki reseptörleri üzerinde bulunan kemokinler ve hücre adezyon molekülleri arasındaki

etkileşimlerin aracılık ettiği inflamatuvar hücrelerin alınması AMI sonrası inflamatuvar cevabın önemli bir adımıdır (58).

3.3.5. Monositler

Aterosklerotik plaklarda bulunan en bol immün hücre tipi olan monositler, ateroskleroz ve akut koroner olayda önemli bir rol oynarlar. Monositlerin infarktüsle kalbe girmesi inflamatuvar ve onarıcı şekilleri düzenler (58).

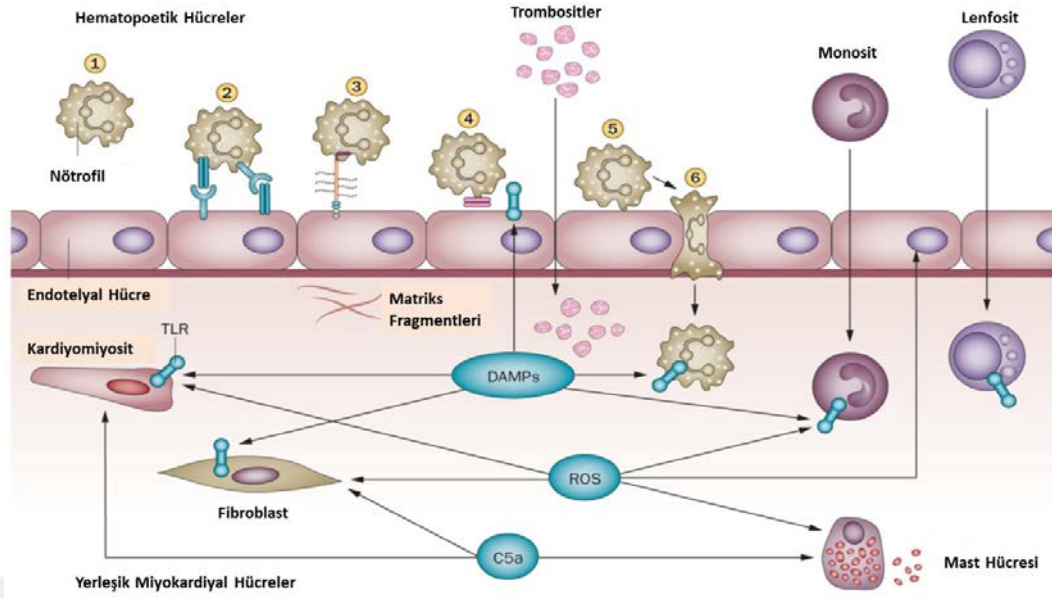
3.3.6. Lenfositler

AMI'de nötrofiller ve monositlerden farklı olarak daha düşük bir lenfosit sayısı gözlenmiştir. T hücreleri adaptif bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir ve T hücreleri bağışıklık rolüne göre yardımcı T hücrelerine (CD4: Th1, Th2, Th17, vb.), sitotoksik T hücrelerine (CD8) ve düzenleyici T hücrelerine ayrılabilir (58).

3.3.7. Plateletler

Trombositler inflamatuvar ve immün hücreler olarak kabul edilmektedir. Trombositler, lökosit aktivasyonuna iltihaplı dokulara infiltrasyonuna aracılık eden inflamatuvar araçların ve trombosit-lökosit etkileşimlerini sağlayan moleküllerin salınması yoluyla inflamatuvar tepkilere katkıda bulunurlar.

Kemik iliği ve dalağın lenfoid organlar olarak aktivasyonu da miyokardiyal hasara karşı sistemik inflamatuvar yanıtta anahtar rol oynar. AMI'da sistemik inflamatuvar yanıt çok karmaşıktır, birçok farklı kan hücresi tipini ve farklı plazma inflamatuvar araçları içerir (sitokinler, kemokinler, hücre adezyon molekülleri ve kompleman sistemi) (58).



Şekil 7. MI Sonrası İnflamatuvar Cevap (Gleeson M. ve arkadaşlarının yayınından uyarlanmıştır) (58).

İnfarktüslü miyokarda ölmekte olan kardiyomiyositler ve hasar gören matris miyokardiyal hücrelerde TLR sinyalini aktive eden DAMP 'leri salgılar ve inflamatuvar bir reaksiyon başlatır. Bütün kademelerin ve ROS üretiminin aktivasyonu inflamatuvar reaksiyonu başlatmaya yardımcı olur. Ölen ve sağ kalan kardiyomiyositler, endotel hücreler, yerleşmiş kardiyak fibroblastlar, yerleşmiş mast hücreleri ve yeni gelişen nötrofiller, monositler ve plateletler infarktüs sonrası inflamatuvar cevaba katılırlar. Lökositler, çok basamaklı bir yapışma basamağının harekete geçirilmesiyle işe başlar. Aktive edilmiş endotel hücreleri tarafından kanda dolaşan lökositlerin tutulmasında, selektinleri içeren etkileşimler aracılık eder. Damar endotel yüzeyinde yuvarlanan lökositler, endotel yüzeyinde proteoglikanlara (PG) bağlı kemokinler tarafından aktive edilir. Aktive edilmiş lökositler endotel hücrelerine yapışır. Lökositler ve endotel hücreleri arasındaki yapışkan etkileşimin güçlendirilmesi, hücrelerin infarktüslü bölgeye göç etmesi ile devam eder (58).

Miyokard infarktüsü geçiren hastalar patofizyolojik olarak heterojen yanıtlar gösterirler ve bu kısmen infarkt boyutundan bağımsızdır. Miyokard infarktüsünden sonra bazı hastalarda progresif dilatasyon ve sistolik fonksiyon bozukluğu gelişirken bazı hastalarda diyastolik kalp yetmezliği gelişir. Aşırı inflamasyonlu hastalar, anti-IL1 veya anti-MCP1'den fayda sağlayabilirken, profibrotik yanıtı hastalar TGF- β /smad şalesinin inhibisyonundan fayda sağlayabilir (41).

Sonuç olarak inflamatuvar yollar, infarktüsle kalpteki hem onarımda hem de kalbi olumsuz yönde etkilemede kritik önem taşımaktadır.

3.4. İnflamasyon Üzerine Egzersizin Etkileri

Hücrel immün yanıtta egzersiz ilgili değişikliklerin altında yatan mekanizma multifaktöriyeldir (59). Ağır ve uzun süreli egzersiz, immün sistem fonksiyonları üzerinde olumsuz etkileri olan sayısız hormonal ve biyokimyasal değişiklikler ile ilişkilidir (60). Ağır ve uzun süreli egzersiz sonrası artmış inflamasyon meydana gelmektedir (61). Ancak düzenli yapılan orta ve hafif yoğunluktaki egzersizler bağışıklık sistemini güçlendirmektedir. Genel olarak egzersizin bağışıklık sistemi üzerine kısa ve uzun süreli etkileri vardır. Süresi veya tipi nasıl olursa olsun egzersiz lökositlerde hızlı bir artışa neden olur. Kısa süreli egzersizlerde artan daha çok lenfositlerdir. Egzersiz uzadıkça daha çok nötrofiller artar (62). Klasik yaklaşıma göre düzenli egzersiz yapmak yararlı kabul edilmekte ve bağışıklık sistemini güçlendirmesinin yanı sıra, koroner arter hastalığı riskini azalttığı, psikolojik streslere karşı direnci arttırdığı, yaşlanmayı geciktirdiği ve yaşam sürecini uzattığı görüşü kabul görmektedir.

Direnç egzersizleri sonrasında özellikle egzersiz yoğun ve uzun süreli olduğunda kaslarda ağrı ve zedelenme meydana gelir. Yaralı bölgeye ve metabolik olarak aktif olan dokulara plazma proteinleri ve lökositler giderek bir inflamasyon yanıtı ortaya çıkarırlar. Sitokinler (TNF- α , IL-1 α/β , IL-6) ile birlikte çalışan interferonlar inflamasyon durumunun düzenlenmesinde yardımcı olmaktadır (63). TNF- α seviyeleri, egzersiz öncesine göre, egzersiz sonrası ilk 5 dakikada düşüş gösterirken egzersiz sonrası bir saat içerisinde de önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir (62). Egzersizin TLR ekspresyon üzerine etkisini inceleyen çok az sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan ilk çalışmada, uzun süre devam eden aerobik egzersizin yalnızca kısa bir süre sonunda TLR ekspresyonunun sayısında ve fonksiyonunda azalmaya neden olduğu görülmüştür. 34°C de, %65 maxVO₂ de 1,5 saat süreyle yapılan bisiklet egzersizinin TLR ekspresyonu ve fonksiyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. TLR-1, TLR-2 ve TLR-4 egzersiz sonrası ve iki saat dinlendikten sonra incelenmiş ve egzersiz sonrasında düşük olduğu görülmüştür. Bunun aksine, TLR 9 egzersizden etkilenmemiştir. TLR 'de gözlemlenen değişimlerin egzersiz yolu ile ortaya çıkan fizyolojik değişimlerin bir sonucu olduğu ya da ateşli hastalıklarda gözlemlenen değişikliklere kıyasla vücut ısısında oldukça büyük artışla başlayan fizyolojik değişiklikler sonucu olup olmadığı kesinlik kazanmamıştır (63).

3.5. Egzersizin MI Patogenezindeki Rolü

Egzersiz sırasında iskelet kaslarının artan enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla oksijenin atmosferden alınıp mitokondrilere taşınması sırasında oluşan olayların koordine bir şekilde birbirini takip etmesiyle egzersiz tamamlanmış olur (64). Egzersizin insan sağlığı için yararlı olmasının yanı sıra, aşırı egzersiz

vücutta zararlı etkilere neden olabilmektedir. Aşırı egzersiz özellikle de kalbe zarar verebilmektedir. Aşırı egzersiz ile tetiklenen kalp hasarı; şiddetli aritmi, kalp yetmezliği ve hatta ani kardiyak ölümlere neden olmaktadır. Yorucu egzersizler tarafından uyarılan, kalp hasarı üzerine yapılan araştırmalar oldukça önemlidir. Fakat bu kalp hasarı hakkında henüz çok az sayıda sistematik çalışma bulunmaktadır. Bunun altında yatan sinyal yolağı mekanizmalarının ortaya çıkartılması gerekmektedir (65).

3.5.1. Egzersiz Çeşitleri

3.5.1.1. Aerobik (Endurance) Egzersizleri

Uzun süreli orta yoğunlukta, büyük kas gruplarının iş yaptığı egzersizlerdir. Koşma, bisiklet ve koşu bandı egzersizleri bu tipteki egzersizlerdendir. Programın süresi 6 ile 8 hafta arasında değişmektedir (66). Orta ve yüksek şiddette aerobik egzersiz eğitimi laktik asidozu azaltarak iskelet kaslarının aerobik kapasitesini artırmaktadır. Bizde çalışmamızda kalp üzerine olumlu etkileri olduğu bilindiğinden dolayı 6 haftalık koşu bandı egzersizinin koruyucu etkilerini değerlendirdik.

3.5.1.2. Üst Ekstremit ve Omuz Kuşağı Egzersizleri

Kol çarkı ile maksimum iş kapasitesinin %60 yoğunlukta 6 ile 10 hafta arası süreyle haftada 3-5 kez olmak üzere 20-30 dk süreyle üst ekstremit kaslarının eğitimi yapılmaktadır. Çark bulunmayan durumlarda ise ağırlıklı gravite rezistans egzersizler, nöromüsküler fasilasyon egzersizleri, yüzme, kano gibi veya basitçe kolların anterior elevasyonu gibi egzersizler üst ekstremit kaslarının enduransını artırmaktadır (66, 67).

3.5.1.3. Solunum (Ventilatuvur) Kasları Egzersizleri

Solunum kaslarının kuvvet ve dayanıklılığını artıran egzersiz eğitimi, egzersiz kapasitesini ve yaşam kalitesini düzenler.

3.6. MI Etyopatogenezinde Mitokondriyal Biyogenez

Hücresin metabolik santralleri olan mitokondriler 2-6 mikrometre büyüklükte olup; ATP üretimi, biyomolekül sentezi, iyonik homeostazis ve antioksidan savunma da dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahiptirler. Hücreler yaşlandıkça ve mtDNA hasarı biriktikçe mitokondri ATP ihtiyaçlarını daha zor karşılar ve böylece hücrelerin fonksiyonu ve rejeneratif kapasitesi azalır.

Mitokondriyal DNA (mtDNA) 16.5 kb büyüklükte olup çift iplikli ve dairesel bir moleküldür. 22 tRNA (transfer RNA), 2 rRNA (ribozomal RNA) ve elektron transport zinciri kompleksleri I, III, IV ve V'in 13 alt birimini kodlayan 37 gen içermektedir (68). Mitokondriyal biyogenez mitokondrinin büyümesi ve bölünmesi olarak tanımlanmaktadır. Mitokondriyal biyogeneze görevli genler nükleer genom ve mitokondrial genom tarafından kodlanan ve yaklaşık 1000 proteinin eş zamanlı sentezini gerektirmektedir (68).

Mitokondriyal biyogeneze önemli rol oynayan pek çok gen tanımlanmıştır. Mitokondrial genomda bulunan genlerin ifadesi mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM), B1 (TFBM1) ve B2 (TFBM2) olmak üzere 3 farklı transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilir (69). Nükleer genom üzerinde yer alan genlerin ifadesi ise, nükleer solunum yolu faktörleri 1 ve 2 (nükleer respiration factor; NRF-1 ve 2) merkezi olan birkaç farklı transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenir. Bu iki transkripsiyon faktörü, sitokrom C, suksinat dehidrogenaz ve sitokrom oksidaz gibi anahtar mitokondriyal proteinlerin

sentezini düzenler. Bu proteinlere ek olarak, NRF'ler aynı zamanda mitokondriyal transkripsiyon faktörlerini de düzenler ve dolayısıyla mitokondriyal genomun düzenlenmesinde dolaylı olarak görev alırlar (70).

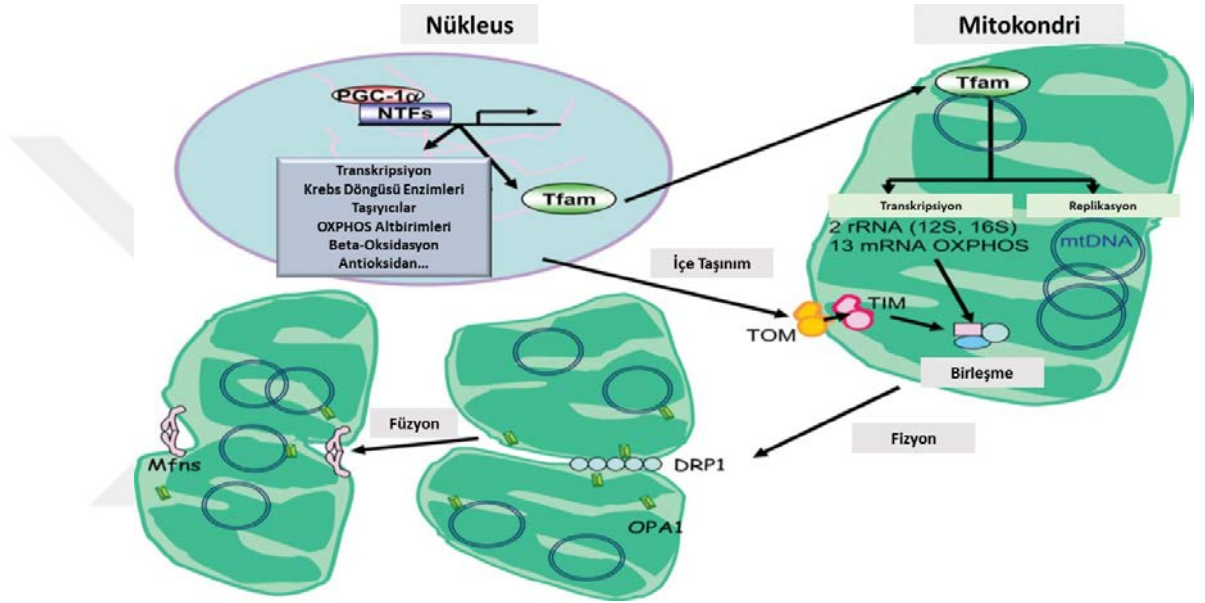
Tablo 1: Mitokondriyal Biyogeneze Görevli Genler

Sembol	İsim	Lokus	Özellik
ATP5B	ATPsynthase subunit beta, mitochondrial	12q13.3	Bu gen ATP sentazın β altbirimini kodlar. Mitokondriyal ATP sentaz, oksidatif fosforilasyon sırasında iç zar boyunca protonların elektrokimyasal gradyanını kullanan ATP sentezini katalize eder.
PPARGC1A	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha	12q13.3	Enerji metabolizmasında rol oynayan genleri düzenleyen bir transkripsiyonel koaktivatördür. Dış fizyolojik uyarılarla mitokondriyal biyogenezin düzenlenmesi arasında doğrudan bir bağlantı sağlar.
PPARGC1B	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Beta	5q32	Östrojen reseptörü alfa, nükleer solunum faktörü 1 ve glukokortikoid reseptörü dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörünün ve nükleer reseptörlerin aktivitesini uyarır. Yağ oksidasyonu, oksidatif olmayan glikoz metabolizması ve enerji harcamalarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

PRKAA2	Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2	1p32.2	AMP ile aktive olan protein kinazın (AMPK) katalitik bir altbirimidir. AMPK, hücrel enerji durumuyla ilişkili bir enzimdir. Hücrel metabolik streslere yanıt olarak aktive edilen AMPK asetil-CoA karboksilaz (ACC), yağ asidi ve kolesterolün biyosentezini düzenleyen kilit enzimleri fosforilleyerek onları inaktive eder.
NRF1	Nuclear respiratory factor 1	7q32.2	Solunum, heme biyosentezi, mitokondriyal DNA transkripsiyonu ve replikasyonu için gerekli nükleer genleri düzenler.
MNF2	Mitofusin 2	1p36.22	Mitokondriyal füzyona katılan ve mitokondriyal ağın bakım ve işletilmesine katkıda bulunan bir mitokondriyal membran proteinidir. Ayrıca, vasküler düz kas hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynar.
OPA 1	Mitochondrial dynamin like gtpase	3q29	Nükleer olarak kodlanmış bir mitokondriyal protein olup, dynamine bağlı GTPazlara benzerlik göstermektedir. İç mitokondriyal membrana yerleşmiş olup mitokondriyal stabiliteyi ve enerji çıkışını düzenlemeye yardımcı olur.

HIF-1A	Hypoxia inducible factor 1-Alpha	14q23.2	İskemik hastalık patofizyolojisinde önemli bir rol oynayan hipoksiyle indüklenebilir faktör-1'in (HIF-1) alfa alt ünitesini kodlar. Transkripsiyon faktörü olarak iş gören protein enerji metabolizması, anjiyogenez, apoptoz ve protein ürünleri oksijen dağıtımını arttıran genler dahil olmak üzere birçok genin transkripsiyonunu aktive ederek düzenleyici olarak işlev görmektedir. oynar.
CHRM 1	Cholinergic receptor muscarinic 1	11q12.3	Adenilat siklaz inhibisyonu, fosfoinositid dejenerasyonu ve potasyum kanallarının kontrolü gibi hücrel süreçlerde görevlidir.
TFAM	Transcription factor A, mitochondria 1	10q21.1	Bir transkripsiyon faktörü olup mitokondriyal DNA replikasyonu ve onarımında da işlev görür.
NFE2L2	Nuclear factor, erythroid 2 like 2	2q31.2	Bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan protein promoterlerinde antioksidan yanıt elementleri (ARE) içeren genleri düzenler. ARE elementi içeren genlerin çoğu yaralanma ve inflamasyon durumlarında görevlidirler.
METRNL	Meteorin-like	10q32.3	Egzersiz ya da enerji tüketimini teşvik eden soğuğa maruziyet veya egzersizin ardından iskelet kası ve yağ dokuda sentezi artmaktadır.

Mitokondriyal biyogenez egzersiz, soğuğa maruz kalma, kalori kısıtlaması ve oksidatif stres, hücre bölünmesi ve yenilenmesi ve farklılaşma gibi çevresel faktörler tarafından etkilenmektedir. Mitokondriyal biyogenez, mitokondriyal sayı değişikliğinin yanında boyut ve kütle değişiklikleridir. Mitokondriyal DNA replikasyonu ve mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmaları da koordineli olarak çalışmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. Mitokondriyal Biyogenezin Şematik Gösterimi (Ventura Clapier ve arkadaşlarının yayınından uyarlanmıştır) (68).

(PGC-1 α), nükleer kodlanmış proteinlerin ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü TFAM'in transkripsiyonuna neden olan nükleer transkripsiyon faktörlerini (NTF) aktive eder. TFAM, mitokondriyal genomun transkripsiyonu ve çoğalmasını aktive eder. Nükleer kodlanmış proteinler, dış veya iç zar hareketleriyle mitokondriye aktarılır. Bu işlemlerin tümü dokunun gerekli ihtiyaçlarını karşılamak için düzenlenmektedir. Daha sonra, solunum zincirinin nükleer ve mitokondri tarafından kodlanmış alt birimleri toplanır. Dış membran için dinaminle ilişkili protein 1 (DRP1) ve mitokondriyalın iç membranı için

OPA1 aracılığıyla mitokondrial fisyon ve mitokondriyal bölünmeyi sağlarken mitofusinler (MFN) mitokondriyal füzyonu kontrol eder. Füzyon/fizyon süreçleri mitokondriyal ağın düzgün bir şekilde düzenlenmesine yardımcı işlemlerdir. (OXPHOS: oksidatif fosforilasyon) (68).

3.7. Mitokondriyal Biyogenez ve Egzersiz

Dayanıklılık egzersizleri sırasında oluşan metabolik stresin, mitokondriyal biyogenezi teşvik ettiği gösterilmiştir (71, 72). Mitokondriyal biyogenez süreci egzersiz fizyolojisi araştırmalarında en çok ilgi gören alanlardan biridir. Mitokondriyal biyogenez düzeyi mitokondriyal içeriğin biyolojik belirteçlerinden ve / veya metabolik transkriptlerin ifadesinden yola çıkılarak değerlendirilmektedir.

Dayanıklılık egzersizinin doğurduğu metabolik stresin, uzun süreli egzersizler (yani dayanıklılık antrenmanı) ile tekrarlandığında mitokondriyal içeriğin ve fonksiyonun adaptasyonel değişikliklerine yol açarak mitokondriyal biyogenezi teşvik ettiği gösterilmiştir (72). Mitokondriyal biyogenezdeki değişikliklerin hipertrofik ya da kalp yetmezliği gibi kardiyak patolojilere katkıda bulunduğu da bilinmektedir.

Toksik maddeye veya hücre strese maruz kaldıktan sonra mitokondri zarar görebilir ve artan serbest radikal üretimi kalıcı mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olabilir. ATP'nin azalması ve serbest radikallerin artması hasara yol açar ve daha sonra doku ve organlarda fonksiyon kaybına neden olur. Bu sorunu çözmek için mitokondriyal biyogenezi ve hücrelerin onarımını başlatan fonksiyonel mitokondriyi indükleyen bazı proteinler bulunmuştur. Bunların başında

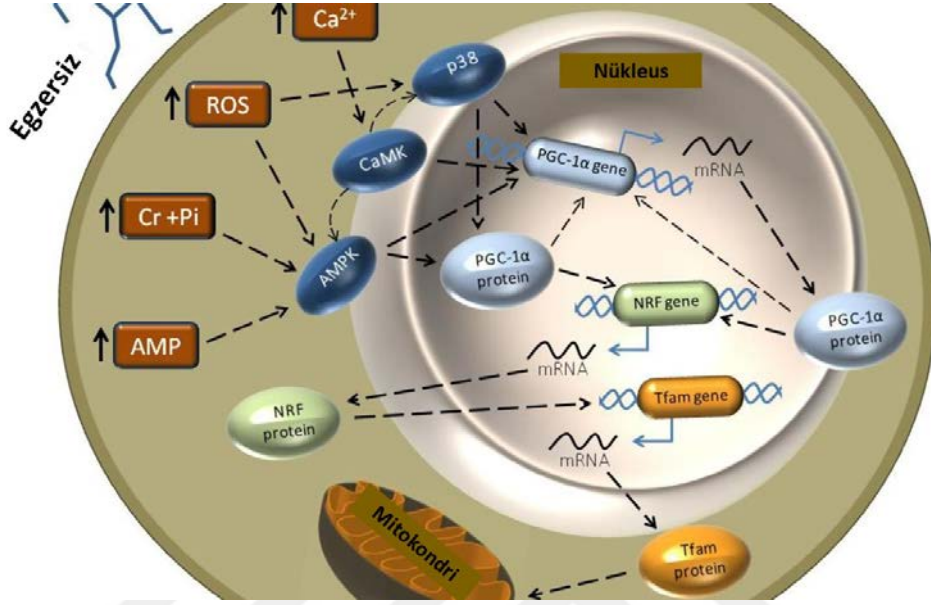
Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör- γ ortak aktifleştirici-1 α (PGC-1 α) yer almaktadır (73).

Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör- γ ortak aktifleştirici-1 α (PGC-1 α), mitokondriyal biyogenezin bir ana düzenleyicisidir. Mitokondriyal proliferasyonunun oranının kontrol edilmesinde rol oynamaktadır (65).

Spiegelman ve arkadaşları tarafından keşfedilen PGC-1 α , DNA bağlanma aktivitesinden yoksundur, ancak mtTFA'nın üzerinde NRF'ler de dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörü ile etkileşir ve onları aktive eder (74).

PGC-1 α geninin dört farklı mRNA varyantı bulunmaktadır. PGC-1 α 1, 2 ve 3 olarak adlandırılan varyantları, mitokondriyal kapasite ve fonksiyonda rol oynayan genlerin transkripsiyonunu indükleyerek oksidatif iskelet kası fenotipini uyarmaktadır (75). PGC-1 α 4 varyantı, oksidatif metabolizma değil, kas büyümesiyle ilgili spesifik gen grubunda değişikliklere neden olmaktadır (76). PGC-1 α , zayıf enerji metabolizmasının oluşmasına yol açarak kalp yetmezliğine neden olabilmektedir (65). Egzersizden belirgin şekilde etkilenen moleküller ve iyonlar, homeostazdaki bozulmalara mitokondriyal biyogenez gibi adaptif süreçlere aracılık edebilen, güçlü sinyal veren maddelerdir. MEK / ERK aktivasyonu, aynı zamanda PGC-1 α 4 ifadesini arttıran bir uyarıcı olarak direnç egzersizi sonrasında gerçekleşmektedir (76). PGC-1 α mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM) 'i aktive eden NRF-1 ile etkileşime girerek mitokondriyal proteinlerin eşgüdümlü ifadesini aktive eder (77). Egzersiz; hücre içi AMP, Ca²⁺ + konsantrasyonları, serbest fosfat grupları (Pi) ve reaktif oksijen türleri (ROS) artırırken hücresel enerji talebini artırır (78). Bu maddeler, PGC-1 α ve mitokondriyal biyogenezin transkripsiyon ve aktivasyonunu tetikleyen güçlü

sinyal vericiler olup, kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinazları (CaMK), AMP ile aktive protein kinazı (AMPK) ve p38MAPK aktive eder (79).



Şekil 9. Egzersizi İndükleyen PGC-1α Ekspresyonunu ve Aktivitesini Düzenleyen Sinyal Yolaklarının Yanı Sıra Sonraki PGC-1α İle İndüklenen Mitokondriyal Biyogenezin Basitleştirilmiş Genel Görünüşü. ROS, reaktif oksijen türleri; Cr, kreatin; Pi, bağlanmamış fosfat grubu; AMP, adenosin monofosfat; p38, p38 mitojen ile aktive olan kinaz; CaMK, kalsiyum / kalmodulin-bağımlı protein kinazlar; AMPK, AMP ile aktive protein kinaz; PGC-1α, peroksizom proliferatif-aktive reseptör-γ koaktivatörü 1α; NRF, nükleer solunum faktörleri; Tfam, mitokondriyal transkripsiyon faktörü A. (Scarpulla RC' nin çalışmasından uyarlanmıştır) (80).

PGC-1α aynı zamanda PGC-1β ve PGC-1'e bağlı koaktivatörü (PRC) içeren bir protein ailesine aittir. Bu iki aile üyesi, PGC-1α'ya kıyasla işlevlerinde benzerlik ve farklılıklara sahiptir ancak bunların kesin rolleri hala araştırılmaktadır (81).

PGC-1α mitokondriyal biyogenez düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin çoğunluğu ile etkileşir (82, 83). Bu transkripsiyon faktörleri içerisinde PPAR'lar, NRF, Miyosit Arttırıcı Faktörler (Myocyte Enhancer Factors; MEF), ERR, Forkhead Box (FOX)O1 ve yin-yang (YY) bulunmaktadır (84). Protein kalp,

karaciğer, beyin, iskelet kası ve adipoz doku gibi çok geniş bir doku dağılımına sahiptir. MB' de dahil olmak üzere glukoneogenez ve antioksidan defansta görevli proteinlerin düzenlenmesinde de görev almaktadır. Özellikle iskelet kasında egzersizin PGC-1 α transkripsiyonunu ve mRNA içeriğini düzenlediği bilinmektedir (84, 85, 86). İnsan iskelet kasında egzersiz sırasında tekrarlanan PGC-1 α 'nın geçici mRNA patlamalarının mitokondriyal biyogenezden önce gerçekleştiği ve mRNA ifadesinin büyüklüğünün mitokondriyal biyogenezin büyüklüğü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (71).

3.8. Meteorin-Like (METRNL)

Son zamanlarda, genetik ve proteomik yaklaşımlar kullanılarak, Rao ve ark. tarafından Meteorin-like adı verilen yeni bir protein bulunmuştur (86, 87). Kalori kısıtlama modeli kullanan Li ve ark. tarafından METRNL'in adipogenez ve obezite tarafından düzenlenen yeni bir adipokin olduğu keşfedilmiştir (89). METRNL geni farelerde kromozom 11qE2 ve insanlarda 17q25.3 üzerinde bulunmaktadır (89, 90). Fare ve insan METRNL proteini 293 aminoasitlik (%77) benzerlik göstermektedir (91).

Cometin, Subfatin veya Interlökin 39 olarak da bilinen METRNL, 45 amino asit sinyal peptidli 311 amino asit içeren bir proteindir. METRNL'in homoloğu olan METRN, bir protein olarak Nishino ve arkadaşları tarafından 2004'te keşfedilmiştir (92).

Meteorin-like (METRNL) ilk olarak adipoz doku ile ilişkili bir gen olarak tanımlanmıştır. Miao'nun grubu, METRNL'in en yüksek ifadesinin hem kemirgenler hem de insanlardaki beyaz yağ dokusunda bulunduğunu belirtmişlerdir (89). Son zamanlarda, METRNL'in soğuğa maruz kalma ve

egzersize yanıt olarak adipoz ve kas doku tarafından salgılandığı gösterilmiştir (52). Kalp dahil pek çok organda sentezlendiği tespit edilmiştir (92, 93).

METRNL çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen yaklaşık 28 kDa'luk küçük bir protein olup doğuştan ve sonradan kazanılmış bağışıklık ile ilişkili olup yeni bir sitokin olarak tanımlanmaktadır. METRNL'nin deride yüksek ekspresyonu göz önüne alındığında, bazı cilt patolojilerindeki ifadesi araştırılmaya başlanmıştır. İfadesinin sedef hastalığında, atopik dermatit (AD), Prurigo nodularis, Aktinik keratoz ve romatoid artritte önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (52). Bu sonuçlar birlikte ele alındığında METRNL'in inflamatuvar yanıtlarda bir rol oynadığını ve her ikisi de doğal ve sonradan kazanılmış bağışıklık fonksiyonlarında elde edilebilir yeni bir sitokin olduğunu göstermektedir (52). METRNL, deri ve mukoza dokularında ve bununla birlikte M2- polarize makrofajlarda güçlü ifadeye sahiptir. Çeşitli makrofaj popülasyonları ve bununla birlikte dendritik hücreleri ve bazı granülositler tarafından da üretilmektedir. Ancak lenfoid hücreler tarafından üretilmemektedir (T, B, NK (Naturel Killer) veya NKT (Naturel Killer T) hücreleri) (52). METRNL ana hücre kaynaklarının, M2 makrofajlar ve bariyer dokular (deri ve mukoza) olduğu bulunmuştur. METRNL yara iyileşmesi de dahil olmak üzere M2-polarize makrofajlar ile ilişkilidir (52).

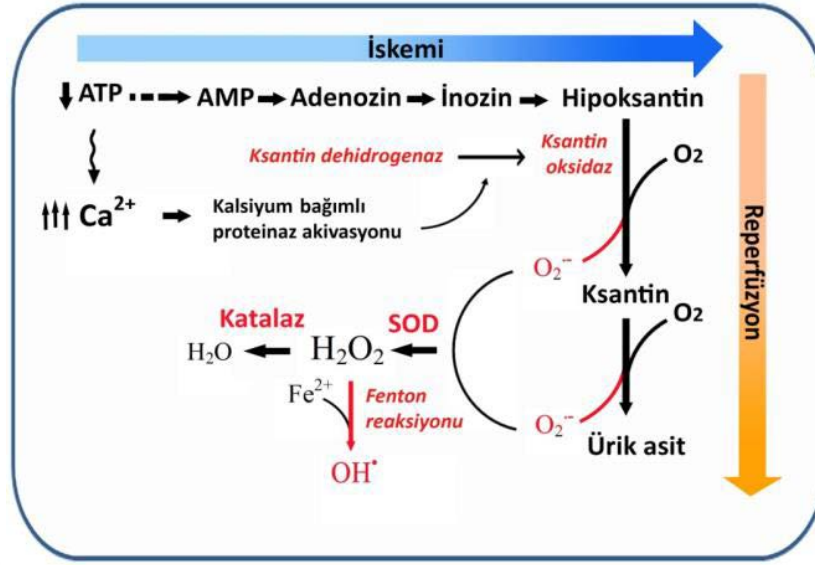
METRNL'nin, eozinofile bağlı IL-4 salgısında bir artışı uyardığı ve yağ termojenik anti-inflamatuvar gen programlarının artan ifadesi için gerekli olan adipoz doku makrofajları, alternatif aktivasyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir (92, 93).

3.9. Sıçanda AMI Modeli Olarak İskemi/Reperfüzyon Modelleri

Arteriyel kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokuların oksijenden yoksun kalması olayına iskemi denir. İskemiye uğrayan dokunun belirli bir süre oksijenden yoksun kalması doku hasarı veya nekroz ile sonuçlanır. Reperfüzyon ise kan akımının iskemi sonrasında yeniden sağlanması olarak tanımlanır. Reperfüzyon sonucu iskeminin neden olduğu hasarda artış meydana gelir. Perfüzyonun yeterli olmaması durumunda, toksik metabolitler birikerek hücre ölümüne neden olur. Hücrenin rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenmesi için iskemik dokuya yeniden kan akımının gelmesi gerekir (94). Hücresel yapılar, zar lipitleri, proteinler ve nükleik asit molekülleri reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan yapılardır (95). İskemik periyodu takip eden reperfüzyon süreci ölümcül aritmilere zemin hazırlayabilmektedir. Meydana gelen aritmiler genellikle idioventrikülerdir ve en fazla ventriküler taşikardi ile fibrilasyon gözlenir (96).

İskemi/reperfüzyon(I/R) hasarı olarak bilinen bu durum miyokard infarktüsünde ortaya çıkan yüksek morbidite ve mortalitenin ana nedenidir. Oksijen paradoksu olarakta bilinen I/R hasarında görev alan moleküler süreçlerin anlaşılması klinikte doku hasarını azaltacak veya önleyecek tedavilerin geliştirilmesi bakımından oldukça önemlidir (97). I/R hasarı trombolitik tedavi, organ nakli, koroner anjioplasti ve kardiyopulmoner bypass gibi çeşitli tıbbi ve cerrahi girişimler sırasında görülen sorunlardandır (98). Kalpte, I/Rhasarına bağlı olarak miyokardiyal sersemleme, reperfüzyon aritmileri, miyositlerde nekroz, koroner endotelyal ve mikrovasküler disfonksiyon gözlenebilmektedir (99).

Kalbin normal fonksiyonunu sürdürebilmesi için her daim oksijene ihtiyacı vardır. Kalp koroner arter kanı miyokarddan her geçişinde içinde bulundurduğu oksijenin %75'ini kullanmaktadır (100). İskeminin başlangıcından itibaren birkaç saniye içinde miyokardın oksijen rezervi tükenir ve doku oksijen basıncının düşmesiyle oksidatif fosforilasyon, elektron transportu ve mitokondriyal adenozin trifosfat (ATP) yapımı durur. Bunun sonucunda mitokondriyal aktivite azalır ve aerobik metabolizma yerine anaerobik glikolizis temel enerji kaynağı olur. Glikolizis, glikolitik ara maddelerin birikmesi ve nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'in azalmasına yol açmaktadır. Glikolitik aktivitenin devam edebilmesi için piruvat laktata indirgenerek NAD'ı oluşturur. Sonuç olarak miyokard hücrelerinde laktik asit birikerek kan dolaşımına geçer. Laktik asitin miyokardda birikmesi, glikolitik zincirin anahtar enzimlerinin inhibe olmasına doku pH'ının düşmesine ve hücre içi asidozisin yoğun olarak meydana gelmesine sebep olur. Membran bütünlüğü bozulmasıyla hücrede potasyum (K^+) kaybı hücre içinde aşırı miktarda sodyum (Na^+), klor (Cl^-), kalsiyum (Ca^{+2}) ve su birikimi oluşur (101). Hücre içi Ca^{+2} miktarının artması ikincil mesajcılara ve çeşitli enzimlere etki etmektedir. Öncü inflamatuvar araçları artırarak, membranların işlev ve bütünlüğünü olumsuz etkiler, ayrıca hücre iskeletinin organizasyonu bozulur (102).



Şekil 10. İskemi/reperfüzyon basamakları (97).

Çalışmamızdaki temel amaç METRNL'nin kalp iskemi hasarlarındaki rolünün aydınlatılmasıdır. Çalışmamızın alt amaçları aşağıdaki şekildedir.

1. İnsan MI hastalarından alınan serum örneklerinde METRNL düzeylerinin bir belirteç olarak kullanılabilirliğinin kontrolle karşılaştırılarak araştırılması,
2. Sıçanlarda egzersiz sonrası oluşturulacak I/R hasarında METRNL düzeylerinin serum ve kalp, kas, yağ ve damar dokularında değerlendirilerek egzersizle değişiminin saptanması,
3. METRNL izole organ banyosunda sıçan damar kasılma ve gevşeme cevapları üzerine muhtemel etkilerinin ortaya konması,
4. METRNL'nin mitokondriyal biyogenez ilişkili gen ifadeleri olan etkisinin kalp, kas, yağ ve damar dokuda değerlendirilmesidir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız insan ve hayvan deneyleri olmak üzere iki ana çalışma alanı içermektedir.

4.1. İnsan Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Çalışmaya 15.06.2016-27.12.2017 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Koroner Yoğun Bakım Ünitesi (KYBÜ)'ne Akut MI tanısı konulan 200 hasta alındı. Kontrol grubu olarak yaş, cinsiyet ve eğitim düzeyi bakımından hasta grubuna denk 100 sağlıklı birey kullanıldı. Çalışmaya alınan tüm hastalara, uygulanan genetik testler ve MI hakkında sözlü olarak bilgi verilerek katılmayı kabul eden 200 hasta ve 100 kontrole araştırma detaylarını anlatan hasta bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak izinleri alındı. Fırat üniversitesi, girişimsel olmayan araştırmalar etik kurulu başkanlığından 14.06.2016 tarihli, 11. toplantı ve 20. Karar numarası ile çalışma onayı alındı.

4.1.1. Çalışmaya Alınma Kriterleri

Akut MI tanısı, klinik semptom ve bulguların varlığında yoğun bakıma kabul sırasında elde edilen yüzey EKG'si ve/veya kardiyak biyomarkerlar dikkate alınarak konuldu. Hastalarda;

- 1- Akut myokard infarktüsü (AMI) kriterleri olarak en az 20 dakika süren göğüs ağrısı olması,
- 2- EKG' de en az 2 komşu derivasyonda en az ≥ 1 mm ST elevasyonu olması,
- 3- Ağrı başlangıcından sonra 12 saat içerisinde Koroner Yoğun Bakım Ünitesi (KYBÜ)' ne kabul edilmesi arandı.

4.1.2. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

- 1- Göğüs ağrı süresi 12 saatin üstünde olan bireyler,
- 2- 80 yaş üstü hastalar,
- 3- Kronik böbrek yetmezliği (serum kreatinin >2.5) tanısı konan bireyler,
- 4- Kronik karaciğer yetmezliği tanısı konan bireyler,
- 5- Morbid Obez tanısı konan bireyler,
- 6- Klinik kalp yetersizliği (Killip II/III) veya kardiyogenik şok bulguları gözlenen bireyler,
- 7- Malignitesi ve kalp dışı sistemik inflamasyon yaratabilecek kronik inflamatuvar hastalığı olan bireyler çalışma dışı bırakıldı.

4.1.3. Elektrokardiyografi (EKG)

Elektrokardiyografi çekimleri, her derivasyon için en az 5 QRS kompleksi içerecek şekilde, 25mm/sn hızında standart 12 derivasyonda 3 kanal eş zamanlı Nihon Kohden (Tokyo-Japan) marka EKG cihazları ile yapıldı.

4.1.4. Kontrol Grubu Seçim Kriterleri

Kontrol grubu herhangi bir iskemik kalp hastalığı olmayan hipertansiyon, lipit anomalisi, metabolik hastalık (DM), böbrek yetersizliği, karaciğer yetersizliği, ailede bilinen erken başlangıçlı iskemik kalp hastalığı, lipit metabolizması ve hipertansiyon bulgusu olmayan bireylerden seçildi.

4.1.5. Kullanılan Kimyasallar ve Araç-Gereçler

- Human meteorin-like protein (METRNL) ELİSA Kit: SunLong Biotech Co., Ltd. Cat No:SL2567Hu, CHİNA
- -20°C derin dondurucu: Arçelik, Türkiye
- -80°C derin dondurucu: Nuaire, Meksika

- Etüv: Gallenkamp, Economy Incubator Size, Ukranya
- ELISA cihazı: Biotek, ELX800, ABD
- Falkon Tüp: Corning® 430766, 15 mL Centrifüğe Tube, Meksika
- Vorteks: Elektro-Mag, Türkiye

4.1.6. İnsanda ELİSA Analizleri

Hastalardan rutin EDTA'lı biyokimya tüplerine alınan 3ml kan örnekleri 5000 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serum örnekleri 100 µl lik parçalara ayrılarak kullanılıncaya kadar -80°C' de saklandı. Serum örneklerinden Elisa yöntemi kullanılarak METRNL düzeylerine bakıldı. Çalışmanın bu kısmı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında bulunan Biotek Epoch mikropate (EL X 800, Bio-Tek Instruments, Winooski, USA) spektrofotometre cihazında yapıldı.

4.1.7. ELİSA Testi ile METRNL Seviyesinin Tayini Protokolü

Çalışmada toplanan hasta tam kan serum örneklerinden METRNL seviyesi tayini için, Human meteorin-like protein (METRNL) ELİSA Kit (SunLong Biotech Co.,LTD, Cat No :SL2567Hu, CHİNA) kullanıldı.

-1A: Kit içinde bulunan Standart solüsyonlar 18 12, 6, 3, 1.5 ng/ml olacak şekilde hazırlandı Örnek eklenmeyip, sadece kromojen A, kromojen B ve stop solüsyonu eklendi.

-2-6A Kuyucukları: 50 µl standart ve 50 µl streptavidin-HRP kuyucuklara eklendi.

-7A ve sonrası: Kuyucuklara 40 µl örnek, 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Plate koruma membranı yapıştırıldı. Hafifçe sallanarak karıştırıldıktan sonra plate, 37 °C'de 60 dk inkübasyona bırakıldı.

1. İnkübasyondan sonra plate koruma membranı çıkarıldı ve içindeki sıvı boşaltıldı. Daha sonra plate distile su ile dilute edilmiş (1X) yıkama solüsyonu ile yıkandı. 30 sn bekledikten sonra sıvı boşaltıldı ve bu işlem 5 kez tekrarlandı.
2. Her kuyucuğa önce 50 µl solüsyon A daha sonra 50 µl solüsyon B eklenip hafifçe karıştırılıp 37 °C de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
3. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi. (mavi rengin sarı renge dönüştüğü gözlendi.)
4. Referans olarak 450 nm dalga boyunda ELİSA cihazında okuma yapıldı.
5. Konsantrasyon hesaplama işlemi KJ Junior programı ile yapıldı.

4.2. Deney Hayvanları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Hayvan çalışmasında denek olarak, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edilen 230-250 gr ağırlığında Wistar albino cinsi erkek sıçanlar (n=85) kullanıldı. Sıçanlar standart şartlarda (12 saat günışığı, 12 saat karanlık, havalandırılmalı, sabit ısı odalarda) barındırıldı. Deney sonunda ölçümü yapılacak biyokimyasal parametreler arasındaki farklılıkların en aza indirgenmesi amacıyla erkek ve ağırlık bakımından birbirine yakın ağırlıklara sahip sıçanlar kullanıldı. Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 28.07.2016 tarihli, 14. toplantı ve 144.no ile çalışma onayı alındı.

4.2.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler

- -20°C derin dondurucu: Arçelik, Türkiye
- -80°C derin dondurucu: Nuaire, Meksika
- Etüv: Gallenkamp, Economy Incubator Size, Ukranya

- ELISA cihazı: Biotek, ELX800, ABD
- Falcon Tüp: Corning® 430766, 15 mL Centrifüge Tube, Meksika
- Homojenizatör: Next Advance, Averill Park NY, Bullet Blender Storm, Katalog No: BBY24M, ABD
- Homojenizatör Boncuğu: Next Advance, GB05-RNA 0.5mm Dia, RNase-Free Glass Beads, Katalog No: GB05, ABD
- Mini Plate Spin: Labnet C1000, ABD
- Otomatik Pipetler: Socorex, Acura 825, İsviçre
- Qubit tüpleri (0.6ml): Neptune, Katalog No: 3737.S.X, Biotix Laboratory Media, İngiltere
- Real Time-PCR cihazı: Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, CA
- Santrifüj: Sigma 3K30, Almanya
- Spin: Labnet International, Katalog No:C1031B-230V, Kore
- Vorteks: Elektro-Mag, Türkiye

4.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- RmMETRNL(Meteorin-like) recombinant Mouse (CHO cell-derived) . Cat No:6679-MN, USA
- Rat Meteorin-like protein (METRNL) ELİSA Kit: Shanghai YL Biotech Co., Ltd. Cat No: YLA1399RA, CHINA
- Rat Interleukin 4 (IL-4) ELİSA Kit: Shanghai YL Biotech Co.,Ltd . Cat No: YLA0220RA, CHINA
- Rat Adenosine triphosphate (ATP) ELİSA Kit: Shanghai YL Biotech Co., Ltd. Cat No: YLA0323RA, CHINA

- Rat Meteorin-like protein (METRNL) ELISA Kit: Shanghai YL Biotech Co., Ltd. Cat No: YLA1399RA, CHINA
- Anti-METRNL antibody: Rabbit Meteorin-like protein Polyclonal Antibody. Cat No: MBS7004241: MyBioSource, Inc. P.O. Box 153308 San Diego, CA 92195-3308 USA
- Rat CK-MB ELISA Kit (Creatine Kinase MB Isoenzyme): Wuhan Fine Biotech Co., Ltd. Cat No: ER0841, CHINA



4.2.3. Deney Hayvanları Gruplandırılması

IR deneyleri için her bir grupta 6 hayvan olacak şekilde 6 grup oluşturuldu. Egzersiz yapan grubun koşu egzersizleri, elektrikli motor sürücülü dört yollu koşu bandında (Animal Treadmill) yaptırıldı.

4.2.3.1. Kontrol Grubu (K)

Bu gruptaki hayvanlara deney süresince hiçbir işlem uygulanmadı.

4.2.3.2. Egzersiz Grubu (E)

45 gün boyunca treadmill egzersiz uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlara 6 hafta boyunca haftada beş gün sabah saatlerinde başlayarak her hafta artan sürelerle Rico ve arkadaşlarının geliştirdiği koşu bandı protokolü orta ve yüksek düzeyde egzersiz yaptırıldı (107).

4.2.3.3. İskemi/Reperfüzyon Grubu (I/R)

Anestezi altında her hayvana miyokardiyal I/R yapıldı. Sıçanlar ürethanın (1,2-1,4 gr/kg) intraperitoneal enjeksiyonu ile genel anesteziye alındı. Yapay solunum için trakea kanülasyonu yapıldı ve sıçanlar solunum pompasına bağlandı. Karotid artere yerleştirilen bir kanülden, transdüser ve bir kaydedici yardımı ile kan basıncı, kalp hızı ve EKG değerleri yazdırıldı. Göğsün sol tarafına 1-1,5 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldıktan sonra cilt altı dokuları ve göğüs kasları geçilerek, sternumun hemen solunda dördüncü kosta kesilerek sol torakotomi yapıldı. Toraks açıldığı anda içerideki negatif basınç ortadan kalkacağı için, solunumun devamı ve pCO₂, pO₂ ve pH değerlerini korumak amacı ile ventilasyon cihazı ile 1,5 ml/100gr'lık hacim ve 60 atım/dakika'lık bir hızla oda havası verilerek pozitif basınçlı solunum uygulanmaya başlandı. Perikardiyum yavaşça sıyrılarak ve kalp serbest hale getirildi. Göğsün sağ tarafına hafifçe

basılarak kalp dışarı alındı ve 10 mm'lik yuvarlak uçlu iğne ile 6/0 ipek iplik sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızla geçirildi. 30 dakikalık iskemi sonunda klemp açılarak tüp içinden geçen iplik gevşetildi ve böylece yeniden kanlanma yani reperfüzyon sağlanmış oldu. Reperfüzyon süresi 120 dakika olarak uygulandı. Deneylerde sistolik ve diyastolik kan basıncı karotid artere yerleştirilen bir kanülden, transdüser ve bir kaydedici yardımı ile direkt yöntemle ölçüldü. Ayrıca cerrahi uygulamalar süresince kalp hızı ve EKG bulguları kaydedildi.

4.2.3.4. İskemi/reperfüzyon+Egzersiz (I/R+E) Grubu

I/R öncesi 45 gün (6 hafta) boyunca egzersiz uygulanan gruplara I/R deneyi yukarıda anlatıldığı gibi yapıldı.

4.2.3.5. İskemi/reperfüzyon+METRNL (I/R+M) Grubu

İskemiye başlamadan 10 dk öncesinde her hayvana 0,1 mg/kg dozunda karotid arterden METRNL verildi.

4.2.3.6. İskemi/reperfüzyon+Egzersiz+METRNL (I/R+E+M) Grubu

45 günlük egzersiz uygulamasından sonra her hayvana iki buçuk saat süren iskemi-reperfüzyon işlemi uygulandı. İskemiye başlamadan 10 dk öncesinde 0,1 mg/kg miktarında karotid arterden METRNL enjekte edildi.

Tablo 2: Haftalara Göre Treadmill Egzersiz Uygulamaları

Hafta		Pazartesi	Salı	Çarşamba	Perşembe	Cuma
1	Hız\Süre	0,9 km\h 15 dk	0,9 km\h 15 dk	0,9 km\h 20 dk	0,9 km\h 20 dk	0,9 km\h 20 dk
2	Hız\Süre	0,11 km\h 20 dk	0,11 km\h 20 dk	0,11 km\h 25 dk	0,11 km\h 25 dk	0,11 km\h 25 dk

3	Hız\Süre	0,13 km\h 30 dk	0,13 km\h 30 dk	0,13 km\h 30 dk	0,13 km\h 35 dk	0,13 km\h 35 dk
4	Hız\Süre	0,15 km\h 35 dk	0,15 km\h 35 dk	0,15 km\h 40 dk	0,15 km\h 40 dk	0,15 km\h 40 dk
5	Hız\Süre	0,15 km\h 45 dk	0,15 km\h 45 dk	0,15 km\h 45 dk	0,15 km\h 50 dk	0,15 km\h 50 dk
6	Hız\Süre	0,15 km\h 50 dk	0,15 km\h 50 dk	0,15 km\h 55 dk	0,15 km\h 55 dk	0,15 km\h 55 dk

4.2.3.7. Kantitatif Real-Time PCR Analizleri

Tri Reagent ile Kalp, Kas, Yağ ve Damar Dokularından RNA İzolasyonu

1. 30-40 mg doku ependorf tüplere konularak üzerlerine 500 µl Tri Reagent eklendi.
2. Homojenizasyon boncuklarından doku miktarı kadar eklendi.
3. Dokular homojenizatörde 8. hızda 5 dk homojenize edildi.
4. Örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
5. Tüpler içindeki homojenizatör boncukları ile birlikte 12.000 x g'de 2 dk santrifüj edildi.
6. Süpernatant kısım yeni tüplere alındı ve üzerine 100 µl kloroform eklenip yaklaşık 15 sn vortekslendi.
7. Tüpler oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildi.
8. 12.000 x g'de 2-4°C'de 15 dk santrifüj edildi.
9. Santrifüj işleminden sonra 3 faza ayrılan sıvının en üst fazı yeni bir tüpe alındı.
10. 250 µl izopropil alkol eklendi.
11. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
12. 12.000 x g'de 2-4°C'de 10 dk santrifüj edildi.
13. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı
14. Pellet üzerine 500 µl %75'lik etanol eklendi.

15. Vortekslendi ve 7500 x g'de 2-4°C'de 5 dk santrifüj edildi.
16. Süpernatant atıldı ve etanol yıkama işlemi tekrarlandı.
17. Süpernatant atıldı ve tüpler bir müddet oda sıcaklığında bekletilerek etanolün uçması sağlandı.
18. Kuruyan tüplerin üzerine dietilpirokarbonatlı (DEPC) su eklendi ve pipetaj yapıldı.
19. İzole edilen RNA'lar kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

4.2.3.8. RNA Ölçümü

RNA ölçümüne başlamadan önce distile suyun kör olarak okutulmasıyla cihaz kalibre edildi. BioSpec-Nano (Shimadzu) cihazının ölçüm alanına 1 µl RNA konularak RNA miktarı ng/µl olarak ölçüldü. Her örnek okumasının ardından cihaz temizlenerek 2 dakika bekletildi.

Komplementer DNA (cDNA) sentezinde eşit RNA miktarlarında çalışılabilmesi için okunan en düşük RNA değeri standart olarak alındı. K, E, I/R, I/R+E, I/R+M ve I/R+E+M olmak üzere toplamda 6 farklı RNA havuzu oluşturuldu.

4.2.3.9. Komplementer DNA Sentezi

RT-PCR'ı için kullanılacak cDNA'ların hazırlanmasında havuz yapılan RNA örnekleri kullanıldı. Bunun için her örnekten 10 µl RNA alındı. cDNA sentezi toplam 20 µl hacimde gerçekleştirildi. Sentez için The High Capacity RNA-to-cDNA™ Kiti (Applied Biosystems, Katalog No: 4387406) kullanıldı (Tablo 4). Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve en son sıcaklık 4°C olacak şekilde cihazda bekletildi (Tablo 4). Oluşan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Tablo 3. cDNA karışım miktarı (20µl'lik reaksiyon) (The High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit, Applied Biosystems, Katalog No: 4387406).

Bileşik	Hacim (µl)
10X RT tamponu	2,0
25X dNTP karışımı (100mM)	0,8
MultiScribe™Revers Transkriptaz (50U/µl)	1
10XRT Random Primer	2
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4,2
RNA örneği	10
Reaksiyon toplamı	20

Tablo 4. cDNA sentezi PCR programı

PCR	1.Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	30 dk	120 dk	5 dk	∞

4.2.3.10. Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar dizi spesifik primerlerin varlığında Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (quantitative qRT-PCR) yöntemi ile çoğaltıldı. Sıçanların kalp ve kas dokularında tabloda belirtilen genlerin mRNA ifade düzeyleri incelendi. qRT-PCR analizleri sonucunda gen ifadelerindeki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanıldı.

Tablo 5. qRT-PCR'da Kullanılan Primerler (Qiagen, Almanya).

Primerler	Katalog Numarası
METRNL	PPR51535A
ATP5B	PPR53179A
PPARGC1A	PPR46783A

PRKAA2	PPR51543A
NRF1	PPR48314A
MFN2	PPR44137A
HIF1A	PPR45087B
CHRM1	PPR06806A
TFAM	PPR46611A
NFE2L2	PPR45094A
MFN1	PPR46301A
PPARGC1B	PPR51585A

qRT-PCR yapılırken pleytin kuyucuklarına cDNA örneklerinden 0,5 µl koyuldu. Her bir örnek için 1µl Eva Green Master Mix (Tonk Bio, Katalog No: TB20003B, Parsippany, USA), 3 µl nükleaz içermeyen su ve 0,5 µl primer hibridizasyon probu örnek sayısına göre bileşen miktarları hesaplanarak ependorflara bırakıldı ve vortekslendi. Pleytteki cDNA örneklerinin üzerine hazırlanan karışımdan 4,5 µl pipet ile bırakılarak pleytin üzeri optik filmle kapatıldı (Tablo 5). Pleyt örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla mini pleyt santrifüj cihazında 1 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu.

Tablo 6. RT-PCR İçin Kullanılan Bileşikler

Bileşikler	Hacim (µl) X Örnek Sayısı
cDNA	0,5
Primer	0,5
Eva Green Master Mix	1
Nükleaz içermeyen H ₂ O	3
Toplam	5

Gen ifade seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystem, MA, USA) sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 50°C’de 2 dakika, 95°C’de 10 dakika, 95°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı (Tablo 7).

Tablo 7. RT-PCR Programı

RT-PCR	1.Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Zaman	2 dk	10 dk	15 sn	1 dk

4.2.4. ELISA Analizleri

METRNL, ATP ve IL-4 ELİSA analizleri serum, kas ve kalp dokularında gerçekleştirildi. CK-MB analizleri ise sadece serum örneklerinde yapıldı.

ELİSA için serum örneklerinin hazırlanması:

1. Yöntemin uygulanabilmesi için dekapite edilen sıçanların kanları aprotininli tüplerde toplandı.
2. 3500 RPM’de, 5 dk santrifüjleme işlemi uygulandıktan sonra supernatant kısım alınarak ELISA testinde kullanılmak üzere -80°C’de saklandı.

ELİSA için doku örneklerinin hazırlanması:

4. Her bir hayvanın kalp ve kas dokularından 50 mg tartılarak ependorf tüplere kondu. Üzerine 450 ml PBS eklendi.
5. Ardından homojenizasyon işlemi yapılarak parçalara ayrıldı.
6. 4C°’de 4000 devirde 10 dk sanrifüj işlemi yapıldı.
7. Üstteki süpernatant kısım eliza için kullanıldı.

4.2.4.1. Sıçan CK-MB (Creatine Kinase MB Isoenzyme) ELİSA Kit Protokolü

Solüsyonların Hazırlanması:

Yıkama Tamponu: Kitte bulunan konsantre yıkama solüsyonundan 30 ml alındı ve üzerine 750 ml deiyonize distile su koyuldu.

Standart Solüsyonu: Her kitin protokolüne bağlı kalınarak 6 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.

Biotin-Etiketli Antikor Çalışma Solüsyonu: Her bir numune için 1 µl Biotin-etiketli antikor üzerine 99 µl antikor seyreltme tamponu eklendi (Örn: Numune sayısı*1 µl Biotin-etiketli antikor ve numune sayısı*99 µl antikor seyreltme tamponu).

HRP-Streptavidin Konjuge (SABC) Çalışma Solüsyonu: Her bir numune için 1 µl SABC üzerine 99 µl SABC seyreltme tamponu eklendi (Örn: Numune sayısı*1 µl SABC ve numune sayısı*99 µl SABC seyreltme tamponu).

Yöntem

1. Standartlardan ve numunelerden her bir kuyucuğa 50 µl koyuldu. Örneklerin kuyucuklardaki yerleri kaydedildi.
2. Kuyucuklardaki standart ve numunelerin üzerine 50 µl Biotin-Etiketli Antikor Çalışma Solüsyonu eklendi. Plate koruma membranı ile kapatılıp 37 °C'de 45 dk inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyondan sonra plate koruma membranı çıkarıldı. Sıvı boşaltılarak her kuyucuk 100 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyucuklarda yıkama tamponu 1 dk bekletilip döküldü ve yeniden eklendi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

4. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa 100 µl SABC çalışma solüsyonu eklendi. Plate koruma membranı ile kapatılıp 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyondan sonra plate koruma membranı çıkarıldı. Sıvı boşaltılarak her kuyucuk 100 µl yıkama tamponu ile 5 kez yıkama yapıldı. Tampon kuyucuklarda her defasında 1-2 dk bekletildi. Beşinci yıkama yapıp kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı.
6. Yıkamayı takiben her bir kuyucuğa 90 µl TMB substrat eklendi. Plate koruma membranı ile kapatılıp 37 °C'de 15-20 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. (Kuyucuklarda renk maviye dönüştü.)
7. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi. (Mavi renk hemen sarı renge dönüştü.)
8. Referans olarak 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında okuma yapıldı.
9. Hesaplama işlemi gerçekleştirildi.

4.2.4.2. METRNL, IL-4 ve ATP ELİSA Kitleri Protokolü

1. Tüm reaktifleri, örnekleri ve standartları hazırlandı;
2. Standartlar ve ELISA solüsyonu hazırlanmış örneklerin üzerine eklendi. 37 °C 'da 60 dakika boyunca tepkime vermeleri için beklendi.
3. Beş kez yıkama işlemi yapıldı. Kromojen A ve B solüsyonları eklendi. 37 °C de 10 dakika inkübe edildi; (renk değişimi için).
4. Stop solüsyonu eklendi.
5. 10 dakika içinde optimum değeri okundu.

4.2.5. Histopatolojik İncelemeler

4.2.5.1. Hematoksilen Eozin Boyama

Hematoksilen eozin rutin histopatolojik analizlerde en sık kullanılan boyadır. Hematoksilen koyu mavi-mor renklidir ve nükleik asitleri hala tam olarak anlaşılamamış bir reaksiyonla boyar. Eozin pembedir ve non-spesifik bir şekilde proteinleri boyar. Tipik bir dokuda çekirdekler mavi-siyah renkte, sitoplazma ve hücre dışı madde pembenin farklı tonlarında boyanır. İyi fikse olmuş dokularda intranükleer detaylar belirgindir. Çalışmamızda kalp dokularında METRNL'nin koruyucu etkisinin belirlenmesi için hematoksilen eosin boyama yöntemi kullanılarak kalp dokusu değerlendirildi.

Tablo 8. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi

1. Preparatlar etüvde	5-6 saat bekletildikten sonra 10-15 dk oda ısında soğutulur.
2. Xylolde 1 gece boyunca bekletilir.	
3. %100, %95, %80, %70 ve %50 etanol serilerinin her birinden sırasıyla 3, 2, 1, 1 ve 1 dakika olacak şekilde geçirildikten sonra distile suda 1 dakika bekletilir.	
4. Harris hematoksilen boyasında 3 dakika bekletildikten sonra 5 dk çeşme suyunda yıkanır.	
5. Asit- alkol solüsyonuna 8-10 defa daldırılıp çıkarıldıktan sonra distile suda 30 sn bekletilir.	
6. Blueing solüsyonu ile 1 dakika muamele yapılır.	
7. Çeşme suyu ile 2 dakika yıkanır.	
8. %80'lik alkolde 30 sn tutulur.	
9. Eosin ile 30 sn boyanır.	
10. %70 (1dk) , %95 (1dk), %95 (1dk), %100 (30 sn) ve %100 (30 sn) alkol serilerinden geçirilir.	
11. iki ardışık Xylol ve xylol solüsyonlarının her birinde 5 dk bekletilir.	
12. Entellan ile kapatılır.	

4.2.5.2. METRNL İmmünohistokimyasal Boyanması

Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu ile 5 dakika muameleden sonra primer antikorlar (Anti-METRNL antibody: Rabbit Meteorin-like protein Polyclonal Antibody. Cat No: MBS7004241: MyBioSource, Inc. P.O. Box 153308 San Diego, CA 92195-3308, USA) ile 60 dakika inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biotinylated anti-rabbit IgG) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikor uygulanmasından sonra Streptavidin Alkaline Phosphatase (TS-060-AP, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra distile su içerisine alındı. Dokulara Fast Red Substrate System (TA-125-AF, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak distile su ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilin ile zıt boyaması yapılan dokular distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX 50 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı esas alındı. İmmün boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı 0'dan +4'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (0: Yok, +1: Çok Az, +2: Az, +3: Orta, +4: Şiddetli).

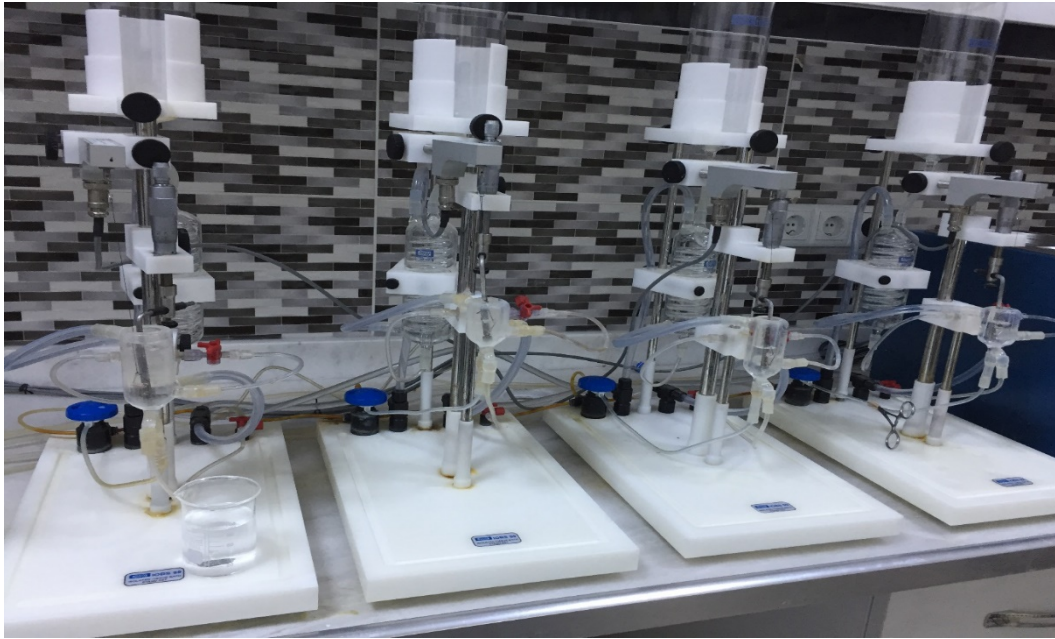
4.2.6. İzole Organ Banyosu Deneyi

Damar kasılması üzerine METRNL proteinin etkilerinin belirlenmesi amacıyla bu yöntem kullanıldı. Wistar albino cinsi erkek sıçanlar herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan ve herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamasına dikkat edilerek anestezi uygulanmadan dekapite edildi. Yaklaşık 4 mm boyutundaki aort damarı kesildi. Aort halkaları, lümeninden birbirine paralel iki paslanmaz çengel geçirilerek içerisinde 37°C'ta ısıtılmış ve %95 O₂ + %5 CO₂ karışımı ile gazlandırılan Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu bulunan değişken kapasiteli haznelere (5,10,50 ml'lik) sahip organ banyosuna asıldı. İzole organ banyoları iç içe iki katmandan oluşmaktadır. İki katman arasında termosirkulatörde ısıtılmış su, iç katmanın içinde ise Krebs solüsyonu ve çalışmalarda kullanılan düz kas şeritlerinin asılacağı düzenek bulunmaktadır. Krebs çözeltisi in vivo ortamdaki fizyolojik şartları invitro ortamda da belli ölçülerde sağlayan bir çözeltidir. Krebs solüsyonu içeriği mM/L olarak aşağıdaki tabloda belirtildiği gibidir.

Tablo 9. Krebs Solusyonu İçeriği mM/L

NaCl	118
KCl	4.7
MgSO ₄	1.2
Glikoz	11.5
CaCl ₂	2.4
KH ₂ PO ₄	1.18
NaHCO ₃	15.8
EDTA	0.016

Alt çengel izole organ banyosunun tutma kısmına ve üst çengel ise izometrik kasılma cevaplarını kaydetmek için force-displacement transducerlerine (FT 0.03) bağlandı. Kayıtlar BİOPAC marka (Model MP36) multirecorder ile yapıldı. İzole organ banyosuna asılan aort halkaları 2 gramlık istirahat gerimi altında 1 saat boyunca dengelenmesi için bekletildi. İzole organ banyosundaki Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu, her 15 dakikada bir taze solüsyonla değiştirildi.



Şekil 11. İzole Organ Banyosu Deney Düzeneği.

Fenilefrin (FNP) kasılma cevaplarının belirlenmesi için aortik halkalarda artan konsantrasyonda fenilnefrin (10^{-9} - 10^{-4} mol/L) kümülatif olarak verildi ve her dozda kasılma platoları net bir şekilde görülmeden diğer doza geçilmedi.

Asetilkolin (ACH) ve sodyum nitroprüssid (SNP) gevşeme cevaplarının belirlenmesi için artan dozlarda fenilnefrin uygulamasıyla elde edilen eğriden submaximal doz belirlendi. Sonrasında submax fenilnefrin dozu ile kasılma

yapıldıktan sonra asetilkolin ve SNP artan konsantrasyonda (10^{-9} - 10^{-4} mol/L) kümülatif olarak verildi. Konsantrasyonlar % kasılma cevabı olarak ifade edildi.

METRNL peptid 12,5 µg/ml dozunda uygulandı. Kasılma ve gevşeme cevapları 30 dk boyunca kaydedildi. 30dk sonunda yıkamalar yapılmadan damar örnekleri qRT-PCR için sıvı azotta donduruldu.



4.2.8.İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizler SPSS 16 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programı kullanılarak yapıldı. İnsan serumunda METRNL düzeyi tespiti, qRT-PCR analizleri, ELISA testi değerleri, izole organ banyosu gibi parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması için Mann Whitney U ve T testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.



5. SONUÇLAR

5.1. MI'lı Hastalarda Serum METRNL Analiz Sonuçları

METRNL düzeyleri hasta ve kontrol grubunda cinsiyetlere göre karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$) (Tablo 10).

Tablo 10. Hasta ve Kontrol Grubunda Serum METRNL Konsantrasyonlarının Cinsiyetlere Göre Dağılımı

METRNL DÜZEYLERİ			
Gruplar	Kadın	Erkek	P değeri
MI grubu	1,54 ±0,23	1,79 ±0,19	0,45
Kontrol grubu	1,94 ±0,62	1,90 ±0,46	0,96

Veriler oran (yüzde) ve ortalama $\pm$ standart sapma veya standart hata olarak sunuldu.

*Eşleştirilmiş student t, Mann- Whitney U ve ki kare testleri uygulandı. $p<0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

Hasta grubunda METRNL ile yaş, boy, kilo, BMI, Troponin-T, CK-MB, LDH, nabız, b.tansiyon, k.tansiyon, sol sistolik çap, sol diastolik çap, sol ventriküler kalınlık, sağ diastolik çap, sağ sistolik çap ve ef değerleri arasında korelasyon analizi yapıldığında METRNL ile bu veriler arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Benzer şekilde kontrol grubunda da METRNL ile yaş, boy, kilo, BMI, Troponin-T, CK-MB, LDH, nabız, b.tansiyon, k.tansiyon arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Tablo 11).

Tablo 11. Hastaların Demografik, Klinik ve Biyokimyasal Karakteristikleri

Değişkenler	Kontrol Grubu (n=225) (ortalama±SD)	AMI Grubu (n=225) (ortalama±SD)	P* değeri
Yaş (yıl)	63,83 ±12,25	64,11 ±12,28	0,834
Cinsiyet (E/K)	148/77	156/69	0,421
Hipertansiyon (%)	-----	(54,2) 122	-----
	-----	(44) 99	-----
Diyabet(%)	24,4 ±4,82	26,46 ±4,76	0,158
Vücut-Kütle İndeksi (kg/m2)	(47,6) 107	(44,4) 100	0,508
Sigara içme(%)	-----	(67,6) 152	-----
Aile öyküsü(%)	27,45 ± 25,68	69,01 ±61,38	0,001
CK-MB (ng/ml)	0,7 ±1,74	11,94 ± 11,05	0,001
Troponin-T (ng/ml)	118,2 ±21	117,7 ±26	0,72
Sistolik Kan Basıncı (mm/Hg)	76 ±9	78,16 ±16,18	0,13
Diastolik Kan Basıncı (mm/Hg)	285,4 ±90,57	334,24 ±146,1	0,257
LDH (mg/dl)	1,92 ± 0,37	1,68 ± 0,13	0,461
METRNL (ng/ml)	-----	-----	-----
Miyokard İnfarktus Tipi (%)	-----	-----	-----
A.inferiyor		(48,9) 110	
A.anteriyor		(36) 81	
NSTMI		(15,1) 34	

Veriler oran (yüzde) ve ortalama ± standart sapma veya standart hata olarak sunuldu.

*Eşleştirilmiş student t, Mann- Whitney U ve ki kare testleri uygulandı. p<0,05 anlamlı olarak değerlendirildi.

METRNL düzeyleri açısından HP, diyabet, MI tipi ve aile öyküsü arasında anlamlı bir ilişki olmadığı gözlemlendi (Tablo 12).

Tablo 12. Hasta Grubu İçinde Biyokimyasal ve Demografik Verilerle Serum METRNL Düzeyleri Arasındaki İlişki

Gruplar	METRNL düzeyleri	P* değeri
HP olanlar/ olmayanlar	1.96±0.31-1.57±0.15	0.28 (t= 1.09)
Diyabet olanlar/olmayanlar	1.71±0.29-1.84±0.22	0.72 (t= -0.36)
Anterior MI/ inferior MI	1.97± 0.44- 1.73 ±0.27	0.63 (t= -0.48)
Aile öyküsü olanlar/ olmayanlar	1.94 ±0.27 – 1.49±0.10	0.27 (t= 1.11)

Veriler ortalama ± standart sapma veya standart hata olarak sunuldu. * Student t ve Mann-Whitney U uygulandı. p<0,05 anlamlı olarak değerlendirildi.

5.2.qRT-PCR Verilerinin Değerlendirilmesi

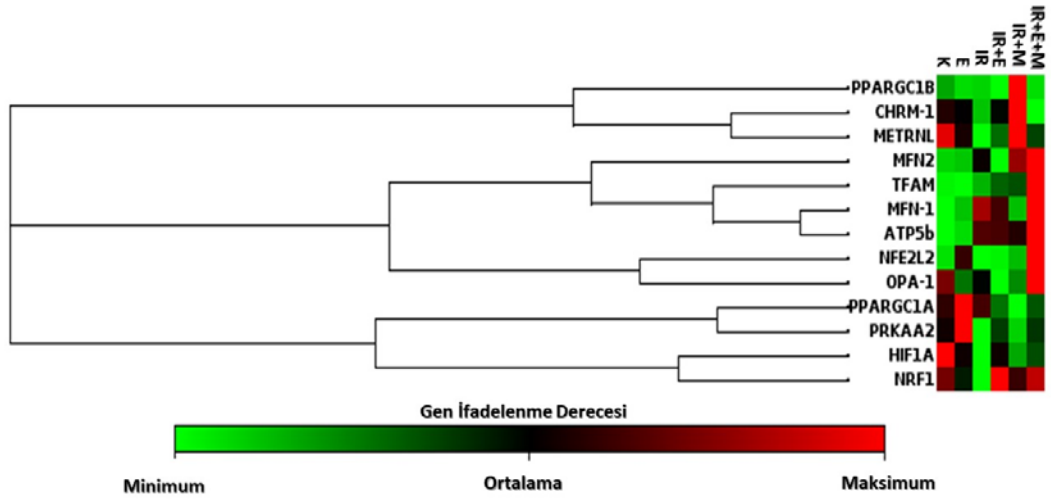
5.2.1.Kalp Dokusunda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi

Kalp dokusunda mRNA kat değişim verileri değerlendirildiğinde: kontrol grubuna göre egzersiz grubunda anlamlı bir kat değişimi görülmemiştir. Kontrole göre I/R grubunda CHRM1’de (p= 0,037) ve METRNL (p=0,049) anlamlı azalma ve ATP5B(p= 0,013)’de anlamlı artma saptanmıştır. Kontrole göre I/R+M grubunda ATP5B’de (p=0,03) anlamlı artma gözlenmiştir. Kontrole göre I/R+E grubunda PPARGC1B (p= 0,013) ve ATP5B (p= 0,02) genlerinde anlamlı artma belirlenmiştir. Kontrole göre I/R+E+M grubunda ATP5B (p= 0,008), MFN2’de (p= 0,036) ve TFAM (p= 0,045) genlerinde anlamlı derecede artma ve CHRM1’de (p= 0,0170) anlamlı azalma gözlenmiştir (Tablo 13). Şekil 14’ te kalp dokusunda analiz edilen genlerin clustergram analiz grafiği verilmiştir.

Tablo 13. Kalp Dokusunda Analiz Edilen Genlerin mRNA Kat Değişimleri.

K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon. p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.

No	Sembol	Egzersiz		I/R		I/R+M		I/R+E		I/R+E+M	
		mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA Kat değişimi	p değeri	mRNA Kat değişimi	p değeri
1	GAPDH	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
2	NFE2L2	1,2	0,476	0,97	0,907	0,98	0,929	1,02	0,94	1,35	0,265
3	MFN-1	1,07	0,78	1,58	0,125	1,44	0,193	1,08	0,76	1,7	0,088
4	PPARGC1B	0,82	0,453	0,85	0,531	0,72	0,246	2,32	0,03	0,82	0,439
5	OPA-1	0,75	0,289	0,87	0,564	0,6	0,112	0,72	0,25	1,14	0,617
6	TFAM	0,98	0,929	1,13	0,636	1,3	0,327	1,33	0,28	2,01	0,045
7	HIF1A	0,81	0,412	0,6	0,109	0,81	0,412	0,66	0,17	0,74	0,271
8	CHRM-1	0,92	0,715	0,43	0,037	0,9	0,656	1,53	0,14	0,29	0,017
9	PPARGC1A	1,26	0,376	1,02	0,935	0,79	0,374	0,61	0,12	0,83	0,468
10	PRKAA2	1,21	0,461	0,75	0,298	0,93	0,756	0,79	0,37	0,93	0,777
11	NRF1	0,92	0,715	0,79	0,362	1,07	0,78	0,96	0,86	1,04	0,89
12	METRNL	0,78	0,35	0,49	0,049	0,65	0,15	1,02	0,94	0,69	0,197
13	ATP5B	1,21	0,461	3,16	0,013	3,1	0,013	2,86	0,02	4,28	0,008
14	MFN2	1,03	0,912	1,54	0,138	0,9	0,656	1,89	0,06	2,14	0,036



Şekil 12. Kalp Dokuda qRT-PCR İle Analiz Edilen Genlerin Clustergram Haritalaması. K:

Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

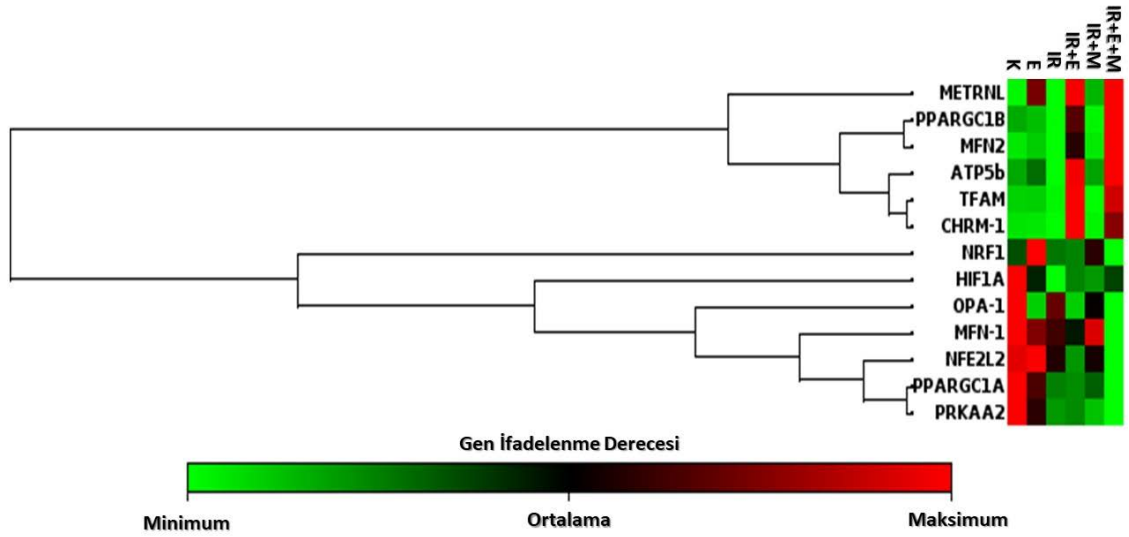
5.2.2. Kas Dokusunda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi

Kas dokusunda mRNA kat değişimi verileri değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre egzersiz yapan grupta NRF1 ($p=0,029$) ve METRNL ($p=0,030$) genlerinde anlamlı derecede artma gözlemlendi. Kontrole göre I/R grubunda HIF1A($p=0,021$), PPARGC1A ($p=0,022$), PRKAA2($p=0,023$) ve ATP5B ($p=0,038$) genlerinde anlamlı azalma belirlenmiştir. Kontrole göre I/R+M grubunda TFAM ($p=0,014$) ,CHRM1 ($p=0,004$), METRNL($p=0,018$), ATP5B ($p=0,009$) ve MFN2 ($p= 0,006$) genlerinde anlamlı artma saptanmıştır. PPARGC1A ($p=0,019$), PRKAA2 ($p=0,025$) ve HIF1A ($p=0,049$) genlerinde anlamlı azalma görülmüştür. Kontrole göre I/R+E grubunda HIF1A ($p=0,05$), PPARGC1A ($p=0,030$) ve PRKAA2 ($p=0,02$) genlerinde anlamlı azalma belirlenmiştir. Kontrole göre I/R+E+M grubunda NFE2L2 ($p=0,027$), MFN1 ($p=0,011$), PPARGC1A ($p=0,007$), PRKAA2 ($p=0,01$) ve NRF1 ($p=0,02$) genlerinde anlamlı azalma görülürken METRNL ($p=0,018$), PPARGC1B ($p=0,034$), CHRM1 ($p=0,005$), ATP5B ($p=0,009$) ve MFN2 ($p=0,004$) genlerinde anlamlı derecede artma belirlenmiştir (Tablo 14). Şekil 15'te kas dokusunda analiz edilen genlerin clustergram analiz grafiği verilmiştir.

Tablo 14. Kas Dokusunda Analiz Edilen Genlerin mRNA Kat Değişimleri.

No	Symbol	E		I/R		I/R+M		I/R+E		I/R+E+M	
		mRNA kat değişimi	P değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri
1	GAPDH	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
2	NFE2L2	1,03	0,912	0,74	0,28	0,5	0,057	0,72	0,25	0,36	0,027
3	MFN-1	0,8	0,386	0,7	0,21	0,56	0,086	0,94	0,8	0,2	0,011
4	PPARGC1B	0,94	0,798	0,76	0,318	1,71	0,085	0,79	0,36	2,18	0,034
5	OPA-1	0,68	0,185	0,89	0,637	0,68	0,185	0,82	0,45	0,65	0,15
6	TFAM	1,02	0,957	0,84	0,484	3,05	0,014	0,81	0,41	2,84	0,017
7	HIF1A	0,62	0,126	0,33	0,021	0,49	0,049	0,46	0,05	0,58	0,096
8	CHRM-1	0,92	0,735	0,62	0,126	8,22	0,004	0,76	0,32	6,4	0,005
9	PPARGC1A	0,69	0,197	0,34	0,022	0,31	0,019	0,39	0,03	0,12	0,007
10	PRKAA2	0,66	0,164	0,35	0,023	0,37	0,025	0,28	0,02	0,18	0,01
11	NRF1	2,28	0,029	0,84	0,499	0,79	0,374	1,46	0,18	0,32	0,02
12	METRNL	2,26	0,03	0,98	0,93	2,71	0,018	1,23	0,43	2,73	0,018
13	ATP5B	1,4	0,222	0,43	0,038	3,78	0,009	1,04	0,89	3,86	0,009
14	MFN2	1,43	0,2	0,65	0,159	5,24	0,006	0,96	0,86	8,57	0,004

K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon. $p < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

**Şekil 13.** Kas Dokuda qRT-PCR İle Analiz Edilen Genlerin Clustergram Haritalaması.

K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

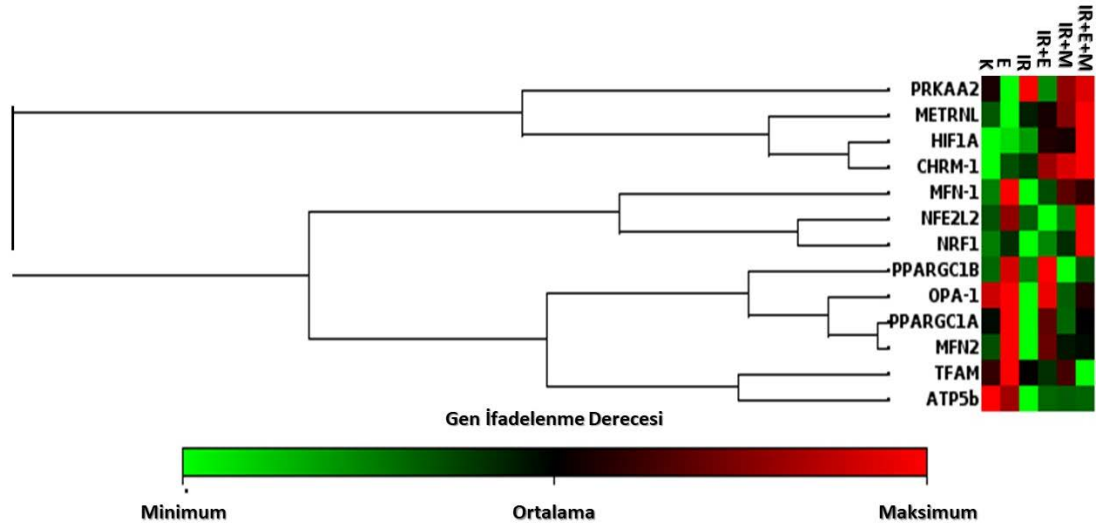
5.2.3.Beyaz Yağ Dokuda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi

BY dokusunda mRNA kat değişimi verileri değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre I/R grubunda ATP5B geninde (p=0,020) azalma gözlenmiştir. Diğer gruplardaki gen ifadelerinde herhangi bir değişim görülmemiştir (Tablo 15). Şekil 16'da BY dokusunda analiz edilen genlerin clustergram analiz grafiği verilmiştir.

Tablo 15. BY Dokusunda Analiz Edilen Genlerin mRNA Kat Değişimleri.

No	Symbol	Egzersiz		I/R		I/R+M		I/R+E		I/R+E+M	
		mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p value
1	GAPDH	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
2	NFE2L2	1,29	0,34	0,98	0,92	0,779	0,34	0,952	0,81	1,43	0,2
3	MFN-1	1,35	0,27	0,88	0,6	1,049	0,86	1,205	0,47	1,16	0,561
4	PPARGC1B	1,27	0,36	0,97	0,9	1,31	0,31	0,87	0,56	1,02	0,957
5	OPA-1	1,04	0,89	0,61	0,12	1,028	0,93	0,752	0,28	0,85	0,531
6	TFAM	1,25	0,39	0,93	0,77	0,876	0,58	1,021	0,95	0,61	0,116
7	HIF1A	1,03	0,91	1,1	0,71	1,301	0,32	1,292	0,33	1,53	0,142
8	CHRM-1	1,13	0,64	1,15	0,57	1,31	0,31	1,356	0,26	1,38	0,238
9	PPARGC1A	1,27	0,36	0,74	0,27	1,109	0,69	0,907	0,67	1,01	0,98
10	PRKAA2	0,86	0,55	1,1	0,69	0,92	0,71	1,057	0,84	1,09	0,737
11	NRF1	1,17	0,54	0,72	0,24	0,979	0,9	1,172	0,54	1,8	0,069
12	METRNL	0,85	0,53	1,04	0,86	1,094	0,73	1,189	0,5	1,29	0,338
13	ATP5B	0,87	0,58	0,33	0,02	0,532	0,06	0,543	0,07	0,53	0,07
14	MFN2	1,51	0,15	0,73	0,25	1,283	0,35	1,094	0,73	1,1	0,696

K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon. p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.



Şekil 14. BY Dokuda qRT-PCR İle Analiz Edilen Genlerin Clustergram Haritalaması.

K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

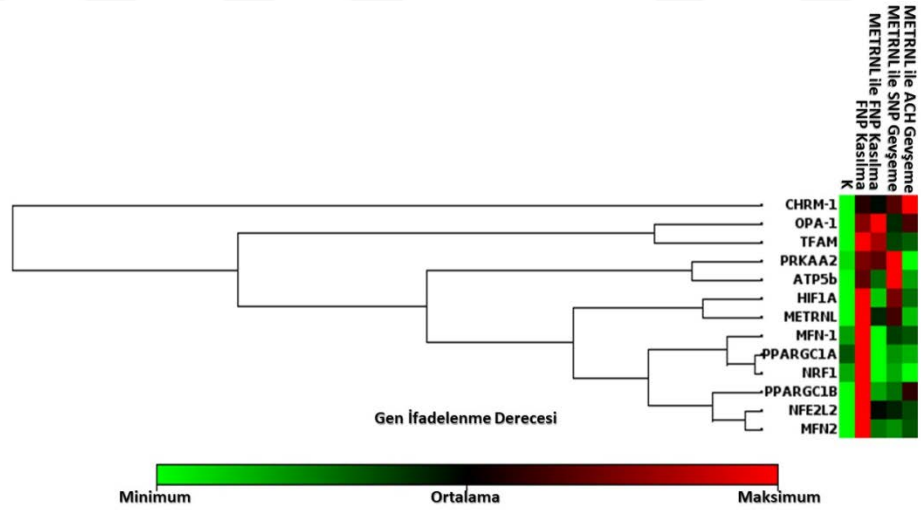
5.2.4. Damar Dokuda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi

FNP kasılması olan grupta HIF1A ($p=0,037$) ve ATP5B ($p=0,014$) genlerinde anlamlı artma gözlenirken, METRNL ile SNP gevşeme protokolü uygulanan grupta ATP5B ($p=0,009$) geninin anlamlı artması gözlenmiştir (Tablo 16). Şekil 17’de damar dokusunda analiz edilen genlerin clustergram analiz grafiği verilmiştir.

Tablo 16. Damar Dokusunda Analiz Edilen Genlerin mRNA Kat Değişimleri

No	Symbol	FNP Kasılma		METRNL ile FNP Kasılma		METRNL ile SNP Gevşeme		METRNL ile ACH Gevşeme	
		mRNA kat değişimi	P değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri
1	GAPDH	1	0	1	0	1	0	1	0
2	NFE2L2	1,81	0,067	1,39	0,23	1,35	0,265	1,29	0,338
3	MFN-1	1,64	0,103	0,85	0,514	1,15	0,579	1,11	0,675
4	PPARGC1B	1,49	0,163	1,08	0,758	1,14	0,617	1,29	0,338
5	OPA-1	1,15	0,579	1,2	0,476	1,08	0,758	1,13	0,636
6	TFAM	1,44	0,193	1,36	0,256	1,16	0,561	1,14	0,617
7	HIF1A	2,12	0,037	1,11	0,675	1,82	0,066	1,31	0,305
8	CHRM-1	1,09	0,737	1,07	0,78	1,1	0,696	1,16	0,561
9	PPARGC1A	1,22	0,446	0,88	0,618	0,95	0,841	0,93	0,777
10	PRKAA2	1,07	0,78	1,07	0,801	1,1	0,696	0,99	0,952
11	NRF1	1,33	0,284	0,93	0,756	1	0,974	0,93	0,756
12	METRNL	1,46	0,18	1,19	0,493	1,29	0,338	1,05	0,845
13	ATP5B	3,01	0,014	1,86	0,06	3,94	0,009	1,53	0,142
14	MFN2	1,61	0,113	1,16	0,561	1,13	0,636	1,2	0,476

K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon. METRNL: Meteririn benzeri, FNP: Fenilnefrin, SNP: Sodyum nitroprussid, ACH: Asetilkolin. $p < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

**Şekil 15.** Damar Dokuda qRT-PCR İle Analiz Edilen Genlerin Clustergram Haritalaması.

K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

5.3. ELISA Testi Verilerinin Değerlendirilmesi

5.3.1. ATP'nin Serum, Kalp, Kas Düzeylerinde Değerlendirilmesi

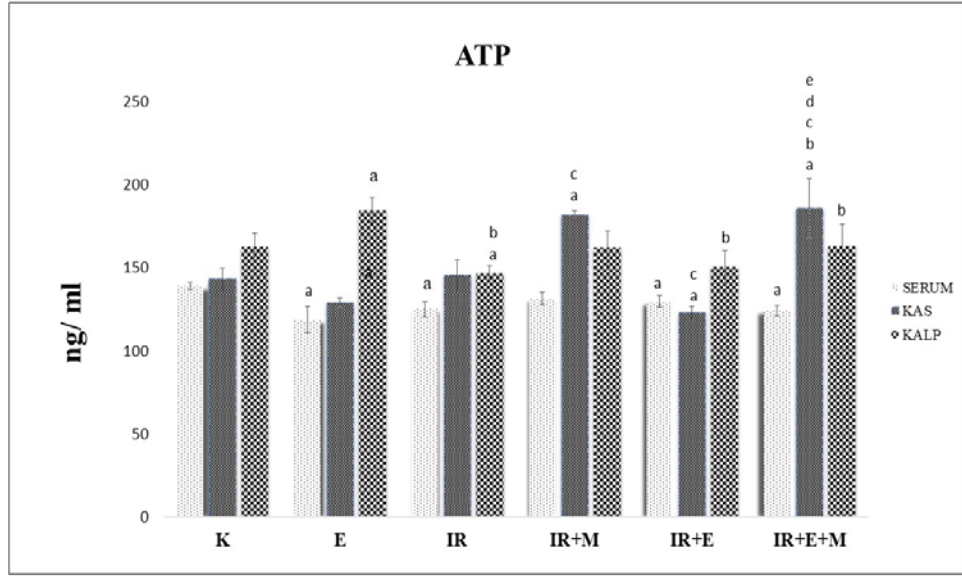
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında egzersiz grubunun serum ATP düzeylerinde ($p=0,025$) anlamlı azalma ve kalp dokusunda ($p=0,049$) anlamlı artma belirlenmiştir. Kontrole göre I/R grubunun serum düzeylerinde ($p=0,014$) anlamlı azalma, kalp dokusunda ($p=0,005$) anlamlı artma gözlenmiştir. Kontrole göre I/R+M grubunun kas dokusunda ($p=0,033$) anlamlı artma belirlenmiştir. Kontrole göre I/R+E+M grubunun serum ($p=0,003$) düzeylerinin anlamlı azaldığı gözlenirken, kas dokusu ($p= 0,00$) düzeylerinde anlamlı artma olduğu saptanmıştır.

Egzersiz grubu ile karşılaştırıldığında; I/R grubunun kalp dokusunda ($p=0,001$) anlamlı azalma, I/R+E grubunun kalp dokusunda ($p=0,013$) anlamlı azalma, I/R+E+M grubunun kas dokusunda ($p=0,00$) anlamlı artma ve kalp dokusunda ($p=0,049$) anlamlı azalma gözlenmiştir.

İskemi-reperfüzyon grubu ile karşılaştırıldığında; I/R+M grubunun kas dokusunda ($p=0,002$) anlamlı artma, I/R+E grubunun kas dokusunda ($p=0,003$) anlamlı azalma, I/R+E+M grubunun kas dokusunda ($p=0,001$) anlamlı olarak artma bulunmuştur.

I/R+M grubu ile karşılaştırıldığında I/R+E+M grubunun kas dokusunda ($p=0,00$) anlamlı artma gözlenmiştir.

I/R+E grubu ile karşılaştırıldığında I/R+E+M grubunda kas dokusu ATP düzeyi ($p=0,00$) anlamlı olarak artmıştır.



Şekil 16. ATP ELİSA Serum, Kalp, Kas Düzeyleri. ^aKontrol grubuna göre grubu karşılaştırıldığında. ^bE grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cI/R grubuna göre karşılaştırıldığında. ^dI/R+M grubuna göre karşılaştırıldığında. ^eI/R+E grubuna göre karşılaştırıldığında, $p < 0.05$.
K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

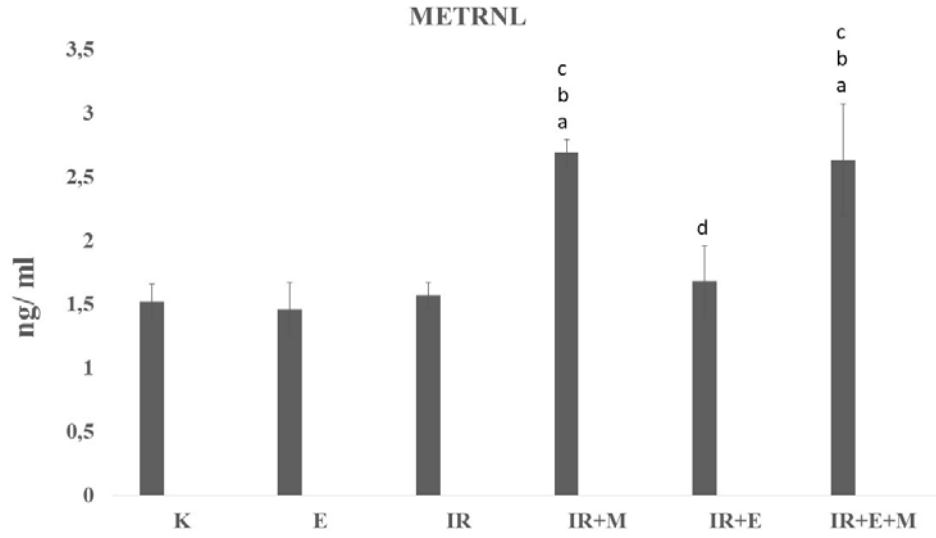
5.3.2. METRNL'nin Serum Düzeylerinde Gruplara Göre Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında I/R+M ve IR+E+M ($p=0,00$ ve $p=0,00$, sırasıyla) gruplarının serum METRNL düzeylerinde anlamlı derecede artma gözlenmiştir.

Egzersiz ile karşılaştırıldığında I/R+M ve IR+E+M ($p=0,02$ ve $p=0,02$, sırasıyla) gruplarının serum METRNL düzeylerinde anlamlı derecede artma belirlenmiştir.

I/R grubu ile karşılaştırıldığında I/R+M ve IR+E+M ($p=0,002$ ve $p=0,002$, sırasıyla) gruplarının serum METRNL düzeylerinde anlamlı derecede artma olduğu görülmüştür.

I/R+M ile karşılaştırıldığında I/R+E ($p=0,018$) grubunun serum METRNL düzeyinde anlamlı derecede azalma olduğu belirlenmiştir.



Şekil 17. METRNL ELİSA Serum Düzeyleri. ^aKontrol grubuna göre grubu karşılaştırıldığında. ^bE grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cI/R grubuna göre karşılaştırıldığında. ^dI/R+M grubuna göre karşılaştırıldığında. ^eI/R+E grubuna göre karşılaştırıldığında, $p<0.05$. K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

5.3.3. IL-4'ün Serum, Kalp, Kas Düzeylerinde Gruplara Göre Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında; egzersiz grubunun kas dokusunda ($p=0,01$) ve kalp dokusunda ($p= 0,00$) anlamlı azalma gözlenmiştir. I/R grubunun kas dokusunda ($p=0,048$) ve kalp dokusunda ($p= 0,005$) anlamlı azalma belirlenmiştir. I/R+M grubunun kas dokusunda ($p=0,008$) anlamlı azalma belirlenmiştir. I/R+E+M grubunun kas dokusunda ($p=0,001$) anlamlı artma gözlenmiştir.

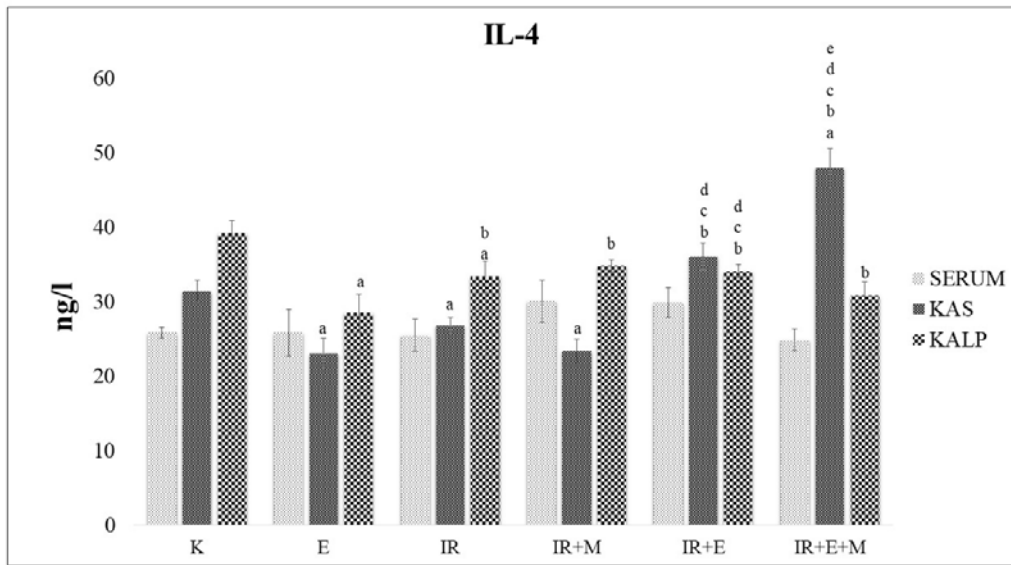
Egzersiz grubuna göre; I/R grubunun kalp dokusunda ($p=0,00$) ve I/R+M grubunun kalp dokusunda ($p= 0,001$) anlamlı artma gözlenmiştir. I/R+E grubunun kalp dokusunda ($p=0,00$) ve kas dokusunda ($p=0,002$) anlamlı artma

belirlenmiştir. I/R+E+M grubunun kas dokusunda ($p=0,00$) ve kalp dokusunda ($p=0,00$) anlamlı artma bulunmuştur.

I/R grubu ile karşılaştırıldığında; I/R+E grubunun kalp dokusunda ($p=0,003$) anlamlı azalma ve kas dokusunda ($0,005$) anlamlı artma gözlenmiştir.

I/R+M grubu ile karşılaştırıldığında; I/R+E grubunun kalp dokusunda ($p=0,03$) anlamlı azalma gözlenirken kas dokusunda ($p=0,002$) anlamlı derecede artma olduğu gözlenmiştir.

I/R+E grubu ile karşılaştırıldığında; I/R+E+M grubunun kas dokusunda ($p=0,007$) anlamlı artma olduğu belirlenmiştir.



Şekil 18. IL-4 ELİSA Serum, Kalp, Kas Düzeyleri. ^aK grubuna göre grubu karşılaştırıldığında. ^bE grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cI/R grubuna göre karşılaştırıldığında. ^dI/R+M grubuna göre karşılaştırıldığında. ^eI/R+E grubuna göre karşılaştırıldığında, $p<0.05$. K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

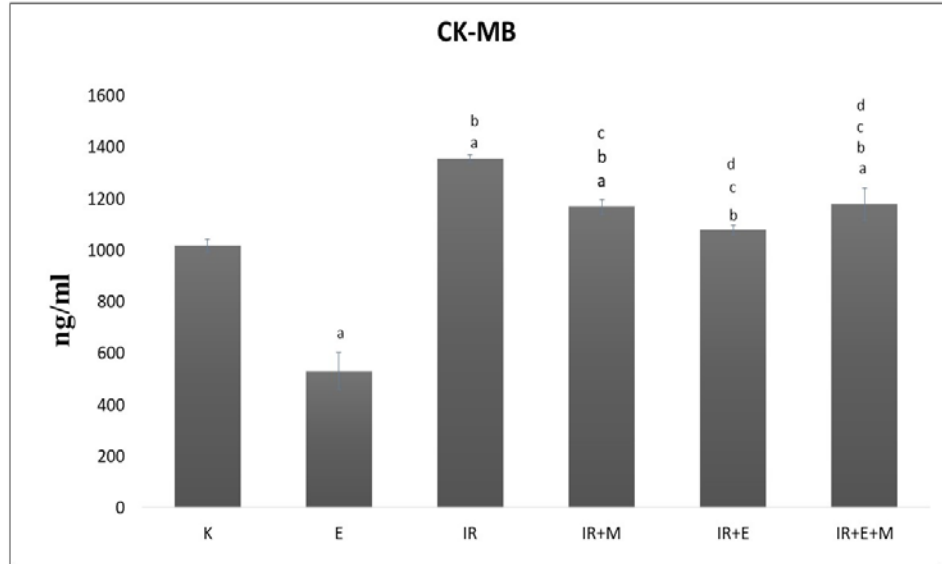
5.3.4. CK-MB'nin Serumda Gruplara Göre Değerlendirilmesi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; Serumdaki CK-MB düzeyi egzersiz grubunda ($p=0,00$), I/R grubunda ($p=0,00$), I/R+M grubunda ($p=0,008$) ve I/R+E+M grubunda ($p=0,044$) anlamlı bir artma göstermiştir.

Egzersiz grubu ile karşılaştırıldığında; Serumdaki CK-MB düzeyi I/R grubunda ($p=0,001$), I/R+M grubunda ($p=0,001$), I/R+E grubunda ($p=0,00$) ve I/R+E+M grubunda ($p=0,00$) anlamlı artma olduğu bulunmuştur.

I/R grubu ile karşılaştırıldığında; Serumdaki CK-MB düzeyi I/R+M, I/R+E ve I/R+E+M gruplarında ($p=0,00$, $p=0,00$ ve $p=0,49$, sırasıyla) anlamlı azalma gözlenmiştir.

I/R+M grubu ile karşılaştırıldığında; Serumdaki CK-MB düzeyi I/R grubunda ($p=0,001$) anlamlı artma ve I/R+E grubunda ($p=0,030$) ise anlamlı azalma göstermiştir.



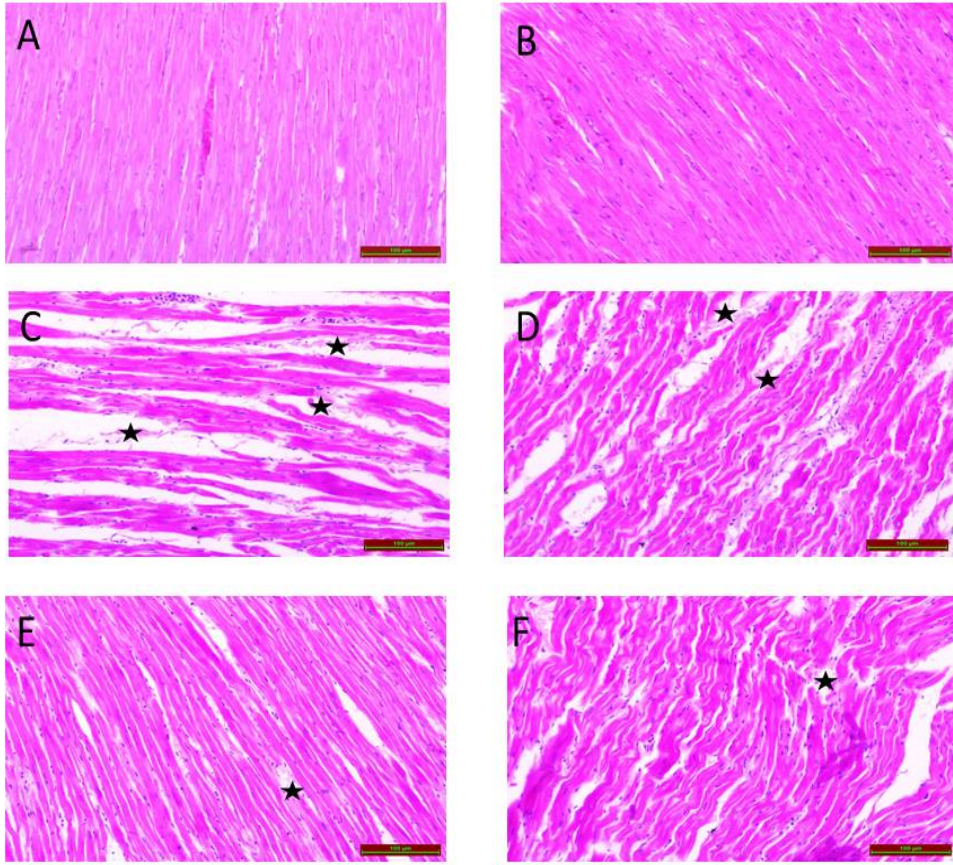
Şekil 19. CK-MB ELİSA Serum, Kalp, Kas düzeyleri. ^aKontrol grubuna göre grubu karşılaştırıldığında. ^bE grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cI/R grubuna göre karşılaştırıldığında.

^dI/R+M grubuna göre karşılaştırıldığında. ^eI/R+E grubuna göre karşılaştırıldığında. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

5.4. Histolojik Bulgular

Yapılan hematoksilin&eozen boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu;

Kalp dokusu K (A) ve E (B) gruplarında normal histolojik görünümdeydi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında I/R (C) grubunda kalp dokusunda belirgin olarak ödemin eşlik ettiği ayrılma ve bozulmalar (siyah yıldız) izlendi. I/R grubu ile kıyaslandığında bu histopatolojik değişiklikler I/R+E (E) grubunda daha belirgin olmak üzere I/R+M (D) ve I/R+E+M (F) gruplarında azalmış olarak gözlemlendi.



Şekil 20. Kalp Dokularının Hematoksilen Eozin İle Boyanması. Histopatolojik olarak sıçan kalp kesitleri; (A) Normal grup: Normal myokardium morfolojisi ve düzenli hücre dağılımı gösterdi. (B) E grubu: Normal myokardium morfolojisi ve düzenli hücre dağılımı gösterdi. (C) I/R grubu: Myofibriler kayıplar ve sitoplazmik vakuoller gözlemlendi. (D) I/R+M: I/R grubuna göre I/R grubuna göre myokardial lezyonlarda anlamlı azalma gözlemlendi. (E) I/R+Egzersiz: I/R grubuna göre myokardial lezyonlarda anlamlı azalma gözlemlendi. (F): I/R+M+E: I/R grubuna göre myokardial lezyonlarda anlamlı azalma gözlemlendi. K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

5.4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

5.4.1.1. Kalp Dokusuna Ait Bulgular

METRNL immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; METRNL immünreaktivitesi kalp dokusunda kalp kası hücrelerinin çevresindeki bağ dokuda (kırmızı ok), gözlemlendi.

Kalp dokusunda Meteorin immünreaktivitesi; Kontrol (A) ve egzersiz gruplarıyla kıyaslandığında I/R (C), I/R+E (E) ve I/R+E+M (F) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu ($p<0.05$). I/R+M grubu ile karşılaştırıldığında METRNL immünreaktivitesi I/R+E ve I/R+E+M gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu ($p<0,05$).

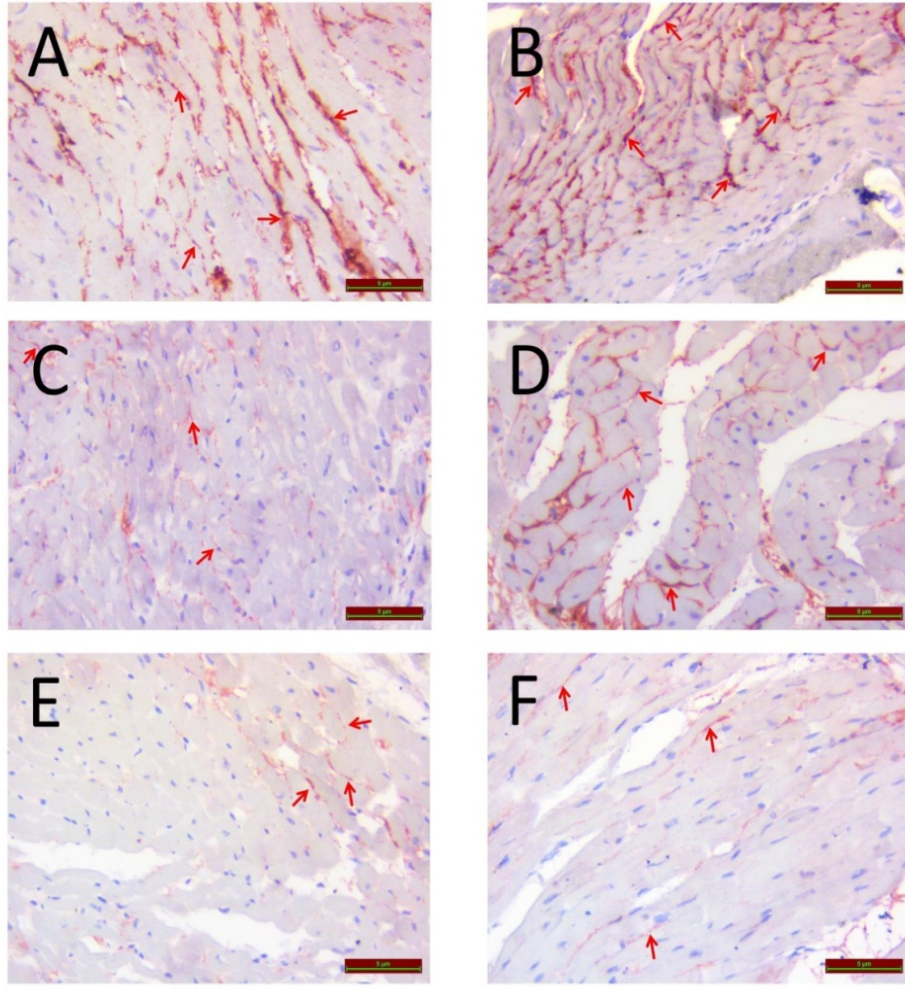
Tablo 17. Kalp dokuda METRNL histoskorları.

Gruplar	Histoskor
Kontrol	2,40±0,51
Egzersiz	2,25±0,49
İskemi Reperfüzyon	0,42±0,03 ^{ab}
İskemi- Meteorin	2,20±0,86
İskemi- Egzersiz	0,45±0,21 ^{abd}
İskemi- Egzersiz- Meteorin	0,37±0,1 ^{abd}

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b Egzersiz grubu ile karşılaştırıldığında, ^c İskemi- Meteorin ile karşılaştırıldığında. $p<0,05$

anlamlı olarak kabul edildi. K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.



Şekil 21. Kalp Dokuda METRNL İmmünohistokimyasal Boyanması. Gruplar arasında METRNL düzeyleri açısından kontrole göre iskemi meteorin grubu hariç METRNL düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. K (A), E (B), I/R (C), I/R+M (D), I/R+E (E) ve I/R+E+M (F). K: Kontrol, E: Eggersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

5.4.1.2. İskelet Kasına Ait Bulgular

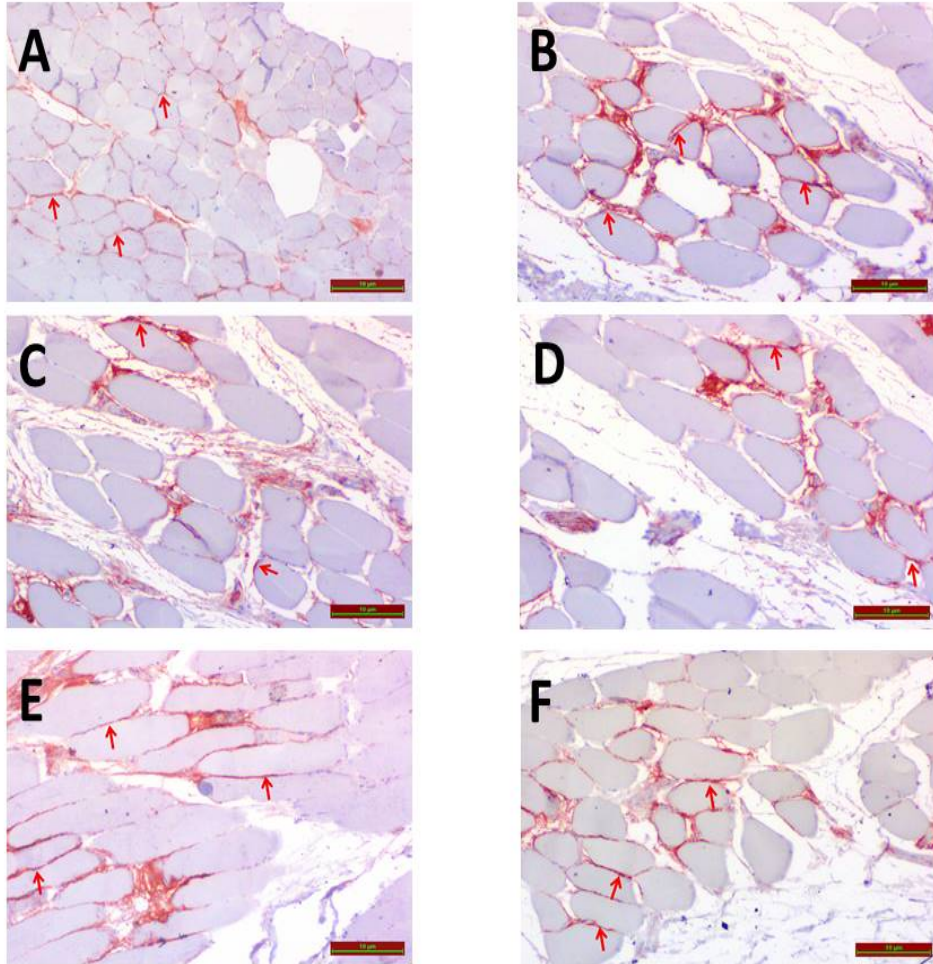
METRNL immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; METRNL immünreaktivitesi iskelet kaslarında endomisyum ve perimisyum olarak bilinen iskelet kas hücrelerinin çevresindeki bağ dokuda (kırmızı ok) gözlemlendi.

İskelet kası dokusunda METRNL immünreaktivitesi; K (A), E (B), I/R (C), I/R+M (D), I/R+E (E) ve I/R+E+M (F) gruplarında benzer şekilde izlendi (Tablo 18).

Tablo 18. Kas Dokuda METRNL Histoskorları.

Gruplar	Histoskor
Kontrol	1,05±0,21
Egzersiz	1,84±1,27 ^a
İskemi Reperfüzyon	1,73±0,63 ^a
İskemi- Meteorin	1,68±0,70 ^a
İskemi- Egzersiz	1,70±0,42 ^a
İskemi- Egzersiz- Meteorin	1,65±1,48 ^a

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.



Şekil 22. Kas dokuda METRNL immünohistokimyasal boyanması. Gruplar arasında METRNL düzeyleri açısından kontrole göre diğer gruplarda METRNL düzeylerinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. K (A), E (B), I/R (C), I/R+M (D), I/R+E (E) ve I/R+E+M (F). K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

5.4.1.3. Adipoz Dokuya Ait Bulgular

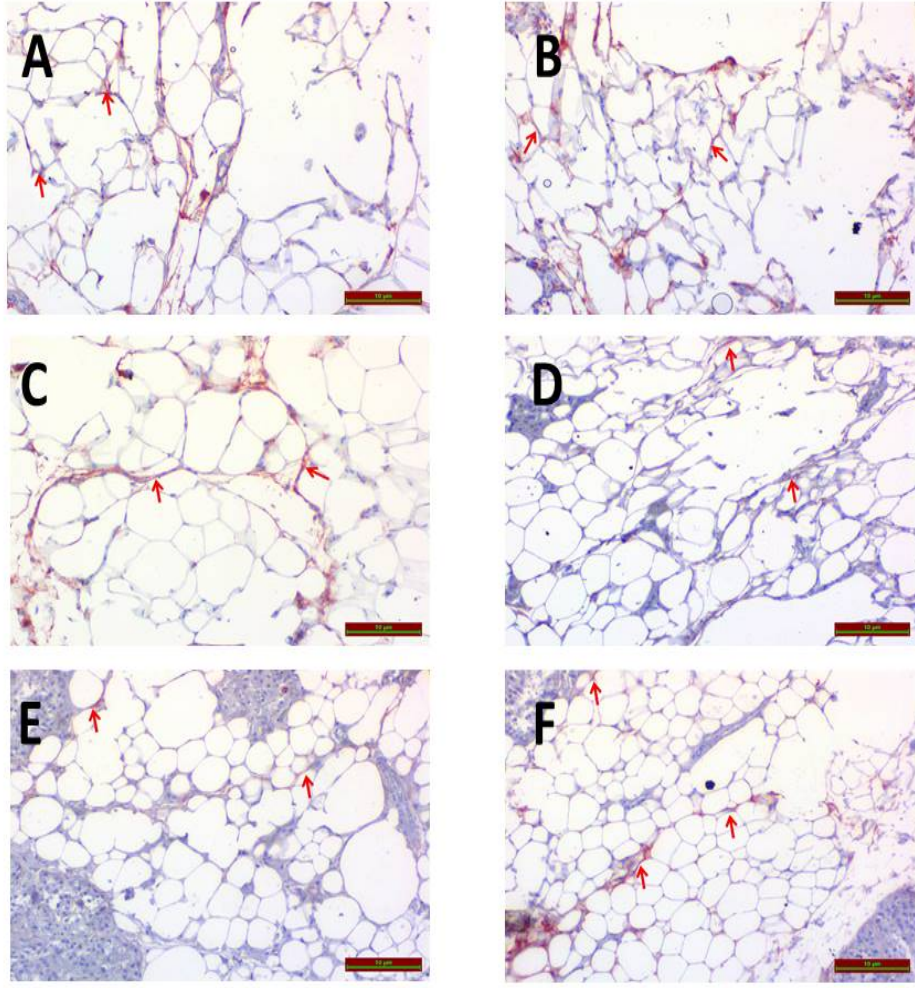
METRNL immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; METRNL immünreaktivitesi adipoz dokuda yağ hücrelerini çevreleyen bağ dokuda (kırmızı ok) gözlemlendi (Tablo 19).

Adipoz Dokuda METRNL immünreaktivitesi; K (A), E (B), I/R (C), I/R+M (D), I/R+E (E) ve I/R+E+M (F) gruplarında benzer şekilde izlendi.

Tablo 19. Yağ Dokuda METRNL Histoskorları.

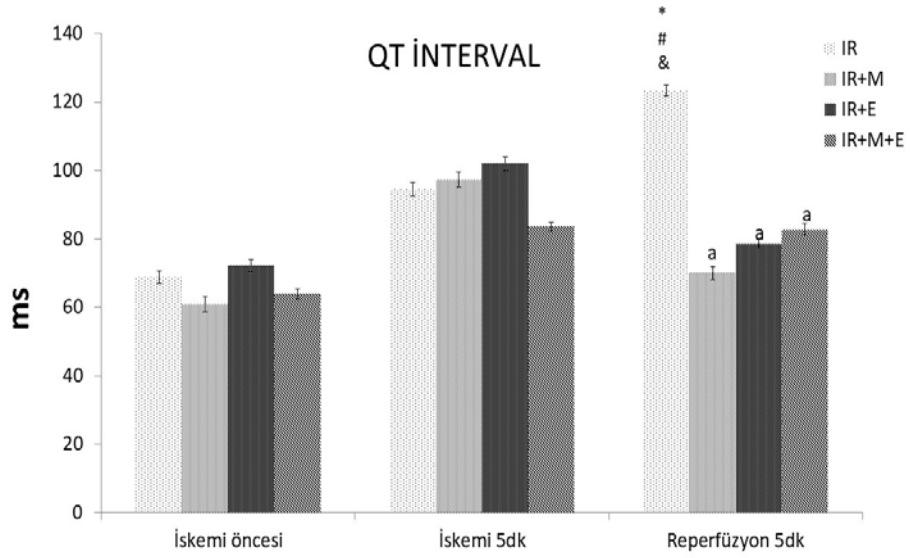
Gruplar	Histoskor
Kontrol	0,42±0,3
Egzersiz	0,45±0,21
İskemi Reperfüzyon	0,50±0,42
İskemi- Meteorin	0,52±0,10
İskemi- Egzersiz	0,75±0,63
İskemi- Egzersiz- Meteorin	0,50±0,14

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.



Şekil 23. Yağ Dokuda METRNL İmmünohistokimyasal Boyanması. Gruplar arasında METRNL düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık izlenmedi. K (A), E (B), I/R (C), I/R+M (D), I/R+E (E) ve I/R+E+M (F). K: Kontrol, E: Egzersiz, I/R: İskemi/Reperfüzyon.

5.5. Elektrokardiyografi (EKG) Bulguları



Şekil 24. QT İntervali Elektrokardiyografi Grafiği.

*İskemi öncesi I/R grubu ile reperfüzyonun 5.dakikası I/R, I/R+M, I/R+E ve I/R+E+M grupları karşılaştırıldığında. #İskemi öncesi I/R+M grubu ile I/R, I/R+E ve I/R+E+M grupları ile karşılaştırıldığında. &İskemi öncesi I/R+E+M ile reperfüzyon 5. dakikası I/R, I/R+E ve I/R+E+M grupları ile karşılaştırıldığında.

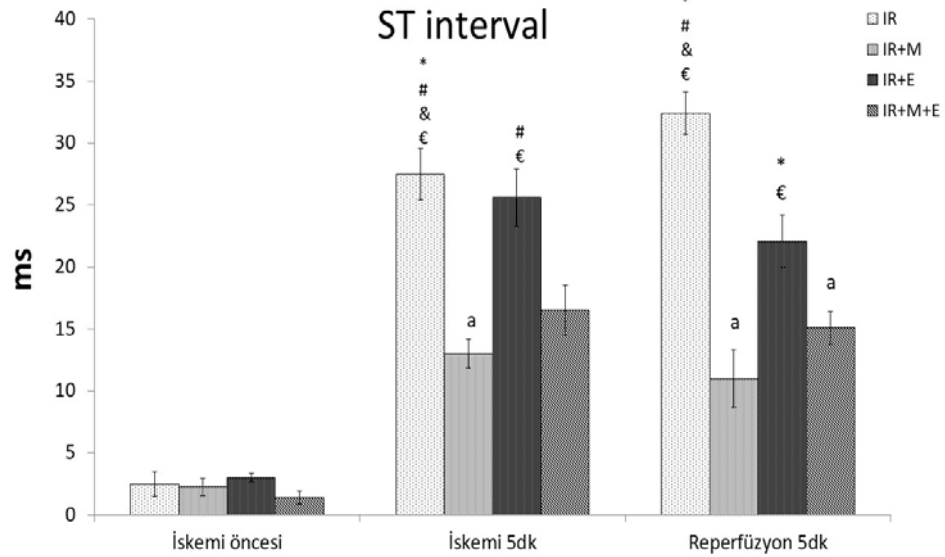
^aI/R grubu ile karşılaştırıldığında. ^bI/R+M grubu ile karşılaştırıldığında. ^cI/R+E grubu ile karşılaştırıldığında, ^dI/R+E+M grubu ile karşılaştırıldığında. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

EKG bulguları açısından I/R grubunda I/R öncesi ve reperfüzyon 5.dakikası karşılaştırıldığında QT'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,05$). EKG bulguları açısından I/R+M grubu I/R öncesi ve I/R grubu reperfüzyon 5.dakikası karşılaştırıldığında QT'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,003$). EKG bulguları açısından I/R+E+M grubu I/R öncesi ve I/R grubu reperfüzyon 5.dakikası karşılaştırıldığında QT'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,01$).

Elektrokardiyografi analizleri egzersiz ve METRNL uygulamasının reperfüzyonun 5.dakikasında istatistiki olarak anlamlı düzeyde QT intervalinin azalmasını sağladığı gösterilmiştir.

I/R grubu ile karşılaştırıldığında; egzersiz ve METRNL uygulamasının reperfüzyonun 5. dakikasında QT intervalini I/R+M ($p=0,001$), I/R+E ($p=0,010$) ve I/R+E+M ($p=0,08$) gruplarında anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir.

Reperfüzyonun 5.dakikasında I/R+M, I/R+E ve I/R+E+M gruplarında istatistiki olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Benzer şekilde reperfüzyonun 5.dakikasında I/R+E'ye göre I/R+E+M grubunda anlamlı farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 25. ST İntervali Elektrokardiyografi Grafiği.

*İskemi öncesi I/R grubu ile reperfüzyonun 5.dakikası I/R, I/R+M, I/R+E ve I/R+E+M grupları karşılaştırıldığında. #İskemi öncesi I/R+M grubu ile reperfüzyon 5. dakikası I/R, I/R+E ve I/R+E+M grupları ile karşılaştırıldığında. € İskemi öncesi I/R+E ile reperfüzyon 5. dakikası I/R, I/R+E ve I/R+E+M grupları ile karşılaştırıldığında. &İskemi öncesi I/R+E+M ile reperfüzyon 5. dakikası I/R, I/R+E ve I/R+E+M grupları ile karşılaştırıldığında.

^aI/R grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bI/R+M grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cI/R+E grubuna göre karşılaştırıldığında, ^dI/R+E+M grubuna göre karşılaştırıldığında. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

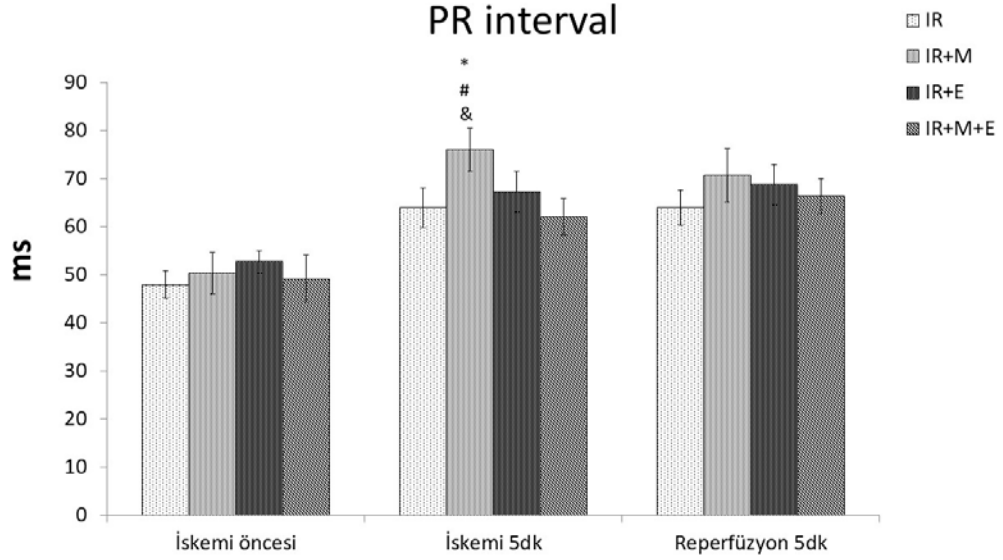
EKG bulguları açısından I/R öncesi I/R grubu ile iskeminin 5.dakikası I/R ve I/R+E grupları karşılaştırıldığında ST'nin anlamlı olarak arttığı bulundu

($p=0,002$, $p=0,016$, sırasıyla). EKG bulguları açısından I/R öncesi I/R+E grubu ile iskeminin 5.dakikası I/R ve I/R+E grubu karşılaştırıldığında ST'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,08$, $p=0,043$, sırasıyla). EKG bulguları açısından I/R öncesi I/R+M grubu ile iskeminin 5.dakikası I/R ve I/R+E grupları karşılaştırıldığında ST'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,000$, $p=0,005$, sırasıyla). EKG bulguları açısından I/R öncesi I/R+E+M grubuyla iskeminin 5.dakikası I/R ve I/R+E gruplarıyla karşılaştırıldığında ST'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,000$, $p=0,005$, sırasıyla).

EKG bulguları açısından I/R öncesi I/R grubu ile reperfüzyonun 5.dakikası I/R ve I/R+E grupları karşılaştırıldığında ST'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,000$, $p=0,045$, sırasıyla). EKG bulguları açısından I/R öncesi I/R+E grubu ile reperfüzyonun 5.dakikasında I/R grubu karşılaştırıldığında ST'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,00$). EKG bulguları açısından I/R öncesi I/R+E+M grubuyla reperfüzyonun 5.dakikası I/R ve I/R+E gruplarıyla karşılaştırıldığında ST'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,000$, $p=0,033$, sırasıyla). Yine benzer şekilde ST intervalinin IR ye göre IR+E+M ve IR+M gruplarında anlamlı olarak kısaldığı gösterilmiştir. I/R grubu ile karşılaştırıldığında; egzersiz ve METRNL uygulamasının reperfüzyonun 5.dakikasında ST intervalini I/R+M ($p=0,002$) ve I/R+E+M ($p=0,015$) gruplarında anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir.

Kontrole göre I/R+E ve I/R+E+M gruplarında reperfüzyonun 5.dakikasında ST intervalinin değişmediği belirlenmiştir. Kontrole göre I/R+M grubunda reperfüzyonun 5.dakikasında ST intervalinin anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p=0,049$).

İskemi öncesi ile karşılaştırıldığında iskemi 5.dakika ve reperfüzyon 5.dakikadaki ST değerlerinin tüm gruplarda anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p<0,000$).



Şekil 26. PR İntervali Elektrokardiyografi Grafiği.

*İskemi öncesi I/R grubu ile reperfüzyonun 5.dakikası I/R, I/R+M, I/R+E ve I/R+E+M grupları karşılaştırıldığında. #İskemi öncesi I/R+M grubu ile reperfüzyon 5. dakikası I/R, I/R+E ve I/R+E+M grupları ile karşılaştırıldığında. € İskemi öncesi I/R+E ile reperfüzyon 5. dakikası I/R, I/R+E ve I/R+E+M grupları ile karşılaştırıldığında. &İskemi öncesi I/R+E+M ile reperfüzyon 5. dakikası I/R, I/R+E ve I/R+E+M grupları ile karşılaştırıldığında.

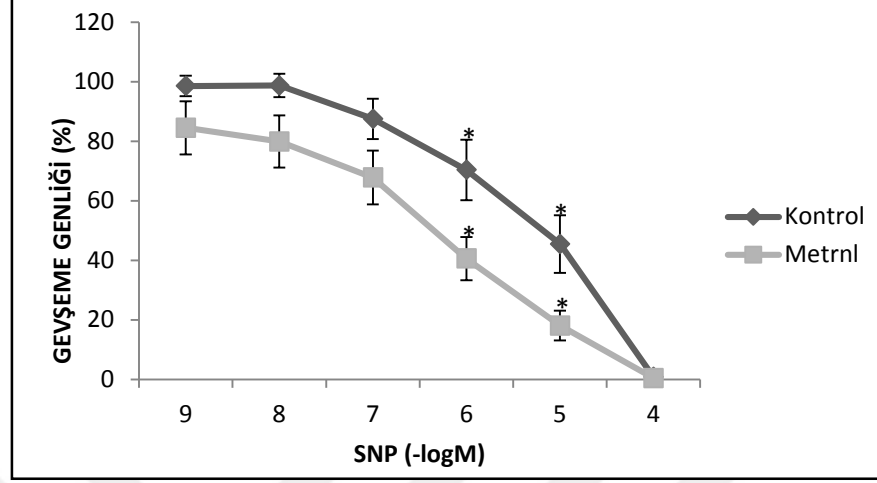
^aI/R grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bI/R+M grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cI/R+E grubuna göre karşılaştırıldığında, ^dI/R+E+M grubuna göre karşılaştırıldığında. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

EKG bulguları açısından I/R öncesi I/R, I/R+M, I/R+E+M grupları ile iskeminin 5.dakikası I/R+M grubu karşılaştırıldığında PR'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,01$, $p=0,007$, $P=0,008$, sırasıyla). EKG bulguları açısından I/R öncesi I/R+E+M grubu ile iskeminin 5.dakikası I/R+M grubu karşılaştırıldığında PR'nin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,008$).

PR intervali açısından diğer grup karşıştırmalarında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

5.6. İzole Organ Banyosu Deneyi Sonuçları

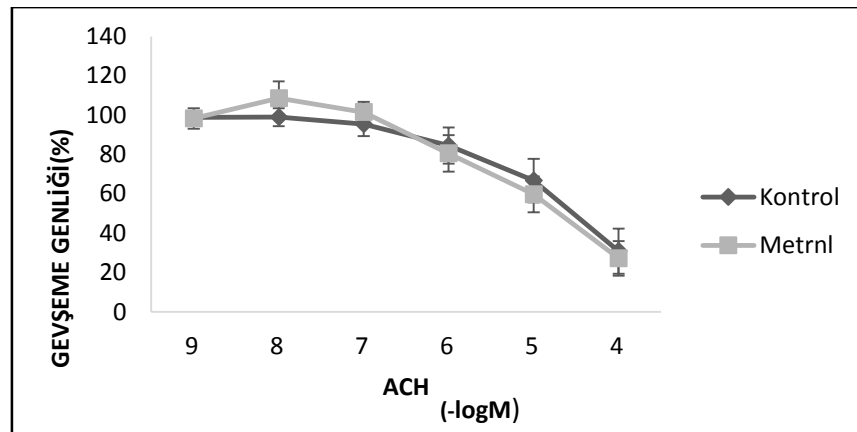
5.6.1. SNP Gevşeme Protokolü Sonuçları



Şekil 27. SNP Gevşeme Grafiği. * $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, aort halkalarının artan dozlarda SNP ile gevşeme yüzdeleri eğrisi. Değerler en yüksek kasılma gerilimi %100 alınarak $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

METRNL'nin 12,5 $\mu\text{g/ml}$ dozunun şekildeki veriler incelendiğinde SNP gevşeme protokolüne göre aort kontraksiyonu gerilim azalımının 10^{-6} ve 10^{-5} dozlarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir.

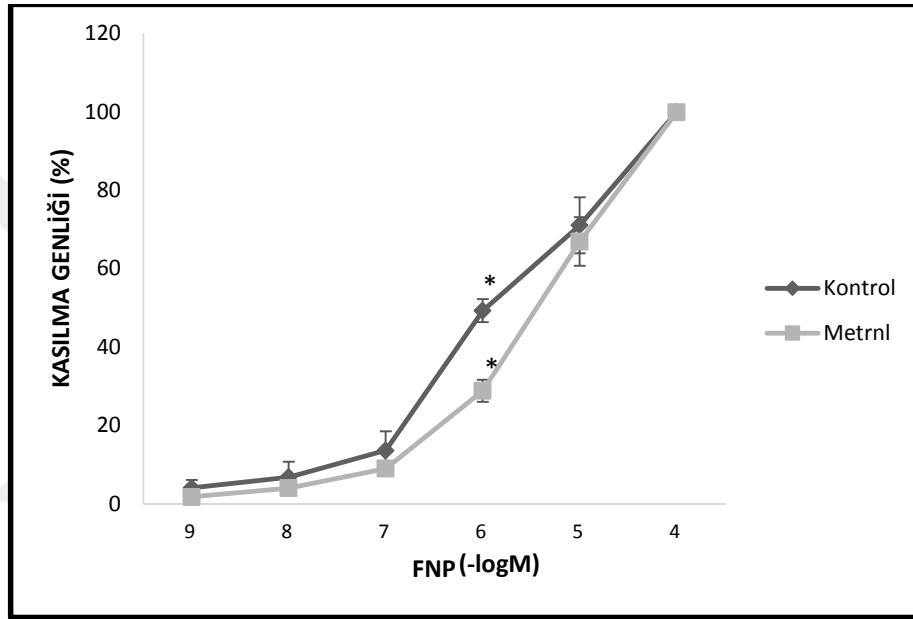
5.6.2. ACH Gevşeme Protokolü Sonuçları



Şekil 28. ACH Gevşeme Grafiği. * $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, aort halkalarının artan dozlarda ACH ile gevşeme yüzdeleri eğrisi. Değerler en yüksek kasılma gerilimi %100 alınarak $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

METRNL uygulanan grupla kontrol grubu kıyaslandığında ACH'ın artan dozuna karşılık gevşeme yüzdelерinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Elde edilen veriler METRNL'nin gevşeme üzerinde anlamlı bir etki göstermediğini ortaya çıkarmıştır.

5.6.3. FNP Kasılma Protokolü Sonuçları



Şekil 29. FNP Kasılma Grafiği. * $p<0.05$, Fenilnefrinin aort kesiti üzerindeki kasılma yüzde değerleri. Değerler en yüksek kasılma gerilimi %100 alınarak $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

METRNL'nin 12,5 $\mu\text{g/ml}$ dozu kullanıldığında aort kontraksiyonu gerilim artımının 10^{-6} dozunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir.

6.TARTIşMA

Miyokart infarktüsü (MI), yüksek mortalite ve morbidite oranına sahip bir koroner kalp rahatsızlığıdır. İnflamasyon, infarktüsün ilk onarımına katkıda bulunan MI sonrası kardiyak iyileşmede çok önemli bir rol oynar (104). METRNL peptid yakın zamanda yeni bir adipomiyokin olarak bulunmuştur. Yeni keşfedilen bu molekülün fizyolojik ve patolojik süreçlerde kritik rol oynayıp çeşitli hastalıklar için biyobelirteç veya tedavi hedefi olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir. Çalışmamız insan MI hastalarında ve sıçan I/R modelinde METRNL'nin bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin değerlendirildiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Pek çok farklı hastalıkta METRNL'nin serum düzeyleri değerlendirilmiş ve hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Chung ve arkadaşları diyabetli hastalarda METRNL düzeylerinin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (105). Lee ve arkadaşları yeni tanı konan diyabetli hastalarda METRNL düzeylerinin kontrole göre anlamlı düzeyde azaldığını ifade etmişlerdir (106). Pellitero ve arkadaşları obez hastaların kontrole göre daha düşük METRNL düzeylerine sahip olduğunu belirtmişlerdir (107). Shivakumar ve arkadaşları METRNL'nin mesane kanseri için prognostik bir markır olabileceğini ifade etmişlerdir (108). Li ve arkadaşları METRNL'nin insan ve fare gastrointestinal sisteminde yüksek düzeyde sentezlediğini ve METRNL farelerde antimikrobiyal peptid sentezlerinin anlamlı olarak azaldığını gözlemlemişlerdir. METRNL'nin bağırsak antimikrobiyal peptidlerin düzeylerinin korunmasında önemli roller üstlendiğini ifade etmişlerdir (109). Çalışmamızda insanlar üzerinde yaptığımız analizlerde METRNL'nin serum düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MI hastalarında istatistiki

olarak anlamlı bir değişime uğramadığı belirlenmiştir. Alt grup analizleri yapıldığında hipertansiyon ve diyabetli hasta gruplarında da kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. Çalışmamız MI hastalarında METRNL düzeylerinin değerlendirildiği ilk çalışma olup kanımızca MI oluşum sürecinde serum METRNL düzeyleri etkilenmemektedir. Ancak kalp kas dokusunda analizler yapılamadığından bu dokuda herhangi bir değişimin olup olmadığı söylenemez. Bu sorunun cevabının bulunması adına çalışmamızda hayvanlar üzerinde MI oluşturulmuş ve METRNL düzeyleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın bu kısmı aşağıda ayrı olarak tartışılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda plazma METRNL düzeylerinin akut egzersizi takiben meydana gelen kas METRNL artışına paralel olarak arttığı belirlenmiştir (110). Kronik yağlı diyetin kas dokuda ve yağ dokuda METRNL düzeylerini azalttığı, egzersizin ise arttırdığı gösterilmiştir (111). Bae ve arkadaşları 8 haftalık egzersiz yapan obez farelerde soleus kası AMP-activated protein kinase (AMPK), PGC-1 α ve plazma METRNL düzeylerini artırdığını göstermişlerdir. ($p<0,05$). Çalışmamızda da diğer çalışmalara benzer şekilde 6 haftalık egzersizin kas dokuda METRNL düzeylerini mRNA ve immünohistokimyasal olarak artırdığı ancak bu artışın egzersiz sonrası serum örneklerine yansımadağı METRNL serum düzeylerinin egzersiz sonrası değişmediği gösterilmiştir. Çalışmamızda ayrıca kalp dokuda yapılan analizlerde de METRNL düzeylerinin egzersiz ile değişmediği belirlenmiştir. Hem immünohistokimyasal olarak hem de qRT-PCR sonucuna göre kontrol grubu ile kıyaslandığında I/R grubunda mRNA ifadelerinde anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir. qRT-PCR bulgularımıza göre METRNL düzeylerinde kontrole göre I/R grubu hariç I/R+M, I/R+E ve

I/R+E+M gruplarında anlamlı bir değişim gözlenmemiş olmasına rağmen immünohistokimyasal olarak I/R+M hariç I/R+E ve I/R+E+M gruplarında da METRNL'nin kontrole göre de anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. I/R+M grubunda ise anlamlı bir artış olduğu ortaya konmuştur. I/R+M grubunda kalp dokuda belirlenen bu artışın en önemli nedenlerinden birinin doğrudan damar içine verilen METRNL'nin damar dışına çıkarak hücreler arası alanda birikimi olabileceğı düşünölmektedir. İlginç bir şekilde aynı anlamlı artış I/R+E+M grubunda gözlenmemiştir. Bunun en muhtemel nedenlerinde birinin bu grupta egzersize bağlı olarak bu molekülün kullanımındaki artış olabileceğı düşünölmektedir. Ancak řu durumda METRNL'nin muhtemel reseptörleri veya aktive ettiği hücre içi yolaklar bilinmediğinden bu konunun özellikle yeni yapılacak çalışmalarla aydınlatılması gerekmektedir. Özellikle çalışmamızda serum düzeylerinde artışın tespit edilememesinin birkaç olası nedeni vardır. Bunlar arasında diğer çalışmalarda egzersiz süresinin daha uzun tutulması ve farklı egzersizlerin yaptırılmış olması sayılabilir.

Kalp yetmezliği azalmış aerobik kapasiteye neden olan mitokondriyal yoğunluk ve oksidatif enzimlerde bir azalma ile ilişkili iskelet kasında değişmiş metabolizma ile beraberlik gösterir. Mitokondriyal yoğunluktaki azalmanın en önemli delilleri kronik kalp yetmezliğinde fosfokreatinin parçalanmasındaki artış intraselöler asidoz, egzersiz ve dinlenme boyunca ATP sentezinin azalmış oranı belirli oksidatif enzimlerin azalmış aktivitesidir (112). Kronik kalp yetmezliğinin hayvan modellerinde ve insanlarda yapılan çalışmalarda fiber tip transformasyon, fiber atrofi gibi iskelet kası histolojik anomalileri ve azalmış oksijen enzim aktiviteleri tanımlanmıştır. Fosfokreatinin ve kreatinkinaz kas hücrelerinde enerji

üretimi ve enerji kullanımı arasındaki ana düzenlenmeden sorumludur (113,114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123). Çalışmamızda hem kalp kası hem iskelet kası dokularında mitokondriyal biyogenez yolları değerlendirilerek I/R'ye bağlı kas iskelet kası dokusunda mitokondriyal biyogenez açısından meydana gelen değişimlerde ortaya konmuştur. Bu bağlamda mitokondriyal biyogenez ile ilişkili MFN2, NRF1, ATP5B, TFAM, PPARGC1A, PPARGC1B, CHRM1, HIF1A, OPA1, PRKAA2, MFN1 ve NFE2L2 genlerinin kalp, kas, beyaz yağ ve damar dokuda ekspresyon düzeyleri incelenerek mitokondriyal biyogenez genlerinin I/R hasarında ve egzersiz sonrasında METRN1 ile arasındaki ilişki araştırılmıştır.

İlk olarak 1967'de John Holloszy, egzersiz eğitiminin iskelet kasında mitokondriyal biyogenezi teşvik ettiğini kanıtlamıştır (124). İskelet kasında mitokondri, sarkoplazmanın (subsarkommanmal mitokondri) altında kümelenmiş birbirine bağlı mitokondrilerle ve tek tek z-çizgisinin (intermyofibriller mitokondri) her bir tarafındaki miyofibrillerin arasına serilmiş bir retiküle ağı oluşturur (125). Egzersiz eğitimi, fiziksel performansı artırır ve büyük ölçüde iskelet kasındaki adaptasyonlarla sağlıklı bir yaşam için yarar sağlar. Nicelik (içerik) ve kalitedeki (yapı ve işlev) koordineli gelişmeleri içeren mitokondriyal uyarılma, egzersiz eğitiminin yararlı sonuçlarında önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir. Egzersiz eğitiminin mitokondriyal biyogenezi desteklediği uzun zamandır bilinmektedir, ancak son zamanlarda yapılan çalışma, mitokondriyal dinamikleri (füzyon ve fisyon) ve klirensi (mitofaji) üzerinde de derin bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (125).

Kas dokusuna benzer şekilde kalp kasında da egzersizin mitokondriyal biyogenezi artırdığı ifade edilmektedir. Mitokondri, yeterli kalp fonksiyonunu sürdürebilmesi için önemli bir organeldir ve mitokondriyal disfonksiyon, kardiyovasküler hastalıkla ilişkilidir. Kalp kasının sabit bir enerji kaynağı gerektirmesi nedeniyle yeterli kalp fonksiyonunu sürdürmek için önem taşımaktadır (125). Düzenli egzersizin kalpteki mitokondriyal biyogenezi ve dinamiği içeren birçok yolu tetiklediği gösterilmiştir (126, 127).

PPARGC1A, metabolik kontrol, transkripsiyonel aktivite, mitokondriyal solunum fonksiyonu ve mitokondriyal devir gibi hücrel süreçleri düzenlediği için egzersize bağlı mitokondriyal biyogenesinin kilit bir düzenleyicisidir (128). PPARGC1A ve diğer formu PPARGC1B; kalp, böbrek ve kas gibi oksidatif dokularda yüksek oranda eksprese edilir. PPARGC1A ve PPARGC1B ekspresyonu sonucu mitokondriyal biyogenesis indüklenir ve hücrel solunum artar. PPARGC1A'nın mitokondriyal biyogenezi arttırdığı çeşitli çalışmalarla ortaya koymuştur (129). Aoi ve arkadaşlarının 4 hafta süren koşu egzersizinde iskelet kasında PPARGC1A seviyelerinin arttığını bulmuşlardır (130). Ikeda ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada dişi farelere içinde koşu tekerleği bulunan kafeslerde 1, 2, 4, 6 veya 8 hafta boyunca egzersiz yaptırmışlardır. PPARGC1A'nın ekspresyon seviyesi sadece PLA kasında (Plantaris kas) artmıştır. Tibialis anterior (TA) kasında PPARGC1A ifadesinde artış olmamasına rağmen, mitokondriyal proteinler ve GLUT4 ekspresyon seviyeleri artmıştır (131). Jung ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada orta yaşlı erkek sıçanlarda 8 hafta boyunca haftada 3 gün merdiven tırmanma egzersizinin serum PPARGC1A'ı arttırdığını ve buna bağlı olarak mitokondriyal biyogenez gen ifadelerinde arttığını

bulmuşlardır (132). Oliveira ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada orta yaşlı erkek sıçanlara treadmill egzersizi uygulanmıştır. 0.8 veya 1,2 km/h hızlarda 8 hafta boyunca haftada 5 gün ve günde 50 dakikalık egzersiz eğitimlerinin serum PPARGC1A'yı arttırdığını bulunmuştur (133). Poppov ve arkadaşları insanlarda egzersiz sonrası kas dokuda PPARGC1A'nın ifadesinin değişmediğini göstermişlerdir (134). Summermatter ve arkadaşları sağlıklı insanlarda 6 hafta boyunca haftada 5 gün olacak şekilde günde 30 dakikalık egzersizini bisiklet sürerek yapan insanların iskelet kasında PPARGC1A'nın arttığını bulmuşlardır (135). Terada ve arkadaşları Sprague-Dawley cinsi sıçanları kullanarak günde 6 saat boyunca yavaş hızda yüzme egzersizi yaptırmışlardır ve bunun sonucunda sıçanların iskelet kasında PPARGC1A'nın arttığını gözlemlemişlerdir (136). Özetlendiği üzere farklı çalışmalarda birbiriyle çelişen bulgular elde edilmiştir. Çalışmaların bir kısmında egzersizle PPARGC1A arttığı belirlenirken bir kısmında değişmediği gözlenmiştir. Çalışmamızda soleus kası alınmış ve qRT-PCR analizleri bu kasta yapılmıştır. Analizlerimizin sonucuna göre treadmill egzersizinin kas dokuda PPARGC1A ve B'nin mRNA düzeylerini değiştirmedeği belirlenmiştir.

PPARGC1A'nın, dayanıklılık egzersizine yanıt olarak iskelet kası mitokondriyal biyogenezinde önemli bir rol oynayan NRF-1 ve NRF-2, transkripsiyon faktörlerini birlikte aktive ettiği bilinmektedir (137).

Psilander ve arkadaşları kısa mesafe egzersizinin PPARGC1A ve alt hedefi olan mitokondriyal biogenezde görevli TFAM ifadesini arttırdığını ancak NRF-2 gen ifadesinin değiştirmedeğini göstermişlerdir (138). Çalışmamızda sıçanlarda 45 günlük treadmill egzersizinin kas dokuda PPARGC1A ve B

ifadesini değiştirmediği ancak onların alt hedefi olan NRF-1 ve METRNL ifadesini anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir.

Mitokondriyal stabilite kardiyomiyosit sağkalımı ile ilgilidir. MFN2'nin kardiyomiyositlerde hücre ölümünü tetikleyen bir sinyal mekanizmasına sahip olduğu bilinmektedir. Mitokondri, MFN2 aracılığıyla endoplazmik retikuluma fiziksel olarak bağlanır. Mitokondriyal dinamikleri, dengeyi ve kalsiyum transportunu korumak için MFN2'nin transkripsiyonel düzenlemesi PGC-1 α sinyal mekanizmalarına bağlıdır (139).

I/R hasarı veya miyokardiyumdaki diğer sitotoksik hasarlardan kaynaklanan oksidatif stres, NRF1'in nükleer translokasyonuna ve PGC-1 α 'nın ifadesinde artışa yol açar. NRF1, TFAM'nin transkripsiyonunu düzenler ve mitokondriyal biyogenez ve onarım mekanizmalarına katkıda bulunur (140).

Hamilelik sırasında anne egzersizinin fetal kalpte mitokondriyal biyogenez üzerine olan etkileri tam olarak bilinmemektedir. Bu veriden yola çıkararak Chung ve arkadaşları, fetal miyokardda mitokondriyal gen ifadesinin maternal egzersizle artıp artmayacağı hipotezini test etmişlerdir. alışmalarında egzersize tabi tuttukları gebe sıçanlara ait fetal kalp örneklerinde NRF1, NRF2 ve MFN2 gen mRNA ifadelerinin kontrol sıçanlarına göre anlamlı olarak attığını, PPARGC1A ve TFAM'da mRNA düzeylerinin değişmediğini göstermişlerdir. Hamileliğin 17.gününde fetal kalpler çıkarılarak yapılan çalışma sonucunda gebeliğin 1. gününde başlatılan maternal egzersizin pozitif mitokondriyal fenotipi fetal kalplere aktarabildiğini göstermektedir (125). Emmanuel Mukwevho sıçanlarda 4, 6, 8, 10, 12 ve 15 saatlik egzersiz sonrası gastronemius kasında CPT-1, NRF-1, MEF2A, GLUT4, CPT2 and PGC-1 gen ifadelerinin anlamlı olarak arttığını

göstermişlerdir. Chung ve arkadaşlarının çalışmasının bulgularının bir kısmını destekleyecek şekilde çalışmamızda kalp dokularında I/R+E+M grubunda MFN2 ve TFAM gen mRNA ifadelerinde önemli artmalar olduğu görülmüştür. Yine Emmanuel'in çalışması ile uyumlu şekilde egzersizin kas dokuda NRF-1 ifadesini artırdığı gösterilmişti (140).

Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres, I/R hasarının erken evresine önemli ölçüde katkıda bulunur ve inflamatuvar yanıtı güçlendirir. TFAM, majör mitokondriyal gen düzenleyicidir ve transkripsiyon faktörü olarak gen ifadesini değiştirebilir. Çekirdekte üretilip ve mitokondriye taşınan TFAM, mitokondriyal stabilite ile doğrudan ilişkili bir DNA-bağlayıcı bir proteindir. Tüm temel biyolojik süreçler için verimli enerji üretimi gerekli olduğundan mitokondriyal DNA (mtDNA) fizyolojik koşulların oluşturulmasında hayati önem taşımaktadır. TFAM, mtDNA kompleksleri etrafında sarılarak kalsiyum yanlış kullanım ve ROS üretimini azaltmaya çalışan bir gen düzenleyicidir. Memeli hücrelerinde mtDNA kopya sayısının ana düzenleyicisi TFAM'dir. TFAM'nin serca2a, NFAT ve Lon proteaz üzerindeki düzenleyici fonksiyonları kardiyomiyosit stabilitesine katkıda bulunur. TFAM'ın ROS üretimi ve kalsiyum yanlış kullanımı üzerindeki düzenleyici rolü, ekzojen TFAM'nin kardiyoprotektif rolüne ilişkin daha fazla araştırmaya yol açmaktadır (139). Ayrıca adipoz dokuda (deri altı BY dokusunda) egzersiz sonrasında TFAM ve NRF1 mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (141). İntestinal I/R hasarında mitokondriyi hedefleyen bir antioksidan olan MitoQ'nun mitokondriyal transkripsiyonun önemli bir aktivatörü olan TFAM stabilitesini koruduğu ve ifadesini artırdığı belirlenmiştir (142). Mevcut çalışmamızda, kalp ve kasta mitokondriyal onarım ve stres hasarı ile mücadele

için METRNL peptidin hem kas dokusu hem de kalp dokusunda TFAM seviyelerini önemli ölçüde artırarak mitokondriyal biyogenezin iyileşmesi yoluyla kardiyoprotektif etki gösterebileceği öngörülmektedir. Fakat yağ dokuda METRNL peptidin TFAM seviyeleri üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

ATP5B'nin yapısı ve işlevi mitokondriyal morfolojiyle yakından bağlantılıdır. ATP5B'nin memeli hücrelerinde mitokondriyal füzyon ve fisyon için düzenleme mekanizmasında yer aldığı bilinmektedir. Mitokondriyal ATP sentezi sırasında, F1-ATPase hücresel fonksiyon için yüksek seviyede ATP üretmek için bir dizi yapısal değişiklik geçirir. ATP5B'nin kendisi mitokondri uzamasını arttırabilir (143). ATP5B'nin egzersiz sırasında kas ve kalp dokuda artış gösterdiği bilinmektedir ve molekülün kan akış düzenlenmesine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (144, 123). Antioksidan bir nanomateryal olan serum oksit nanozim (cerium oxide nanozyme; (CON)) egzersiz yapan kas içine enjeksiyonunun kas dokuda ATP5B miktarını artırdığını göstermişlerdir (145). Çalışmamızda da ATP5B'nin kalp dokuda I/R, I/R+E, I/R+M ve I/R+E+M gruplarında kontrole göre anlamlı olarak arttığı, kas dokuda ise I/R grubunda azaldığı, ancak METRNL verilen gruplarda kalp dokuya benzer şekilde arttığı belirlenmiştir. I/R'nin özellikle ATP5B düzeylerini anlamlı olarak artmasına neden olduğu ve özellikle METRNL'nin ekzojen olarak uygulandığı I/R+E+M grubunda ATP5B düzeylerinin I/R ve I/R+E gruplarına göre de anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir.

ATP5B düzeylerindeki artışla paralel olarak I/R+M ve I/R+E+M gruplarında özellikle kas dokuda ATP düzeylerinde arttığı gösterilmiştir. Kalp

ATP5B düzeylerinde kas dokudaki kadar yüksek bir kat artış olmamasına rağmen kalp dokuda da I/R+M ve I/R+E+M gruplarında artışlar olduğu ve paralel olarak ATP düzeylerinin kontrole benzer şekilde normaleştiği belirlenmiştir. Ancak egzersiz I/R gruplarında kalp dokuda ATP düzeylerindeki azalmanın devam ettiği belirlenmiştir. Bunun en muhtemel sebebi kalp dokuda gerçekleşen I/R boyunca ATP üretimindeki azalma ve tüketimindeki artıştır (146).

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) egzersiz sırasında üretilir ve iskelet kasında egzersiz için adaptif cevaba aracılık edebilir. Merry ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada redoks duyarlı transkripsiyon faktörü nükleer faktör eritroid türevli 2-benzeri 2'nin (NFE2L2) akut egzersiz ve eğitim kaynaklı mitokondriyal biyogenez ve antioksidan yanıtındaki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Fare iskelet kası ve kas hücrelerinde NFE2L2 ifadesinin egzersizle arttığı ve NFE2L2'deki eksikliğin, mitokondriyal biyogenez belirteçlerinin mRNA'sındaki normal akut koşu bandı egzersize bağlı artışları önlediği bilinmektedir (147). Bizim çalışmamızda Merry ve arkadaşlarının bulgularından farklı olarak NFE2L2 mRNA düzeylerinde IR+E+M grubunda anlamlı derecede azalma olduğu, IR+M grubunda ise azalmanın anlamlılığa yakın ($p=0,057$) bir değerde olduğu gösterilmiştir.

OPA1 (Optik atrofi 1) proteini, hücrelerdeki enerji üreten merkez olan mitokondrinin iç zarında bulunmaktadır. Protein, organelin intermembran boşluğunda oligomerik kompleksler ile bağlantılıdır ve füzyon sürecinde önemli mitokondri şeklini düzenlemeye yardımcı olur. OPA1 proteini, oksidatif fosforilasyonda yer alır. Kontrollü hücre ölümü (apoptoz) sırasında mtDNA'nın

korunmasında rol oynar (148, 149). Mevcut çalışmamızda OPA1 gen mRNA ifadesinde herhangi bir değişim olmadığı gözlenmiştir.

PRKAA2 (protein kinase, AMP-activated, α catalytic subunit) mitokondriyal biyogenezi, fonksiyonunu, yapım ve yıkım olayları gibi mitokondriyal dinamikleri düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır. PRKAA1^{-/-} VE PRKAA2^{-/-} fare endotelyumunda mitokondriyal füzyon ve fizyon olaylarının bozulduğu ve buna bağlı olarak bozuk mitokondriyal fragmentasyonun gerçekleştiği bulunmuştur. PRKAA2 / AMPK α 2 inhibisyonu mitokondriyal fizyonu arttırdığı gösterilmiştir (150). Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PRKAA2'nin dolaylı olarak kalp hastalığını iyileştirici yönde etki gösterdiği bulunmuştur (151). Çalışmamızda PRKAA2 geninin mRNA düzeyinin kalp dokusunda herhangi bir grupta değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Bunun aksine kas dokusunda PRKAA2 geni I/R, I/R+E, I/R+M ve I/R+E+M gruplarında anlamlı olarak azalmıştır. Bu azalma bize mitokondriyal dengenin bozulduğunun en önemli göstergelerinden biridir.

Çalışmamızda METRNL ve egzersizin koruyucu etkilerine aracılık eden mekanizmanın en azından bir kısmının tanımlanması adına HIF1A ifadesi kalp dokuda değerlendirilmiştir. Hipoksi İndüklenebilir Faktör (HIF)1A vasküler gelişim, redoks homeostazisi ve hücre döngüsü kontrolünde görevli genlerin düzenlenmesinde iş gören ve hücrel oksijen konsantrasyonu tarafından düzenlenen bir transkripsiyon faktörüdür. İskelet kas fonksiyonu ve metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Egzersiz sonucunda kas içi oksijen seviyelerinde meydana gelen azalma HIF1A'nın indüksiyonuna neden olmaktadır (152). Sıçan kalp I/R modelinde Astragaloside IV (AstIV) ile post

iskemik tedavinin HIF1A ekspresyonunu artırarak I/R iyileştirebileceği ifade edilmektedir (153). Lundby ve arkadaşları 4 hafta 5 gün olmak üzere insan deneklerde egzersiz yapan ve yapmayan bacak kasında HIF1A mRNA düzeylerini değerlendirmişler ve ifade düzeyinin egzersize bağlı olarak değişmediğini göstermişlerdir (154). Bizde çalışmamızda egzersizin kas doku ve kalp dokuda HIF1A mRNA düzeylerini değiştirmedik. Çalışmamızda kalp dokuda kontrole göre HIF1A ifadesinde hiçbir grupta anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Ancak ilginç bir şekilde kas dokusunda I/R, I/R+E, I/R+M gruplarında kontrole göre HIF1A mRNA düzeylerinde azalma olduğu belirlenmiştir. HIF1A mitokondriyal biyogenezi negatif yönde etkilemektedir. Bu veri I/R boyunca etkilenen tek dokunun kalp olmadığını aynı zamanda kas dokusunda bu durumdan etkilendiğini göstermektedir.

İntrasellüler hipoksiden kaynaklanan artmış oksijen kaynağı ile mitokondriyal biyogenezden sonra artmış oksijen ihtiyacını karşılamak için PGC-1 α ve HIF sinyalizasyonu beraberce intrasellüler oksijen mevcudiyetinin düzenlenmesinde görev yapmaktadırlar. Fizyolojik oksijen konsantrasyonlarında HIF hedef genlerinin PGC-1 α bağımlı uyarılması HIF'in transkripsiyonel koaktivasyonu ve HIF mRNA artışı ile değil protein satabilizasyonu ile gerçekleşmektedir (155, 156). Çalışmamızda hem PPARGC1A hemde HIF1A düzeylerinin kas dokuda benzer şekilde tüm I/R gruplarında azaldığı belirlenmiştir. Bu açıdan her iki genin hipoksi durumunda kas dokuda benzer bir ifade profili gösterdikleri söylenebilir. Daha önce yapılan pek çok çalışmada kalp I/R modellerinde sadece kalp doku gen analizleri yapıldığında diğer dokularda bu sürecin nasıl sonuçları olduğuna dair çok fazla veri bulunmamaktadır. Abozguia ve arkadaşları kronik kalp yetmezliği

hastalarının iskelet kası dokularında dinlenme oksijen kullanımının anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir (112). Çalışmamızda iskelet kas dokusundan hem PPARGC1A hemde HIF1A düzeylerinin azalmasının en muhtemel açıklaması bu dokularda oksijen kullanımında azalmış olmasıdır.

Subkutan adipoz dokuda METRNL düzeyleri immünohistokimyasal olarakda değerlendirildiğinde METRNL'nin hem mRNA hemde immünohistokimyasal olarak lokalizasyonunda ve boyanmanın şiddeti ve yaygınlığında gruplar arasında önemli farklıklara bulunmadığı belirlenmiştir. Yine çalışmamızda subkutan adipoz dokuda mitokondriyal biyogenez gen ifadeleri değerlendirilmiş sadece I/R grubunda ATP5B gen ifadesinde anlamlı azalma olduğu gözlenmiştir. Diğer gen ifadelerinin hiçbirinde anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Chung (2017) ve arkadaşları inguinal adipoz dokuda PGC-1 α ve NRF-1 ifadesinin değişmediğini ifade etmişlerdir. Sutherland ve arkadaşları sıçan abdominal adipoz dokuda PGC-1 α mRNA ifadesinin egzersizi ile arttığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda subkutan adipoz doku alınmış olup çalışmalar arasındaki bu farklı bulguların en muhtemel nedenlerinden biri alınan beyaz yağ dokunun farklı bölgelerden alınmış olmasıdır.

CK-MB'nin CK-MM, CK-MB ve CK-BB olmak üzere 3 sitoplazmik izoformu bilinmektedir. Dolaşımdaki CK-MB akut miyokardiyal infarktüstten sonra artmaktadır. Benzer şekilde çeşitli egzersizlerde dolaşımdaki CK-MB düzeylerinde artışa neden olabilmektedir. Dolaşımdaki CK artışı sarkolemma ve z-disk hasarı gerçekleştiği zaman meydana gelir. Egzersiz sırasında artan membran permeabilitesi CK'nin intersitisiyel sıvılara sızmasına neden olur. Daha sonra CK-MB lenfatik sistem yoluyla dolaşıma geçer. Bilimsel çalışmalar 2 ana

faktörün egzersiz ile uyarılan kas hasarına neden olduğunu göstermiştir. Bunlar mekanik stres ve metabolik strestir. Mekanik stres egzersiz boyunca kas üzerinde gerçekleşir. Metabolik stres ise egzersiz boyunca kasta serbest radikal oluşumu ve kalsiyum artışı şeklindedir. Egzersizi sırasında O₂ kullanımındaki artış serbest oksijen radikal üretiminin ana nedenidir (157).

Apple ve arkadaşları egzersizin sıçanlarda kas dokuda CK-MB düzeylerini artırdığını göstermişlerdir (158). Roshan ve arkadaşları sıçanlarda 8 hafta boyunca haftada 5 gün 1 saat yaptırılan treadmill egzersizinin kontrole göre CK-MB düzeylerini anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir (159). Yapılan 2 farklı çalışmada kronik treadmill egzersizinin sıçanlarda izoproenolle indüklenen iskemi modelinde serum CK-MB düzeylerini düşürdüğünü belirlemişlerdir (160, 161). DOX ile uyarılan sıçan kardiyotoksisite modelinde kronik treadmill egzersizinin serum CK-MB düzeylerini DOX grubuna göre iyileştirdiği gösterilmiştir. Mevcut çalışmamızda egzersizin sıçan I/R modelinde CK-MB düzeylerini anlamlı olarak düşürdüğü belirlenmiştir. Ancak METRNL verilen grupta I/R grubuna göre azalma yönünde bir meyil olmasına rağmen bu azalmanın anlamlı düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak özellikle treadmill egzersiz sıçan I/R modelinde koruyucu etkilere sahiptir ve bu koruyucu etkinin en önemli göstergelerinde biride I/R egzersiz gruplarında CK-MB'nın azalmış olmasıdır.

IL-4 anti-inflamtuvar cevapta önemli olan pleotropik bir sitokindir. T hücreleri, mast hücreleri ve nötrofiller IL-4 üreten ana hücrelerdir. Aynı zamanda karaciğer, fibroblastlar, beyin ve kas dokuda ifadelendiği belirtilmektedir. IL-4'ün kuvvet egzersizlerinden sonra iskelet kasında arttığı ifade edilmektedir. Bu sitokin

aynı zamanda IL-4 reseptörü aracılığıyla kas hücre füzyonu ve kas gelişiminin düzenlenmesinde de görev yapmaktadır (162).

Rosa Neto ve arkadaşları egzersiz sonrası yorgunluğun 6 saatinde IL-4 protein içeriğinin extensor digitorum longus (EDL)'da arttığını ve soleus kasında azaldığını belirtmişlerdir. Salehian ve arkadaşları da orta düzeyde treadmill egzersizinin serum IL-4 seviyelerini azalttığını ancak yüksek düzeyde treadmill egzersizinin ise IL-4'ün serum düzeylerini düşürdüğünü belirlemişlerdir. Biz çalışmamızda soleus kasında benzer şekilde IL-4'ün azaldığını ancak egzersiz grubunda kontrole göre serum IL-4 seviyelerinin değişmediğini gösterdik.

Vasküler tonus üzerinde yapılan kontraktile çalışmalarında, vasküler tonusun düz kas ve endotel hücrelerinde bulunan intrasellüler Ca^{+2} depoları tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (163).

EKG değişimlerinin gözlenmesi miyokardiyal hastalıkların altında yatan nedenlerin ortaya çıkarılması açısından oldukça önemlidir. Emeka ve arkadaşları doksorubusinele oluşturdukları sıçan iskemi modelinde metforminin elektrokardiyografi bulguları üzerine olumlu etkilerinin olup olmadığını araştırmışlardır. PR ve QT intervallerinde meydana gelen artışın metformin tedavisi uygulanan gruplarda anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir (164). Damesceno ve arkadaşları tonin uygulamasının sıçanlarda *invivo* ve *invitro* etkilerini değerlendirmişlerdir. ECG bulgularına göre tonin uygulamasının PR intervalini değiştirmediğini ancak QT intervalini azalttığını saptamışlardır (165). Toutouchi ve arkadaşları izoprotenolle uyardıkları sıçan kalp yetmezliği modelinde rosmarinik asitin *invitro* kardiokoruyucu etkileri olduğunu izoprotenolün neden olduğu ST segment artışını normalize ettiğini göstermişlerdir

(166). Bizde çalışmamızda reperfüzyonun 5 dk'sında I/R'ye göre egzersiz ve METRNL hem tek tek hemde beraber uygulandığında QT intervalini anlamlı olarak azaldığını gösterdik. I/R grubunda elde edilen uzamış QT intervali egzersiz, METRNL veya her ikisinin beraber uygulanmasıyla reperfüzyonun 5dk'sında azalmıştır. Ancak bu iyileşme iskeminin 5dk'sında gözlenmemiştir. Uzamış QT intervali iskemi kaynaklı oksidatif stres ve membran hasarının neden olduğu ventriküler fonksiyonel anomalilerinin bir göstergesi olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca ST'deki azalma koroner basınçla koreledir (165). Çalışmamızda da ST intervalinin reperfüzyonun 5dk'sında METRNL veya METRNL'nin egzersizle kombinasyonunda azaldığı belirlenmiştir.

Egzersiz son zamanlarda kalp yetmezliği yaşayan birelerin tedavisinde önemli bir yer tutmaya başlamıştır. 1980'lerden önce kalp yetmezliği yaşayan bireylere kalp krizi geçirme riskinden dolayı egzersiz tavsiye edilmezken son yıllarda hem aerobik hemde direnç egzersizlerinin egzersiz toleransını ve hayat kalitesini iyileştirerek kas dekonidasyonunu engelleyerek kalp yetmezliği olan bireylerde yararlı ve güvenli olduğunu göstermektedir. Egzersizin kardiyo koruyucu mekanizması bilinmemektedir. Bununla beraber transjenik hayvanlarda yapılan deneyler PI3K (p110 alfa) aracı molekül olduğunu göstermektedir (167). Bozi ve arkadaşları egzersiz yapan sıçanlarda miyokardiyal infartın sedentar sıçanlarla karşılaştırıldığında daha küçük miyokardiyal infart yayılımı, daha ince bir infart duvarı ve daha az kollejen birikimine neden olduğunu göstermişlerdir (168). Çalışmamızda egzersizinde EKG bulguları üzerinde özellikle I/R grubunda artmış olan QT intervalini azaltıcı etkilerinin olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda egzersiz, METRNL veya bunların kombinasyonunun özellikle kalp I/R hasarının reperfüzyon aşamasında gerçekleşen konduksiyon anomalileri ve mekanik disfonksiyonun zararlı etkilerinden kalbi koruduğunu düşündürmektedir. Özellikle verilerimiz miyokardiyal hasarda koruyucu özellikleri olduğu bilinen veya düşünülen ajanlarla yapılan sıçan tedavi yaklaşımlarında EKG gibi kardiyak fonksiyon parametrelerinde gözlenmesi gerektiğini önermekte ve desteklemektedir.

Kas kasılması ve gevşemesi olayları birbirini tetikleyen birçok fizyolojik sürecin yer aldığı ve bunların birbirleriyle olan ilişkilerinin tam olarak aydınlatılamadığı fizyolojik bir süreçtir. Yapmış olduğumuz çalışmada kasların kasılma ve gevşeme mekanizmaları üzerine yeni bir sitokin olan metrnln'nin sıçan aortundaki kasılma ve gevşeme mekanizması üzerine olan etkilerini literatüre kazandırmayı amaçladık. SNP damar düz kasları üzerinde farklı mekanizmalarla etki ederek hem arter hem de venleri genişleterek kan basıncında azalmaya neden olur. Gevşetici etkisini potasyum kanallarını açarak ve zarda elektrojenik sodyum pompasını aktive ederek gösterir. Reseptör aracılı kalsiyum kanallarından Ca^{2+} girişini inhibe eder (169). SNP'ye bağlı gevşeme cevaplarının METRNL'nin 10^{-6} ve 10^{-5} dozlarında azaldığı gösterilmiştir.

ACH gevşeme yanıtlarında vasküler endotel kaynaklı endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) tarafından sentezlenen NO önemlidir. Bu nedenle ACH gevşeme yanıtları endotel tabakasının zedelenip zedelenmediğini ve NO biyosentezini göstermesi açısından önemlidir. ACH hücre içi Ca^{2+} 'u artırarak eNOS akut stimülasyonuna ve NO açığa çıkışına neden olur (170). ACH'a bağlı gevşeme cevaplarının METRNL tarafından değiştirilmediği gözlenmiştir. Bu

doğrultuda çalışmamızda ACH yanıtlarında değişim olmaması, METRNL'nin endotel aracılı yanıtları değiştirmedigini, endotel tabakasında bir harabiyete neden olmadığını göstermektedir.

FNPN'ye bağı kasılma cevaplarının METRNL'nin 10^{-6} dozunda arttığı belirlenmiştir. α -adrenerjik reseptör aracılı kasılmaya neden olan FNP, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonlarını membran depolarizasyonu sonucu direkt ya da indirekt olarak reseptör ya da voltaj aracılı Ca^{+2} kanalları açarak, fosfolipaz C aktivasyonu sonucu myosin hafif zincir kinaz aktive ederek ya da inositol-3 fosfat(IP3) üretimi ile birlikte IP3 ile indüklenen endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} açığa çıkışını sağlayarak gerçekleştirebilir (171). Bilgilerimize göre METRNL'nin damar hareketlerinde değışiklere sebep olabileceğı, FNP, NSP ve ACH ile uyarım sonucu kasılma ve gevşeme cevaplarını değıştirebileceğı ilk kez gösterilmiştir. Sonuç olarak METRNL'nin gevşemeyi baskılması ve kasılmayı artırması METRNL'nin damar üzerinde koruyucu etkilerinin olduğunun en önemli göstergelerindendir. Çalışmamızın bulguları literatür bilgileri ile birlikte değılendirilemediğinde METRNL'nin damar veya diğerkas dokuları üzerindeki kasılma ve gevşeme cevapları üzerine etkilerinin moleküler düzeyde kullandığı sinyal yolaklarında ortaya konacağı yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

METRNL damar dokuda kasılma gevşeme cevaplarını değıştirmekle beraber aynı zamanda mitokondriyal biyogenez ilişkili gen ifadelerinde değıştirmektedir. Özellikle kalp ve kas dokuya benzer şekilde METRNL damar dokusunda ATP5B'nin SNP kasılma protokolü uygulandığında kontrole göre anlamlı düzeyde artığı gösterilmiştir. Ancak aynı artış FNP ve ACH uygulandığı

kasılma ve gevşeme protokollerinde elde edilmemiştir. Aynı zamanda sadece FNP uygulanan grupta ATP5B düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu aslında izole organ banyosunda elde ettiğimiz METRNL'nin kontrole göre SNP+METRNL grubunda görülen gevşemeyi azaltıcı ve FNP+METRNL grubunda kasılmayı artırıcı etkisiyle tutarlıdır. Çünkü kasılma protokolü uygulanan damar dokularında ATP5B artışını METRNL normalize etmiştir.



7. ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada ilk kez METRNL'nin insan ve sıçan I/R modellerindeki rolü değerlendirilmiştir. METRNL'nin özellikle sıçan I/R modelinde koruyucu özelliklerinin olduğu gözlenmiş ve bu koruyucu özelliğini özellikle mitokondriyal DNA'nın korunmasından sorumlu olan TFAM düzeylerini artırarak gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca izole organ banyosunda kasılmayı artırıcı ve gevşemeyi azaltıcı özelliklerinin de bu koruyuculukta aracılık edebileceği gösterilmiştir. Yeni planlanacak çalışmalarda özellikle METRNL'in diğer I/R modellerinde veya hastalıklardaki rollerinin belirlenmesine yönelik olarak planlanması gerekmektedir. Hala METRNL'nin kullandığı bir reseptör olup olmadığı, etki mekanizmasını nasıl gösterdiği bilinmemektedir. Bu bağlamda özellikle METRNL'nin reseptörünün ve hücre içinde aktive ettiği ikincil yolların belirlenmesine ihtiyaç vardır.

8.KAYNAKLAR

1. Selvet S. Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi 2006; 3(1) :12-21.
2. “Kalp anatomisi”. <https://www.anatomi.gen.tr/kalp-anatomisi.html> 26.12.2017.
3. “Kalbin anatomisi genel anatomi”. <http://www.izafet.net/threads/kalbin-anatomisi-genel-anatomi.56200/> 26.12.2017.
4. “Kalp histoloji ve fizyolojisi”. <https://tipnotlarim.wordpress.com/2011/09/28/kalp-histoloji-ve-fizyoloji-ozeti/> 08.01.2018.
5. İpek Ergür. “Kardiyovasküler sistem hastalıkları”. http://dent.ege.edu.tr/yayinlarimiz/bitirme_tezleri/pdf/745.pdf 10.05.2018.
6. “Damar hastalığı”. <http://www.anjioplasti.com/damar-hastaligi-nedir> 10.01.18.
7. David C., “Perkütan translüminal koroner anjiyoplasti”. <https://medlineplus.gov/ency/anatomyvideos/000096.htm> 01.01.18.
8. World Health Organization. "The World health report: 1999: Making a difference: message from the Director-General." (1999).
9. Koroner kalp hastalığından korunma ve tedaviye ilişkin ulusal klavuz.1999 Türk Kardiyoloji Derneği.
10. Dr. Cihan Şengül. Genç Yaşta Miyokard Enfarktüsü Geçiren Hastalarda Klasik Ve Psikososyal Risk Faktörlerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. Kardiyoloji Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, 2006.
11. Terci A. İç Hastalıkları Dış Hekimleri ve Dış Hekimleri Öğrencileri için. İzmir, Bornova: Ege Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi, 2000.
12. Topsakal R. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Ders Notları. Kayseri: 2016-2017.
13. Yaşa E. Okside LDL Reseptör-1 (OLR-1) Geni 3 UTR C>T Polimorfizminin Koroner Arter Hastalığı Ve Ciddiyeti ile ilişkisi. Uzmanlık Tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2009.
14. Başar I. Hipertansiyon, Sigara Alışkanlığı, Obezite Ve Bozulmuş Açlık Şekerinin Kalp-Damar Hastalığını Çıkarmadaki Etkileri. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri kardiyoloji gündemi sempozyum dizisi, 2008; 64:15-24.
15. Elliott M. Antman, Braunwald E. ST-Elevation myocardial infarction: pathology, pathophysiology, and clinical features: Braunwald, Zipes, Libby (ed). 7th Edition Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 2005: 1141–1163
16. DeWood MA, Spores J, Notske R, et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. N Engl J Med 1980; 303: 897-902.
17. Nagase K, Tamura A, Mikuriya Y, et al. Significance of Q-wave regression after anterior Wall acute myocardial infarction. Eur Heart J 1998; 19: 742.

18. "Koroner ateroskleroz".<https://www.birdoktorbul.com/hastalik/1188/koroner-ateroskleroz-kalp-damar-sertligi> 10.01.18
19. Ceylan, Y., Kaya, Y., & Tuncer, M. Akut Koroner Sendrom Kliniği ile Başvuran Hastalarda Koroner Arter Hastalığı Risk Faktörleri. Van Tıp Dergisi 2011; 3: 147-54.
20. Onat, A. Ulusal kalp sağlığı politikası. Kalp-damar hastalıklarından korunma stratejisi. Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi 2004; 9: 596-602.
21. Grundy SM, Balady GL, Criqui MH, et al. Primary prevention of coronary heart disease: Guidance from Framingham—A statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. Am Heart J 1998; 97: 1876-1887.
22. Roberts WC. Preventing and arresting coronary atherosclerosis. Am Heart J 1995;130: 580-600
23. Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A, Chen RS. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the third national health and nutrition examination survey. Circulation 2004;109: 42-46.
24. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. Circulation 1993; 88:2149-2155.
25. Ölüm İstatistikleri İl ve İlçe Merkezleri 2008, Ankara TÜİK 2009.
26. Kannel WP. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. JAMA 1996; 275: 1571-76
27. Wong ND, Cupples LA, Ostfeld AM, Levy D, Kannel WB. Risk factors for long-term coronary prognosis after initial myocardial infarction: Framingham Study. Am J Epidemiol 1989;130: 469-80.
28. "Türk Kardiyoloji Derneği Koroner Arter Hastalığına Yaklaşım ve Tedavi Kılavuzu". <http://www.tkd.org.tr/kilavuz/k06.htm> 03.03.2018.
29. British Heart Foundation. Coronary Heart Disease Statistics, 2004. London: British Heart.
30. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation 2002; 106: 3143-3421.
31. Andreoli TE, Bennet JC, Carpenter CCJ, Plum F. Cecil Essentials Of Medicine, Türkçesi, Türkçe yayın editörü: Tuzcu M, Çevik Matbaası, Türkçe 4. edisyon; 2000 Ocak: 445-449.
32. Simes RJ, Topol EJ, Holmes DR, et al. Link between the angiographic substudy and mortality outcomes in a large randomized trial of myocardial reperfusion. Importance of early and complete infarct artery reperfusion. GUSTO-I Investigators. Circulation 1995; 91: 1928.
33. Dissmann R, Schroder R, Busse U, et al. Early assessment of outcome by ST-segment analysis after thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. Am Heart J 1994; 128: 851-857.

34. Feng Y, Chao W. Toll-like receptors and myocardial inflammation. *Int J Inflam* 2011; 2011: 170352.
35. Timmers L, Sluijter JP, Keulen JK, et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 2008; 102: 257–264.
36. Oyama J, Blais C, Liu X, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004; 109: 784–789.
37. Kim SC, Ghanem A, Stapel H, et al. Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but no gain in function. *BMC Physiol* 2007; 7: 5.
38. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2011; 123: 594–604.
39. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J* 2014; 55: 101–105.
40. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol* 2011; 41: 1203–1217.
41. Frangogiannis NG. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 1998; 98: 699–710.
42. Maekawa N. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1229–1235.
43. Kurrelmeyer KM. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5456–5461.
44. Hamid T. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappaB and inflammatory activation. *Circulation* 2009; 119: 1386–1397.
45. Zinsser H, Tamiya T. An Experimental Analysis Of Bacterial Allergy. *J Exp Med* 1926; 6: 753-76.
46. Chinen J, Notarangelo D, Shearer T. Advances in basic and clinical immunology in 2012. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 3: 675-682.
47. Nororiha IL, Niemir Z, Stein H, Waldher R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1995, 10: 775-786.
48. “Sitokinler”.http://www.microbiologybook.org/Turkish_immunol/immunolchapter_13turk.htm 23.11.2017.
49. “Sitokin nedir”. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Sitokin> 20.10.2017.
50. Calabro P, Golia E, Yeh ET. CRP and the risk of atherosclerotic events. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 79–94.
51. Luo Y, Zheng G. Hall of Fame among pro-inflammatory cytokines: Interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front Immunol* 2016; 19: 7:604.

52. Karahasanoğlu AB. Akut ve Düzenli Egzersizin Biyokimyasal Parametrelere Etkisi. Bitirme ödevi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2011.
53. Hu X, Ma R, Lu J, et al. IL-23 promotes myocardial I/R injury by increasing the inflammatory responses and oxidative stress reactions. *Cell Physiol Biochem* 2016; 6: 2163-2172.
54. Fuchs M. Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *Faseb J* 2003; 17: 2118-2120.
55. Nunez J, Nunez E, Bodi V, et al. Usefulness of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in ST segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardio* 2008; 101: 747-752.
56. Dayawansa NH, Gao XM, White DA, et al. Role of MIF in myocardial ischaemia and infarction: insight from recent clinical and experimental findings. *Clin Sci* 2014; 127: 149-161.
57. Takahashi M, Nishihira J, Katsuki T, et al. Elevation of plasma levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2002; 89: 248-249.
58. Frangogiannis G. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol* 2014; 5: 255-265.
59. Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, et al. Acute Immune Response in Respect To Exercise-Induced Oxidative Stress, Pathophysiology 2001; 7: 263-270.
60. Gleeson M and Bishop NC. Modification of immune responses to exercise by carbohydrate, glutamine and anti-oxidant supplements, *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 554-561.
61. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines, *Br J Sports Med* 2000;34: 246-251.
62. Artış AS. Akut Yoğun Egzersizde Proinflamatuvar Sitokinler Ve Beyin Natriüretik Peptid (Bnp) Seviyesi İlişkisi. Uzmanlık Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 2009: 102; 3, 5, 16, 17, 60.
63. Öztürk Y. Direnç Egzersizinin TLR Ekspresyonu, IL-8, IL-6, TNF α ve Kortizol Hormonu Üzerine Akut Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Manisa: Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antrenörlük Eğitimi Anabilim Dalı Hareket ve Antrenman Bilim Dalı, ;76; 1, 41, 42
64. Gürsel G. Egzersiz testleri: Klinik tanıdaki yeri ve hasta takibindeki önemi. *Solunum* 2000; 2: 175-193.
65. Ping, Zheng. "The protective effects of salidroside from exhaustive exercise-induced heart injury by enhancing the PGC-1 α -NRF1/NRF2 pathway and mitochondrial respiratory function in rats." *Oxid Med Cell Longev* 2015; Article ID 876825, 9 pages.
66. Köseoğlu Fusun Pulmoner rehabilitasyon. Beyazova M, kutsal YG (Eds) Fiziksel tıp ve rehabilitasyon. Güneş Kitap Evi 2011.s.1565—1577.

67. Ries AL. The importance of exercise in pulmonary rehabilitation. *Clin Chest Med* 1994; 15: 327-336.
68. Ventura Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovasc Res*, 2008; 2: 208-217.
69. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 2004; 18: 357-368.
70. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1147: 321-334.
71. Perry CG, Lally J, Holloway GP, et al. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol* 2010; 588: 4795-4810.
72. Jacobs RA, Flück D, Bonne TC, et al. Improvements in exercise performance with high-intensity interval training coincide with an increase in skeletal muscle mitochondrial content and function. *J Appl Physiol* 2013; 115: 785-793.
73. Cameron RB, Beeson CC, Schnellmann RG. Development of therapeutics that induce mitochondrial biogenesis for the treatment of acute and chronic degenerative diseases. *J Med Chem* 2016; 59: 10411-10434.
74. Wu ZD, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; 98: 115–124.
75. Lin J, Wu H, Tarr PT, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 2002; 418: 797.
76. Ruas JL, White JP, Rao RR, et al. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* 2012; 151: 1319-1331.
77. Jung S, Kim K. Exercise-induced PGC-1 α transcriptional factors in skeletal muscle. *Integr Med Res* 2014; 3: 155-160.
78. Baar K. Nutrition and the adaptation to endurance training. *Sports Med* 2014; 44: 5-12.
79. Kang C, Li Ji L. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1271: 110-117.
80. Psilander N. The effect of different exercise regimens on mitochondrial biogenesis and performance. *Inst för fysiologi och farmakologi/Dept of Physiology and Pharmacology*, 2014.
81. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 1269-1278.
82. Soriano FX, Liesa M, Bach D, et al. Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , estrogen-related receptor- α , and mitofusin 2. *Diabetes* 2006; 55: 1783-1791.

83. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1868-1876.
84. Haemmerle G, Moustafa T, Woelkart G, et al. ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- α and PGC-1. *Nat Med* 2011; 17: 1076.
85. Olesen J, Kiilerich K, Pilegaard H. PGC-1 α -mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflügers Archiv: Eur J Appl Physiol* 2010; 460: 153-162.
86. Rao RR, Long JZ, White JP, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* 2014; 157: 1279–1291.
87. Ost M, Coleman V, Kasch J, Klaus S. Regulation of myokine expression: Role of exercise and cellular stress. *Free Radic Biol Med* 2016; 98:78-89.
88. Li ZY, Zheng SL, Wang P, et al. Subfatin is a novel adipokine and unlike Meteorin in adipose and brain expression. *CNS Neurosci Ther* 2014; 20: 344–354.
89. Li ZY, Song J, Zheng SL, et al. Adipocyte Metrnl Antagonizes Insulin Resistance Through PPARgamma Signaling. *Diabetes* 2015; 64: 4011–4022.
90. Zheng SL, Li ZY, Song J, Liu JM, Miao CY. Metrnl: a secreted protein with new emerging functions. *Acta Pharmacol Sin* 2016; 37: 571-579.
91. Surace C, Piazzolla S, Sirleto P, et al. Mild ring 17 syndrome shares common phenotypic features irrespective of the chromosomal breakpoints location. *Clin Genet* 2009; 76: 256–262.
92. Yi C, Zhang C, Hu X, et al. Vagus nerve stimulation attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting the expression of interleukin-17A. *Exp Ther Med* 2016; 11: 171-176.
93. Shinlapawittayatorn K, Chinda K, Palee S, et al. Vagus nerve stimulation initiated late during ischemia, but not reperfusion, exerts cardioprotection via amelioration of cardiac mitochondrial dysfunction. *Heart Rhythm* 2014; 11: 2278-2287.
94. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
95. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
96. Kaeffer N, Richard V, Francois A, et al. Preconditioning prevents chronic perfusion-induced coronary endothelial dysfunction in rats. *Am J Physiol* 1996; 271: H842–H849.
97. Ozcan O, Erdal H, Yonden Z. İskemi-reperfüzyon hasarı ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakış. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi* 2015; 6: 27-33.
98. Grace PA, Mathie RT. Ischemia-reperfusion Injury. London, Blackwell Science, 1999.
99. Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, et al. Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron Artery Dis* 2001; 12: 349- 356.
100. Brover RW, Meij S, Serruys PW. A model of asynchronous left ventricular relaxation predict- ing the bi-experimental pressure decay. *Cardia- Vasc Res* 1983; 17: 482.
101. Katz AM, Reuter H. Cellular calcium and cardi- ac cell death. *Am J Cardiol* 1979; 44: 188.

102. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255–266.
103. Rico H, Crespo E, Hernandez ER, et al. Influence of boron supplementation on vertebral and femoral bone mass in rats on strenuous treadmill exercise: a morphometric, densitometric, and histomorphometric study. *J Clin Densitom* 2002; 5: 187-192.
104. Curley D, Plaza BL, Shah AM, Botnar RM. Molecular imaging of cardiac remodelling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2018; 113: 10.
105. Chung HS, Hwang SY, Choi JH, et al. Implications of circulating Meteorin-like (Metrl) level in human subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2018; 136: 100-107.
106. Lee JH, Kang YE, Kim JM, et al. Serum Meteorin-like protein levels decreased in patients newly diagnosed with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2018; 135: 7-10.
107. Pellitero S, Piquer-Garcia I, Ferrer-Curriu G, et al. Opposite changes in meteorin-like and oncostatin m levels are associated with metabolic improvements after bariatric surgery. *Int J Obes* 2018; 42: 919.
108. Shivakumar M, Lee Y, Bang L, et al. Identification of epigenetic interactions between miRNA and DNA methylation associated with gene expression as potential prognostic markers in bladder cancer. *BMC Med Genomics* 2017; 24;10: 30.
109. Li ZY, Fan MB, Zhang SL, et al. Intestinal Metrl released into the gut lumen acts as a local regulator for gut antimicrobial peptides. *Acta Pharmacol Sin* 2016; 37: 1458-1466.
110. Rao RR, Long JZ, White JP, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* 2014; 157: 1279-1291.
111. Bae JY. Aerobic Exercise Increases Meteorin-Like Protein in Muscle and Adipose Tissue of Chronic High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Biomed Res Int*, 2018; 30:6283932.
112. Abozguia K, Phan TT, Shivu GN, et al. Reduced in vivo skeletal muscle oxygen consumption in patients with chronic heart failure—A study using Near Infrared Spectrophotometry (NIRS). *Eur J Heart Fail* 2008; 10: 652-657.
113. Drexler H, Riede U, Münzel T et al. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 1992; 85: 1751-1759.
114. Mancini DM, Coyle E, Coggan A, et al. Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1989; 80: 1338-1346.
115. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* 1990; 81: 518-527.
116. Massie BM, Simonini A, Sahgal P, Wells L, Dudley GA. Relation of systemic and local muscle exercise capacity to skeletal muscle characteristics in men with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 140-145.
117. Sullivan MJ, Duscha BD, Klitgaard H, et al. Altered expression of myosin heavy chain in human skeletal muscle in chronic heart failure. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29: 860-866.

118. Arnolda L, Brosnan J, Rajagopalan B, Radda GK. Skeletal muscle metabolism in heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1991; 261: H434-H442.
119. Bernocchi P, Ceconi C, Pedersini P, et al. Skeletal muscle metabolism in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 2263-2273.
120. Sabbah HN, Hansen-Smith F, Sharov VG, et al. Decreased proportion of type I myofibers in skeletal muscle of dogs with chronic heart failure. *Circulation* 1993; 87: 1729-1737.
121. Simonini A, Long CS, Dudley GA, et al. Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. *Circ Res* 1996; 79: 128-136.
122. Simonini A, Massie BM, Long CS, Qi M, Samarel AM. Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1683-1691.
123. Delp MD, Duan C, Mattson JP, Musch TI. Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure. *J Appl Physiol* 1997; 83: 1291-1299.
124. Drake JC, Wilson RJ, Yan Z. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *The FASEB Journal* 2015; 30: 13-22.
125. Chung E, Joiner HE, Skelton T, et al. Maternal exercise upregulates mitochondrial gene expression and increases enzyme activity of fetal mouse hearts. *Physiol Rep* 2017; 5: e13184
126. Jiang HK, Wang YH, Sun L, et al. Aerobic interval training attenuates mitochondrial dysfunction in rats post-myocardial infarction: roles of mitochondrial network dynamics. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 5304-5322.
127. Vettor R, Valerio A, Ragni M, Trevelin E, et al. Exercise training boosts eNOS-dependent mitochondrial biogenesis in mouse heart: role in adaptation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 306: E519-E528.
128. Granata C, Jamnick NA, Bishop DJ. Principles of Exercise Prescription, and How They Influence Exercise-Induced Changes of Transcription Factors and Other Regulators of Mitochondrial Biogenesis. *Sports Med* 2018; 48: 1541–1559.
129. Jung S, Kim K. Exercise-induced PGC-1 α transcriptional factors in skeletal muscle. *Integr Med Res* 2014; 3: 155-160.
130. Aoi W, Naito Y, Mizushima K, et al. The microRNA miR-696 regulates PGC-1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E799-E806.
131. Ikeda S, Kawamoto H, Kasaoka K, et al. Muscle type-specific response of PGC-1 α and oxidative enzymes during voluntary wheel running in mouse skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 2006; 188: 217–223.

132. Jung SR, Ahn NY, Kim SH, Kim KJ. The effects of ladder climbing exercise training on PGC-1 α expression and mitochondrial biogenesis of skeletal muscle in young and middle-aged rats. *Exerc Sci* 2014; 23: 339–345.
133. Oliveira NR, Marques SO, Luciano TF, et al. Treadmill training increases SIRT-1 and PGC-1 α protein levels and AMPK phosphorylation in quadriceps of middle-aged rats in an intensity-dependent manner. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 987017.
134. Popov DB, Zinovkin RA, Karger EM, Tarasova OS, Vinogradova OL. The effects of aerobic exercise upon genes expression in skeletal muscle of trained and untrained men. *Fiziol Cheloveka* 2013; 39: 92–98.
135. Summermatter S, Baum O, Santos G, Hoppeler H, Handschin C. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) promotes skeletal muscle lipid refueling in vivo by activating de novo lipogenesis and the pentose phosphate pathway. *J Biol Chem* 2010; 285: 32793–32800.
136. Terada S, Goto M, Kato M, et al. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 350–354.
137. Safdar A, Little JP, Stokl AJ, et al. Exercise increases mitochondrial PGC-1 α content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 2011; 286: 10605–10617.
138. Niklas P, Li W, Jens W, Michail T, Kent S. Mitochondrial gene expression in elite cyclists: effects of high-intensity interval exercise. *Eur J Appl Physiol* 2010; 110: 597–606.
139. Kunkel GH, Chaturvedi P, Tyagi SC. Mitochondrial pathways to cardiac recovery: TFAM. *Heart Fail Rev* 2016; 21: 499–517.
140. Mukwevho E. NRF-1 and its target genes are increased by exercise: Potential role of NRF-1 in type 2 diabetes. *The FASEB Journal* 2013; 27: lb718–lb718.
141. Trevellin E, Scorzeto M, Olivieri M, et al. Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. *Diabetes* 2014; 63: 2800–2811.
142. Hu Q, Ren J, Li G, et al. The mitochondrially targeted antioxidant MitoQ protects the intestinal barrier by ameliorating mitochondrial DNA damage via the Nrf2/ARE signaling pathway. *Cell Death Dis* 2018; 9: 403.
143. Seo H, Lee I, Chung HS, et al. ATP5B regulates mitochondrial fission and fusion in mammalian cells. *Anim Cells Syst* 2016; 20: 157–164.
144. Hansen AH, Nyberg M, Bangsbo J, Saltin B, Hellsten Y. Exercise training alters the balance between vasoactive compounds in skeletal muscle of individuals with essential hypertension. *Hypertension* 2011; 58: 943–949.
145. Arya A, Sethy NK, Gangwar A, et al. Cerium oxide nanozyme modulate the ‘exercise’ redox biology of skeletal muscle. *Mater Res Express* 2017; 4: 055401.

146. Yu H, Guan Q, Guo L, et al. Gypenosides alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuation of oxidative stress and preservation of mitochondrial function in rat heart. *Cell Stress Chaperones* 2016; 21: 429-437.
147. Merry TL, Ristow M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. *J Physiol* 2016; 594: 5195-5207.
148. Belenguer P, Pellegrini L. The dynamin GTPase OPA1: more than mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2013; 1833: 176-183.
149. "OPA1 Gene". <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/OPA1> 20.03.2018.
150. Wang Q, Wu S, Zhu H, et al. Deletion of PRKAA triggers mitochondrial fission by inhibiting the autophagy-dependent degradation of DNM1L. *Autophagy* 2017; 13: 404-422.
151. Liu Y, Zhang FB, Tang SH, et al. Analysis on "component-target-pathway" of *Paeonia lactiflora* in treating cardiac diseases based on data mining. *China journal of Chinese materia medica* 2018; 43: 1310-1316.
152. Görgens SW, Benninghoff T, Eckardt K, et al. Hypoxia in Combination With Muscle Contraction Improves Insulin Action and Glucose Metabolism in Human Skeletal Muscle via the HIF-1 α Pathway. *Diabetes* 2017; db161488.
153. Si J, Wang N, Wang H, et al. HIF-1 α signaling activation by post-ischemia treatment with astragaloside IV attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *PloS One* 2014; 9: 107832.
154. Lundby C, Gassmann M, Pilegaard H. Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1 α and HIF-2 α mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur J Appl Physiol* 2006; 96: 363-369.
155. O'Hagan KA, Cocchiglia S, Zhdanov AV, et al. PGC-1 α is coupled to HIF-1 α -dependent gene expression by increasing mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 2188-2193.
156. Arany Z, Foo SY, Ma Y, et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* 2008; 451: 1008.
157. Koch AJ, Pereira R, Machado M. The creatine kinase response to resistance exercise. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2014; 14: 68-77.
158. Apple FS, Billadello JJ. Expression of creative kinase M and B mRNAs in treadmill trained rat skeletal muscle. *Life sci* 1994; 55: 585-592.
159. Roshan VD, Assali M, Moghaddam AH, Hosseinzadeh M, Myers J. Exercise training and antioxidants: effects on rat heart tissue exposed to lead acetate. *Int J Toxicol* 2011; 30: 190-196.
160. Frederico MJ, Justo SL, Da Luz, et al. Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reactive oxygen species in rats submitted to myocardial infarction induced by isoproterenol. *Free Radic Res* 2009; 43: 957-964.

161. Salimeh A, Mohammadi M, Mohaddes G, Badalzadeh R. Protective effect of diosgenin and exercise training on biochemical and ECG alteration in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Iran J Basic Med Sci* 2011; 14: 264.
162. Neto J.C.R, Lira FS, Zanchi NE, et al. Acute exhaustive exercise regulates IL-2, IL-4 and MyoD in skeletal muscle but not adipose tissue in rats. *Lipids Health Dis* 2011;13; 10: 97.
163. Daniel EE, Breemen CV, Schilling WP, Kwan CY. Regulation of vascular tone: cross-talk between sarcoplasmic reticulum and plasmalemma. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 551-557.
164. Emeka PM, AA Anas. Effect of metformin on ECG, HR and BP of rats administered with cardiotoxic agent doxorubicin. *Int J Basic Clin Pharmacol* 2017; 6: 1054-1059.
165. Damasceno DD, Lima MP, Motta DF, et al. Cardiovascular and electrocardiographic parameters after tonin administration in Wistar rats. *Regul Pept* 2013; 181: 30-36.
166. Toutounchi NS, Afroozian A, Rameshrad M, et al. Cardioprotective Effects of Rosmarinic Acid on IsoproterenolInduced Myocardial Infarction in Rats. *Pharm Sci* 2017; 23: 103-111.
167. Owen KL, Pretorius L, McMullen JR. The protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) in the failing heart. *Clin Sci (Lond)* 2009; 15:365-375.
168. Bozi LH, Maldonado IR, Baldo MP, et al. Exercise training prior to myocardial infarction attenuates cardiac deterioration and cardiomyocyte dysfunction in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013; 68 (4): 549-556.
169. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic & clinical pharmacology. 2004.
170. Arnal JF, Tack IVAN, Besombes JP, Pipy B, Negre-Salvayre A. Nitric oxide and superoxide anion production during endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 1996; 271: C1521-C1526.
171. Demirci B, Uysal A, Ulker S. Alterations in the vascular reactivity of aorta in the early and late phase of adjuvant-induced arthritis in rat. *Vascular Disease Prevention* 2007; 4: 11-19.