

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**ELLAJİK ASİTİN DENEYSEL OLARAK MİYOKARDİYAL
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN
RATLARDA KORUYUCU ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ELİF ŞİMŞEK**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ABDULLAH ÖZER**

**YARDIMCI TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. HÜSEYİN DEMİRTAŞ**

**ANKARA
EKİM 2025**

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

ELLAJİK ASİTİN DENEYSEL OLARAK MİYOKARDİYAL
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN
RATLARDA KORUYUCU ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ELİF ŞİMŞEK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ABDULLAH ÖZER

YARDIMCI TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. HÜSEYİN DEMİRTAŞ

ANKARA
EKİM 2025

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi, deneyim ve desteğini her zaman hissettiren hocam Prof Dr Abdullah Özer'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneyim ve birikimini her zaman yanımda hissettiren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Volkan Sinci'ye,

Bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, desteklerini eksik etmeyen çok kıymetli hocam Prof Dr Mustafa Levent Gökgöz'e

Klinik ve akademik konularda her zaman danışabildiğim; bilgi, vizyon ve teşvikleriyle eğitimime büyük katkı sağlayan ve ufkumu genişleten; Prof Dr Gürsel Levent Oktar, Prof Dr Erkan İriz ve Prof Dr Mustafa Hakan Zor'a,

Bilgi ve tecrübesiyle beni destekleyen, mesleki anlamda öğrettiği her şey için Prof Dr Hikmet Selçuk Gedik ve Dr Öğr Üyesi Sercan Tak'a,

Eğitim sürecim boyunca desteklerini esirgemeyen, klinik ve akademik anlamda her soruma sabırla yanıt veren Gazi Üniversitesi Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof Dr Yusuf Ünal'a,

Tez sürecimin boyunca yönlendirmeleriyle yanımda olan yardımcı tez danışmanım Doç Dr Hüseyin Demirtaş'a

Asistanlığa başladığım ilk günden itibaren bana yol gösteren, mesleki tutumu ve sabrından her zaman ilham aldığım Öğr. Gör. Dr Başak Koçak’a,

Asistanlık döneminin tüm zorluk ve güzelliklerini birlikte paylaştığım Gazi Üniversitesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı’ndaki tüm öğretim üyelerine, bu zor süreçten keyif almamı sağlayan çalışma arkadaşlarıma; ameliyathane, yoğun bakım ve servis süreçlerinde özveriyle çalışan hemşire, perfüzyonist, teknisyen ve diğer sağlık personeli arkadaşlarıma,

Yoğun ve yorucu uzmanlık sürecinin bana en büyük katkısı olan, benim için iş arkadaşlığı kavramını değiştiren, beni bu yolculukta yalnız bırakmayan Op Dr Eda Nur Yiğiter’e,

Uzmanlık sürecimin her aşamasında varlığıyla güç veren, iyi günde kötü günde yanımda olan canım arkadaşım Dr Esra Doğan’a,

Zorlandığım anlarda sabırla dinleyip bana yol gösteren, hayattaki duruşları ile gurur duyduğum arkadaşlarım Uzm Dr İnci Meltem Akkaya ve Dr Margaret Tulessin’e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, beni yetiştiren, bana güç veren ve koşulsuz desteğini daima hissettiren aileme minnettarım...

Dr Elif Şimşek
Ankara, Ekim 2025

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	İ
İÇİNDEKİLER.....	İİİ
TABLolar	VI
ŞEKİLLER VE RESİMLER	VII
KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI PATOFİZYOLOJİSİ.....	4
2.1.1. İSKEMİK FAZ	4
2.1.2. REPERFÜZYON FAZI.....	7
2.2. MİYOKARDİYAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI.....	9
2.2.1. OKSİDATİF STRES	9
2.2.2. KALSİYUM DİSREGÜLASYONU	9
2.2.3. MİTOKONDRIYAL DİSFONKSİYON	9
2.2.4. İNFLAMATUVAR KASKAD	10
2.2.5. HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARI	10
2.3. MİYOKARDİYAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ (İRİ) KLİNİK ÖNEMİ	11
2.3.1. MİYOKARD İNFARKTÜSÜ	11
2.3.2. MİYOKARDİYAL STUNNING.....	12
2.3.3. MİYOKARDİYAL HİBERNASYON	12

2.4.	İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDAN KORUNMA YÖNTEMLERİ.....	14
2.4.1.	EKZOJEN KORUNMA YÖNTEMLERİ	14
2.4.2.	ENDOJEN KORUNMA YÖNTEMLERİ.....	18
2.5.	MİYOKARDİYAL İSKEMİ–REPERFÜZYONDA HASARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	22
2.5.1.	TOPLAM ANTİOKSİDAN DÜZEY (TAS)	22
2.5.2.	TOPLAM OKSİDAN DÜZEY (TOS)	22
2.5.3.	OKSİDATİF STRES İNDEKSİ (OSI)	23
2.5.4.	PARAOKSONAZ-1 (PON-1)	24
2.5.5.	TUNEL (TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE dUTP NICK-END LABELING).....	24
2.6.	İSKEMİ–REPERFÜZYON HASARINDA ANTİOKSİDAN OLARAK ELLAJİK ASİT	25
2.7.	MİYOKARDİYAL İ/R MODELİNDE RATLARIN YERİ.....	27
3.	GEREÇ YÖNTEM.....	29
3.1.	ARAŞTIRMANIN TİPİ	29
3.2.	ETİK KURUL ONAYI.....	29
3.3.	ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI	29
3.4.	KULLANILAN DENEKLER VE ÇALIŞMA GRUPLARI	29
3.5.	ELLAJİK ASİTİN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI	31
3.6.	CERRAHİ YÖNTEM.....	31
3.7.	HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	32

3.8.	APOPTOZUN BELİRLENMESİ.....	33
3.9.	BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME.....	34
3.10.	İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	37
4.	BULGULAR	38
4.1.	HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	38
4.2.	BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	43
5.	TARTIŞMA	46
6.	SONUÇ	54
7.	KAYNAKÇA	55
8.	ÖZET.....	68
9.	ABSTRACT	69
10.	EKLER	70
10.2.	: ETİK KURUL ONAYI.....	70
11.	ÖZGEÇMİŞ.....	71

TABLÖLAR

Tablo 1: Kalp dokusu histopatolojik bulguları [Ort $\pm$ SH].....	40
Tablo 2: Kalp dokusu TUNEL analizi bulguları [Ort $\pm$ SH]	42
Tablo 3: Serum oksidan durum parametreleri [Ort $\pm$ SH].....	44
Tablo 4: Kalp dokusu oksidan durum parametreleri [Ort $\pm$ SH].....	45



ŞEKİLLER ve RESİMLER

Şekil 1. miyokardiyal İ/R mekanizmaları..... 11

Şekil 2. İ/R hasarı sırasında ortaya çıkan ROS 21

Resim 1. H&E boyalı kalp doku örneklerine ait görüntüler..... 41

Resim 2. Kalp doku örneklerinin TUNEL pozitifliğini gösteren görüntüler..... 42



KISALTMALAR

ARE:	antioksidan yanıt elemanı
ATP:	adenozin trifosfat
CAT:	Katalaz
DAMP:	hasar ilişkili moleküler örgüler
EA:	Ellajik Asit
eNOS:	endotelyal nitrik oksit sentaz
GPX:	glutasyon peroksidaz
GSH:	indirgenmiş glutasyon
GÜDAM:	Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
H₂O₂:	hidrojen peroksit
IL-1β:	İnterlökin 1 beta
IL-6:	İnterlökin-6
İ/R:	İskemi–Reperfüzyon
İRH:	İskemi–Reperfüzyon Hasarı
MDA:	malondialdehit
MI:	miyokard infarktüsü
mPTP:	mitokondriyal geçirgenlik geçiş poru
MRG:	manyetik rezonans görüntüleme
MSC-Exo:	mezenkimal kök hücre kökenli eksozomlar
MVO:	mikrovasküler obstrüksiyon

NCX:	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
NF-κB:	nükleer faktör kappa B
NHE:	Na ⁺ /H ⁺ exchanger
NO:	nitrik oksit
Nrf2:	nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
O₂⁻:	süperoksit anyonu
OSI:	2.5.3. OKSİDATİF STRES İNDEKSİ
PON:	Paraoksonaz
PET:	pozitron emisyon tomografisi
PKG:	perkütan koroner girişim
RET:	ters elektron taşınımı
RISK:	Reperfusion Injury Salvage Kinase
ROS:	reaktif oksijen türleri
SAFE:	Survivor Activating Factor Enhancement
SOD:	süperoksit dismutaz
STEMI:	ST-segment elevasyonlu miyokard infarktüsü
TAS:	Total antioksidan status
TLR:	Toll benzeri reseptör
TNF-α:	tümör nekrozis faktör alfa
TOS:	Total antioksidan kapasite
TUNEL:	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Dntp Nick-End Labeling
ΔΨ_m:	mitokondriyal membran potansiyeli

1. GİRİŞ

Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon (İ/R) hasarı, akut koroner sendromların ve kardiyak cerrahinin temel patobiyolojik bileşenidir. Her ne kadar hızlı reperfüzyon sağkalımı önemli ölçüde arttırsa da oksidatif stres, kalsiyum disregülasyonu, mitokondriyal işlev bozukluğu ve düzenlenmiş hücre ölüm programları yoluyla ek doku hasarı oluşur.(1-3) Mikrovasküler düzeyde endotel disfonksiyonu, nitrik oksit (NO) biyoyararlanımında azalma ve lökosit-trombosit tıkaçları, epikardiyal damar kan akışının yeniden oluşmasına rağmen doku perfüzyonunu sınırlayan mikrovasküler obstrüksiyon (no-reflow) tablosuna zemin hazırlar.(4)

Akut miyokard infarktüsü (MI) gibi bir insan hastalığının patogenezinin yalnızca otopsiye dayanarak belirlemek zordur, çünkü hasarın görünümü zamanla değişir ve premortem yaşı kesin olarak belirlemek kolay değildir. Ayrıca, postmortem otoliz bu analizleri daha da karmaşık hale getirebilir. Otoliz ve iskemi temelde aynı mekanizmaları içerir ve her ikisi de hızlı bir şekilde ilerler. Bu nedenle, insan kardiyak otopsi dokusunda metabolik çalışmalar yapmak neredeyse imkansızdır. Hastaların, akut infarktüsün gelişen olaylarını mantıklı bir süre içinde sıralamayı mümkün kılacak bir takvime göre ölmemeleri, bu analizleri daha da karmaşık hale getiren bir diğer faktördür. Ancak, deneysel hayvanlarda iskemi üzerine yapılan çalışmalar, miyokardiyal iskemiye bağlı olarak meydana gelen metabolik, fizyolojik, histolojik, elektriksel ve patolojik değişiklikleri öğrenmek için iyi ve tekrarlanabilir bir yöntem sunmaktadır.(5)

Bu çerçevede antioksidan stratejiler ve mitokondriyi hedefleyen yaklaşımlar kardiyoprotektif araştırmaların odak noktasıdır. Ellajik Asit (EA); nar, çilek, ahududu ve ceviz gibi meyve-kuruyemişlerde ellagitaninlerden türeyen doğal bir polifenolik bileşiktir. Deneysel modellerde serbest radikal süpürücü, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiler göstermiştir.(6, 7) Kardiyak alanda doğrudan veriler sınırlı olmakla birlikte, EA-altın nanoparçacık formülasyonları miyokard infarktüsü modellerinde infarkt alanını küçültme ve sol ventrikül fonksiyonunu iyileştirme yönünde umut verici sonuçlar bildirmiştir.(8) Ellajik Asit biyoyararlanımının düşük olması, nano-taşıyıcı ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarına ilgiyi artırmıştır.(6, 8)

Bu bilgiler ışığında hazırlamış olduğum bu çalışmada günümüzde hala popülerliğini koruyan, miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon hasarı konusunda koruyucu etkileri olabileceğini düşündüğüm Ellajik Asit'in ratlarda deneysel kullanımı ve sonuçlarını sunmayı amaçladım.

2. GENEL BİLGİLER

İskemi–Reperfüzyon Hasarı (İRİ) kavramı, ilk olarak 20. yüzyılın ortalarında, araştırmacıların oksijenden yoksun dokulara kan akımının yeniden sağlanmasının paradoksal biçimde iyileşme yerine ek hasara yol açabildiğini fark etmeleriyle ortaya çıkmıştır. Bu gözlem, revaskülarizasyonun bütünüyle yararlı olduğu yönündeki yerleşik varsayıma meydan okumuştur.

1960’larda Jennings ve çalışma arkadaşlarının yürüttüğü öncü çalışmalarda, iskemi sonrası reperfüzyonun kardiyak dokuda belirgin hücresel hasar oluşturduğu gösterilmiştir. Hayvan modellerindeki deneylerinde, kan akımının geri dönüşünün mitokondriyal bozulma ve nekroz gibi yapısal anormalliklere neden olduğunu belgeleyerek, iyileşmeyi tek başına kolaylaştırmak yerine bizzat reperfüzyon evresinin miyokardiyal hasara önemli ölçüde katkıda bulunabildiğini ortaya koymuşlardır.(9)

İskemik olayların ardından infarkt boyutunu en aza indirmek için kan akımının erken dönemde yeniden sağlanması hayati öneme sahip olsa da paradoksal biçimde ek bir hasarı tetikler, bu olgu reperfüzyon hasarı olarak adlandırılır. Bu hasar; reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi, kalsiyum dengesizliği, inflamatuvar yanıtlar ve hücre ölümü yollarının aktivasyonu gibi bir dizi mekanizma aracılığıyla ortaya çıkar.(10)

2.1. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI PATOFİZYOLOJİSİ

2.1.1. İSKEMİK FAZ

Miyokardiyal iskemi, koroner kan akımının aerobik metabolizmanın sürdürülmesi için gerekli düzeyin altına ani düşmesiyle tetiklenen, zamana bağımlı bir olaylar dizisidir. Saniyeler içinde oksidatif fosforilasyon duraklar, yüksek enerjili fosfat depoları azalır ve miyokard anaerobik glikolize kayarak laktik asidoz, kontraktıl fonksiyon kaybı ve akım yeniden sağlanmadığı takdirde ilerleyici yapısal hasar ile seyrederek.(11) In vivo ve ex vivo modeller, iskemik sürenin uzamasıyla birlikte geri dönüşlü hasarın geri dönüşsüz hücre ölümüne evrilme olasılığının arttığını ve bunun reperfüzyon sırasında ortaya çıkacak ek hasar için biyolojik bir zemin hazırladığını tutarlı biçimde göstermektedir.(11)

Enerji Metabolizması, Asidoz ve Nekrozun “Dalga-Cephe” Fenomeni

Şiddetli iskemi sırasında adenosin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin depoları hızla tükenir, anaerobik glikolizin baskın hale gelmesine bağlı olarak hücre içi pH düşer ve sarkolemmal iyon pompalarının işlevi bozulur; bunun sonucunda hücrel şişme ve uyarılabilirlik kaybı gelişir.(11) Gelişen miyokardiyal hasarın temel mekansal özelliği, “dalga-cephe (wavefront) fenomeni” olarak tanımlanır; nekroz, perfüzyonun en yetersiz olduğu subendokardiyumda başlar ve oklüzyon sürdükçe transmural olarak epikardiyuma doğru ilerler.(12) Bu kavram, infarktüs evriminin modern anlayışında merkezi bir yer tutmayı sürdürmekte ve erken reperfüzyonun klinik öneminin patofizyolojik temelini oluşturmaktadır. (11, 12)

İyonik Düzen Bozukluğu ve Kalsiyum Yüklenmesi

İskemik asidoz, Na^+/H^+ exchanger (NHE; Sodyum-Hidrojen Değiştirici)'ı aktive ederek hücre içi Na^+ birikimini artırır. Artan Na^+ yükü, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX; Sodyum Kalsiyum Değiştirici)'ın ters modda çalışmasını tetikler ve hem sitozolik hem de organel içi Ca^{2+} aşırı yüklenmesini kolaylaştırır. Eş zamanlı ATP tükenmesi, Na^+/K^+ -ATPaz ve Ca^{2+} -ATPaz işlevlerini zayıflatarak iyonik dengesizliği daha da derinleştirir. Net sonuç; Ca^{2+} -bağımlı proteazların (örn. kalpainler) ve fosfolipazların aktivasyonu, sitokeletal bütünlükte bozulma ve aritmiye duyarlılığın artmasıdır.(13-15) İskemi sırasında NHE aktivasyonunun büyüklüğü deneysel koşullara göre değişkenlik gösterse de, NHE'ye bağımlı hücre içi Na^+ yüklenmesinin terapötik olarak azaltılması, Ca^{2+} aşırı yüklenmesini ve buna bağlı doku hasarını sınırlamak için mekanik açıdan iyi temellendirilmiş bir strateji olmaya devam etmektedir.(13, 15)

Mitokondriyal Disfonksiyon ve Geçirgenlik Geçışı

Mitokondriler, iskemi sırasında ve özellikle bunu izleyen reperfüzyon fazında kardiyomiyositlerin kaderini belirleyen başlıca organellerdir. İskemi, mitokondriyal membran potansiyelini bozarak pH'nin nötralize olması ve reperfüzyon sırasında oksidan stresin artması durumlarında mitokondriyal geçirgenlik geçiş porunun (mPTP) açılmasına zemin hazırlar. mPTP açılımı, mitokondriyal membran potansiyelinin çökmesine, oksidatif fosforilasyonun bağlantısını engeller ve sonuçta nekroza yol açar. Kısa ve geçici açılmalar

fizyolojik olarak görülebilse de, uzamış mPTP açılımı iskemi–reperfüzyon bağlamında patolojiktir.(16, 17)

Metabolik Yeniden Programlama: Süksinat ve Ters Elektron Taşınımı (RET)

Son on yıldaki önemli bir ilerleme, iskeminin süksinat birikimine yol açığının gösterilmesidir. Reperfüzyonla birlikte bu süksinat, kompleks II (süksinat dehidrogenaz) tarafından hızla oksitlenir; bunun sonucunda belirgin ölçüde indirgenmiş bir koenzim Q havuzu oluşur ve bu durum kompleks I’de ters elektron taşınımını (RET; reverse electron transport) zorlayarak mitokondriyal süperoksit patlamasını tetikler.(18, 19) RET kaynaklı reaktif oksijen türleri (ROS) dalgası, erken reperfüzyon hasarının yakın/proksimal bir belirleyicisidir ve Ca^{2+} aşırı yüklenmesi ile etkileşerek mPTP açılımını başlatır.(18, 19)

Mikrovasküler ve Endotelyal Bileşenler

İskemi, endotelyal NO biyoyararlanımını azaltır, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır ve lökositler ile trombositlerin kapiller düzeyde tıkaç oluşturmalarını, aynı zamanda endotelyal hücrelerdeki ödem ile kolaylaştırır. Bu değişiklikler, anjiyografideki “no-reflow” olgusunun yapısal karşılığı olan mikrovasküler obstrüksiyon (MVO) tablosuna evrilebilir. MVO, epikardiyal arter yeniden açılmış olsa dahi doku düzeyi perfüzyonu sınırlar. ST-segment elevasyonlu miyokard infarktüsü (STEMI) sonrasında MVO yaygındır ve daha geniş infarkt alanları ile daha kötü klinik sonuçları öngörür.(4, 20, 21)

2.1.2. REPERFÜZYON FAZI

Reperfüzyon, iskemik miyokarda kan ve oksijen akımının yeniden sağlanmasıyla doku kurtarımının tek yolu olmakla birlikte, erken fazda ortaya çıkan oksidatif stres, iyonik dengesizlik ve inflamatuvar yanıt nedeniyle ek hasarı tetikleyebilir.(11, 22) İlk dakikalarda hızla pH nötralizasyonu, Ca^{2+} girişinin artışı, mitokondriyal ROS patlaması ve mPTP'nin açılımına duyarlılığın artması nihai infarkt boyutunu belirleyen başlıca süreçlerdir. (2, 16, 17)

Reperfüzyonun Evreleri

Reperfüzyonu izleyen saniyeler–dakikalar içinde ani reoksijenasyon, adenosin aracılı vazodilatasyon ve hiperemik akımı başlatır. Laktat hızla tamponlanıp katabolize olur ve intramiyokardiyal pH nötralize olur. Bu dönemde NHE aktivasyonu hücre içine Na^+ girişini artırır; yükselen Na^+ , NCX'i ters modda çalıştırarak sitoplazmik Ca^{2+} yükü arttırır.(11, 22)

Ardından dakikalar içinde, iskemide biriken süksinatın kompleks II üzerinden hızla oksidasyonu kompleks I'de ters elektron akışı (RET) başlatarak belirgin bir mitokondriyal süperoksit patlamasına yol açar. Artan oksidan yük ve sitoplazmik/mitokondriyal Ca^{2+} birikimi, mPTP açılımını tetikler; bunun sonucunda mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) çöker, oksidatif fosforilasyon ayrışır ve nekrotik hücre ölümü gelişir.(2, 16)

Bu aşama ile dakikalar saatler içinde endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) disfonksiyonu ve NO biyoyararlanımındaki azalma belirginleşir; adezyon

molekülleri (örn. ICAM-1, VCAM-1, P-selektin) up-regüle olur ve lökosit–trombosit tıkaçları ile endotel şişmesi gelişir. Bu mikrovasküler değişiklikler, doku düzeyinde no-reflow ile uyumlu mikrovasküler obstrüksiyona yol açabilir.(4, 23)

Son olarak saatler günler içinde, hasarlı hücrelerden salınan hasar ilişkili moleküler örgüler (DAMP; Damage-associated molecular pattern) aracılığıyla Toll benzeri reseptör (TLR) sinyalleme ve nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivasyonu belirginleşir. Bunun sonucu nötrofil ve monosit infiltrasyonu, sitokin/kemokin düzeylerinde artış ve apoptoz, nekroptoz, ferroptoz gibi düzenlenmiş hücre ölümü programlarının devreye girmesiyle doku yanıtı şekillenir.(11, 24)

Erken reperfüzyonun zaman bağımlı yararı tartışmasıdır. Mümkün olan en kısa sürede kan akımının yeniden sağlanması infarkt boyutunu ve ölümcül aritmi riskini azaltır.(22) Bununla birlikte, no-reflow ve reperfüzyon hasarı doku düzeyinde kurtarılabılır miyokardı sınırlayabilir. Bu nedenle mPTP'nin hedeflenmesi, RISK/SAFE pro-survival ağlarının uyarılması, NO–sGC–cGMP–PKG ekseninin desteklenmesi ve antioksidan/antiinflamatuvar stratejiler gibi adjuvan yaklaşımlar, özellikle yüksek riskli olgularda klinik sonuçları iyileştirmeye adaydır. (16, 23, 24)

2.2. MİYOKARDİYAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

2.2.1. OKSİDATİF STRES

Reperfüzyonun ilk dakikalarında iskemide biriken süksinatın kompleks II'de hızla oksidasyonu, kompleks I'de ters elektron akışı (RET) ve mitokondriyal ROS patlaması oluşturur; bu patlama lipid/protein/DNA oksidasyonunu tetikler. Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 -antioksidan yanıt elemanı (Nrf2–ARE) yanıtının farmakolojik olarak desteklenmesi oksidatif hasarı ve/veya ferroptozu azaltarak kardiyoproteksiyon sağlamıştır.(7, 25, 26) Ayrıca yakın tarihli deneysel çalışmalar, Nrf2'nin artışının İ/R'de oksidatif stres ve inflamasyonu birlikte baskıladığını göstermektedir.(27)

2.2.2. KALSİYUM DİSREGÜLASYONU

pH'nin hızla nötralize olduğu erken reperfüzyonda NHE aktivasyonu hücre içine Na^+ girişini artırır; yükselen Na^+ , NCX'yi ters modda çalıştırarak Ca^{2+} aşırı yüklenmesine neden olur. Mitokondriyal Ca^{2+} birikimi mPTP açılımını tetikleyerek hücre ölümünü kolaylaştırır; bu eksen hedefleyen yaklaşımlar (NHE1/NCX modulasyonu, mitokondriyal Ca^{2+} akışlarının kontrolü) deneysel modellerde yarar göstermiştir.(1, 28-31)

2.2.3. MİTOKONDİRİYAL DİSFONKSİYON

Reperfüzyon sırasında gelişen Ca^{2+} aşırı yükü ve oksidan stres, mPTP açılım eşiğini düşürerek por aktivasyonuna yatkınlığı artırır. Kalıcı mPTP açılımı, $\Delta\Psi_m$ 'nin çökmesine, oksidatif fosforilasyonun ayrışmasına ve sonuçta nekrotik hücre ölümüne yol açar. Güncel derlemeler, mPTP'nin yapısal bileşenleri,

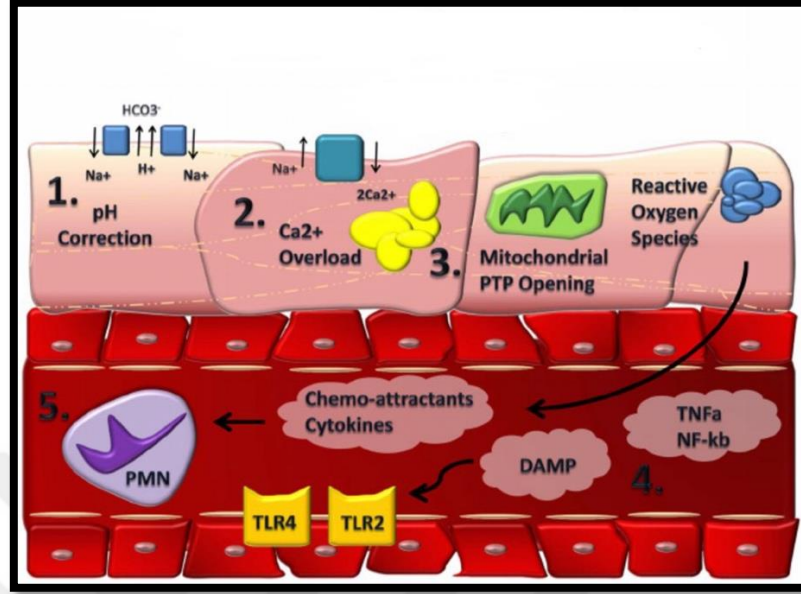
düzenlenmesi ve farmakolojik olarak hedeflenmesine ilişkin verileri kapsamlı biçimde özetlemekte; ayrıca mPTP inhibisyonu ile lipid peroksidasyonunun baskılanmasının birlikte uygulanmasının kardiyoprotektif etkileri additif olarak güçlendirdiğini göstermektedir.(3, 17, 32, 33)

2.2.4. İNFLAMATUVAR KASKAD

Hasarlı hücrelerden salınan DAMP'ler, TLR/NF- κ B sinyalini aktive ederek nötrofil-monosit infiltrasyonu ve sitokin/kemokin artışı ile sonuçlanır. Endotel disfonksiyonu ve NO biyoyararlanımındaki azalma, adezyon moleküllerinin artışı ve distal embolizasyon gibi faktörlerle birleştğinde mikrovasküler obstrüksiyon (no-reflow) gelişebilir. (34-36)

2.2.5. HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARI

Miyokardiyal İ/R'de apoptoz, nekroptoz, piroptoz ve ferroptoz gibi düzenlenmiş yollar, mPTP-aracılı enerji çöküşü ve inflamatuvar/oksidatif tetikleyicilerle etkileşim içinde ortaya çıkar. Erken nekroz, mPTP aracılı enerji çöküşünün sonucudur; apoptoz ise kaspaz kaskadı ve Bcl-2 ailesi dengesi ile düzenlenir. Son yıllarda nekroptoz (RIPK1/3-MLKL) ve ferroptoz (lipid peroksidasyonu, glutatyon peroksidaz-4 yetersizliği) İ/R'de önemli katkı sağlayan düzenlenmiş nekrotik yollar olarak tanımlanmıştır. Bu yolların seçici inhibisyonu deneysel olarak infarkt boyutunu azaltmıştır.(2, 11) 2024–2025 derlemeleri, bu yollar arasındaki çapraz düzenlemeyi ayırtılandırmış; seçici inhibitörlerin (zVAD, Nec-1, Fer-1 vb.) kalp fonksiyonu ve mitokondriyal bütünlüğü iyileştirdiğini göstermiştir.(37-41)



Şekil 1. miyokardiyal İ/R mekanizmaları(42)

2.3. MİYOKARDİYAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ (İRİ) KLİNİK ÖNEMİ

Miyokardiyal İR hasarının altta yatan patofizyolojik mekanizmaları, klinikte akut miyokard infarktüsünden başlayıp miyokardiyal stunning ve hibernasyon gibi geri dönüşlü kontraktıl disfonksiyon durumlarına uzanan geniş bir yelpazede karşılık bulur. Bu klinik tabloların -özellikle de tipik zaman seyirlerinin- anlaşılması, tedavi stratejilerinin belirlenmesi ve hasta sonuçlarının iyileştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

2.3.1. MİYOKARD İNFARKTÜSÜ

Akut miyokard infarktüsü, uzamış iskemiye bağlı geri dönüşsüz kardiyomiyosit nekrozu ile karakterizedir. Tedavi edilmeyen iskeminin süresi

belirleyicidir: şiddetli koroner oklüzyon altında nekroz genellikle 20–30 dakika içinde başlar ve reperfüzyon sağlanmazsa 4–6 saat içinde transmural infarkta ilerler.(43) Reperfüzyon tedavilerinin amacı infarkt boyutunu sınırlamak üzere kan akımını en kısa sürede yeniden sağlamaktır; ne var ki reperfüzyonun kendisi de oksidatif stres ve inflamasyon aracılığıyla ek hasar oluşturabilir. “Altın saat” içinde gerçekleştirilen zamanında reperfüzyon, klinik sonuçları anlamlı ölçüde iyileştirirken; geciken müdahale geri dönüşsüz doku kaybını artırır.(44)

2.3.1. MİYOKARDİYAL STUNNING

Miyokardiyal stunning, normal ya da normale yakın koroner kan akımı yeniden sağlanmasına rağmen süregelen geçici post-iskemik kontraktıl disfonksiyonu ifade eder. Kontraktıl bozulma genellikle reperfüzyonu takiben hemen ortaya çıkar ve dakikalardan saatlere, hatta günlere kadar uzayabilir; tipik olarak 1–7 gün içinde düzelir.(45) Bu disfonksiyon kalıcı hücre ölümünden kaynaklanmaz; oksidatif stres, kalsiyum aşırı yüklenmesi ve mitokondriyal disfonksiyon aracılı geri dönüşlü hasarın sonucudur.(2) Klinik olarak stunning, akut koroner sendromları ve kardiyak cerrahileri takiben görülebilir ve geçici olarak kardiyak fonksiyonu bozabilir.

2.3.2. MİYOKARDİYAL HİBERNASYON

Miyokardiyal hibernasyon, koroner kan akımındaki kalıcı azalmaya uyum amacıyla gelişen ve haftalar–aylar sürebilen kontraktıl disfonksiyon ile karakterize kronik bir adaptasyon durumudur. Geçici bir olgu olan stunning’ten farklı olarak hibernasyon; azalmış oksijen arzına uyum sağlayacak biçimde

miyokardın metabolizma ve fonksiyonunun down-regölasyonu ile hücre viabilitesinin korunmasını yansıtır.(44) Hiberne miyokardda fonksiyonel düzelme genellikle uzamış perfüzyonun yeniden sağlanması ile -çoğunlukla revaskülarizasyon sonrasında- görülür ve müdahale sonrası haftalar ile aylar içinde kademeli olarak ortaya çıkar.(46) Bu yönüyle hibernasyonun zaman seyri, stunning'e kıyasla daha uzamış ve adaptif niteliktedir.

Bu klinik tabloların zaman seyri ve patofizyolojik temellerine göre ayrıştırılması, tedavi planlaması için esastır. Örneğin, stunning genellikle günler içinde kendiliğinden ya da destek tedavisiyle düzelirken, hibernasyonda fonksiyonun yeniden kazanılması çoğunlukla revaskülarizasyon gerektirir ve daha uzun bir zaman dilimine yayılır.(45) Pozitron emisyon tomografisi (PET) ve kardiyak manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi ileri görüntüleme yöntemleri, viabl ancak disfonksiyonel miyokardı geri dönüşsüz skar/infarkt dokusundan ayırt ederek prognozun öngörölmesine ve revaskülarizasyon kararlarının verilmesine katkı sağlar.(47) Ayrıca bu durumların zamanlaması ve mekanizmalarının anlaşılması, iskemi-reperfüzyon hasarını ve miyokardiyal iyileşmeyi hedefleyen yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini destekler.

2.4. İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDAN KORUNMA YÖNTEMLERİ

2.4.1. EKZOJEN KORUNMA YÖNTEMLERİ

2.4.1.1.İSKEMİK KOŞULLANDIRMA

İskemik koşullama, hedef miyokarda uygulanan iskemik atağın öncesinde (preconditioning), sırasında (perconditioning) veya sonrasında (postconditioning) kısa süreli iskemi–reperfüzyon döngüleri oluşturulmasına dayanan, mekanik kökenli kardiyoprotektif bir yaklaşımdır. Bu müdahalelerin, deneysel ve klinik çalışmalarda infarkt boyutunu azalttığı ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklediği gösterilmiştir.

İskemik preconditioning (IPC)

Uzamış iskemi öncesinde uygulanan kısa iskemi epizodları, PI3K/Akt ve ERK1/2 gibi pro-survival kinaz kaskadlarını aktive eder; bunun sonucunda mPTP'nin açılım eşiği yükselir ve ROS üretimi düzenlenir.(48)

İskemik postconditioning (IPostC)

Reperfüzyonun başlangıcında kan akımının kısa kesintilerle yeniden başlatılması, erken ROS patlamasını ve Ca^{2+} aşırı yüklenmesini sönmeler; eşzamanlı olarak RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) ve SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement) yolaklarını devreye sokarak kardiyomiyosit sağkalımını artırır.(48)

Uzak iskemik koşullama (RIC)

Uzak bir organ/ekstremitede uygulanan kısa iskemi–reperfüzyon döngülerinin humoral mediyatörler ve nöral yollar üzerinden miyokarda kardiyoproteksiyon ilettiğı; mPTP açılım eşiğini artırma, ROS yanıtını modüle etme ve sağıkalım kinazlarını (ör. RISK/SAFE) etkinleştirme gibi mekanizmalarla etkisini gösterdiğı bildirilmiştir.(49)

Kontrollü Reperfüzyon Teknikleri

Kademeli, aralıklı (postconditioning benzeri) ya da hipotermik reperfüzyon gibi kontrollü reperfüzyon stratejileri, reoksijenasyon hızını ve koşullarını düzenleyerek erken reperfüzyondaki ROS patlamasını sönmölemeyi, mitokondriyal Ca^{2+} /enerji yüklenmesini önlemeyi ve böylece infarkt boyutunu sınırlamayı amaçlar.(22) (31) Deneysel verilerde oksijenlenmenin ve akımın kademeli verilmesi ile hipotermik reperfüzyonun mPTP açılım eşiğini yükselttiğı ve mikrovasküler işlevi koruduğı gösterilirken, klinik çeviriye ilişkin sonuçlar halen değışkendir.(22, 31)

2.4.1.2.FARMAKOLOJİK AJANLAR

Antioksidanlar

Reperfüzyon sırasında ROS aşırı üretimine bağılı oksidatif stres, miyokardiyal hasarın merkezinde yer alır; bu nedenle antioksidan tedavi, İRİ sınırlamaya yönelik en çok araştırılan farmakolojik stratejilerden biridir. Salidroside ve ginsenoside Rg3 gibi doğıal bileşikler, prelinik modellerde belirgin

kardiyoprotektif etkiler göstermiştir: salidroside, AMPK α 2'yi aktive ederek mitokondriyal ROS üretimini azaltır, ferroptozu baskılar ve mitokondri bütünlüğünü korur.(24, 50) Benzer biçimde Rg3, Keap1/Nrf2/GPX4 eksenini aktive ederek demir birikimini ve lipid peroksidasyonunu azaltır.(51) Diğer antioksidanlar (resveratrol, melatonin, C/E vitamini,...) infarkt boyutunu sınırlama; malondialdehit (MDA) gibi oksidatif stres belirteçlerini düşürme ve süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi endojen enzim aktivitelerini artırma yönünde yararlar bildirmiştir.(50) Dikkat çekici olarak, mPTP inhibisyonu ile antioksidan tedavinin birlikte kullanımı ilave kardiyoprotektif etki sağlayabilir; yakın tarihli bir çalışmada her iki yolak hedeflenerek miyokardiyal kurtarımın optimize edildiği gösterilmiştir.(33)

Nitrik Oksit (NO) Vericileri

NO, İ/R bağlamında çift yönlü etki gösterebilir; fizyolojik düzeylerde vazodilatasyonu sağlar, trombosit agregasyonu ve lökosit adezyonunu inhibe eder; ayrıca süperoksiti süpürerek kardiyoprotektif etki oluşturur. Sodyum nitroprusid gibi NO donörleri, endotelial fonksiyonu ve mitokondriyal respirasyonu modüle ederek infarkt boyutunu azaltma ve miyokardiyal fonksiyonu iyileştirme potansiyeli göstermiştir.(48)

Antiinflamatuvar Ajanlar

İ/R hasarı, tümör nekrozis faktör alfa(TNF- α), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin 1 beta (IL-1 β) başta olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerle ve nötrofil/kompleman aktivasyonu ile yakından ilişkilidir; kortikosteroid veya

sitokin yolak inhibitörleri bazı modellerde infiltrasyonu ve oksidatif hasarı azaltsa da, güvenilirlik ve etkinlikte heterojen klinik sonuçlar nedeniyle rutin kullanımları sınırlı kalmıştır.(11, 22)

Metabolik Modölatörler

Trimetazidin ve ranolazin, iskemik miyokardda substrat kullanımını glukoz oksidasyonuna kaydırma ve iyon/metabolik stresini azaltma yoluyla metabolik verimliliği artırır; çok sayıda çalışma, özellikle kombine kardiyoprotektif stratejilerle birlikte uygulandıklarında infarkt boyutu ve sol ventrikül fonksiyonu üzerinde yarar bildirmiştir.(52)

2.4.1.3.GELİŞMEKTE OLAN BİYOLOJİK TEDAVİLER

Gen Tedavisi

Sitoprotektif proteinleri hedefleyen gen düzenleme/transfer yaklaşımları antioksidan enzimler (örn. SOD, katalaz), antiapoptotik faktörler (örn. Bcl-2) ve Nrf2 gibi kilit transkripsiyon faktörleri, deneysel modellerde kardiyoprotektif etki göstermektedir. Özellikle miR-432-5p'nin aşırı ekspresyonunun Nrf2/SLC7A11 eksenini aktive edip Keap1'i hedefleyerek ferroptozu baskıladığı ve böylece redoks homeostazını güçlendirdiği bildirilmiştir.(50)

Kök Hücreler ve Eksozomlar

Mezenkimal kök hücre kökenli eksozomlar (MSC-Exo), zengin mikroRNA ve protein kargosuyla parakrin düzeyde etkili olup inflamatuvar yanıtı düzenler, oksidatif stresi ve apoptozu azaltır, anjiyogenezi uyarır. Böylece İ/R

sonrası miyokardda doku onarımı ile fonksiyonel iyileşmeyi destekleyecek bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.(53, 54)

2.4.2. ENDOJEN KORUNMA YÖNTEMLERİ

2.4.2.1.MİTOKONDRIYAL STABİLİZASYON

İskemi–reperfüzyonda kardiyomiyosit sağkalımının ana hedefi mPTP açılımını önleyerek $\Delta\Psi_m$ 'yi korumak ve Bcl-2 ailesi dengesini (Bcl-2/Bcl-xL $\uparrow$; Bax/Bak $\downarrow$) antiapoptotik yöne kaydırmaktır; bu yaklaşımlar nekroz/apoptozu azaltarak infarkt boyutunu sınırlar.(16, 17, 40)

2.4.2.2.ENDOTEL KAYNAKLI NO

eNOS-kaynaklı NO, vazodilatasyonu artırır, trombosit agregasyonu ile lökosit adezyonunu inhibe eder ve böylece reperfüzyonda mikrovasküler obstrüksiyon/no-reflow riskini düşürür; NO biyoyararlanımının korunması (eNOS “coupling”, BH₄/L-arginin desteği) klinik sonuçları iyileştirebilir.(23, 55, 56)

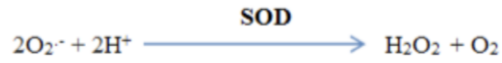
2.4.2.3.ANTİOKSİDANLAR

Enzimatik Antioksidanlar

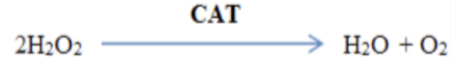
İRH sırasında kan akımının ani olarak yeniden sağlanması, ROS'ta keskin bir artışa yol açar ve kalbin endojen antioksidan savunmalarını aşırı yükler. Süperoksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (•OH) gibi ROS; lipidler, proteinler ve DNA üzerinde oksidatif hasar oluşturarak sonuçta apoptoz veya nekrozu tetikleyebilir. Bu tabloya karşı miyokard, enzimatik (ör. SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve enzimatik olmayan (ör. glutatyon, E ve C

vitamini, koenzim Q) bileşenlerden oluşan, iyi koordine edilmiş endojen antioksidan sistemine dayanır.

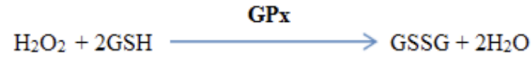
Süperoksit dismutaz (SOD): SOD, reperfüzyonun erken fazında artan oksidatif yük karşısında süperoksit anyonunu (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürerek ilk savunma hattını oluşturur. Üç ana izoformdan SOD1 (Cu/Zn-SOD) sitozolde, SOD3 ekstrasellüler matrikste, SOD2 (Mn-SOD) ise mitokondride yer alır ve özellikle reperfüzyon sırasında mitokondri kaynaklı ROS'un sınırlandırılmasında kritik rol oynar. Nitekim SOD2'nin devre dışı bırakıldığı deneysel modellerde infarkt boyutunun belirgin şekilde arttığı ve mitokondriyal disfonksiyonun derinleştiği gösterilmiştir; bu bulgular SOD2'nin mitokondriyal oksidatif hasarı sınırlamadaki belirleyici konumunu desteklemektedir.(51)



Katalaz: Katalaz, H_2O_2 'yi su ve oksijene parçalayan yüksek kapasiteli bir enzim olup başlıca peroksizomlarda lokalize edilir; sitoplazmadaki etkisi de oksidatif yükün hızla tamponlanmasına katkı sağlar. İskemi–reperfüzyon bağlamında H_2O_2 birikiminin zararlı eşiklere ulaşmasını engelleyerek lipid, protein ve DNA oksidasyonunu sınırlar. Hayvan çalışmalarında katalazın aşırı ekspresyonu, reperfüzyon sonrası infarkt boyutunu azalttığı ve sol ventrikül fonksiyonunu iyileştirdiği için kardiyomiyosit bütünlüğünün korunmasına yönelik güçlü bir antioksidan strateji olarak öne çıkmaktadır.(51)



Glutasyon peroksidaz (GPx): GPx enzimi, indirgenmiş glutasyonu (GSH) substrat olarak kullanarak hem H_2O_2 'yi hem de lipid hidroperoksitleri azaltır; böylece zar lipidlerinin oksidatif hasarını ve buna bağlı sinyal bozukluklarını önler. Aile üyeleri içinde GPx4, demir bağımlı düzenlenmiş hücre ölümü olan ferroptozun baskılanmasında kilit role sahiptir ve reperfüzyona eşlik eden lipid peroksidasyonu döngüsünü kırar. Deneysel veriler, Rg3 ve salidroside gibi ajanların Nrf2 yolunu aktive ederek GPx4 ekspresyonunu artırdığını; bunun da lipid peroksidasyonunu ve miyokardiyal hasarı azalttığını göstermektedir.(24, 51)



Non-Enzimatik Antioksidanlar

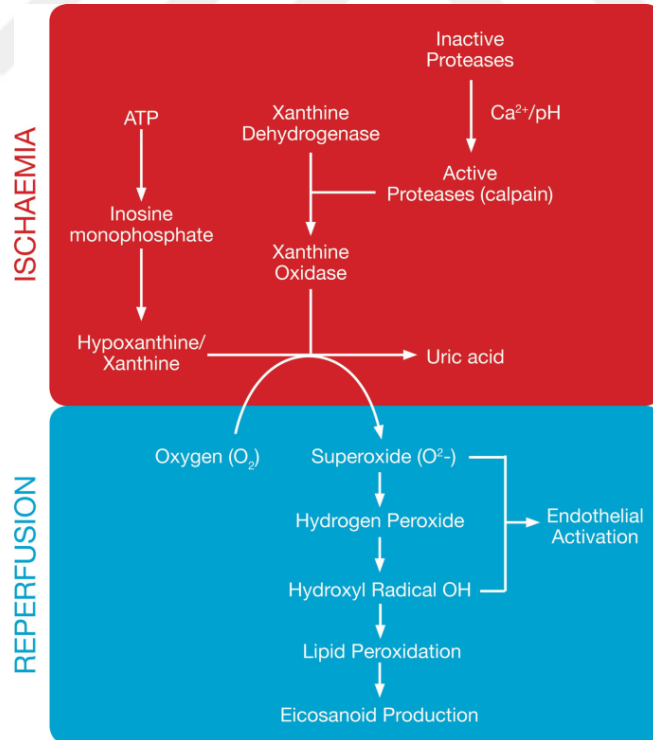
Miyokard, ROS'ları doğrudan süpüren veya enzimatik savunmayı destekleyen enzimatik olmayan antioksidanlara da dayanır.

Glutasyon (GSH): glutasyon redüktaz aracılığıyla sürekli yenilenerek redoks dengesinin ve detoksifikasyonun merkezinde yer alır; reperfüzyon sırasında GSH havuzunun tükenmesi oksidatif hasar ve miyokardiyal yaralanma ile ilişkilidir.(57)

Tioredoxin (Trx)–Peroksiredoksin (Prx) sistemi: Tiyol redoks durumunu koruyup H_2O_2 'nin azaltılmasında birlikte çalışır; kardiyak dokuda Prx ailesinin

bazı üyelerinin (ör. Prx5) azalması oksidatif stres ve fonksiyon bozukluğunu hızlandırırken, Prx'lerin korunması İ/R ile ilişkili hasarı sınırlayabilir.(58)

Ubiquinon (koenzim Q10, CoQ10), C ve E vitaminleri: Membran lipidlerinin peroksidasyonuna karşı lipofilik/hidrofilik antioksidan havuzuna katkı sağlar; CoQ10'un reperfüzyon tedavisi sonrasında oksidan–antioksidan belirteç dengesini iyileştirebildiği, C vitaminine ilişkin bulguların ise heterojen olmakla birlikte kardiyovasküler oksidatif strese karşı potansiyel koruyucu roller işaret ettiği bildirilmiştir.(59, 60)



Şekil 2. İ/R hasarı sırasında ortaya çıkan ROS(61)

2.5. MİYOKARDİYAL İSKEMİ–REPERFÜZYONDA HASARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Oksidatif stres, miyokardiyal iskemi–reperfüzyon hasarının temel belirleyicisidir. Reperfüzyonla birlikte iskemik miyokarda oksijenin ani dönüşü süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\bullet OH$) gibi ROS’ların aşırı üretimine yol açar; bunun sonucunda lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, DNA hasarı ve nihayet apoptoz/nekroz gelişir.(62) ROS ve antioksidan repertuvarının çokluğu ve çeşitliliği nedeniyle tek tek ölçümler pratik değildir; bu nedenle Toplam Antioksidan Düzey (TAS) ve Toplam Oksidan Düzey (TOS), deneysel ve klinik çalışmalarda oksidatif durumu topluca değerlendiren güvenilir göstergeler olarak kullanılmaktadır.

2.5.1. TOPLAM ANTİOKSİDAN DÜZEY (TAS)

TAS, biyolojik sıvılardaki tüm enzimatik (ör. SOD, katalaz, GPx) ve enzimatik olmayan (ör. C ve E vitamini, ürik asit, bilirubin) antioksidanların birikimli kapasitesini yansıtır ve organizmanın ROS nötralizasyon gücünü/redoks homeostazını temsil eder.(63) İRİ bağlamında reperfüzyonu izleyen oksidatif patlama nedeniyle TAS genellikle azalır; TAS’taki düşüşün artan miyokardiyal hasarla ilişkili olduğu bildirilmiştir.(64)

2.5.2. TOPLAM OKSİDAN DÜZEY (TOS)

TOS, serum/dokudaki toplam oksitleyici kapasiteyi niceler; ROS ve diğer pro-oksidanların bileşik etkisini yansıtır. Yüksek TOS, kardiyovasküler hastalıklarda artmış oksidatif yük ile ilişkilidir.(65) Miyokardiyal İRİ’de erken

reperfüzyon fazında TOS yükselir ve infarkt boyutu, troponin düzeyi ve MDA gibi oksidatif hasar belirteçleriyle pozitif korelasyon gösterir.(66)

2.5.3. OKSİDATİF STRES İNDEKSİ (OSI)

OSI, TOS/TAS oranından türetilen bileşik bir redoks dengesizliği göstergesidir:

$$OSI = \left(\frac{TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşd./L})}{TAS (\text{mmol Trolox eşd./L})} \right) \times 100$$

OSI'nin yükselmesi, oksidatif strese kaymayı gösterir ve antioksidan tedavilerin etkinliğini değerlendirmede yaygın olarak kullanılır.(51)

İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Önemi

Deneysel ve klinik veriler TAS/TOS'nin biyokimyasal sonlanım göstergeleri olarak değerini desteklemektedir:

Hayvan modellerinde miyokardiyal iskemi–reperfüzyon, toplam oksidan düzeyi (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerlerinde artışa, toplam antioksidan düzeyinde (TAS) ise azalışa yol açmaktadır.(67, 68)

Salidroside, ellagik asit ve ginsenositler gibi antioksidan bileşikler TAS'ı yükseltip, TOS/OSI'yi düşürerek histolojik ve fonksiyonel iyileşme sağlar.(24, 50)

STEMI hastalarında yüksek TOS ve OSI, daha yüksek kardiyak enzimler ve daha kötü prognoz ile ilişkilidir.(66)

2.5.4. PARAOKSONAZ-1 (PON-1)

PON-1, dolaşımda HDL ile kompleks hâlde bulunan, kalsiyum-bağımlı bir esteraz/laktonaz enzimidir. Oksitlenmiş fosfolipitleri ve lipid peroksitlerini hidrolize ederek HDL'nin antioksidan ve antiinflamatuvar fonksiyonlarına aracılık eder. Paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri mevcuttur.(69, 70)

PON-1 aktivitesi aterosklerotik olaylarla ters ilişkilidir. Diyabet, dislipidemi ve sistemik inflamasyon PON-1'i baskılayabilir.(71) Miyokardiyal İ/R modellerinde artmış oksidatif yük ile birlikte PON-1 aktivitesinin azaldığı, buna karşılık antioksidan ya da endotelin yolaklarını hedefleyen müdahalelerin PON-1'i yükseltip eşzamanlı olarak TAS artışı ve TOS/OSI azalması yönünde iyileşme sağladığı gösterilmiştir; bu bulgular, PON-1'in redoks homeostazı ve miyokard korunmasındaki işlevsel rolünü desteklemektedir.

2.5.5. TUNEL (TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE dUTP NICK-END LABELING)

TUNEL yöntemi, terminal deoksinükleotidil transferazın (TdT) serbest 3'-OH uçlarına işaretli dUTP eklemesi ilkesine dayanarak DNA zincir kırıklarını saptar. Oluşan sinyal kromojenik ya da floresan raporlayıcılarla görselleştirilir. Bu yaklaşım, intranükleozomal DNA parçalanmasının geç dönem apoptozun ayırt edici özelliği olması nedeniyle, İ/R sonrası parafin bloklanmış kalp dokusunda apoptotik hücrelerin yarı-nicel olarak belirlenmesinde yaygın biçimde kullanılmaktadır.(72-75)

Güncel kardiyak iskemi reperfüzyon çalışmalarında, reperfüzyonu izleyen ilk saatler içinde TUNEL-pozitif çekirdek sayısında belirgin artış gözlenir ve bu artış antiapoptotik müdahaleler (ör. mitokondri stabilizasyonu, kinaz yolak modülasyonu) ile azalma eğilimi gösterir. Bu nedenle TUNEL, cleaved caspase-3 ekspresyonu ve infarkt alanı ölçümleriyle birlikte doku korumasını değerlendirmede kullanılmaktadır.

2.6. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA ANTİOKSİDAN OLARAK ELLAJİK ASİT

Koroner olayları takiben gelişen miyokardiyal İ/R hasarı reperfüzyonun ilk dakikalarında ortaya çıkan ROS patlaması, inflamasyon ve düzenlenmiş hücre ölüm programları (nekroz/apoptoz/ferroptoz/piroptoz) ile doku hasarını derinleştirir.(11, 22, 48) Doğal bir polifenolik bileşik olan Ellajik Asit (EA), güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle bu patofizyolojik süreçlerin birden fazlasını aynı anda hedefleyebilecek çoklu-etkili bir aday olarak öne çıkmaktadır.

Kaynaklar ve Biyoyararlanım

EA; nar, çilek, ahududu gibi meyvelerde ve ceviz/pecan gibi kabuklu yemişlerde ellagitanin formunda bulunur; gastrointestinal sistemde ellagitaninlerin hidroliziyle serbest EA açığa çıkar.(6) Bununla birlikte düşük suda çözünürlük ve sınırlı oral biyoyararlanım, klinik kullanımı kısıtlar; bu nedenle nano-taşıyıcılar (lipit/nanoaltın partiküller, polimerik sistemler) ve formülasyon iyileştirmeleri (fosfolipid kompleksleri, siklodekstrin inklüzyonları) ile emilim/dağılımın artırılması hedeflenmektedir.(76)

Etki Mekanizmaları

Antioksidan savunmanın güçlendirilmesi

EA, doğrudan serbest radikal süpürmeye ek olarak Nrf2/HO-1 eksenini aktive eder ve SOD, GPx, NQO1 gibi hedeflerin ekspresyonunu artırarak redoks homeostazını geri kurup lipid peroksidasyonunu sınırlar; aynı zamanda NF-κB sinyalini baskılayarak proinflamatuvar sitokinleri azalttığı fare karaciğerinde çalışılarak gösterilmiştir. (8)

Antiapoptotik ve anti-piroptotik etki

Ellajik asitin Bcl-2/Bax dengesi ve kaspaz kaskadı üzerinde düzenleyici etki gösterirken, kaspaz-1/GSDMD yolunu hedefleyerek piroptozu baskıladığı hepatik İ/R modelinde doğrulanmıştır.(77)

Oksidan üreten enzimlerin düzenlenmesi

İskemik dokuda önemli bir ROS kaynağı olan NOX4'ün ekspresyonu EA ile downregüle olur. Buna paralel JAK/STAT sinyallemesinin baskılanması oksidatif ve inflamatuvar yükü azalttığı renal İ/R modelinde kanıtlanmıştır.(78)

Ferroptoz modülasyonu

EA, mikroRNA ağlarıyla etkileşim içinde Nrf2/SLC7A11/GPX4 eksenini destekleyerek demir-bağımlı lipid peroksidasyonu ve ferroptozu azaltabileceği ratlarda yapılan İ/R çalışmalarında gösterilmiştir.(79)

İ/R Modellerinden Kanıtlar

Organ-spesifik İ/R çalışmalarında EA; inflamasyon, oksidatif stres ve piroptoz belirteçlerini anlamlı biçimde azaltmıştır: hepatik İ/R'de kaspaz-1/GSDMD aracılı piroptozun ve sitokinlerin baskılanması, renal İ/R'de NOX4/JAK-STAT inhibisyonu ile oksidatif hasarın azalması gösterilmiştir. Kardiyak alanda doğrudan İ/R verileri sınırlı olsa da EA ile zenginleştirilmiş çok katmanlı çekirdek-kabuk altın nanoparçacık formülasyonları miyokard infarktüsü modellerinde infarkt alanını küçültüp sol ventrikül fonksiyonunu iyileştirmiştir. Ayrıca ekstremitte İ/R gibi preklinik setlerde EA'nın TOS/OSI'yi düşürüp TAS'ı yükselttiği ve doku korunmasını artırdığı bildirilmiştir.(76-78)

Sonuç olarak EA, miyokardiyal İ/R'nin başat süreçlerini—Nrf2/HO-1 aracılı antioksidan yanıtın güçlendirilmesi, NF-κB inflamasyonunun baskılanması, apoptoz/piroptoz/ferroptozun azaltılması ve NOX4-bağımlı oksidan üretimin düşürülmesi—eşzamanlı hedefleyen multimodal bir ajandır; biyoyararlanım sınırlılığı ise nano-taşıyıcı ve yeni formülasyon yaklaşımlarıyla aşılmaya çalışılmaktadır. Kardiyak ve kardiyak-dışı İ/R modellerinden gelen güncel kanıtlar, özellikle geliştirilmiş taşıyıcı sistemlerle EA'nın deneysel kardiyoprotektif potansiyelini desteklemektedir. Genel İ/R patofizyolojisi ve reperfüzyon hedefli stratejilerle de uyumludur.(8, 11, 76)

2.7. MİYOKARDİYAL İ/R MODELİNDE RATLARIN YERİ

Ratlar, miyokardiyal İ/R çalışmalarında iyi tanımlanmış ve tekrarlanabilir deney ortamı sağlarlar. Koroner arter anatomileri -özellikle sınırlı kollateral akımı

olması sebebiyle- ve kalp boyutu, sol ön inen (LAD) arter ligasyonu ile tutarlı infarkt alanları elde etmeye elverişlidir.(80, 81)

Son yıllarda yapılan meta-analizler, rat miyokardiyal İ/R modellerinde kardiyoprotektif müdahalelerin infarkt boyutunu tutarlı biçimde azalttığını göstererek modelin duyarlılığını ve kıyaslamaya elverişliliğini desteklemektedir.(82) Ratların, cerrahi işlemlerde (entübasyon, torakotomi, LAD görselleştirme) fareye kıyasla daha büyük boyut nedeniyle teknik olarak avantajlıdır; hemodinamik monitörizasyonları kolaydır.(80, 81)

İnsanla karşılaştırıldığında yüksek kalp hızı, farklı immün yanıtı ve komorbidite eksikliği gibi sınırlılıklar mevcuttur. Bu nedenle bulguların kliniğe uyarlanması ihtiyatlı yorum ve kritik bulgular için gerekirse büyük hayvan doğrulaması önerilir. (83, 84)

3. GEREÇ YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ

Bu deneysel çalışmada ratlarda miyokard iskemisi öncesi intraperitoneal olarak uygulanan ellajik asitin miyokardı iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı koruyup korumadığının gösterilmesi çalışıldı.

3.2.ETİK KURUL ONAYI

Araştırmamıza Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından 07.11.2022 tarihli, 66332047-604.01.02 sayılı, G.Ü.ET-22.108 kod numaralı onayı etik kurul izni alındıktan sonra başlandı.

3.3.ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezinde (GÜDAM), Ağustos 2023'te gerçekleştirildi.

3.4.KULLANILAN DENEKLER VE ÇALIŞMA GRUPLARI

Bu çalışmada kullanılan ratlar Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM) temin edildi. Araştırma amacı ile 24 adet erişkin dişi Wistar-Albino rat kullanıldı. Ratlara 20-21°C ısıda, 12 saat gece 12 saat gündüz periyot sağlanarak ve anestezi uygulamasından 2 saat öncesine kadar yemelerine izin verilecek şekilde bakıldı. Hayvanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Yapılacak tüm cerrahi işlemler ketamin anestezisi altında steril koşullarda gerçekleştirildi.

Sham grubu (Grup K, n=6): Bu gruptaki ratlara miyokard iskemisi yapılmaksızın sadece sol torakotomi yapıp kapatılıp, işlemden 150 dakika sonra anestezi altında ratların miyokard dokusu çıkarıldı. Bu dokularda histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Ellajik asit grubu (Grup EA, n=6): Bu gruptaki ratlara miyokard iskemisi yapılmaksızın sadece sol torakotomi yapıp kapatıldı. İşlem boyunca ellajik asit solüsyonu 40 ml/kg olacak şekilde intraperitoneal verildi. İşlemden 150 dakika sonra anestezi altında ratların miyokard dokusu çıkarıldı. Bu dokularda histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Miyokard İskemi/ Reperfüzyon Grubu (Grup MİR, n=6): Bu gruptaki ratlara sol torakotomi yapıldı. 30 dakika süre ile sol ana koroner (LAD) arter ligasyonu yapılarak miyokard kasında iskemi gerçekleştirildi. 30 dakikalık iskemiyi takiben LAD ligasyonu kaldırılarak reperfüzyon başlatıldı. 120 dakikalık reperfüzyon sonrasında anestezi altında ratların miyokart dokusu çıkarıldı. Bu dokularda histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Miyokard İskemi/ Reperfüzyon Ellajik Asit grubu (Grup MİR+EA, n=6): Bu gruptaki ratlarda reperfüzyondan 5 dakika öncesi tek doz intraperitoneal olacak şekilde 40 ml/kg Ellajik asit uygulandı. Sol torakotomi sonrasında 30 dakika süre ile LAD ligasyonu ile miyokardiyal iskemi gerçekleştirildi. 30 dakikalık iskemiyi takiben ligasyon kaldırıldı ve reperfüzyon başlatıldı. 120 dakikalık reperfüzyon sonrasında anestezi altında ratların miyokard dokusu çıkarıldı. Bu dokularda histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

3.5.ELLAJİK ASİTİN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

Ellajik Asit, (safılık>%98, molekül formülü C₂₃H₂₈O₁₃, Sıgma Aldrich CAS N:39012-20-9, Almanya) fosfat tamponlu salin (PBS) ile 10 g/L' lik bir çözelti meydana getirmek üzere seyreltilti. Ellajik asit, 40 mg/kg olmak üzere EA grubu ve MİR+EA grubundaki ratlara reperfüzyon başlangıcında intraperitoneal yolla uygulandı.

3.6.CERRAHİ YÖNTEM

İndüksiyon anestezisi, intramüsküler yolla 100 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Parke-Davis, ABD) uygulanarak sağlandı. İşlem süresince ratlar supin pozisyonda ve normotermiyi sürdürmek amacıyla ısıtma lambası altında tutuldu. (fotoğraf 1) Cerrahi alanların tıraşı sonrası boyun orta hatta yaklaşık 1 cm'lik vertikal insizyon yapıldı; künt diseksiyonla trakeaya ulaşılarak 16 G intraket (Flon®, La-med Healthcare, Hindistan) ile trakeostomi açıldı.(fotoğraf 2, fotoğraf 3) Ardından ratlar mekanik ventilatöre (Harvard Apparatus Rodent Ventilator, Inspira ASV, ABD) bağlanarak işlem boyunca %100 oksijen ile tidal volüm 10–15 mL/kg ve solunum sayısı 65–80/dk olacak şekilde ventile edildi. Sol 4. interkostal aralıktan yapılan insizyonla torakotomi gerçekleştirildi, perikard açıldı ve LAD düzeyinden 8/0 prolene suture ile ligasyon yapılarak iskemi oluşturuldu. (fotoğraf 4) Deney sonunda intrakardiyak kan alınarak ötenazi uygulandı. Ratlardan kan ve miyokard dokusu bütünlük bozulmayacak ve travmatize edilmeyecek şekilde alındı. Alınan örnekler histopatolojik inceleme için %10'luk formol içine konuldu, sıvı azot içinde dondurularak biyokimyasal inceleme için -80°C'de saklandı.



fotoğraf 1



fotoğraf 2



fotoğraf 3



fotoğraf 4

Histolojik olarak kardiyak İ/R hasarı ve apoptotik hücreler incelenerek tedavinin etkileri değerlendirildi. Serumda; total oksidan status (TOS), total antioksidan status (TAS), oksidatif stres indeksi (OSİ), Paraoksonaz 1 (PON-1) parametrelerinin çalışıldı.

3.7.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Sakrifikasyondan sonra toplanan rat miyokard doku örnekleri fiksasyon için %10'luk tamponlu formalin içerisine alındı. Fiksasyonu takiben doku örnekleri %60, %70, %80, %90, %96 ve %100 artan dereceli etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilen içerisinde şeffaflaştırılan doku örnekleri 59°C'ye ayarlı etüvde sıvı parafin içerisinde infiltrasyonu takiben parafine gömüldü. Parafin doku bloklarından mikrotom (HistoCore MULTICUT, Leica, Almanya) ile 5µm kalınlığında alınan kesitler, histopatolojik değerlendirme

için hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyandı. Ardışık kesitlerde uygulanan TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling, İn Situ DNA Uç İşaretleme) yöntemi ile kardiyomiyositlerde apoptoz değerlendirildi.

Hazırlanan boyalı doku örnekleri Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskobunda 200× ve 400× büyültmelerde incelendi ve Leica LAS V4.12 programı kullanılarak kesitlere ait görüntüler elde edildi.

İskemi reperfüzyon hasarını değerlendirmek üzere doku örneklerinde nötrofil infiltrasyonu, kardiyomiyosit hasarı, intersitisyel ödem ve hemoraji bulguları 0-3 arasında skorlanarak (0, normal; 1, hafif düzeyde değişiklik; 2, orta düzeyde değişiklik; 3, şiddetli değişiklik) yarı kantitatif değerlendirildi. Her bir değişken için elde edilen verileri ayrı ayrı karşılaştırmakla beraber, skorların toplanmasıyla elde edilen ve 0-12 arasında değişen toplam hasar skoru da gruplar arasında karşılaştırıldı. (85)

3.8.APOPTOZUN BELİRLENMESİ

Parafin kalp kesitlerinde kardiyomiyosit apoptoz düzeyi TUNEL yöntemi ile değerlendirildi. Bu amaçla parafin kesitlerde TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, POD; Sigma, 11684817910) analiz yöntemi, kit prosedürüne uygun biçimde uygulandı. Doku bloklarından elde edilen 5µm kalınlığındaki parafin kesitler deparafinizasyon ve hidrasyonu takiben sitrat tamponu (pH 6.0) içerisine alındı. Sitrat tamponu içerisindeki kesitlere ısı ile indüklenen antijen dönüştürme işlemi uygulandı. Daha sonra PBS (Phosphate buffered saline, Fosfat tamponlu salin) ile yıkanan kesitler 37°C’de 60 dakika TUNEL reaksiyon solüsyonu ile

inkübasyona bırakıldı. PBS ile yıkamanın ardından kesitler 37°C’de 30 dakika Converter-POD solüsyonu ile inkübe edildi. Ardından oda ısısında 3 dakika DAB (3,3’-Diaminobenzidine) kromojen ile etkin bırakılan kesitler distile su ile yıkanarak alkol serileri ve ksilende bekletildi ve takiben entellan ile kapatıldı. Prosedür sonunda hazırlanan örnekler ışık mikroskobunda (Leica DM 4000B, Almanya) incelendi ve Leica LAS V4.12 programı kullanılarak her bir kesitten 400× büyültme altında, çakışma göstermeyen 6 alana ait görüntüler elde edildi. Kesitlere ait bu görüntülerde, ImageJ programı (1.53a; National Institutes of Health) kullanılarak, kahverengi boyalı çekirdekleriyle belirlenen TUNEL-pozitif apoptotik kardiyomiyosit sayısı ve görüntü alanındaki toplam kardiyomiyosit sayısı belirlendi. Daha sonra TUNEL-pozitif kardiyomiyosit sayısı toplam kardiyomiyosit sayısına oranlanarak her bir görüntü alanındaki TUNEL-pozitif hücre yüzdesi hesaplandı ve “% TUNEL (+) hücre/büyük büyültme alanı” olarak ifade edildi. (86) Apoptoz indeksi (%), aşağıdaki formüle göre belirlendi:

$$\text{Apoptozis İndeksi (\%)} = \frac{\text{TUNEL pozitif boyanan hücre sayısı}}{\text{Total hücre sayısı}} \times 100$$

Elde edilen bu değerler gruplar arasında karşılaştırıldı.

3.9. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Doku Homojenizasyonu

–80 °C’de saklanan doku örnekleri sıvı azot içeren taşıyıcı kaba alınarak çalışma alanına getirildi. Kullanılacak örnek, Eppendorf tüpünden çıkarıldı ve çözünmesine izin verilmeden hassas terazide hızla tartılarak 22 numaralı bistüri

ucu (PLUSMED®) ile 80–100 mg’lık parçalar halinde ayrıldı. Parçalar porselen havanda sıvı azot varlığında ezilerek toz hâline getirildi ve homojenizasyon tüpüne aktarıldı. Her 1 g doku için 1/10 dilüsyon oranında 140 mM KCl çözeltisi eklendi. Isı artışını önlemek amacıyla tüpler buz/karlı cam beher içinde tutuldu ve Glas-Col K5424® homojenizatör ile 2 dk, 50 rpm hızda homojenizasyon gerçekleştirildi. Elde edilen homojenat Eppendorf tüplerine alındı, tüpler parafilm ile kapatıldı ve Hettich Mikro 200R® santrifüjde 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant yeni Eppendorf tüplerine aktarıldı ve bu fraksiyonda Toplam Oksidatif Durum (TOS), Toplam Antioksidan Durum (TAS) ve Paraoksonaz (PON-1) düzeyleri ölçüldü.

Toplam Antioksidan Düzey (TAS) Ölçümü

Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde TAS kiti (RelAssay Diagnostic®, Türkiye) kullanıldı. Kit prosedürüne uygun olarak 500 mL Reaktif-1 (ölçüm tamponu) ile 30 mL örnek karıştırıldı ve 660 nm’de ilk absorbans değeri (A_1) NanoDrop® ND-1000 spektrofotometresinde okundu. Ardından karışıma 75 mL Reaktif-2 [renkli ABTS; 2,2’-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] eklendi, tüp parafilm ile kapatılarak 37 °C su banyosunda (Şimşek Labortechnik®) 5 dk inkübe edildi ve 660 nm’de ikinci absorbans (A_2) ölçüldü. Standart ölçümde, örnek yerine 1 mmol/L Trolox eşdeğer çözeltisi kullanıldı. Her iki ölçüm üç tekrar halinde yapılarak ortalamaları alındı. Absorbans değişimi (ΔAbs), $A_2 - A_1$ olarak hesaplandı. TAS değeri kitin formülüne göre hesaplandı ve mmol Trolox Eq/L olarak raporlandı:

$$TAS = \frac{(\Delta Abs_{H_2O} - \Delta Abs_{\text{örnek}})}{(\Delta Abs_{H_2O} - \Delta Abs_{\text{Standart}})}$$

Toplam Oksidan Düzey (TOS) Ölçümü

Toplam oksidan kapasite için TOS kiti (RelAssay Diagnostic®, Türkiye) kullanıldı. Prosedüre göre 500 mL Reaktif-1 (ölçüm tamponu) ile 75 mL örnek karıştırıldı ve 530 nm’de ilk absorbans (A_1) NanoDrop® ND-1000 ile okundu. Karışıma 25 mL Reaktif-2 (pro-kromojen solüsyon) eklendi; tüp parafilmle kapatılıp 37 °C su banyosunda 5 dk inkübe edildi ve 530 nm’de ikinci absorbans (A_2) ölçüldü. Standart için, kit ile sağlanan 10 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 eşdeğer standart çözeltisi kullanıldı. Tüm ölçümler üç tekrar yapılarak ortalaması alındı ve $\Delta Abs = A_2 - A_1$ olarak hesaplandı. TOS değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı ve mmol H_2O_2 Eq/L olarak ifade edildi:

$$TOS = \left(\frac{\Delta Abs_{\text{örnek}}}{\Delta Abs_{\text{Standart}}} \right) \times \text{Standart Konsantrasyonu (10 } \mu\text{mol/L)}$$

Paraoksonaz-1 (PON-1) Ölçümü

Serum PON-1 aktivitesi, modifiye Eckerson yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Paraoksonun [0-dietil-0-p-nitrofenil fosfat; Sigma Chemical Co., Londra, İngiltere] hidrolizi sonucu açığa çıkan p-nitrofenol, 37 °C’de 405 nm’de ölçüldü; başlangıç hidroliz hızları esas alınarak PON-1 aktivitesi hesaplandı.

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışma verileri SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 22 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak incelendi. Bulgular ortalama $\pm$ standart hata (SH) olarak verilmiştir. Veriler Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Anlamlılık tespit edilen değişkenler, Bonferoni düzeltilmeli Mann-Withney U testi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip I hata düzeyi %5 olarak kullanıldı, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1.HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

H&E boyalı örneklerin değerlendirmesi sonucunda nötrofil infiltrasyonu gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.002$). MİR grubunda K ve EA gruplarına nötrofil infiltrasyonu anlamlı olarak artmış bulundu ($p=0.002$, $p=0.005$, sırasıyla). Benzer şekilde MİR+EA grubunda da K ve EA gruplarına göre nötrofil infiltrasyonu anlamlı olarak artmış bulundu ($p=0.005$, $p=0.013$, sırasıyla), (Tablo 1, Resim 1).

İskemi reperfüzyon hasarının bulgularından biri olarak ele alınan kardiyomiyosit hasarı gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.001$). MİR grubunda K ve EA gruplarına kardiyomiyosit hasarı anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.001$, her ikisi). Benzer şekilde MİR+EA grubunda da K ve EA gruplarına göre kardiyomiyosit hasarı anlamlı olarak artmış bulundu ($p=0.002$, $p<0.001$, sırasıyla), (Tablo 1, Resim 1).

Değerlendirilen diğer bir değişken olan interstisyel ödem gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.001$). MİR grubunda K ve EA gruplarına interstisyel ödem anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.001$, her ikisi). Benzer şekilde MİR+EA grubunda da K ve EA gruplarına göre interstisyel ödem artmış bulunurken ($p<0.001$, her ikisi); MİR grubuyla karşılaştırıldığında MİR+EA grubunda interstisyel ödemin belirgin olarak azaldığı görüldü ($p=0.009$), (Tablo 1, Resim 1).

Ele alınan değişikliklerden bir diğeri olan hemoraji gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.001$). MİR grubunda K ve EA gruplarına hemoraji anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.001$, her ikisi). Benzer şekilde MİR+EA grubunda da K ve EA gruplarına göre hemoraji belirgin olarak artmış bulundu ($p=0.020$, $p=0.003$, sırasıyla). Ancak, MİR grubuyla karşılaştırıldığında MİR+EA grubunda hemoraji anlamlı olarak düşük düzeyde bulundu ($p=0.020$), (Tablo 1, Resim 1).

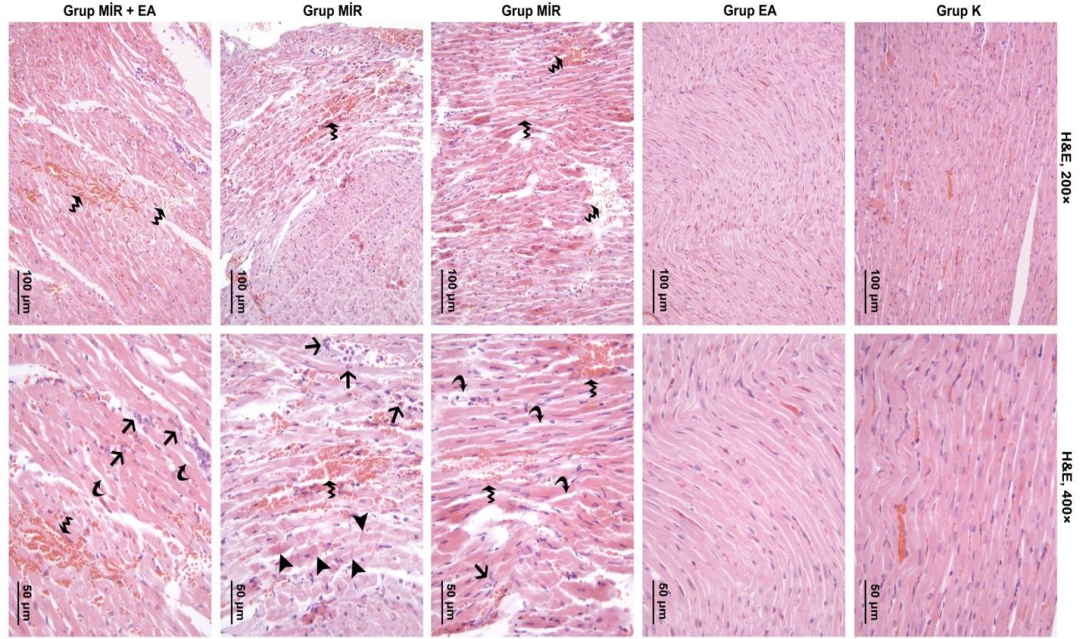
Toplam hasar skoru gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.001$). MİR grubunda K ve EA gruplarına göre toplam hasar skoru anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.001$, tümü). Benzer şekilde MİR+EA grubunda da K ve EA gruplarına göre toplam hasar skoru anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.001$, her ikisi). Ayrıca toplam hasar skoru MİR+EA grubunda MİR grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.040$), (Tablo 1).

Tablo 1: Kalp dokusu histopatolojik bulguları [Ort $\pm$ SH]

	Grup K (n=6)	Grup EA (n=6)	Grup MİR (n=6)	Grup MİR+EA (n=6)	P**
Nötrofil infiltrasyonu	0.17 $\pm$ 0.17	0.33 $\pm$ 0.21	1.67 $\pm$ 0.42*,&	1.50 $\pm$ 0.34*,&	0.002
Kardiyomiyosit hasarı	1.00 $\pm$ 0.00	0.67 $\pm$ 0.21	2.50 $\pm$ 0.22*,&	2.00 $\pm$ 0.26*,&	<0.001
İnterstisyel ödem	0.17 $\pm$ 0.17	0.00 $\pm$ 0.00	2.67 $\pm$ 0.21*,&	1.83 $\pm$ 0.31*,&,+	<0.001
Hemoraji	0.50 $\pm$ 0.17	0.17 $\pm$ 0.17	2.50 $\pm$ 0.34*,&	1.50 $\pm$ 0.34*,&,+	<0.001
Toplam hasar skoru	1.83 $\pm$ 0.17	1.17 $\pm$ 0.40	9.33 $\pm$ 1.02*,&	6.83 $\pm$ 1.17*,&,+	<0.001

p**: Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi p< 0.05

*p<0.05: Grup K ile karşılaştırıldığında; &p<0.05: Grup EA ile karşılaştırıldığında;
+p<0.05: Grup MİR ile karşılaştırıldığında



Resim 1. H&E boyalı kalp doku örneklerine ait görüntüler. Hemoraji (ondüle oklar) ve nötrofil infiltrasyonu (oklar) bulgularına eşlik eden miyokardiyal hücre hasarının (ok başları, kontraksiyon band oluşumları) MİR grubunda daha belirgin olduğu görülmektedir. MİR ve MİR + EA gruplarında hemoraji (ondüle oklar) ve nötrofil infiltrasyonu (oklar) yanı sıra interstisyel ödem de (kırıntılı oklar) dikkati çekmektedir.

Büyük büyültme alanında TUNEL (+) hücre oranı gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.001$). TUNEL pozitif hücre oranı MİR grubunda K ve EA gruplarına göre fazla bulundu ($p<0.001$, $p=0.001$, $p<0.001$, sırasıyla). Benzer şekilde MİR+EA grubunda TUNEL pozitif hücrelerin oranı K ve EA gruplarına göre belirgin olarak fazla bulunmuşken ($p<0.001$, $p=0.001$, $p<0.001$, sırasıyla), MİR grubuyla karşılaştırıldığında TUNEL pozitif hücrelerin oranının anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p<0.001$), (Tablo-2, Resim 2).

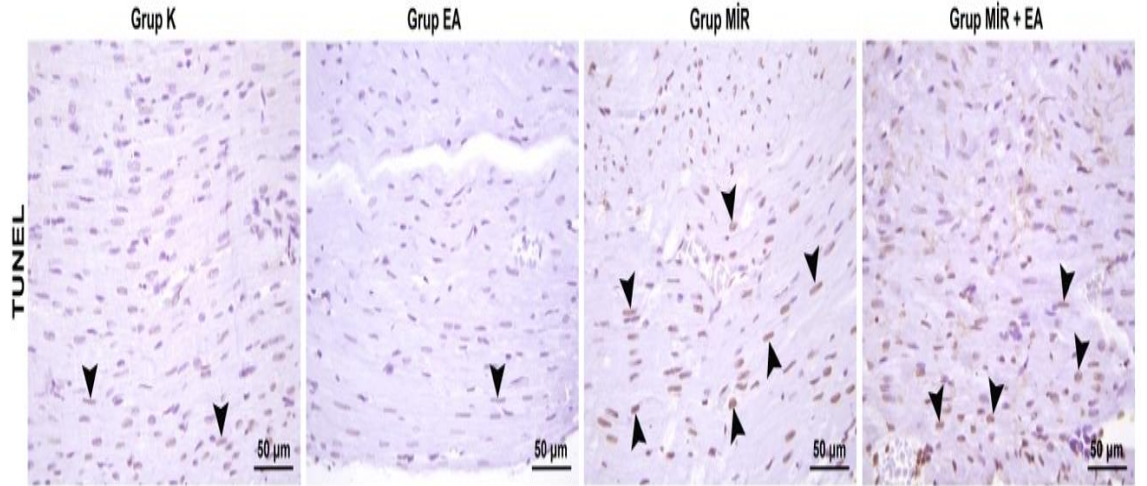
Tablo 2: Kalp dokusu TUNEL analizi bulguları [Ort ± SH]

TUNEL pozitifliği	Grup K (n=6)	Grup EA (n=6)	Grup MİR (n=6)	Grup MİR+EA (n=6)	p**
% TUNEL (+) hücre/büyük büyültme alanı	5.51±1.02	1.17±0.46	59.58±3.00*,&	38.58±2.61*,&,+	<0.001

p**: Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$

* $p < 0.05$: Grup K ile karşılaştırıldığında; & $p < 0.05$: Grup EA ile karşılaştırıldığında;

+ $p < 0.05$: Grup MİR ile karşılaştırıldığında



Resim 2. Kalp doku örneklerinin TUNEL pozitifliğini gösteren görüntüler. MİR grubunda kahverengi boyalı TUNEL (+) nükleusların (ok başları) daha yoğun olduğu görülmektedir.

4.2.BİYOKİMYASAL BULGULAR

Gruplar serum TAS düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.013$). TAS düzeyi MİR grubunda K ve EA gruplarına göre anlamlı düşük olarak bulundu ($p=0.009$, $p=0.005$, sırasıyla), (Tablo 3).

Gruplar serum TOS düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). TOS düzeyi MİR grubunda K ve EA gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu ($p<0.001$, her ikisi). TOS düzeyi MİR+EA grubunda MİR grubuna göre anlamlı düşük olarak bulundu ($p=0.002$), (Tablo 3).

Gruplar serum OSI düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). OSI düzeyi MİR grubunda K ve EA gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu ($p<0.001$, her ikisi). OSI düzeyi MİR+EA grubunda MİR grubuna göre anlamlı düşük olarak bulundu ($p<0.001$), (Tablo 3).

Gruplar serum PON1 enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). PON1 enzim aktivitesi MİR grubunda K ve EA gruplarına göre anlamlı düşük bulundu ($p<0.001$, tümü). Benzer şekilde PON1 enzim aktivitesi düzeyi MİR+EA grubunda K ve EA gruplarına göre de anlamlı düşük bulundu ($p=0.023$, $p=0.008$,

sırasıyla). Ayrıca PON1 enzim aktivitesi düzeyi MİR+EA grubunda MİR grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.024$), (Tablo 3).

Tablo 3: Serum oksidan durum parametreleri [Ort $\pm$ SH]

	Grup K (n=6)	Grup EA (n=6)	Grup MİR (n=6)	Grup MİR+EA (n=6)	P**
TAS (mmol/L)	2.37 $\pm$ 0.15	2.45 $\pm$ 0.36	1.54 $\pm$ 0.06*,&	1.80 $\pm$ 0.09	0.013
TOS (μ mol/L)	9.78 $\pm$ 0.51	13.99 $\pm$ 3.58	36.10 $\pm$ 6.04*,&	15.13 $\pm$ 3.35+	<0.001
OSİ	0.42 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.21	2.34 $\pm$ 0.38*,&	0.85 $\pm$ 0.18+	<0.001
PON-1 (U/L)	931.22 $\pm$ 26.89	968.91 $\pm$ 71.76	535.53 $\pm$ 69.60*,&	733.26 $\pm$ 24.96*,&,+	<0.001

p**: Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$

* $p < 0.05$: Grup K ile karşılaştırıldığında; & $p < 0.05$: Grup EA ile karşılaştırıldığında;

+ $p < 0.05$: Grup MİR ile karşılaştırıldığında

Gruplar kalp dokusu TAS düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.002$). TAS düzeyi MİR grubunda K ve EA gruplarına göre anlamlı düşük olarak bulundu ($p < 0.001$, tümü). TAS düzeyi MİR+EA grubunda MİR grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulundu ($p=0.011$), (Tablo 4).

Gruplar kalp dokusu TOS düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p < 0.001$). TOS düzeyi MİR grubunda K ve EA gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu ($p < 0.001$, her ikisi). TOS düzeyi MİR+EA grubunda MİR grubuna göre anlamlı düşük olarak bulundu ($p < 0.001$), (Tablo 4).

Gruplar kalp dokusu OSİ düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). OSİ düzeyi MİR grubunda K ve EA gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu ($p<0.001$, her ikisi). OSİ düzeyi MİR+EA grubunda MİR grubuna göre anlamlı düşük olarak bulundu ($p<0.001$), (Tablo 4).

Gruplar kalp dokusu PON1 enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). PON1 enzim aktivitesi MİR grubunda K ve EA gruplarına göre anlamlı düşük bulundu ($p<0.001$, tümü). PON1 enzim aktivitesi düzeyi MİR+EA grubunda MİR grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.008$), (Tablo 4).

Tablo 4: Kalp dokusu oksidan durum parametreleri [Ort $\pm$ SH]

	Grup K (n=6)	Grup EA (n=6)	Grup MİR (n=6)	Grup MİR+EA (n=6)	p**
TAS (mmol/L)	0.96 $\pm$ 0.06	0.97 $\pm$ 0.09	0.54 $\pm$ 0.06*,&	0.84 $\pm$ 0.10+	0.002
TOS (μ mol/L)	9.85 $\pm$ 0.96	9.20 $\pm$ 1.16	24.44 $\pm$ 2.08*,&	12.60 $\pm$ 1.37+	<0.001
OSİ	1.05 $\pm$ 0.13	0.97 $\pm$ 0.12	4.79 $\pm$ 0.68*,&	1.55 $\pm$ 0.13+	<0.001
PON-1 (U/L)	23.69 $\pm$ 1.61	21.59 $\pm$ 1.80	12.96 $\pm$ 0.80*,&	19.31 $\pm$ 1.70+	<0.001

p**: Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi $p<0.05$

* $p<0.05$: Grup K ile karşılaştırıldığında; & $p<0.05$: Grup EA ile karşılaştırıldığında; + $p<0.05$: Grup MİR ile karşılaştırıldığında

5. TARTIŞMA

Miyokardiyal İ/R hasarı, iskeminin klinik sonuçlarını belirleyen ve yaşamı tehdit eden başlıca süreçlerden biri olarak uzun süredir önemini korumaktadır. 2022 yılında kardiyovasküler hastalıklar dünya genelinde yaklaşık 19,8 milyon ölüme (tüm ölümlerin yaklaşık %32'si) neden olmuş; bu ölümlerin yaklaşık %85'i miyokard infarktüsü ve inmeye atfedilmiştir.(87) ABD verilerine göre yaklaşık her 40 saniyede bir miyokard infarktüsü meydana gelmektedir; koroner kalp hastalığına bağlı mortalitede son on yılda görece azalma bildirilmiş olsa da mutlak hastalık yükü hala yüksekliğini korumaktadır.(88) Benzer şekilde 2023 yılında 525.814 ölümün izlendiği ülkemizde dolaşım sistemi hastalıkları başlıca ölüm nedeni olup, bu grup içinde iskemik kalp hastalıkları dolaşım sistemi ölümlerinin yaklaşık %42,4'ünü oluşturmuştur.(89) 2024 verileri de dolaşım sistemi hastalıklarının bir numaralı konumunu koruduğunu göstermektedir. Sonuçta miyokardiyal İ/R hasarı, Türkiye'de ve dünyada hala kardiyovasküler mortalitenin yüksek yükü nedeniyle klinik açıdan kalıcı bir sorun olmaya devam etmektedir.

Güncel kılavuzlar, sağkalımın iyileştirilmesinde hızlı reperfüzyonun vazgeçilmez olduğunu vurgulamakla birlikte, epikardiyal kan akımının yeniden sağlanmasına rağmen doku düzeyinde rezidüel hasarın sürdüğünü de açıkça kabul etmektedir.(90) Translasyonel çalışmalar reperfüzyonun oksidatif stres, mikrovasküler obstrüksiyon ve düzenlenmiş hücre ölümü programları üzerinden miyokardiyal hasarı artırabildiğini ve bu nedenle yeni tedaviler için oldukça geniş bir alan bulunduğunu göstermektedir.(1, 91) Nitekim primer perkütan koroner

girişim (PKG) sonrası kardiyak MRG’de saptanan MVO, klinik açıdan anlamlı bir hasta alt grubunda ısrarla gözlenmekte ve olumsuz prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Bu bulgu, epikardiyal rekanalizasyonun ötesinde doku düzeyinde hedeflenmesi gereken başka bir ihtiyacın sürdüğünü ortaya koymaktadır.(92, 93) Özetle, reperfüzyon ve destekleyici tedavilerdeki önemli ilerlemelere karşın, İ/R hasarına bağlı rezidüel risk varlığını sürdürmektedir. Tüm bu veriler infarkt boyutunu daha da azaltmak, ventrikül fonksiyonunu korumak ve uzun dönem sonuçları iyileştirmek amacıyla İ/R hasarına yönelik- özellikle oksidatif stres, mikrovasküler obstrüksiyon (no-reflow) ve düzenlenmiş hücre ölümü yollarını hedefleyen laboratuvar ve klinik araştırmalara duyulan ihtiyacı ortaya koymaktadır.

Ellajik Asit (EA), başta nar, çilek-ahududu gibi yumuşak meyveler ve ceviz/fındık olmak üzere çok sayıda bitkide bulunan ellagitanin türevli doğal bir polifenoldür.(94) EA ve metabolitleri serbest radikal süpürme, Nrf2/ARE-HO-1 antioksidan yanıtını uyarma ve NF-κB aracılı inflamatuvar sinyali baskılama başta olmak üzere çoklu düzeyde hücresel koruma mekanizmaları sergiler.(6, 7) Preklinik kardiyovasküler modellerde -özellikle İ/R patofizyolojisiyle ilişkili oksidatif/inflamatuvar süreçlerde- Ellajik Asit’in antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri tutarlı biçimde rapor edilmiştir.(95)

Literatürde Ellajik Asit iskemi reperfüzyonu üzerindeki etkisini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda öncelikle renal, hepatik ve intestinal gibi end-organlardaki İ/R hasarı üzerindeki koruyucu etkisi araştırılmıştır.(77,

78, 95-97) Bu çalışmalarda oksidatif stresin dokümente edilmesinin sağlayan TAS/TOS/OSİ gibi ölçümler ve TUNEL gibi yöntemlerin kullanıldığı görülmüştür.

EA'in miyokard üzerindeki anti-oksidatif etkilerini gösteren çalışmalar ise kısıtlıdır. Miyokard üzerindeki çalışmalar ise çoğunlukla ex-vivo modeller üzerinedir. Bu çalışmalarda Ellajik Asit kardiyoprotektif etkisi gösterilmiştir.

Xina Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma EA-altın nanoparçacık formülasyonları rodent miyokard infarktüsü modellerinde fonksiyonel iyileşme ve doku koruması sağlamış, EA'in düşük biyoyararlanımı sorununa da çözüm önermiştir. Bu çalışmada EA'in stabilitesini arttırıp, biyoyararlanımının arttırımı hedeflenerek EA ile altın nanoparçacık (EA–AuNP) formülasyonu geliştirilmiştir. Çalışmada MI öncesi 7 gün boyunca ardışık olarak EA–AuNP verilen farelerde intraperitoneal izoproterenol HCl (ISO) uygulanarak MI indüklenmiş ve bu grup kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. MI indüklenen farelerde oksidatif stresin şiddetini yansıtmak amacıyla Katalaz (CAT), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Süperoksit Dismutaz (SOD) gibi enzim aktiviteleri incelenmiştir. EA-AuNP uygulanan farelerde, MI nedeniyle düşen CAT, GSH-Px ve SOD aktivitelerinin normale yakın düzeylere yükseldiği görülmüştür. Yine aynı çalışmada moleküler düzeyde değerlendirme amacıyla antiapoptotik Bcl-2, proapoptotik Bax ve cleaved caspase-3 gibi apoptoz ilişkili bazı proteinlerin ekspresyonu incelenmiş; EA-AuNP uygulanan farelerde H₂O₂ ile indüklenen Bcl-2 inhibisyonunun tersine çevrildiği ve Bax artışının baskılanarak Bax/Bcl-2 oranının azaldığı görülmüştür.

Ayrıca EA-AuNP tedavisinin, kontrol grubuna kıyasla cleaved caspase-3 ekspresyonunda azalma sağladığı görülmüştür. Bu bulgular, EA-AuNP tedavisinin oksidatif hasara karşı kardiyomiyositlerin antioksidan kapasitesini iyileştirebildiğini ve antiapoptotik etkisi olduğunu göstermiştir.(76)

Yamasan ve ark. yaptığı çalışmada ise EA'nın patolojik kardiyak hipertrofiye eşlik eden fonksiyonel yetersizlikleri büyük ölçüde düzelttiği gösterilmiştir. Bu çalışmada ile ratlara subkutan izoproterenol HCl (ISO) uygulanarak kardiyak hipertrofi indüklenmiş, aynı süre boyunca oral gavaj yoluyla EA uygulanan ratlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Kardiyak hipertrofi nedeniyle artmış ROS yükü kardiyomiyositlerde NADPH oksidaz (NOX2) ekspresyonunda artışa neden olmasına rağmen EA uygulanan ratlarda NOX2 kompleksinin p22phox alt biriminin ekspresyonundaki artışı anlamlı olarak azaltırken, p47phox ekspresyonundaki düşüş belirgin olmasına rağmen istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Bu çalışmada da kronik EA uygulamasının oksidatif stresi azaltabildiği gösterilmiştir.(98)

Dhingra ve ark. yaptığı çalışmada ise indüklenabilir ölüm proteini Bnip3'ün doksorubisin uygulanmış ya da hipoksiye maruz bırakılmış kardiyomiyositlerde mitokondriyal hasar ve hücre ölümünün tetiklenmesinin EA ile iyileştirildiği gösterilmiştir. Çalışmada ratlardan elde edilen kardiyomiyositler EA işlendikten sonra doksorubisin ya da hipoksi altında izlenerek kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. EA uygulaması doksorubisinin tetiklediği LDH salınımını ve nükleer yüksek mobilite grup kutusu-1 (HMGB1:high-mobility group protein-1)

kaybını belirgin şekilde baskıladığı görölmüştür. Ayrıca hipoksi ya da doksorubisin ile indüklenen ölüm proteini Bnip3'ün ekspresyonunun EA uygulaması ile belirgin azalarak kardiyomiyositlerdeki mitokondriyal hasarı ve nekrotik hücre ölümünü azalttığına dair güçlü kanıtlar sunduğu görölmüştür.(99) Ancak literatürde miyokarddaki oksidatif indeksi ölçen herhangi bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır.

Bu çalışmada Ellajik Asit miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki kanıt boşluğunu miyokard dokusunda TAS/TOS/OSI ile TUNEL ölçümlerini eş zamanlı olarak değerlendirerek doldurmayı amaçladık. Zira EA ile ilgili önceki araştırmaların bir bölümü kardiyak modellerde oksidatif indeks panelini raporlamamış, diğer bölümü ise paneli non-kardiyak organlarda uygulamıştır.

Bizim çalışmamızda MİR grubu ile MİR+EA grubu karşılaştırıldığında oksidatif durum parametreleri arasında anlamlı fark bulundu.

Çalışmamızda TAS düzeyi MİR grubunda kontrol ve EA gruplarına göre anlamlı düşük olarak bulundu. Aynı zamanda TAS düzeyi MİR+EA grubunda MİR grubuna göre anlamlı yüksek olarak bulundu. Elde edilen veriler, reperfüzyon öncesi verilen EA'in İ/R hasarına karşı belirgin koruyuculuk sağladığını desteklemektedir.

TOS düzeyi MİR grubunda kontrol ve EA gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu. Bununla birlikte TOS düzeyi MİR+EA grubunda MİR grubuna göre anlamlı düşük olarak bulundu. Bu bulgular da benzer şekilde reperfüzyon öncesi verilen EA'nın İ/R hasarına karşı belirgin koruyuculuk sağladığını desteklemektedir.

PON-1, dolaşımda HDL'ye bağlı, kalsiyum-bağımlı bir esterase olup başta oksitlenmiş fosfolipitler ve lipid hidroperoksitleri olmak üzere okside lipid türevlerini hidrolize ederek antioksidan savunmaya katkı sağlar ve redoks homeostazını destekler. Miyokardiyal iskemi–reperfüzyon bağlamında PON-1 aktivitesindeki azalma, artmış oksidatif stresin bir göstergesi kabul edilir ve HDL aracılı antioksidan korumanın zayıfladığını, dolayısıyla doku düzeyinde savunmanın yetersiz kaldığını düşündürür.(69, 71) Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinin ölçümü, İ/R modellerinde PON-1'in müdahalelere duyarlı bir biyobelirteç olarak izlenmesine olanak verir; nitekim yakın dönem rat miyokard İ/R verilerinde tedaviyle PON-1 düzeyindeki artışın TAS artışı ve TOS düşüşü profiliyle eşleştiği bildirilmiştir.(100)

Çalışmamızda PON-1 enzim aktivitesi, MİR grubunda hem kontrol hem de EA gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük saptanmıştır. Buna karşılık MİR+EA grubunda PON-1 aktivitesi, MİR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, reperfüzyon öncesi uygulanan EA'nın İskemi-Reperfüzyon kaynaklı oksidatif hasara karşı belirgin kardiyoprotektif etki sağladığını desteklemektedir.

MİR grubunda, kontrol ve EA gruplarına kıyasla TUNEL-pozitif hücre sayısı belirgin olarak daha yüksek saptanmıştır. Buna karşılık MİR+EA grubunda TUNEL pozitifliği, MİR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu bulgular, reperfüzyon öncesi uygulanan EA'in İskemi-Reperfüzyon kaynaklı apoptotik hücre ölümünü sınırladığını ve belirgin kardioprotektif etki sağladığını desteklemektedir. Tüm bu biyokimyasal veriler reperfüzyon öncesi uygulanan EA'in İ/R kaynaklı apoptotik hücre ölümünü sınırladığını ve belirgin kardioprotektif etki sağladığını desteklemekle beraber yukarıda bahsi geçen Xina Yu ve ark., Yamasan ve ark., Dhingra ve ark. yaptıkları çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Ancak bizim çalışmamızda bu çıkarımlar daha spesifik yöntemlerle ve markerlarla kanıtlanmıştır.

MİR grubunda interstisyel ödem, kontrol ve EA gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış saptanmıştır. Buna karşılık MİR+EA grubundaki interstisyel ödem, MİR grubuna göre anlamlı biçimde daha düşüktür. Bu bulgular, EA'in İ/R bağlamında interstisyel ödem gelişimini ve şiddetini azaltıcı nitelikte koruyucu etki gösterdiğini düşündürmektedir.

MİR grubunda hemorajik değişiklikler, kontrol ve EA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksek değerlendirilmiştir. Buna karşın MİR+EA grubunda hemoraji düzeyi, MİR grubuna kıyasla anlamlı ölçüde daha düşüktür. Bu sonuçlar, EA uygulamasının İ/R koşullarında hemorajik doku hasarını sınırlayıcı bir koruyucu etki ortaya koyduğunu düşündürmektedir.

Bu veriler ışığında çalışmamız yukarıda bahsi geçen çalışmalardan farklı olarak EA'in oksidatif streten koruyucu özelliklerini histopatolojik açıdan da ortaya koymuştur.

Bu çalışmada Ellajik Asit deneysel miyokardiyal İ/R modelinde kardiyoprotektif etki gösterdiği ortaya konmuştur. Biyokimyasal düzeyde TAS artışı ile TOS/OSI azalması ve PON-1 aktivitesinde yükselme; histopatolojik düzeyde ise TUNEL-pozitiflikte azalma, interstisiyel ödem ve hemorajide gerileme saptanması; EA'in oksidatif stresin baskılanması, HDL aracılı antioksidan savunmanın güçlenmesi ve apoptotik yanıtın sınırlanması yoluyla miyokard korunmasına katkı sunduğunu desteklemektedir.

Bununla birlikte bu verilerin miyokard infarktüsünde adjuvan kullanım gibi kliniğe aktarım alanları için ek araştırmalara ihtiyaç vardır. Özellikle doz– zamanlama optimizasyonu (reperfüzyon öncesi/erken reperfüzyon), farmakokinetik, biyoyararlanım (nano-taşıyıcı/ hedefleme stratejileri), güvenlik ve ilaç–ilaç etkileşimleri gibi konular için daha büyük hayvan modelleri ile randomize klinik çalışmalar gereklidir.

6. SONUÇ

Bu çalışmamız Ellajik Asit miyokard İ/R hasarını azaltmada ve kardiyoprotektif etkide biyokimyasal ve histopatolojik olumlu etkilerini göstermekle birlikte bu konuda kesin kanaate varmak için daha fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışma klinik uygulama için bir başlangıç basamağı niteliği taşımaktadır.

7. KAYNAKÇA

1. Heusch G. Myocardial ischemia/reperfusion: Translational pathophysiology of ischemic heart disease. *Med.* 2024;5(1):10-31.
2. Sagris M, Apostolos A, Theofilis P, Ktenopoulos N, Katsaros O, Tsalamandris S, et al. Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury: Unraveling Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Emerging Prevention Strategies. *Biomedicines.* 2024;12(4):802.
3. Bernardi P, Gerle C, Halestrap AP, Jonas EA, Karch J, Mnatsakanyan N, et al. Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell Death & Differentiation.* 2023;30(8):1869-85.
4. Ghobrial M, Bawamia B, Cartlidge T, Spyridopoulos I, Kunadian V, Zaman A, et al. Microvascular Obstruction in Acute Myocardial Infarction, a Potential Therapeutic Target. *Journal of Clinical Medicine.* 2023;12(18):5934.
5. Jennings RB. Historical Perspective on the Pathology of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation Research.* 2013;113(4):428-38.
6. Golmei P, Kasna S, Roy KP, Kumar S. A review on pharmacological advancement of ellagic acid. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics.* 2024;15(2):93-104.
7. Li H-X, Wang T-H, Wu L-X, Xue F-S, Zhang G-H, Yan T. Role of Keap1-Nrf2/ARE signal transduction pathway in protection of dexmedetomidine preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Bioscience Reports.* 2022;42(9).

8. Zhang X, Liu Y, Liu M, Ma Q, Hao Z, Tang S, Dai C. Ellagic acid supplementation ameliorates cisplatin-induced liver injury in mice by inhibiting the NF- κ B pathway and activating the Nrf2/HO-1 pathway. *One Health Advances*. 2024;2(1).
9. Rb J. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68-78.
10. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(11):1121-35.
11. Buja LM. Pathobiology of myocardial ischemia and reperfusion injury: Models, modes, molecular mechanisms, modulation, and clinical applications. *Cardiology in Review*. 2023;31(5):252-64.
12. Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1979;40(6):633-44.
13. Allen DG, Xiao X-H. Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovascular research*. 2003;57(4):934-41.
14. Wang R, Wang M, He S, Sun G, Sun X. Targeting calcium homeostasis in myocardial ischemia/reperfusion injury: an overview of regulatory mechanisms and therapeutic reagents. *Frontiers in pharmacology*. 2020;11:872.
15. Xia H, Zahra A, Jia M, Wang Q, Wang Y, Campbell SL, Wu J. Na⁺/H⁺ exchanger 1, a potential therapeutic drug target for cardiac hypertrophy and heart failure. *Pharmaceuticals*. 2022;15(7):875.
16. Bernardi P, Gerle C, Halestrap AP, Jonas EA, Karch J, Mnatsakanyan N, et al. Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell Death & Differentiation*. 2023;30(8):1869-85.

17. Robichaux DJ, Harata M, Murphy E, Karch J. Mitochondrial permeability transition pore-dependent necrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2023;174:47-55.
18. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014;515(7527):431-5.
19. Kula-Alwar D, Prag HA, Krieg T. Targeting succinate metabolism in ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2019;140(24):1968-70.
20. Canu M, Khouri C, Marliere S, Vautrin E, Piliero N, Ormezzano O, et al. Prognostic significance of severe coronary microvascular dysfunction post-PCI in patients with STEMI: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*. 2022;17(5):e0268330.
21. Rehan R, Yong A, Ng M, Weaver J, Puranik R. Coronary microvascular dysfunction: A review of recent progress and clinical implications. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2023;10.
22. Heusch G. Myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nature Reviews Cardiology*. 2020;17(12):773-89.
23. Carlström M, Weitzberg E, Lundberg JO. Nitric Oxide Signaling and Regulation in the Cardiovascular System: Recent Advances. *Pharmacological Reviews*. 2024;76(6):1038-62.
24. Yang B, Xu Y, Yu J, Wang Q, Fan Q, Zhao X, et al. Salidroside pretreatment alleviates ferroptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion through mitochondrial superoxide-dependent AMPK α 2 activation. *Phytomedicine*. 2024;128:155365.

25. Su Z, Li P, Ding W, Gao Y. Urolithin A improves myocardial ischemia–reperfusion injury by attenuating oxidative stress and ferroptosis through Nrf2 pathway. *International Immunopharmacology*. 2024;143:113394.
26. Zhang Y, Lan H, Zhai W, Jiang L, Xia X, Liu F, et al. Caffeic acid alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by directly targeting Keap1N532/M550 and promoting its degradation. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2025:101219.
27. Shen X, Liu A, Li L, Zhu J, Yuan J, Wu L, Zhang X. Robinin decreases myocardial ischemia/reperfusion injury via Nrf2 anti-oxidative effects mediated by Akt/GSK3 β /Fyn in hypercholesterolemic rats. *Journal of Molecular Histology*. 2025;56(5).
28. Bertero E, Popoiu T-A, Maack C. Mitochondrial calcium in cardiac ischemia/reperfusion injury and cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*. 2024;119(4):569-85.
29. Das J, Sah AK, Choudhary RK, Elshaikh RH, Bhui U, Chowdhury S, et al. Network Pharmacology Approaches to Myocardial Infarction Reperfusion Injury: Exploring Mechanisms, Pathophysiology, and Novel Therapies. *Biomedicines*. 2025;13(7):1532.
30. Murphy E, Eisner DA. How does mitochondrial Ca²⁺ change during ischemia and reperfusion? Implications for activation of the permeability transition pore. *Journal of General Physiology*. 2025;157(1).
31. Tong C, Zhou B. Cardioprotective strategies in myocardial ischemia-reperfusion injury: Implications for improving clinical translation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology Plus*. 2025;11:100278.
32. Morciano G, Pinton P. Modulation of mitochondrial permeability transition pores in reperfusion injury: Mechanisms and therapeutic approaches. *European Journal of Clinical Investigation*. 2025;55(1).

33. Mendoza A, Patel P, Robichaux D, Ramirez D, Karch J. Inhibition of the mPTP and Lipid Peroxidation Is Additively Protective Against I/R Injury. *Circulation Research*. 2024;134(10):1292-305.
34. Pelliccia F, Niccoli G, Zimarino M, Andò G, Porto I, Calabrò P, et al. Pathophysiology and Treatment of the No-Reflow Phenomenon in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: Focus on Low-Dose Fibrinolysis during Primary Percutaneous Intervention. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. 2023;24(12):365.
35. Howes S, Altaee O, Ramirez A, Calaquian L, Asif A, Stone C, et al. Breaking the Barrier: Unraveling the No-Reflow Phenomenon in Cardiovascular Medicine. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. 2025.
36. Nicolau AM, Silva PG, Mejía HPG, Granada JF, Kaluza GL, Burkhoff D, et al. Molecular Mechanisms of Microvascular Obstruction and Dysfunction in Percutaneous Coronary Interventions: From Pathophysiology to Therapeutics—A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025;26(14):6835.
37. Xiang Q, Yi X, Zhu X-H, Wei X, Jiang D-S. Regulated cell death in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2024;35(3):219-34.
38. Pang Q, Meng X, Zhou Z, You L, Yuan J, Feng Q, Zhu B. Temporal regulation of genetic programs governing multiple cell death during myocardial ischemia-reperfusion injury. *Frontiers in Genetics*. 2025;16.
39. Piamsiri C, Maneechote C, Jinawong K, Arunsak B, Chunchai T, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Pharmacological inhibition of apoptosis, necroptosis, and ferroptosis confers effective cardioprotection in post-myocardial infarction in rats. *Scientific Reports*. 2025;15(1).

40. Wang K, Zhu Q, Liu W, Wang L, Li X, Zhao C, et al. Mitochondrial apoptosis in response to cardiac ischemia-reperfusion injury. *Journal of Translational Medicine*. 2025;23(1).
41. Du B, Fu Q, Yang Q, Yang Y, Li R, Yang X, et al. Different types of cell death and their interactions in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Cell Death Discovery*. 2025;11(1).
42. Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2012;16(3):123-32.
43. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(1):92-100.
44. Heusch G. Myocardial stunning and hibernation revisited. *Nature Reviews Cardiology*. 2021;18(7):522-36.
45. Vaidya Y, Cavanaugh SM, Dhamoon AS. Myocardial stunning and hibernation. *StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing*; 2025.
46. Lima EG, Martins EB, Carvalho LNS, Azevedo DFCd. What do Cardiologists Expect Towards Myocardial Viability Assessment. *Arq Bras Cardiol: Imagem cardiovasc*. 2024;37(1):-.
47. Park JS, Lee JH, Hong CM, Park BE, Park YJ, Kim HN, et al. Impact of Positron Emission Tomography Viability Imaging: Guided Revascularizations on Clinical Outcomes in Patients With Myocardial Scar on Single-Photon Emission Computed Tomography Scans. *Journal of Korean Medical Science*. 2023;38(46).
48. Zhang H, Hu H, Zhai C, Jing L, Tian H. Cardioprotective Strategies After Ischemia–Reperfusion Injury. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2024;24(1):5-18.

49. Pearce L, Galán-Arriola C, Bell RM, Carr RD, Cunningham J, Davidson SM, et al. Inter-organ communication: pathways and targets to cardioprotection and neuroprotection. A report from the 12th Hatter Cardiovascular Institute workshop. *Basic Research in Cardiology*. 2024;120(2):287-99.
50. Geng W, Yan S, Li X, Liu Q, Zhang X, Gu X, et al. miR-432-5p Inhibits the Ferroptosis in Cardiomyocytes Induced by Hypoxia/Reoxygenation via Activating Nrf2/SLC7A11 Axis by Degrading Keap1. *Analytical Cellular Pathology*. 2023;2023(1):1-16.
51. Zhong G, Chen J, Li Y, Han Y, Wang M, Nie Q, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates myocardial ischemia/reperfusion-induced ferroptosis via the keap1/Nrf2/GPX4 signaling pathway. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2024;24(1).
52. Lopaschuk GD, Karwi QG, Tian R, Wende AR, Abel ED. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. *Circulation Research*. 2021;128(10):1487-513.
53. Gao Y, Song L, Xu J, Li H. The Role of Exosomes in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Cardiology*. 2024:1-17.
54. Kundu D, Shin SY, Chilian WM, Dong F. The Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Cardiac Repair. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(24):13494.
55. Janaszak-Jasiecka A, Płoska A, Wierońska JM, Dobrucki LW, Kalinowski L. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2023;28(1).
56. Münzel T, Daiber A. Vascular Redox Signaling, Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling, and Endothelial Dysfunction in the Setting of Transportation Noise Exposure or Chronic Treatment with Organic Nitrates. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2023;38(13-15):1001-21.

57. Tan M, Yin Y, Ma X, Zhang J, Pan W, Tan M, et al. Glutathione system enhancement for cardiac protection: pharmacological options against oxidative stress and ferroptosis. *Cell Death & Disease*. 2023;14(2).
58. Hu C, Dai F, Wang J, Jiang L, Wang D, Gao J, et al. Peroxiredoxin-5 Knockdown Accelerates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;2022(1):1-12.
59. Yazdi A, Shirmohammadi K, Parvaneh E, Entezari-Maleki T, Hosseini SK, Ranjbar A, Mehrpooya M. Effects of coenzyme Q10 supplementation on oxidative stress biomarkers following reperfusion in STEMI patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*. 2023;15(4):250-61.
60. Xu Y, Zheng H, Slabu I, Liehn EA, Rusu M. Vitamin C in Cardiovascular Disease: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidence and Therapeutic Applications. *Antioxidants*. 2025;14(5):506.
61. Cowled P, Fitridge R. *Pathophysiology of Reperfusion Injury*. Springer International Publishing; 2020. p. 415-40.
62. Zhang Y, Jiang M, Wang T. Reactive oxygen species (ROS)-responsive biomaterials for treating myocardial ischemia-reperfusion injury. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2024;12.
63. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 2004;37(4):277-85.
64. Karabulut U, Karabulut D, Koçaş C, Kaya A, Katkat F, Yiğit Z. Oxidative Stress Markers in Young Patients with Acute Myocardial Infarction and Their Correlation with Cardiac Enzymes. *Experimed*. 2021;11(2):73-80.

65. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005;38(12):1103-11.
66. Kalaycı B, Hamamcıoğlu AC, Kalaycı S. Hematological incidies may predict oxidative stress in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Archives of the Turkish Society of Cardiology/Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*. 2023;51(3).
67. Köksal Z, Kurtipek Ö, Arslan M, Dursun AD, Yığman Z, Özer A. Protective effects of hydrogen rich saline solution in rats with experimental myocardial ischemia reperfusion injury. *Heliyon*. 2023;9(12).
68. Yığman Z, Demirtaş H, Gülcan MB, Özer A, Dursun AD, Küçük A, Arslan M. Bosentan Reduces Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Journal of Updates in Cardiovascular Medicine*. 2025.
69. Lewoń-Mrozek D, Kurzynoga J, Jędrzejewski P, Kędzierska K, Partyka A, Kuriata-Kordek M, Ściskalska M. Molecular Structure of Paraoxonase-1 and Its Modifications in Relation to Enzyme Activity and Biological Functions—A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(23):13129.
70. Mahrooz A. Pleiotropic functions and clinical importance of circulating HDL-PON1 complex. Elsevier; 2024. p. 132-71.
71. Hidayeta S, Askinb L. Serum Paraoxonase-1 and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Cor et Vasa*. 2024;66(6):608-14.
72. Zhang J, Han X, Chang J, Liu J, Liu Y, Wang H, et al. Soluble RAGE attenuates myocardial I/R injuries via FoxO3–Bnip3 pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(5).

73. Moore CL, Savenka AV, Basnakian AG. TUNEL Assay: A Powerful Tool for Kidney Injury Evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(1):412.
74. Hu X-M, Li Z-X, Lin R-H, Shan J-Q, Yu Q-W, Wang R-X, et al. Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9.
75. Sharma R, Ahmad G, Esteves SC, Agarwal A. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016;33(2):291-300.
76. Yu X, Wang J, Wang T, Song S, Su H, Huang H, Luo P. Ellagic acid-enhanced biocompatibility and bioactivity in multilayer core-shell gold nanoparticles for ameliorating myocardial infarction injury. *Journal of Nanobiotechnology*. 2024;22(1).
77. Wang H, Miao F, Ning D, Shan C. Ellagic acid Alleviates hepatic ischemia–reperfusion injury in C57 mice via the Caspase-1-GSDMD pathway. *BMC Veterinary Research*. 2022;18(1).
78. Liu Q, Liang X, Liang M, Qin R, Qin F, Wang X. Ellagic Acid Ameliorates Renal Ischemic-Reperfusion Injury Through NOX4/JAK/STAT Signaling Pathway. *Inflammation*. 2020;43(1):298-309.
79. Tekin E, Kaya AK, Küçük A, Arslan M, Özer A, Demirtaş H, et al. Effects of Ellagic Acid and Berberine on Hind Limb Ischemia Reperfusion Injury: Pathways of Apoptosis, Pyroptosis, and Oxidative Stress. *Medicina*. 2025;61(3):451.
80. Gao E, Lei YH, Shang X, Huang ZM, Zuo L, Boucher M, et al. A Novel and Efficient Model of Coronary Artery Ligation and Myocardial Infarction in the Mouse. *Circulation Research*. 2010;107(12):1445-53.

81. Lindsey ML, Bolli R, Canty Jr JM, Du X-J, Frangogiannis NG, Frantz S, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2018;314(4):H812-H38.
82. Zhang D-Z, Jia M-Y, Wei H-Y, Yao M, Jiang L-H. Systematic review and meta-analysis of the interventional effects of resveratrol in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Frontiers in pharmacology*. 2024;15:1301502.
83. Shin HS, Shin HH, Shudo Y. Current status and limitations of myocardial infarction large animal models in cardiovascular translational research. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2021;9:673683.
84. Martin TP, MacDonald EA, Elbassioni AAM, O'toole D, Zaeri AAI, Nicklin SA, et al. Preclinical models of myocardial infarction: from mechanism to translation. *British Journal of Pharmacology*. 2022;179(5):770-91.
85. Zhang S, Yang L, Guo S, Hu F, Cheng D, Sun J, et al. Mannose binding lectin-associated serine protease-1 is a novel contributor to myocardial ischemia/reperfusion injury. *International Journal of Cardiology*. 2023;389:131193.
86. Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, et al. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia–reperfusion injury. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2008;33(5):906-13.
87. World Health Organization. 2025.
88. American Heart Association. 2025.
89. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). 2023.
90. Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, Barbato E, Berry C, Chieffo A, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *European Heart Journal*. 2023;44(38):3720-826.

91. Xuan X, Fan J, Zhang J, Ren M, Feng L. Immune in myocardial ischemia/reperfusion injury: potential mechanisms and therapeutic strategies. *Frontiers in Immunology*. 2025;16.
92. Xiang J-Y, Zheng J-Y, Xie W-H, Shi R-Y, Wu R, Chen B-H, et al. Persistence of Microvascular Obstruction From Early to Late Gadolinium Enhancement Images on Cardiac MRI: Prognostic Utility After STEMI—Analysis of EARLY-MYO-CMR Registry Data. *American Journal of Roentgenology*. 2025.
93. Brado J, Schmitt R, Hein M, Valina C, Steinhauer C, Soschynski M, et al. Predicting MRI-diagnosed microvascular obstruction and its long-term impact after acute myocardial infarction. *Clinical Research in Cardiology*. 2025.
94. Tomás-Barberán FA, Selma MV, Espín JC. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2016;19(6):471-6.
95. Mannino F, Imbesi C, Bitto A, Minutoli L, Squadrito F, D'Angelo T, et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of ellagic and puniceic acid in an in vitro model of cardiac fibrosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;162:114666.
96. Zhao X, Zhang E, Ren X, Bai X, Wang D, Bai L, et al. Edaravone alleviates cell apoptosis and mitochondrial injury in ischemia–reperfusion-induced kidney injury via the JAK/STAT pathway. *Biological Research*. 2020;53(1).
97. Büyük A, Kapan M, Firat U, Alp H, Önder A, Gümüş M, Basarali M. Ellagic acid ameliorates lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Pharmacognosy Magazine*. 2011;7(27):224.
98. Yamasan BE, Mercan T, Erkan O, Ozdemir S. Ellagic Acid Prevents Ca²⁺ Dysregulation and Improves Functional Abnormalities of Ventricular Myocytes via Attenuation of Oxidative Stress in Pathological Cardiac Hypertrophy. *Cardiovascular Toxicology*. 2021;21(8):630-41.

99. Dhingra A, Jayas R, Afshar P, Guberman M, Maddaford G, Gerstein J, et al. Ellagic acid antagonizes Bnip3-mediated mitochondrial injury and necrotic cell death of cardiac myocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017;112:411-22.
100. Meisinger C, Freuer D, Bub A, Linseisen J. Association between inflammatory markers and serum paraoxonase and arylesterase activities in the general population: a cross-sectional study. *Lipids in Health and Disease*. 2021;20(1).



8. ÖZET

Amaç: Ellajik asidin (EA) deneysel miyokardiyal iskemi–reperfüzyon (İ/R) modelinde kardiyoprotektif etkilerini; TAS/TOS, OSI, PON-1 gibi biyokimyasal belirteçler ve TUNEL, interstisyel ödem, hemoraji gibi histopatolojik uç noktalar üzerinden değerlendirilmesi amaçlandı.

Yöntem: Erişkin ratlar dört gruba ayrıldı: Sham, EA, İ/R (30 dk LAD oklüzyonu + 120 dk reperfüzyon) ve İ/R+EA (reperfüzyondan ~5 dk önce tek doz intraperitoneal EA). Ardından miyokard dokusu histopatolojik olarak incelendi; serum/doku biyokimyasında ise TAS, TOS, OSI ve PON-1 ölçüldü.

Bulgular: İ/R grubunda TUNEL pozitifliği, interstisyel ödem ve hemoraji belirgin artarken; İ/R+EA grubunda bu parametreler İ/R'ye göre anlamlı biçimde azaldı. PON-1 aktivitesi İ/R grubunda düşmüşken, EA eşliğinde yükseldi; buna paralel TAS artışı ve TOS/OSI azalması gözlemlendi. Bulgular EA'nın oksidatif stres yanıtını iyileştirdiğini düşündürdü.

Sonuç: EA, miyokardiyal İ/R'de antioksidan savunmayı güçlendirme, HDL ilişkili antioksidan kapasiteyi (PON-1) destekleme ve apoptozu sınırlama yoluyla kardiyoprotektif etki göstermektedir. Bununla birlikte, doz–zamanlama, farmakokinetik/biyoyararlanım ve güvenlik açısından daha büyük hayvan ve klinik çalışmalar gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Ellajik asit; miyokard; iskemi–reperfüzyon; TAS; TOS; OSI; PON-1; TUNEL

9. ABSTRACT

Objective: To evaluate the cardioprotective effects of ellagic acid (EA) in an experimental model of myocardial ischemia–reperfusion (I/R) using biochemical endpoints -TAS, TOS, OSI, PON-1 -alongside histopathological outcomes including TUNEL, interstitial edema, and hemorrhage.

Methods: Adult rats were allocated to four groups: Sham, EA, I/R (30-min LAD occlusion + 120-min reperfusion), and I/R+EA (a single intraperitoneal dose of EA ~5 min before reperfusion). Myocardial tissue underwent histopathological assessment, and serum/tissue biochemistry included TAS, TOS, OSI, and PON-1 measurements.

Results: The I/R group exhibited marked increases in TUNEL positivity, interstitial edema, and hemorrhage, whereas these parameters were significantly reduced in the I/R+EA group. PON-1 activity decreased in I/R but enhanced by EA co-treatment, accompanied by higher TAS and lower TOS/OSI, indicating attenuation of oxidative stress.

Conclusion: EA confers cardioprotection in myocardial I/R by enhancing antioxidant defenses, supporting HDL-linked antioxidant capacity (PON-1), and limiting apoptosis. Nonetheless, larger animal studies and clinical trials are needed to clarify optimal dosing/timing, pharmacokinetics/bioavailability, and safety.

Keywords: Ellagic acid; myocardium; ischemia–reperfusion; TAS; TOS; OSI; PON-1; TUNEL.

10.EKLER

10.1.: Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 07.11.2022-E.504156



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-504156 07.11.2022
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Abdullah ÖZER
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Abdullah ÖZER, Elif ŞİMŞEK, Mustafa ARSLAN, Ali Doğan DURSUN, Badegül SARIKAYA, Zeynep YIĞMAN, Çisem YEŞİL KAYABAŞI'ndan oluşan, G.Ü.ET-22.108 kod numaralı ve "*Ellajik Asitin Deneysel Olarak Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Ratlarda Koruyucu Etkileri*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-22.108 and entitled "*Protective Effects of Ellagic Acid in Rats With Experimental Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Wistar Albino Rat
Hayvan Sayısı : 24

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Bu belge, güvenli elektronik imza ile onaylanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu :BSAE25TKJZ Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ehys>

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :61 06560 Yenimahalle ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziumversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57



11. ÖZGEÇMİŞ

Arş.Gör. Elif Şimşek

Doğum Tarihi: xxxxxxxx

Doğum Yeri: xxxxx

Yabancı Dil: İngilizce

E-Posta: xxxxxxxxxxxxx

İlk Öğrenim: Ahmet Haşim İlköğretim Okulu

Lise: Ankara Atatürk Lisesi (2008-2013)

Üniversite: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (2013- 2019)

İhtisas: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Abd (2020-)

Akademik Ünvanları: Arş. Gör. Dr.

Yayınlanan Makaleler:

1. The Role Of Monocyte Distribution Width İn The Early Prediction Of Sepsis İn

Patients Undergoing Cardiovascular Surgery: A Cross-Sectional Study

Özer A., Tak S., Demirtaş H., Yıldırım A. K., Şimşek E., Oktar G. L., Et Al.

Medicina (Lithuania) , Cilt.60, Sa.9, 2024 (Scı-Expanded) Q1

2. In-vivo antioxidant and therapeutic effects of ellagic acid on ischemia reperfusion injury in skeletal muscle

Demirtaş H., Özer A., Yiğit D., Dursun A. D., Yiğman Z., Kösa Ç., Et Al.

Turkish Journal of Vascular Surgery , cilt.34, sa.1, ss.52-60, 2025 (Scopus)

3. Retrospective Research of Clinical and Hematological Changes Occurred by del Nido Cardioplegia in the Perioperative Period of Patients who Underwent Open-Heart Surgery

Özer A., Kocak B., Arslan M., Şimşek E., Özdemirkan Z. A., Ünal Y., Et Al.

GAZI MEDICAL JOURNAL , cilt.35, sa.3, ss.276-280, 2024 (ESCI)

