SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ GÜLHANE TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GANODERMA LUCİDUM EKSTRAKTININ KARBONMONOKSİT ZEHİRLENMESİ OLUŞTURULMUŞ FARE MODELİNDE KALP ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Dr. Tuğba Yılmaz

ANKARA/2023

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ GÜLHANE TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GANODERMA LUCİDUM EKSTRAKTININ KARBONMONOKSİT ZEHİRLENMESİ OLUŞTURULMUŞ FARE MODELİNDE KALP ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Dr. Tuğba Yılmaz

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ayten TÜRKKANI

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

ANKARA/2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi aldığım süre zarfında, tez sürecim dahil her konuda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bana yol gösteren, desteğini her zaman üzerimde hissettiğim ve hissedeceğim çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ayten TÜRKKANI'ya,

Uzmanlık eğitimimin ilk gününden itibaren; eğitimimde ve tez sürecimde desteğini, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Barış BAYKAL'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca her zaman desteklerini hissettiğim, tercübeleriyle bize yol gösteren kıymetli hocalarım Prof. Dr. Cem KORKMAZ ve Doç. Dr. Esra ERDOĞAN'a,

Tez sürecimde, bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bize destek olup yol gösteren çok kıymetli hocalarımız; Ankara Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Esra ERDEMLİ'ye, Gülhane Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Erdim SERTOĞLU'na ve Gülhane Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Zehra ÇİÇEK'e,

Tez sürecimde ve uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan çok mutluluk duyduğum ve her daim yanımda olduklarını hissettiğim çok sevgili asistan ve çalışma arkadaşlarım başta Dr. Kübra ÖZUNCA ve Dr. Yasemin ZÜMRÜT'e,

Tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen ve bize her daim destek olan Dr. Alper Murat ALBAYRAK'a ve kıymetli asistan arkadaşlarım Dr. Ceren ARSLANTÜRK, Dr. Beyhan KARLI, Dr. Muazzez CAV, Dr. Ayşe ÖZDEMİR ve Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı laborantımız Serap GÜNAL'a,

Bütün iyi ve kötü günlerimde yanımda olup beni destekleyen, sınırsız fedakarlıklarıyla ve sevgileriyle beni bugünlere getiren canım annem, babam, ablam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
KISALTMALAR iv
TABLO LİSTESİ vi
ŞEKİL LİSTESİ vii
ÖZET xi
ABSTRACT xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. KALP DOKUSU ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ……...3
2.2. KALP DOKUSU EMBRİYOLOJİSİ…… 12
2.3. KARBONMONOKSİT GAZI……... 15
2.4. KARBONMONOKSİT ZEHİRLENMESİ…… 16
2.4.1. Tarihçe……...16
2.4.2. Epidemiyoloji……16
2.4.3. Patofizyoloji……...17
2.4.4. Klinik Belirti ve Bulgular……...20
2.4.5. Tanı…… 21
2.4.6. Tedavi ……....22
2.5. GANODERMA LUCİDUM…… 23
3. GEREÇ VE YÖNTEM 25
3.1. SAKRİFİKASYON ÖNCESİ FARELERE UYGULANMIŞ YÖNTEMLER…….25
3.1.1. Deney Grupları……...25
3.1.2. Deney Modeli…….26
3.2. SAKRİFİKASYON VE KALP DOKULARININ ALINMASI……..27
3.3. IŞIK MİKROSKOBİK YÖNTEM…….. 28
3.3.1. Histolojik Kesitlerin Alınması……... 28
3.3.2. Picrosirius Red Boyama Yöntemi……. 29
3.3.3. Toluidin Mavisi Boyama Yöntemi…….32
3.3.4. Görüntü ve Analiz……..32

3.3.4.1. Picrosirius Red ile Boyanan Frozen Kesitlerin Görüntülemesi ve Analizi…….33
3.3.4.2. Toluidin Mavisi ile Boyanan Yarı İnce Kesitlerin Görüntülemesi ve Analizi…….41
3.4. TUNEL YÖNTEMİ (İN SİTU APOPİTOZİSİN TESPİTİ)…...44
3.5. ELEKTRON MİKROSKOPİ YÖNTEMİ……. 46
3.5.1. Doku Takibi……...46
3.5.2. İnce ve Yarı ince Kesitlerin Alınması……...49
3.5.3. Polikromatik Boyama Yöntemi…….51
3.6. OKSİDATİF HASARIN (MDA) ÖLÇÜMÜ…….52
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ……....52
4. BULGULAR 53
4.1. IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME BULGULARI……...53
4.1.1. Picrosirius Red Boyama Bulguları……53
4.1.2. Toluidin Mavisi Boyama Bulguları……...57
4.1.3. Polikromatik Boyama Bulguları……69
4.2. TUNEL TESTİ BULGULARI……79
4.3. ELEKTRON MİKROSKOBU BULGULARI….....82
4.4. BİYOKİMYASAL İNCELEME BULGULARI…….96
4.4.1. MDA (Malondialdehyde) Ölçümü Sonuçları……....96
5. TARTIŞMA 97
6. SONUÇ ..... .104
7. KAYNAKLAR 105

KISALTMALAR

ACEP : American College of Emergency Physicians

AOPP : İleri oksidasyon protein ürünlerini

ATP : Adenozintrifosfat

AV : Atriyoventriküler

CAT : Katalaz

CO **:** Karbonmonoksit

CO_2 : Karbondioksit

COHb : Karboksihemoglobin

CYP2E1 : Sitokrom P450 2E1

DNA **:** Deoksiribo nükleik asit

dUTP **:** 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate

EKG : Elektrokardiyografi

GL : Ganoderma lucidum

GNS : Gecikmiş nörolojik sekel

GPx : Glutatyon peroksidaz

GST : Glutatyon-Stransferaz

GT : Ganoderma triterpenoidleri

Hb : Hemoglobin

HBO_2 : Hiperbarik oksijen

HO : Hemeoksijenaz

IL : İnterlökin

KAH : Koroner arter hastalığı

MDA : Malonil dialdehit

Mn-SOD : Manganase-süperoksit dismutaz

MPO : Miyeloperoksidaz

MRI : Manyetik rezonans görüntüleme

NADPH **:** Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NaOH : Sodyum hidroksit

NBO_2 : Normobarik oksijen

NO : Nitrik oksit

NOS : Nitrik oksit sentaz

O_2 : Oksijen

OCT : Optimal Cutting Temperature

PBS : Phosphate Buffer Saline

PFA : Paraformaldehit

ROS : Reaktif oksijen türleri

SA : Sinoatriyal

SDH : Süksinat dehidrojenaz

SOD : Süperoksit dismutaz

SPECT : Single-photon emission computed tomography

TBA : Tiyobarbitürik asit

TNF-alfa : Tümör nekroz faktör-alfa

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

XOD : Ksantin oksidaz

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. CO zehirlenmesinde ortaya çıkan kardiyovasküler semptom ve bulgular

Tablo 2. Picrosirius Red Boyama Protokolü

Tablo 3. Toluidin Mavisi Boyama Solüsyonu

Tablo 4. Fiksatif Tamponu Solüsyonu

Tablo 5. Osmiyum Tetroksit Stok Solüsyonu

Tablo 6. Uranil asetat solüsyonu

Tablo 7. Araldit Solüsyonu

Tablo 8. Elektron Mikroskobu Doku Takibi Protokolü

Tablo 9. İnce Kesit Boyama Protokolü

Tablo 10. Polikromatik Boyama Solüsyonu

ŞEKİL LİSTESİ

Resim 1. Kalbin anatomisi

Resim 2. Kalp duvarı tabakaları

Resim 3. Kalp duvarı tabakalarının histolojisi

Resim 4. Kalp duvarının endokardiyum ve miyokardiyum tabakalarının histolojisi

Resim 5. Kalp duvarı epikardiyum tabakasının histolojisi

Resim 6. Kalp kası liflerinin longitudinal kesiti

Resim 7-8. Kardiyomiyositlerin içerdiği sarkomer ve organellerin transmisyon elektron mikrografı

Resim 9. Fareden eksize edilen kalp dokusu

Resim 10. Dokunun kriyotom içerisinde kesit alma işlemi öncesinde gömülmesi

Resim 11. *Leica Application Suite* X yazılımında aydınlık ayarın (*TL-BF)* seçilmesi

Resim 12. *LAS X Navigator* alanına giriş

Resim 13. Kesitin spirallenerek görüntülemesinin başlatılması

Resim 14. Taratılacak alanın sınırlarının çizilmesi

Resim 15. Odak noktalarının eklenmesi işlemi

Resim 16. Odak noktalarının netlik ayarının yapılması

Resim 17. Taranmış temsili bir kesit görüntüsünün son hali

Resim 18. Temsili görüntünün *FIJI* programında açılması

Resim 19. *FIJI* programında *Color Deconvolution* işlemi

Resim 20. Temsili görüntü üzerinde *Threshold* işleminin yapılması

Resim 21. *Threshold* ayarı sonrası görüntü

Resim 22. Kırmızı alanların *Analyze* butonundan hesaplanması işlemi

Resim 23. Toluidin boyalı kesitlerin analizi

Resim 24. Toluidin boyalı kesitlerin analizinde bir alanda ölçüme katılacak kardiyomiyositlerin seçildiği kareler

Resim 25. *KF Viewer* yazılımında kardiyomiyosit çapı ölçümü

Resim 26. Negatif kontrol grubuna ait fare kalbinden alınmış ve Picrosirius Red ile boyanmış transvers kesitin ışık mikroskobik görüntüsü

Resim 27. Picrosirius Red ile boyanmış fare kalbi kesitlerinden sol ventrikül miyokardiyum tabakasına ait ışık mikroskobik görüntüler

Resim 28. Negatif kontrol grubuna ait fare kalbinden alınmış ve toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitindeki bir kardiyomiyositin ışık mikroskobik görüntüsü
Resim 29. Toluidin mavisi ile boyanmış fare kalp dokusu yarı ince kesitlerindeki kardiyomiyosit çaplarının ışık mikroskobik olarak gruplar arası karşılaştırması
Resim 30. Negatif kontrol grubuna ait fareden alınan toluidin mavisi ile boyanmış bir kalp dokusu yarı ince kesitinin görüntüsü
Resim 31. Pozitif kontrol grubuna ait fareden alınan toluidin mavisi ile boyanmış bir kalp dokusu yarı ince kesitinin ışık mikroskobik görüntüsü
Resim 32. Optimum doz tedavi grubuna ait fareden alınan toluidin mavisi ile boyanmış bir kalp dokusu yarı ince kesitinin ışık mikroskobik görüntüsü
Resim 33. Yüksek doz tedavi grubuna ait fareden alınan toluidin mavisi ile boyanmış bir kalp dokusu yarı ince kesitinin ışık mikroskobik görüntüsü
Resim 34. Toluidin mavisi ile boyanmış kalp dokusu (apeks miyokardiyumu) yarı ince kesitlerinin ışık mikroskobik görüntüsünün gruplar arası karşılaştırması
Resim 35. Toluidin mavisi ile boyanmış kalp dokusu (apeks miyokardiyumu) yarı ince kesitlerinde perivasküler alanların ışık mikroskobik görüntüsünün gruplar arası karşılaştırması
Resim 36. Fare kalbi yarı ince kesitinin polikromatik boyama ile boyanmış ve ışık mikroskobu ile görüntülenmiş mikrografı
Resim 37. Optimum doz tedavi grubuna ait fare kalbi yarı ince kesitindeki perikapiller bölgenin polikromatik boyama (Resim1) ve toluidin mavisi ile boyanmış (Resim 2) ve ışık mikroskobu ile görüntülenmiş mikrograflarının karşılaştırması.
Resim 38. Polikromatik boyanan ve ışık mikroskobik olarak görüntülenmiş negatif kontrol grubuna ait fare kalbi kesitlerindeki kardiyomiyositlerin longitudinal ve transvers görüntüleri
Resim 39. Polikromatik boyanan ve ışık mikroskobik olarak görüntülenmiş pozitif kontrol grubuna ait fare kalbi kesitlerindeki kardiyomiyositlerin longitudinal **(a-b)** ve transvers **(c)** görüntüleri
Resim 40. Polikromatik boyanan ve ışık mikroskobik olarak görüntülenmiş optimum (düşük) doz tedavi grubuna ait fare kalbi kesitlerindeki kardiyomiyositlerin longitudinal **(a-b)** ve transvers **(c)** görüntüleri

Resim 41. Polikromatik boyanan ve ışık mikroskobik olarak görüntülenmiş yüksek doz tedavi grubuna ait fare kalbi kesitlerindeki kardiyomiyositlerin longitudinal **(a-b)** ve transvers **(c)** görüntüleri
Resim 42. Polikromatik boyama ile boyanmış ve taratılmış kalp yarı ince kesitlerinde (apeks miyokardiyumu) perivasküler alanların ışık mikroskobik görüntüsünün gruplar arası karşılaştırması
Resim 43. Fare kalp dokusu kesitlerinin TUNEL işaretleme sonrası floresan mikroskopi görüntüleri ve gruplar arası karşılaştırması
Resim 44. Negatif kontrol grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografları
Resim 45. Negatif kontrol grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografı
Resim 46. Negatif kontrol grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitinde bulunan perikapiller alandaki bağ dokusunun (BD) transmisyon elektron mikrografı
Resim 47. Pozitif kontrol grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografı
Resim 48. Pozitif kontrol grubuna ait farenin kalp dokusunun ince kesitinde bulunan kalp kası lifleri ve komşuluğundaki perikapiller bağ dokusunun (BD) transmisyon elektron mikrografları
Resim 49. Optimum (düşük) doz tedavi grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografı
Resim 50. Optimum (düşük) doz tedavi grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografları
Resim 51. Yüksek doz tedavi grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografları
Resim 52. Yüksek doz tedavi grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografı
Resim 53. Fare kalp dokusu ince kesitlerinin transmisyon elektron mikrograflarındaki interstisyel ve perivasküler bağ dokusunun gruplar arası karşılaştırması.

Resim 54. Fare kalp dokusu ince kesitlerinin transmisyon elektron mikrograflarındaki mitokondriyonların morfolojilerinin gruplar arası karşılaştırması

Şekil 1. Karbonmonoksit zehirlenmesinde miyokardiyal hasarın patofizyolojisi

Grafik 1. Kesitlerdeki birim alana düşen kollajen liflerinin gruplar arası karşılaştırılması
Grafik 2. Kesitlerdeki ortalama kardiyomiyosit çaplarının gruplar arası karşılaştırılması
Grafik 3. TUNEL işaretli fare kalp dokusu kesitlerindeki apoptotik indekslerin gruplar arası karşılaştırması
Grafik 4. Kalp dokularından alınan örneklerdeki ortalama MDA miktarlarının gruplar arası karşılaştırılması

ÖZET

Ganoderma Lucidum Ekstraktının Karbonmonoksit Zehirlenmesi Oluşturulmuş Fare Modelinde Kalp Üzerindeki Etkilerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi

Amaç: Karbonmonoksit zehirlenmesi dünya genelinde zehirlenmeye bağlı mortalite ve morbiditenin en yaygın nedeni olarak kabul edilmektedir. Karbonmonoksit zehirlenmesinde nörolojik ve kardiyovasküler tutulum morbidite ve mortaliteden önemli ölçüde sorumludur. Karbonmonoksit kaynaklı toksisitenin kesin bir antidotu bulunmamakla birlikte güncel tedavi normobarik veya hiperbarik oksijen uygulamasıdır. Bu tedavilerin kalp tutulumu ve mortaliteye etkileri tartışmalıdır. Kültür mantarları arasında, Gonaderma Lucidum besin değerinden ziyade farmasötik değeri ön planda olan ve yıllardır tıbbi kullanımı mevcut bir mantar türüdür. Çalışmamızın amacı; kalp hasarına neden olan fakat henüz net bir tedavisi bulunamayan karbonmonoksit zehirlenmesinde kardiyotoksik hasarın önlenmesi veya azaltılmasına yönelik yeni bir bitkisel ajanın etkilerini araştırmaktır. Bu sebeple yüksek doz karbonmonoksitin kalp dokusunda meydana getirdiği hasarın ve Ganoderma Lucidum'un bu hasar üzerine doz bağımlı etkilerinin histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle ortaya konulması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, karbonmonoksit zehirlenme modeli uygulanarak tedavi gruplarına 9 gün oral gavaj ile Ganoderma Lucidum verilmiş; 10. günde sakrifiye edilmiş olan toplam 20 adet farenin sakrifikasyon sonrası arşiv kalp dokuları kullanılmıştır. Eksize edilen kalplerin ventriküllerinden, sistematik rastgele örnekleme ile frozen kesitler alınarak histokimyasal boyama yapılmış ve bağ dokusu miktarı FIJI programı ile analiz edilmiştir. Frozen kesitlerin bir kısmı da apoptozisin tespiti için TUNEL testinde kullanılmıştır. Kalplerin apeks bölümleri elektron mikroskobik inceleme için gerekli doku takibine alınarak yarı ince ve ince kesitler alınmış; ince kesitler elektron mikroskop altında incelenmiştir. Yarı ince kesitler toluidin mavisi ve polikromatik boyama ile boyanmıştır. Toluidin mavisi boyalı kesitler ışık mikroskop ile görüntülenip ortalama kardiyomiyosit çapları hesaplanarak KF Viewer yazılımı ile analizi yapılmıştır. Polikromatik boyalı kesitlerdeki kardiyomiyosit yapısı ve

ekstraselüler alanlar da ışık mikroskop ile görüntülenip incelenmiştir. Kalp dokularının atriyumları ise oksidatif hasarın tespiti için biyokimyasal (MDA) analizde kullanılmıştır.

Bulgular: Işık mikroskobik görüntülemede; picrosirius red ile boyanan kesitlerin analizleri sonucunda, kollajen lif (fibrozis) alanı/kesit alanı oranı pozitif kontrol grubunda, negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,05$) yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu oran, pozitif kontrol grubunda; yüksek doz Ganoderma Lucidum tedavi grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0,05$) yüksek tespit edilmiştir. Toluidin mavisi ile boyanan kesitlerin analizleri sonucunda; pozitif kontrol ve optimum doz tedavi grubundaki kardiyomiyosit çapları, negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,001$) göstererek düşük bulunmuştur. Pozitif kontrol ve optimum doz tedavi grubunun kardiyomiyosit çapları, yüksek doz Ganoderma Lucidum tedavi grubundakilerden de istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,001$) düşük tespit edilmiştir. TUNEL testinde; pozitif kontrol grubunun apoptotik indeksi, negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0.001$) yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca optimum doz ve yüksek doz tedavi grubunun apoptotik indeksi; pozitif kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0.05$) düşük bulunmuştur.

Elektron mikroskobik görüntülemede; pozitif kontrol grubuna ait kesitlerde mitokondriyonlarda diğer gruplara göre kondensasyon ve krista kaybı, optimum doz tedavi grubunda ise küçük mitokondriyal vakuoller gözlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunda perivasküler ve interstisyel alanlarda belirgin kollajen lif artışına rastlanmıştır. Yüksek doz tedavi grubunda, negatif kontrol grubuna göre belirgin bir değişiklik gözlenmeyip optimum doz tedavi grubunda ise negatif kontrol grubuna kıyasla interstisyel ödem belirgin bir şekilde artmış olarak gözlenmiştir.

MDA analizi sonuçlarına göre; negatif kontrol grubu ve yüksek doz Ganoderma Lucidum tedavi grubunda; pozitif kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0,05$) düşük oksidatif hasar saptanmıştır.

Sonuç: Kalp dokusu üzerinde, yüksek doz karbonmonoksitin miyofibril dejenerasyonu, oksidatif hasar, fibrozis ve apoptozis gibi kardiyotoksik etkileri olduğunu ve yüksek doz Ganoderma Lucidum tedavi grubunda; diğer gruplara kıyasla bu etkilerde anlamlı bir düşüş olduğunu gözlemledik. Karbonmonoksit

zehirlenmesinde, yüksek doz Ganoderma Lucidum'un kalp üzerinde koruyucu etkilerinin olabileceğini ileri sürmekle birlikte karbonmonoksit zehirlenmesine bağlı meydana gelen kardiyotoksisitenin patogenezinin ve Ganoderma Lucidum'un bu sürece etkilerinin ortaya konulabilmesi için daha fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Karbonmonoksit zehirlenmesi, Ganoderma Lucidum, Kalp, Histoloji

ABSTRACT

Histopathological Investigation of the Effects of Ganoderma Lucidum Extract on the Heart in a Mouse Model of Carbon Monoxide Poisoning

Objective: Carbon monoxide poisoning is accepted as the most common cause of mortality and morbidity related to poisoning worldwide. Neurological and cardiovascular involvement is responsible for morbidity and mortality in carbon monoxide poisoning. Although there is no definitive antidote for carbon monoxide-induced toxicity, the current treatment is normobaric or hyperbaric oxygen administration. The effects of these treatments on cardiac involvement and mortality are controversial. The need for new treatment methods has arisen because hyperbaric oxygen therapy is difficult to access, its cost is high, and its effectiveness in cardiotoxicity due to carbon monoxide poisoning has not been clearly demonstrated in the literature. Among cultivated mushrooms, Ganoderma Lucidum is a type of mushroom that has pharmaceutical value rather than nutritional value and has been used medicinally for years. The aim of our study; The aim of this study is to investigate the effects of a new herbal agent for the prevention or reduction of cardiotoxic damage in carbon monoxide poisoning, which causes heart damage but has not yet found a clear treatment. For this reason, it is aimed to reveal the damage caused by high dose carbon monoxide in the heart tissue and the dose-dependent effects of Ganoderma Lucidum on this damage by histological and biochemical methods.

Materials and Methods: In our study, using the carbon monoxide poisoning model, the treatment groups were given Ganoderma Lucidum by oral gavage for 9 days and the archive heart tissues of 20 mice, which were sacrificed on the 10th day, were used after sacrification. Frozen sections were taken from the ventricles of the excised hearts with systematic random sampling, histochemical staining was performed and the amount of connective tissue was analyzed with the FIJI program. Some of the frozen sections were also used in the TUNEL test for the detection of apoptosis. The apex parts of the hearts were taken under tissue follow-up for electron microscopic examination, and semi-thin and thin sections were taken; thin sections were examined under an electron microscope. Semi-thin sections were stained with toluidine blue and polychromatic staining.

Toluidine blue stained sections were viewed with a light microscope, and mean cardiomyocyte diameters were calculated and analyzed with CF Viewer software. The cardiomyocyte structure and extracellular areas in the polychromatic stained sections were also visualized and examined with a light microscope. The atria of the heart tissues were used in biochemical (MDA) analysis for the detection of oxidative damage.

Results: In light microscopic imaging; as a result of the analysis of the sections stained with picrosirius red, the ratio of collagen fiber (fibrosis) area/section area was found to be statistically significantly higher in the positive control group than in the negative control group ($p<0.05$). In addition, this rate was in the positive control group; It was also found to be statistically significantly ($p<0.05$) higher than the high-dose Ganoderma Lucidum treatment group. As a result of the analysis of the sections stained with toluidine blue; cardiomyocyte diameters in the positive control and optimal dose treatment groups were found to be lower, with a statistically significant difference ($p<0.001$) compared to the negative control group. The cardiomyocyte diameters of the positive control and optimum dose treatment group were found to be statistically significantly ($p<0.001$) lower than those in the high dose Ganoderma Lucidum treatment group. In TUNEL test; The apoptotic index of the positive control group was found to be statistically significantly higher ($p<0.001$) when compared to the negative control group. In addition, the apoptotic index of the optimum dose and high dose treatment group; it was found to be statistically significantly ($p<0.05$) lower than the positive control group. In electron microscopic imaging; Condensation and loss of cristae were observed in the mitochondria in the sections belonging to the positive control group compared to the other groups, and small mitochondrial vacuoles were observed in the optimum dose treatment group. In addition, significant collagen fiber increase was observed in the perivascular and interstitial areas in the positive control group. In the high-dose treatment group, no significant change was observed compared to the negative control group, while interstitial edema was observed to be significantly increased in the optimum-dose treatment group compared to the negative control group. According to the results of MDA analysis; Statistically significant ($p<0.05$) lower oxidative damage was detected in the negative control group and high dose Ganoderma Lucidum treatment group compared to the positive control group.

Conclusion: We observed that high-dose carbon monoxide had cardiotoxic effects on heart tissue such as myofibril degeneration, oxidative damage, fibrosis and apoptosis, and there was a significant decrease in these effects in the high-dose Ganoderma Lucidum treatment group compared to the other groups. Although it is suggested that high doses of Ganoderma Lucidum may have protective effects on the heart in carbon monoxide poisoning, more experimental studies are needed to reveal the pathogenesis of cardiotoxicity due to carbon monoxide poisoning and the effects of Ganoderma Lucidum on this process.

Keywords: Carbon monoxide poisoning, Ganoderma Lucidum, Heart, Histology

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karbonmonoksit (CO), hidrokarbonların tam olarak yanmaması sonucunda meydana gelen; renksiz, kokusuz ve tatsız olması sebebiyle 'sessiz katil' olarak da bilinen öldürücü bir gazdır (1). CO oluşumuna sebep olan önemli kaynaklar; ısınmada kullanılan odun, kömür, doğalgaz gibi yakıtlar, tütün dumanı, motorlu araçların egzozu, orman yangınları ve volkanik patlamalar olarak özetlenebilir (2).

CO zehirlenmesi kasıtlı, kaza ile ya da çevresel maruziyet ile meydana gelebilmekte ve dünya genelinde zehirlenmeye bağlı mortalite ve morbiditenin en yaygın nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (3,4,5). Oksijen gereksinimleri görece fazla olan kalp ve beyin, CO zehirlenmesine karşı diğer organlara göre çok daha duyarlıdır (6). CO, solunduğunda hızlı bir şekilde dolaşıma geçerek hemoglobinle birlikte karboksihemoglobini (COHb) meydana getirmektedir. CO'nun hemoglobine (Hb) affinitesi oksijene göre yaklaşık 250 kat fazladır. Bu yüzden bağlanma bölgesi için oksijenle yarışarak Hb'nin oksijen taşıma kapasitesiniazaltmakta ve hücresel düzeyde hipoksiye sebep olmaktadır (7,8). CO, hemoglobinin yanı sıra kalp kasında miyoglobin, sitokrom c oksidaz gibi hem proteinlerine bağlanarak (9,6) ve oksidatif strese neden olarak kardiyomiyositlerin apoptozisine yol açar (10).

Akut CO zehirlenmesi, klinik belirtileri spesifik olmamakla birlikte kardiyotoksisiteye sebep olmaktadır (11,12,13). Kalp ile ilişkili bulgular arasında miyokardiyal hasar, nekroz, kontraktil disfonksiyon, pulmoner ödem, kalp yetmezliği, myokardiyal fibrozis ve COHb seviyelerinin yüksekliğine bağlı olarak miyokard enfarktüsü sayılabilir (14,15,16).

Akut CO zehirlenmesinde mevcut tedavilerin amacı, vücuttan CO eliminasyonunu hızlı bir şekilde gerçekleştirmektir. Bu sayede de akut etkiler veya meydana gelebilecek gecikmiş nöropsikiyatrik sekel engellenmeye çalışılmaktadır (17). CO zehirlenmesinde güncel tedavi, %100 normobarik oksijen solutulması veya hiperbarik oksijen (HBO_2) uygulanması şeklindedir (1). Bununla birlikte, karbon monoksit zehirlenmesine maruz kalan ve kalp tutulumu olan hastalarda yapılmış sınırlı sayıdaki çalışmada, rutin oksijen tedavisinin mortalite veya ağrıyı azaltmada fayda

göstermediği ortaya konulmuştur (18). Ayrıca CO zehirlenmesinde normobarik oksijen tedavisinin, belli durumlarda dokular üzerindeki oksidatif stresi artırabileceği öne sürülmüştür (19). HBO_2 tedavisi ise CO zehirlenmesinde terapötik bir seçenek olmakla beraber kullanımı ve endikasyonları hala netliğe kavuşturulamamıştır (20).

Dünya genelinde bulunan mantar türlerinden yaklaşık 300 tanesi tıbbi özellikleri ile bilinir (21). Çin'de 'lingzhi' ismiyle bilinen parlak yüzeyli, büyük, koyu renkli bir kültür mantarı olan Ganoderma Lucidum da 2000 yılı aşkın bir süredir tanınmakta ve Çin başta olmak üzere diğer Asya ülkelerinde de tıbbi mantar olarak kullanılmaktadır (22,23). Çok sayıda klinik ve pre-klinik çalışma ile Ganoderma lucidum'un; antioksidan, antikanser, immünmodülatör, kardiyoprotektif, anti inflamatuvar, antialerjik, antiviral olmak üzere pek çok etkisi ortaya konulmuştur (24–30). Ganoderma Lucidum polisakkaritlerinin, antioksidan özellik göstererek miyokardiyal ultrayapıyı iyileştirdiği ve kardiyomiyositlerin apoptozisini azalttığı da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (31,32).

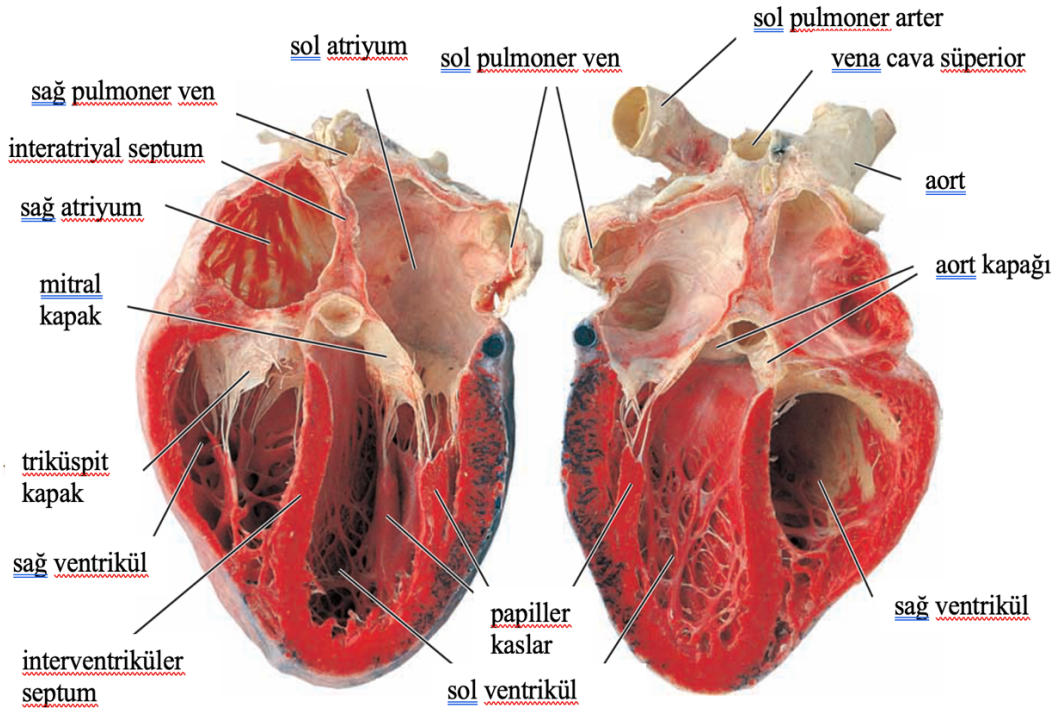
Hiperbarik oksijen tedavisine ulaşımın zor olması, tedavinin maliyeti ve karbonmonoksit zehirlenmesine bağlı kardiyotoksisitede etkinliğinin literatürlerde kesin olarak ortaya konulamaması nedeniyle yeni tedavi arayışları gündeme gelmiştir. Bu çalışmada özellikle kolay ulaşılabilir ve düşük maliyete sahip Ganoderma lucidum ekstraktı uygulamasının; literatürde kardiyoprotektif özelliğinin tanımlanması ile karbonmonoksit zehirlenmesinin sebep olduğu kardiyotoksisite üzerindeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda, şiddetli akut karbonmonoksit zehirlenmesi modelinde kalp dokusunda fibrozis, hücresel hasar, oksidatif hasar ve hücre ölümüne (apoptozisine) Ganoderma Lucidum'un etkileri histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle ortaya konulmaktadır. Ganoderma Lucidum ekstraktı; kardiyoprotektif etkisinin deneysel çalışmalar aracılığıyla doğrulanması ile klinik kullanıma sahip umut verici yeni bir bitkisel ajan ve karbonmonoksit zehirlenmesinde kullanılabilecek bir antidot olarak önerilebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KALP DOKUSU ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Kalp, toraks boşluğunun yaklaşık olarak 2/3 sol tarafında yer alan ve orta mediastende oblik olarak uzanan; devamlı ve ritmik olarak kasılma özelliğine sahip bir organdır. Sağ, sol atriyumlar ve sağ, sol ventriküller olarak toplamda 4 adet boşluk (Resim 1) içermektedir (33). Ventrikül ve atriyumların çıkışında sadece çıkış kapısı görevi görmeyen aynı zamanda kanın geri akışını da önleyen kalp kapakları (valfler) yer almaktadır. Bu kapaklar yarım ay kapakları ve atriyoventriküler kapaklardır. Yarım ay kapakları olarak bilinen kapaklar; aortu sol ventrikülden ayıran aort kapağı ve pulmoner arteri sağ ventrikülden ayıran pulmoner kapaktır. Atriyoventriküler (AV) kapaklar ise; triküspit ve mitral kapaklardır (34). Kalbin sağ tarafı pulmoner dolaşıma; sol tarafı ise sistemik dolaşıma kanı pompalamakla görevlidir. Kalbin sağ ve sol tarafını birbirinden ayıran yapılar ise interatriyal septum ve interventriküler septumdur (33).

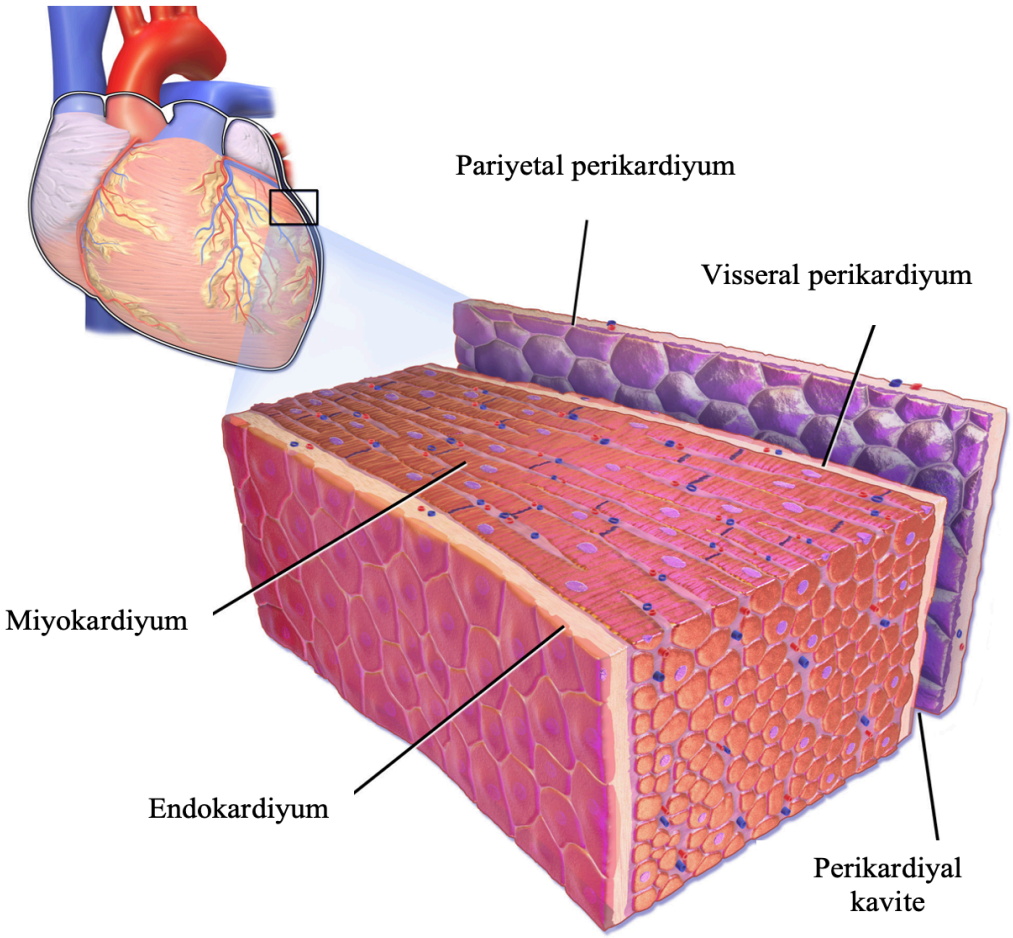


Resim 1. Kalbin anatomisi (33)

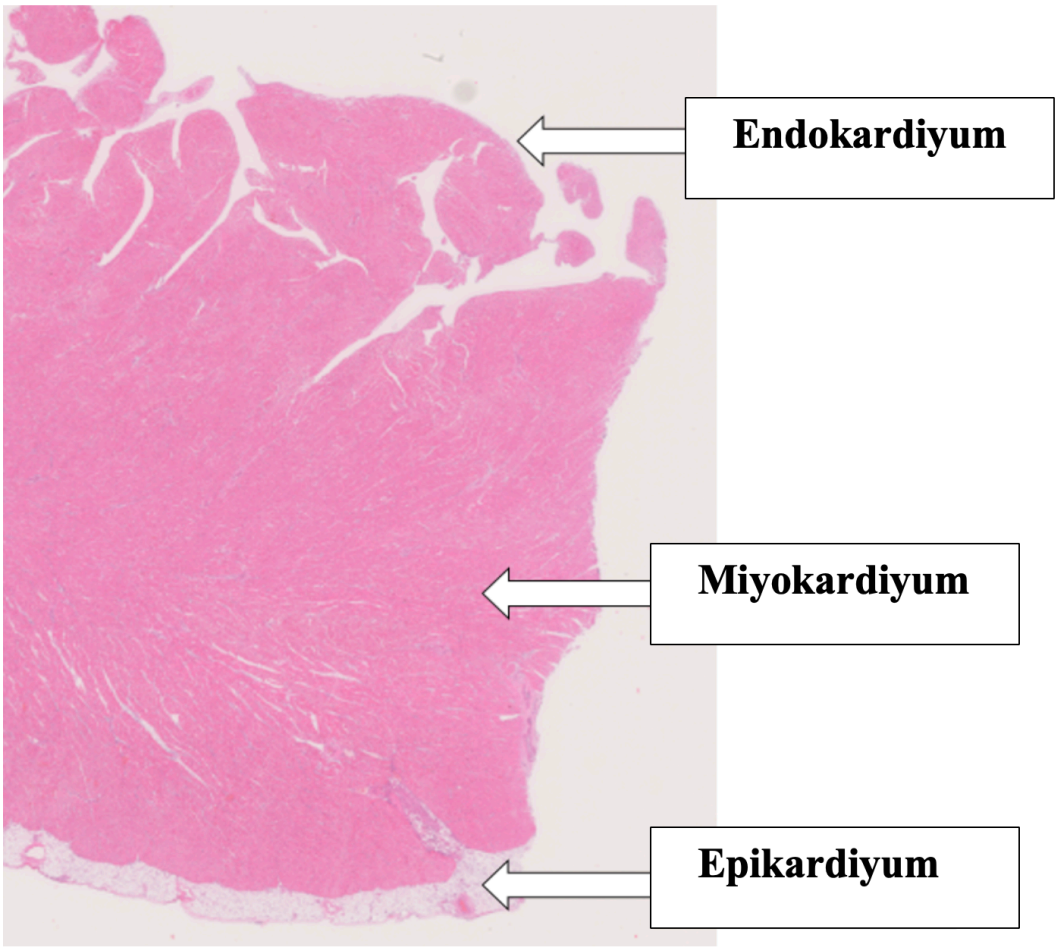
Kalp fonksiyonel olarak 3 bölümden meydana gelir. Birincisi kanın pompalanma fonksiyonunu sağlayan kalp kasıdır. İkincisi kalp kapakları ve bu kapakların tutunduğu fibröz iskelet olarak da isimlendirilen bağ dokusundan oluşan (fibröz) bölgedir. Üçüncüsü ise özelleşmiş kalp kası hücrelerinden oluşan impuls (uyarı) iletici sistemdir (35).

2.1.1. Kalp Kası (Duvarı)

Kalbin duvarı; içte endokardiyum, ortada miyokardiyum ve en dışta epikardiyum (seröz perikardiyumun visseral tabakası) olmak üzere 3 tabakalıdır (Resim 2-3-4-5):



Resim 2. Kalp duvarı tabakaları (36)

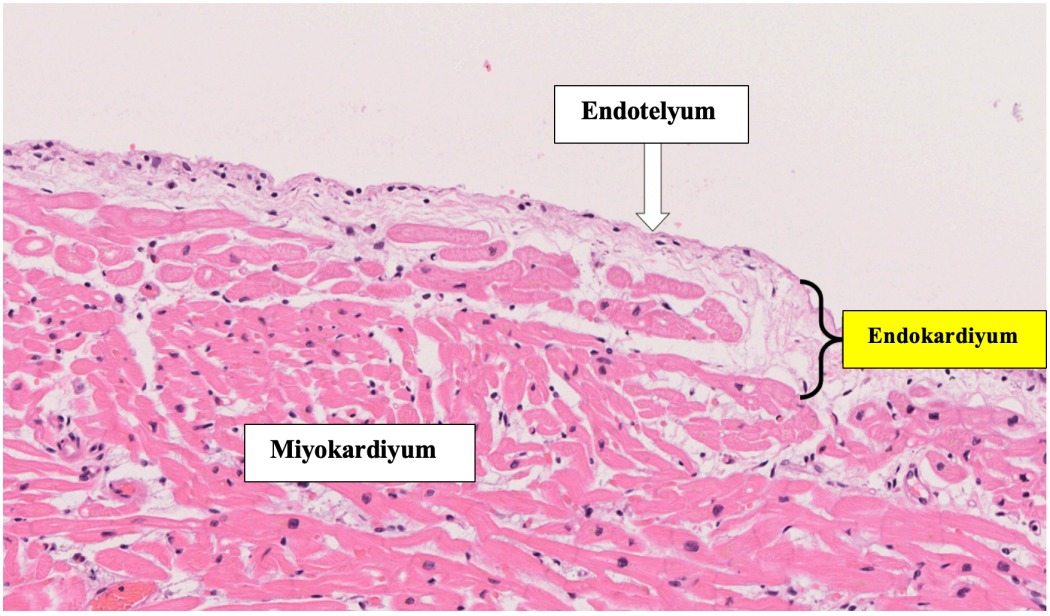


Resim 3. Kalp duvarı tabakalarının histolojisi – H&E boyama (37)

Endokardiyum, kan damarlarının intima tabakası ile aynı yapıyı göstermektedir (38). Endokardiyum da kendi içinde 3 tabakadan meydana gelir. En içte tek katlı yassı endotel tabakası bulunmaktadır. Onun altında düz kas hücreleri ve kollajenden meydana gelen bağ dokusu tabakası olan subendotel, subendotelin altında ise gevşek bağ dokusu tabakası olan ve vasküler yapıları, sinirleri ve özelleşmiş uyarı iletici sistemi içinde bulunduran subendokardiyal tabaka yer almaktadır (35).

Miyokardiyum, kan damarlarının tunika mediya tabakasına karşılık gelmektedir ve kalbin en kalın tabakasıdır (Resim 4). Esas olarak çizgili kalp kası liflerinden (miyofibriller) meydana gelir. Kalp kası histolojik olarak özel bir çizgili kas tipine sahiptir. Hem çizgili kas gibi hızlı hem de düz kas gibi sürekli ve uzun süreli

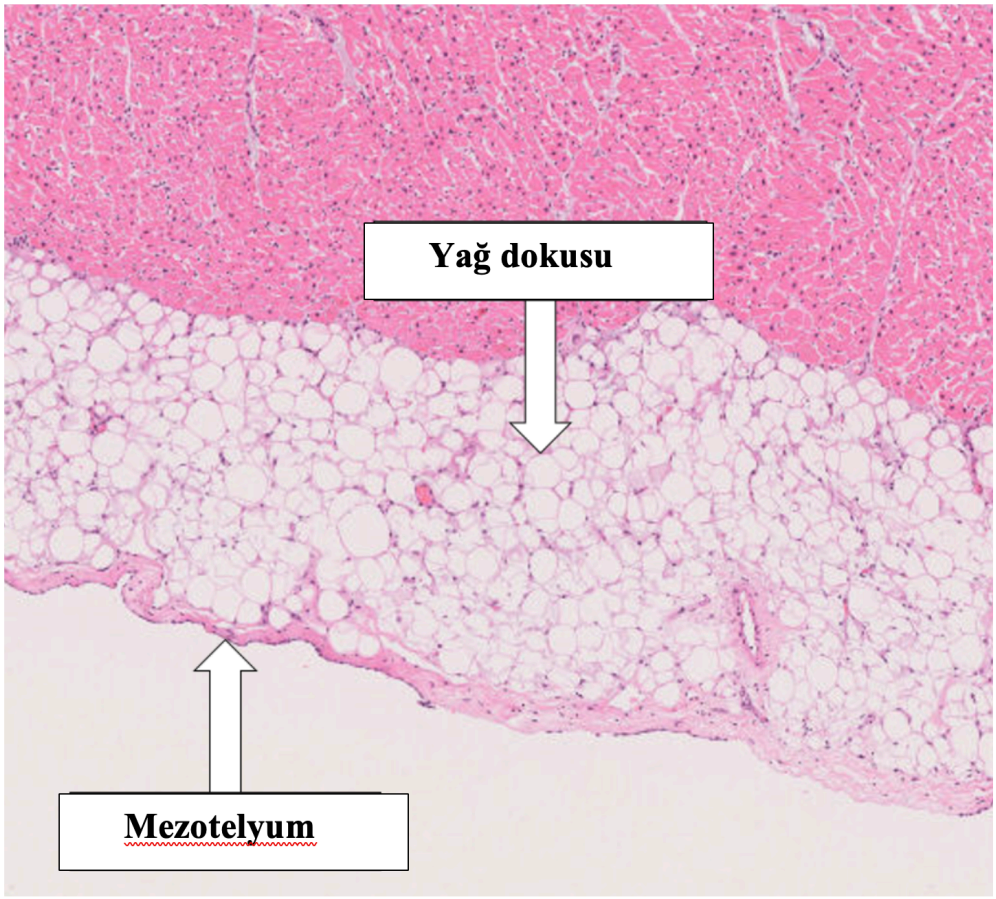
kontraksiyon yapabilir (35). Kalp kası lifleri aynı zamanda rutin histolojik preparatlarda da çizgili kaslar gibi enine çizgilenme gösterir. Bununla birlikte kalp kası hücreleri arasında diskus interkalaris (interkalar disk) de denilen özel bağlantı birimleri yer almaktadır (Resim 6). Kalp kası hücrelerinden bazıları bu diskler aracılığıyla bir veya daha fazla hücreyle bağlantı kurarak dallı lifleri meydana getirir (33). Kardiyomiyositlerin ayrıntılı yapısı transmisyon elektron mikroskobu ile açıkça görülebilmektedir (34). Kalp kası hücrelerinin sitoplazması büyük oranda miyofibrillerle kaplıdır (35). Nükleusu ise iskelet kası liflerinden farklı olarak merkezi yerleşimlidir (33). Kalp kası hücreleri organel bakımından zengindir. Bol kristalı, büyük mitokondriyonları ve iskelet kasındakiler kadar iyi gelişmemiş sarkoplazmik retikulumları içermektedir. Bununla birlikte kalp kasının enerji kaynağının önemli bir kısmını oluşturan glikojen de bulundurmaktadırlar (35). Kardiyomiyositlerin yoğun endomisyumu ve T-tübüller de (Z-çizgilerinde bulunur) elektron mikroskobunda seçilebilen (Resim 7-8) yapılar arasındadır (34).



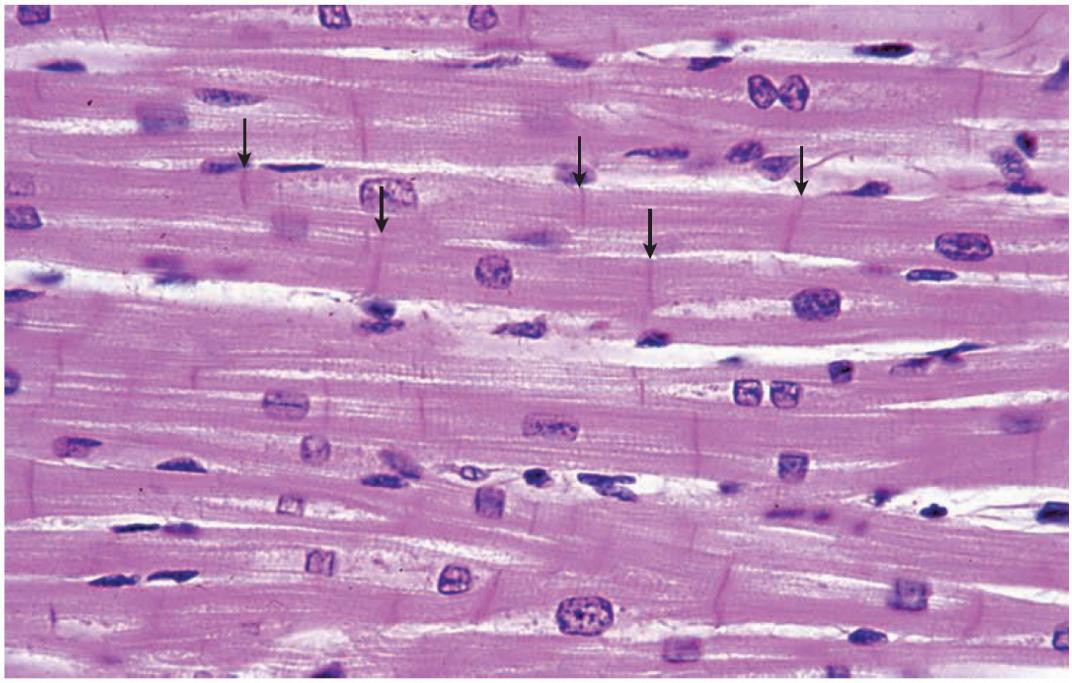
Resim 4. Kalp duvarının endokardiyum ve miyokardiyum tabakalarının histolojisi – H&E boyama (37)

Epikardiyum, kalbin dış yüzeyine yapışık halde bulunan bağ dokusu tabakasıdır (33) (Resim 5). Kalbi aslında perikard olarak bilinen çift katmanlı, sağlam fibröz bir kese çevreler (34). Perikardiyum; iç kısımda seröz perikardiyum, dış kısımda

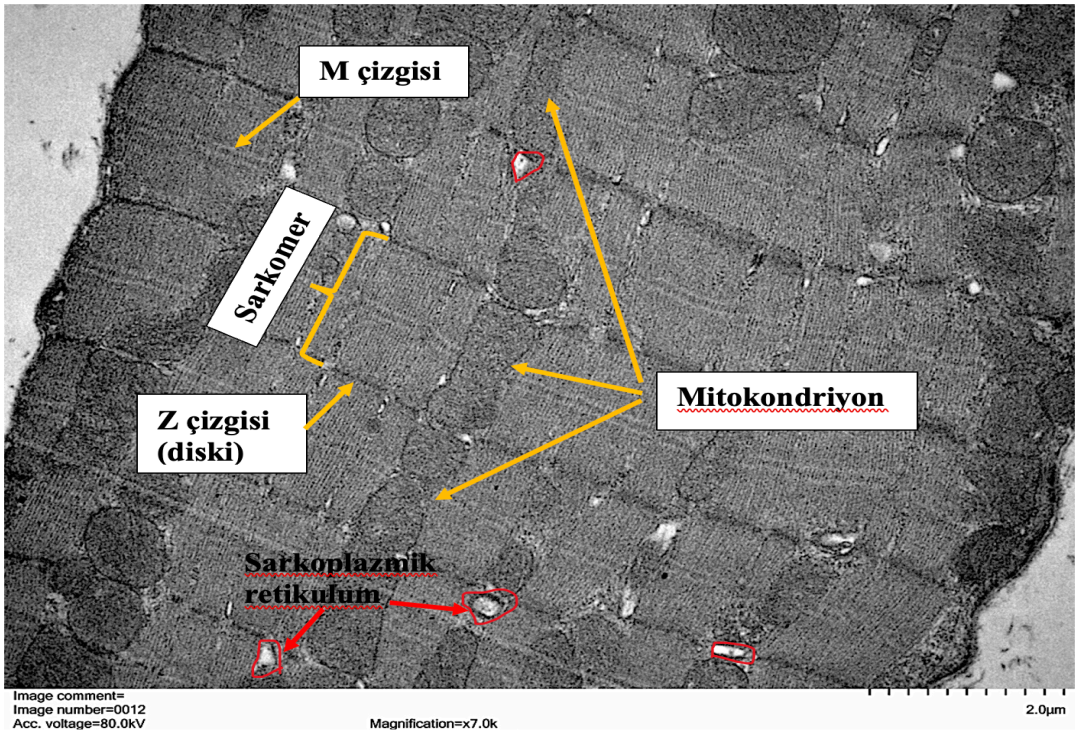
daha yoğun bağ dokusu yapısında fibröz perikardiyum denen iki tabakadan meydana gelmektedir. Seröz perikardiyumun da visseral ve pariyetal olmak üzere iki tabakası bulunur. Seröz perikardiyumun bu visseral tabakasına epikardiyum denilmektedir (35). Epikardiyum; tek katlı epitel olan mezotel, bunun altındaki ince fibroelastik bağ dokusu ve içerisinde kan damarlarını, sinirleri, yağ hücrelerini barındıran kalın subepikardiyal tabakadan meydana gelmektedir (35). Seröz perikardiyumun visseral ve pariyetal tabakaları arasında 15-50 ml kadar perikardiyal (seröz) sıvı bulunduran ve perikardiyal kavite olarak adlandırılan bir alan bulunur. Bu boşlukta bulunan perikardiyal sıvı kalbin hareketine olanak sağlar (33,35).



Resim 5. Kalp duvarı epikardiyum tabakasının histolojisi (37)

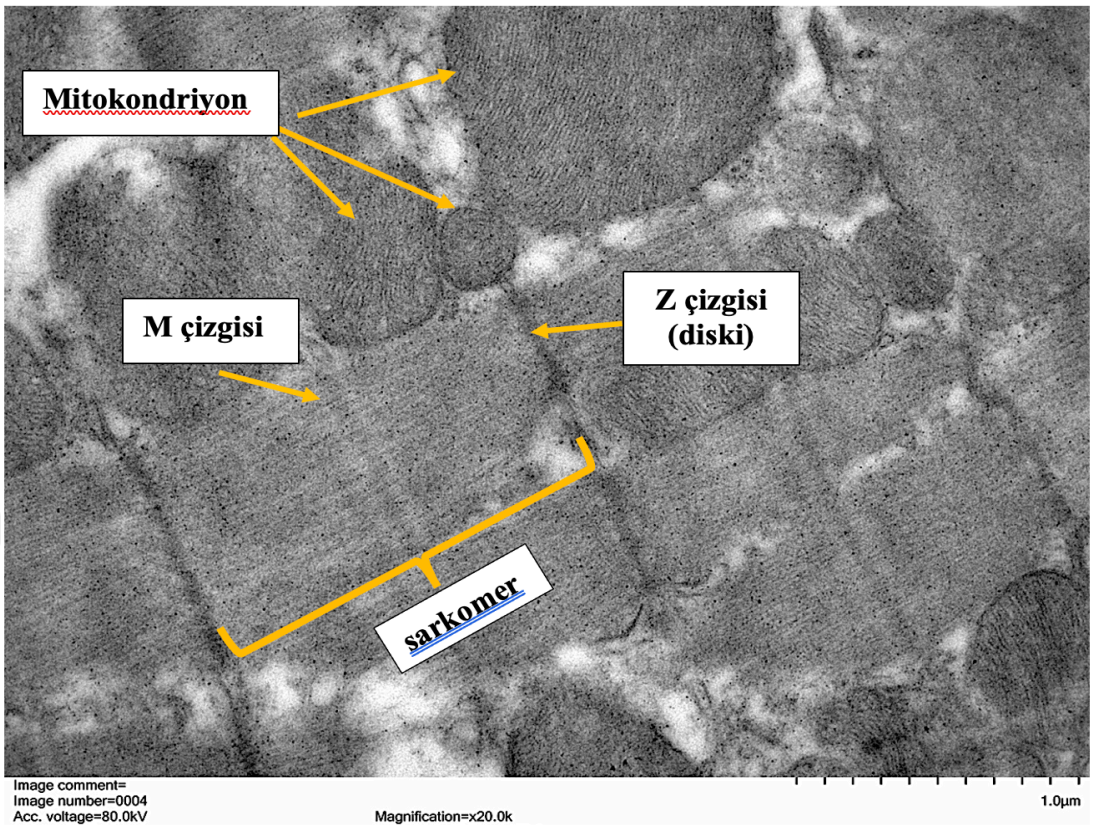


Resim 6. Kalp kası liflerinin longitudinal kesiti. Oklar diskus interkalarisleri göstermektedir (X360 H&E) (33).



Resim 7. Bir kalp kası lifi (kardiyomiyosit) sitoplazmasında bulunan sarkomer ve organellerin transmisyon elektron mikrografı (X7k).

(Fare kalp dokusu- Tez çalışmama ait orijinal mikrograflardır.)



Resim 8. Bir kalp kası lifi (kardiyomiyosit) sitoplazmasında bulunan sarkomer ve organellerin transmisyon elektron mikrografı (X20k).
(Fare kalp dokusu- Tez çalışmama ait orijinal mikrograflardır.)

2.1.2. Kalp Kapakları ve Fibröz İskelet

Kalpte kan akımının tek yönlü iletilmesini sağlayan 4 adet kapak yer almaktadır. Bunlar atriyumlar ve ventriküller arasında bulunan iki atriyoventriküler kapak (mitral ve triküspit kapaklar) ; ventriküllerle büyük arterler arasında bulunan semilunar (aortik ve pulmoner) kapaklardır (39). Kapaklar histolojik olarak 3 tabakadan meydana gelir. Bu tabakalar kapakların üst yüzeyinden alt yüzeyine doğru sırasıyla:

Spongiyoza: Mitral ve triküspit kapaklarda (bu kapaklarda en üst yüzeydeki tabakaya aurikularis de denilmektedir.) atriyum tarafına; aorta ve pulmoner kapaklarda ise kan damarına bakan kısmı oluşturur. Bu tabaka zengin proteoglikan ve bunların arasında daha az miktarda yerleşik kollajen ve elastik lif içeriğine sahip gevşek bağ dokusu

yapısındadır (35). Spongioza tabakası kalp kapaklarına esneklik sağlamakta ve kapak üzerine binen kuvvetlerin absorbe edilmesine yardımcı olur (39).

Fibroza: Kapakların orta kısmını oluşturan, yoğun, düzensiz bağ dokusu yapısındaki tabakadır (35). Fibroza tabakası kalp kapaklarının yapısal bütünlüğünün sağlayan tabakadır ve kapakların ucuna kadar uzanmaktadır (39).

Ventrikülaris: Kapakların ventriküllere bakan yüzünü oluşturur ve esas olarak elastik liflerden meydana gelmektedir. Endotel ile döşeli olan bu tabaka atriyoventriküler kapaklarda korda tendinealar ile devam eder. Semilunar kapaklarda ise ventrikülaris tabakası ventriküler endokardiyumun devamı niteliğindedir (39).

Kalp kapakları yoğun, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındaki fibröz iskelete tutunur (35). Aynı zamanda bu iskelet, atriyum ve ventriküllerin miyokardiyumları için tutunma bölgesi sağlamakta ve atriyum-ventrikül arasında elektrik izolatörü olarak görev görür. Kapak yaprakları normalde avasküler yapılar olup temas halinde oldukları kandan beslenmelerini sağlarlar. Kapak tabanları ise kan damarı ve düz kas içerebilmektedir (33). Fibröz iskeleti meydana getiren yapılar:

Fibröz halka: Atriyoventriküler kapakları ve aorta ile pulmoner trunkus tabanını saran düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan dört adet halkadır. Kalp kapağı yaprakları için tutunma alanı oluştururlar (33).

Fibröz trigon: Fibröz halkaları bağlayan iki adet üçgen şekilli alanlardır.

Septumların membranöz bölümleri: İnterventriküler ve interatriyal septumların membranöz kısımları fibröz iskeletin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. İnterventriküler septumun membranöz bölümü kalp kasından yoksun olup fibröz bağ dokusu yapısındadır. Diğer kısımlar ise endokardiyum ile döşeli olup kas dokusundan meydana gelir (33,35).

2.1.3. Kalbin Uyarı İletici Sistemi

Kalbin normal işlevini kendi başına yerine getirebilmesi için belirli bir düzende ritmik olarak kasılması gereklidir. Bu kasılmayı oluşturan ve ileten elektriksel ileti sistemi, özelleşmiş kalp kası hücrelerince gerçekleştirilmektedir (39). Bu sistemin elemanları sinoatriyal düğüm (nod), atriyoventriküler düğüm (nod) ve his demetidir (35). Elektriksel uyarı ilk olarak sağ atriyumda yer alan sinoatriyal (SA) nodda meydana gelmektedir. Bu bölge aynı zamanda kalp ritmini de belirleyen bölge

özelliğini taşır. SA nodda oluşturulan elektriksel impulslar yine atriyumda bulunan atriyoventriküler (AV) noda iletilir. Buradan His (atriyoventriküler) demetine ulaşan uyarılar fibröz iskeleti kat ederek ventriküllere ulaşmakta sonrasında ise sağ ve sol dallara ayrılarak subendokardiyal bölgede yer alan Purkinje lifleri ile devam etmektedir (39).

Sinoatriyal (SA) Nod: Sağ atriyumun vena cava superior ile birleştiği yerde subepikardiyal bölgede yer alır. Bu bölge depolarizasyon hızı en yüksek bölge olduğu için kalbin pacemakerı olarak da isimlendirilmektedir (33). Burada yer alan özelleşmiş nodal hücreler, atriyal hücreler göre daha küçük çapta olup daha az miyofibril içerirler. Nodal hücreler arasında diskus interkalaris bulunmamaktadır (35).

Atriyoventriküler (AV) Nod: AV nodda da SA noddaki hücrelere benzer şekilde küçük çaplı, özelleşmiş hücreler bulunur (35). AV nodda, nodal hücreler arasında bulunan gap junctionların yapısal özelliklerine bağlı olarak elektriksel uyarı yavaş iletilmektedir (39).

His Demeti (Atriyoventriküler Demet): Elektriksel uyarı, subendokardiyal tabakada bulunan Purkinje lifleri aracılığıyla kalp kası hücrelerine ulaştırılır. Purkinje lifleri, ventriküler kalp kası hücrelerinden daha büyük boyutlu, daha büyük nükleuslu, daha bol sitoplazmalı ve soluk renkte boyanan özelleşmiş kalp kası hücreleridir (39). Bu hücreler mitokondriyon ve glikojen bakımından zengin hücrelerdir. Purkinje lifleri glikojence zengin oldukları için PAS+ boyanma özelliği göstermekte ve hipoksiye karşı da dirençli hücreler olarak bilinmektedir (35).

2.2. KALBİN EMBRİYOLOJİSİ

Embriyolojik gelişimin 3. haftasına kadar embriyo besin ihtiyacını endometriyum damarlarından difüzyon yoluyla sağlamaktadır. Ancak 3.haftanın ortalarında ihtiyacı olan bu gereksinimleri karşılamada bu yöntem yetersiz kalır. Bu dönemde artık kardiyovasküler sistem (dolaşım sistemi) gelişimi başlayarak embriyonun büyüme ve gelişimi bu sistemle devam ettirilir. İntrauterin yaşamın 3. haftasının sonunda (21. Gün) embriyonun kalp atışları başlar ve 4. haftasında da (27-29.gün) kan akımı izlenebilir hale gelir (40).

Kardiyovasküler sistem de diğer sistemler gibi embriyonun epiblast tabakasından köken almaktadır (41). Kalbin gelişimi 4 ana başlık altında toplanabilir:

Kardiyojenik Alan ve Kalp Tüpünün Oluşumu:

Epiblast tabakasından köken alan kardiyak progenitör hücreler primitif çizginin lateralinden ilerleyerek kalbin gelişeceği alana varır. Kardiyak mezoderm de denilen splanknik mezoderm alanı bu dönemde orofaringeal membranın önünde yer almaktadır (41).

Kardiyak progenitör hücrelerden ilk göç eden hücreler kalbin kraniyal katmanlarını oluşturur. Daha sonra ise sağ ventrikül, sol ventrikül ve sinüs venozus gibi kalbin daha kaudal parçalarını meydana getirecek olan hücreler göç eder (42).
Öncü hücreler, gelişimin geç presomit evresinde (18. Gün civarında) alttaki faringeal endoderm aracılığıyla miyoblastlara dönüşme yönünde uyarılırlar (41). Bu esnada mezoderm içerisinde oluşan kan adacıklarından da vaskülogenez ile kan hücreleri ve kan damarları belirmeye başlamaktadır. Zaman içerisinde bu hücreler bir araya gelerek iç yüzü endotelle döşeli, dışı miyoblastlarca sarılmış bir tüp oluşturmaktadır. Bu yapıya **kalp tüpü**, bu bölgeye ise genel olarak **kardiyojenik bölge** denir (42).

Kardiyojenik bölgeler başlangıçta orofaringeal membranın önünde yer alır. İlerleyen dönemde beyin veziküllerinin gelişimi (beynin büyümesi) ve embriyonun kraniyo-kaudal olarak katlanması ile önce servikal bölgeye, sonra ise torakal bölgeye yer değiştirir. 22. Günde ise lateral katlanma ile birbirlerine yaklaşıp birleşerek orta hatta tek bir kalp tüpü meydana getirmektedir. 23. Gün civarında kalbin bölümleri kraniyalden kaudale doğru; trunkus arteriyozus, bulbus kordis, ventrikül ve atriyumdur (41). Kalp tüpü nihayetinde 3 tabakadan oluşur; endoteli oluşturan endokard, düz kas duvarı oluşturan miyokard ve tüpün en dış kısmını saran epikard tabakasıdır. Endokard

ve miyokard tabakaları kardiyojenik alanı oluşturan mezodermal hücreler tarafından geliştirilmektedir. Başlangıçta endotel ve miyokard tabakalarından oluşan kalp tüpü, zamanla bu tabakalar arasında hyalüronik asitten zengin (kardiyak jöle) bir maddenin birikmesiyle kalınlaşır. Epikard ise sinüs venozus alanındaki mezotelyal hücrelerin göç ederek kalbin yüzeyine yayılmasıyla meydana gelir. Büyük damarların çevresindeki mezotelyal hücreler de epikard oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Koroner arterlerin gelişiminden (endotel ve düz kas tabakası dahil) epikard sorumludur (6,8).

Kalp Halkasının Oluşumu:

23. gün civarında bükülmeye başlayan kalp tüpünün sefalik parçası ventrale, kaudale ve sağa doğru bükülme gösterir. Kaudal parçası ise dorsokraniale ve sola doğru yer değiştirir. Yaklaşık 28. günde tamamlanan bu süreç sonucunda **kardiyak halka** adı verilen yapı ortaya çıkar (43).

Kalp tüpündeki kıvrılma sonucunda atriyum ve ventrikül bölgelerinde genişlemeler meydana gelir. Atriyum kalp halkasının oluşumu ile perikardiyal boşluğun içine dahil olarak trunkus arteriyozus seviyesine yükselmektedir. Atriyoventriküler bileşke daralarak atriyoventriküler kanalı oluşturmaktadır. Ventrikül ile bulbus cordisin birleşim bölgeleri de daralarak bulboventriküler sulkusa dönüşür (41). Bu süreçte primitif ventrikül primitif sol ventrikülü, bulbus kordisin proksimal kısmı ise primitif sağ ventrikülü meydana getirmektedir. Sonrasında primitif sol ventrikülden sol ventrikül, bulbus kordisten sağ ventrikül gelişir. Sağ atriyum ise sağ sinus boynuzundan, sol atriyum pulmoner venlerden köken alır (41).

Kalp Septumlarının Gelişimi:

Birinci ayın sonlarına dek kalp tek bir boşluk halinde bulunmaktadır (41). Kalbin ana septumları 27.-37. günler arasında yani embriyonun boyunun 5 milimetreden 17 milimetreye çıktığı dönemde gelişir (43). Septum ve kapakların gelişiminin ilk aşaması, endokardiyal yastık adı verilen yapıların oluşumu ile başlamaktadır. Endokardiyal yastıklar, endotelyal hücrelerin atriyoventriküler ve konotrunkal bölgelerde mezenkimal hücrelere dönüşerek kardiyak jöleye göç etmesiyle meydana gelmektedir (41). Bu yastıkların birleşmesi ile sağ ve sol atriyoventriküler delikçikler oluşur.

Septum primum sağ ve sol atriyumu ayırmaktadır (42). Septum primumun gelişimi intauterin 4. haftanın sonunda atriyum tavanında bir çıkıntı oluşumuyla başlar. Septum primumun büyümesi atriyoventriküler endokardiyal yastıklara doğru olmaktadır. Büyüme tamamlanmadan önce bu bölgede **osteum primum** denilen sağ atriyumdan sol atriyuma kanın geçmesine izin veren bir delik şekillenmektedir (41). Osteum primumun kapanmasından önce, septum primumun üst kısmında ikincil bir açıklık olan **osteum sekundum** oluşur. Sağ atriyum genişleyince septum primumun yanında ona paralel şekilde yer alan daha kalın **septum sekundum** gelişir (41,43). Septum sekundum zaman içerisinde büyüyerek endokardiyal yastıklar ile birleşse de arada foramen ovale adı verilen bir açıklık bırakır. Bu açıklığın da işlevi sağ atriyuma gelen kanın sol atriyuma geçişini sağlamaktır (42). Doğumla birlikte sol atriyum basıncı artmakta bu da septum primum ile septum sekundumun birleşmesini sağlamaktadır. Bu birleşme ile interatriyal septum meydana gelerek foramen ovalenin kapanması gerçekleşmektedir. Foramen ovalenin tam olarak kapanması doğumdan sonraki birkaç hafta içerisinde olur (42). %20-30 oranında tam kapanmanın olmadığı da gözlenmektedir (41).

Kalp Kapaklarının Gelişimi:

Atriyoventriküler kapakların oluşumu embriyonun 5-8. haftasında meydana gelir. Endokardiyal yastık hücreleri çoğalıp farklılaşarak atriyoventriküler kanal bölgesinde kapakların oluşumunu başlatmaktadır. Bu alana uzanan epikardiyuma ait bağ dokusunun da desteğiyle atriyoventriküler kapaklar gelişmektedir (41). Semilunar kapakların oluşumu 5-9. haftalarda gerçekleşir (41). Semilunar kapaklar konotrunkal septum oluşurken aort ve trunkus pulmonaris açıklıklarının evresindeki subendokardiyal dokudan gelişir. Başlangıçta karşılıklı 2 çıkıntı şeklinde beliren bu yapıların çukurlaşıp yeniden şekillenmesiyle ince duvarlı semilunar kapaklar meydana gelir (42). Semilunar kapakların oluşumunda nöral krista hücrelerinin de rol oynadığı düşünülmektedir (43).

2.3. KABONMONOKSİT GAZI

Karbonmonoksit (CO), odun, kömür, doğalgaz gibi organik yakıtların tam olarak yanmaması sonucu ortaya çıkan kokusuz, renksiz, tatsız, tahriş edici olmayan bir gazdır. Bu özelliklerinden dolayı 'sessiz katil' olarak da bilinmektedir (44). Karbonmonoksiti ilk kez 1776 yılında Fransız bir kimyager olan Lassone, toz halindeki çinko oksit karışımını karbon ile ısıtarak ortaya çıkarmıştır. Karbonmonoksitin; karbon ve oksijenden meydana gelen kimyasal bir bileşik olarak tanımlanması ise 1800 yılında William Cruikshank tarafından gerçekleşmiştir (45). Torgny Sjöstrand da ilk defa 1949 yılında karbonmonoksitin endojen olarak da üretildiğini bildirmiştir (46).

En sık karşılaşılan ekzojen karbonmonoksit kaynakları; evlerde ısınma amacı ile kullanılan odun, kömür, doğalgaz gibi organik karbon içeren yakıtların tam yanmaması, motorlu taşıtların egzoz gazları, yangınlar, endüstriyel yakıtlar olarak bildirilmektedir. Sigara da önemli bir CO kaynağıdır. Sigara içen kişilerde CO seviyesi %10'a kadar çıkabilmektedir (44,47). Ayrıca nadiren toksik etki gösterse de endojen karbonmonoksit kaynakları (hemolitik anemi, sepsis vb.) da tanımlanmaktadır (13,14,15). Endojen CO, hemeoksijenaz (HO) enzimi ile heme proteinlerinin oksidatif reaksiyonundan elde edilir (51). Hemoglobinin normal yıkımında, heme proteininin porfirin halkası HO ile kırılır. HO, endoplazmik retikulum üzerinde NADPH-flavoprotein redüktaz ve biliverdin redüktaz ile birlikte yer alır. Burada heme proteini HO enzimi tarafından biliverdin, demir ve CO'ya (O_2 ve NADPH'ya bağımlı) yıkılır. Sonrasında biliverdin, biliverdin redüktaz ile bilirubine ayrılır (52,53).

2.4. KARBONMONOKSİT ZEHİRLENMESİ

2.4.1. Tarihçe

CO'nun intihar yöntemi olarak kullanılması, kayıtlı belgelere göre M.Ö 100 yılına dayanır. Ölüm mekanizması ise çok sonraları ortaya konulabilmiştir (54).

CO'nun ilk ortaya çıkışı 1776'da Fransız kimyager Lassone tarafından olmuş daha sonra Lassone bu maddeyi yanlışlıkla mavi alevle yandığı için hidrojen olarak tanımlamıştır. İskoç bir kimyager olan Cruikshank 1800'de bu gazın karbon ve oksijen içerdiğini tanımlamıştır (55,56). Claude Bernard 1846 yılında deneyinde ilk kez köpekleri CO ile zehirleyerek CO'nun kanda renk değişimine yol açtığını, 1857 yılında ise hipoksiye sebep olduğunu göstermiştir (57,58). CO toksisitesinin mekanizmasını ilk kez ortaya koyan ise 1895 yılında Haldane olmuştur (59). 1929 yılında Sendroy ve ark. CO'nun hemoglobine affinitesinin oksijene oranla 210 kat daha fazla olduğunu göstermiştir (58). 1976 yılında Goldbaum ve ark., Haldane'in hipoksi teorisini destekleyen çalışmalarıyla CO toksisitesinin hücresel düzeyde olduğunu ortaya koymuştur (60).

2.4.2. Epidemiyoloji

CO, dünya genelinde zehirlenmeye bağlı mortalite ve morbiditenin en yaygın nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (26,27). Karbonmonoksit zehirlenmesi kasıtlı olarak, kaza ile ya da çevresel maruziyet sonucu meydana gelebilir. ABD'de yapılan bir çalışmada bir yılda acil servise başvuran hastalardan ortalama 50.000 kişinin karbonmonoksit zehirlenmesi nedeni ile başvurduğu belirtilmektedir (61).

Türkiye'de 2010 yılında yapılmış bir çalışma ise 10.154 kişinin karbonmonoksit zehirlenmesi geçirdiğini ve bunların 39'unun yaşamını yitirdiğini göstermektedir. Aynı çalışmada CO zehirlenmesi sıklığının toplumda 0.0137 ve ölüm oranının ise yaklaşık olarak on milyonda 5 kişi olduğu tespit edilmiştir (62). 2019 yılında yayınlanan verilere göre 2008-2018 yılları arasında ülkemizde karbonmonoksit zehirlenmesine bağlı ölen kişi sayısı 2667 olarak bildirilmiştir (63).

Ülkemizde özellikle kış aylarında, havalandırması yetersiz küçük alanlar, bacasız soba, mangal, şofben ve kombi kullanımı karbonmonoksit zehirlenmelerine zemin hazırlar (64). CO ile intihar vakaları ise çok daha nadir görülmektedir (65). Ülkemiz ile kıyaslandığında gelişmiş ülkelerde sanayi ve egzoz gazına bağlı CO

zehirlenmeleri ve intihar amaçlı CO maruziyeti sonucu ölüm vakaları daha sık görülür (62).

2.4.3. Patofizyoloji

CO vücutta pek çok sistemi etkilemesine rağmen metabolik aktiviteleri ve oksijen gereksinimleri fazla olduğu için kalp ve beyin zehirlenmeye çok daha fazla duyarlıdır. Bu yüzden CO zehirlenmesinde nörolojik ve kardiyovasküler tutulum önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir (6).

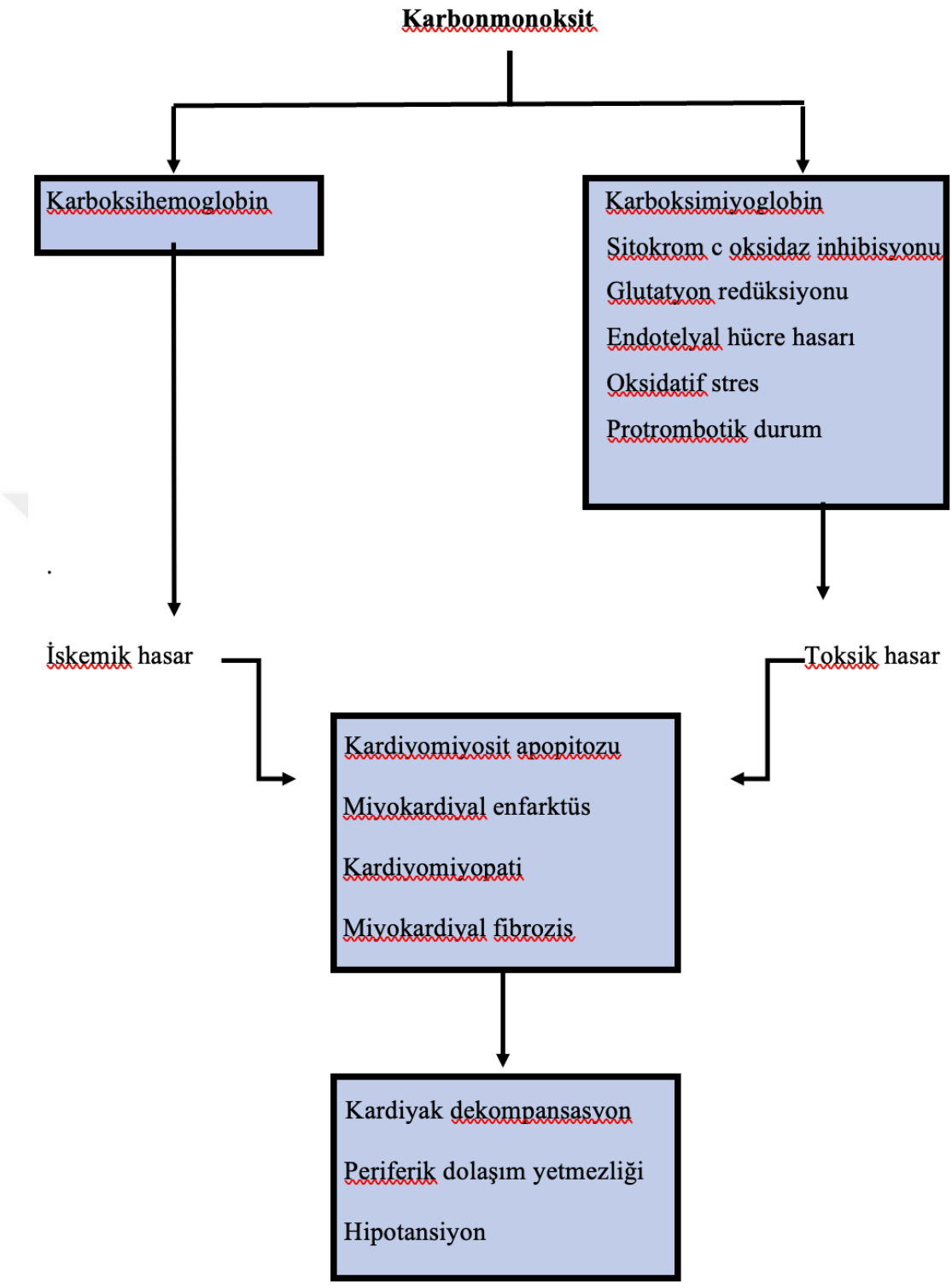
CO inhalasyon yolu ile alınarak hızlı bir şekilde kan dolaşımına geçmektedir. CO'nun hemoglobine afinitesi oksijene göre 230-270 kat daha fazla olduğundan hemoglobinin bağlanma bölgeleri için oksijenle yarışır. Bu durum oksijen disosiyasyon eğrisinin sola kaymasına sebep olarak dokulara oksijen sağlanmasını zorlaştırmakta ve değişen derecelerde hipoksi meydana getirmektedir (44,66). Kişide kandaki oksijen miktarının azalması ve dokulara oksijen salınımının bozulması durumu 'kimyasal anemi' ya da 'anemi benzeri etki' olarak isimlendirilir (47),(67). Absorbe edilen CO'nun %90'ı hemoglobine, %10'u miyoglobin ve sitokrom c oksidaza bağlanırken yaklaşık %1'lik kısmı ise karbondioksite (CO_2) dönüşür (68).

CO zehirlenmesinin iki ana mekanizma yoluyla kardiyomiyosit apoptozisine neden olduğu düşünülmektedir; birincisi elektron zincirindeki sitokrom C oksidaza bağlanarak hücresel düzeyde asfiksiye yol açması, ikincisi ise nötrofillerin degranülasyonunu indükleyerek ve böylece miyeloperoksidazın dolaşım seviyelerini ve reaktif oksijen türlerini artırarak oksidatif strese neden olmasıdır (10).

CO zehirlenmesinin patofizyolojisinin temelini oluşturan; CO'nun hemoglobinin yanı sıra miyoglobin, nitrik oksit sentetaz, sitokrom c oksidaz gibi hem proteinlerine bağlanması ve doğrudan hücresel hasara neden olmasıdır (9) (Şekil 1).

CO, oksijene oranla miyoglobine yaklaşık 40 kat daha fazla afinite göstermekte, bu afinite kardiyak miyoglobin için daha da yüksek değerleri bulmaktadır. Bu yüzden karboksimiyoglobin oksijen disosiyasyon eğrisinin sola kaymasına bu da oksijen alımında azalmaya (hipoksiye) neden olur (69). Vücutta oksijenin suya redüksiyonu ile ATP oluşumu mitokondriyal elektron transport zinciri reaksiyonları aracılığıyla sağlanır. Sitokrom C oksidaz da mitokondriyal elektron transport zincirinin terminal enzimidir. Nitrik oksit (NO) ve CO, sitokrom C oksidaza bağlandığında enzimin

fonksiyonu bozularak hücresel solunum engellenmekte ve doku hipoksisi gelişmektedir (6). CO ayrıca sitozolik hem ve hem oksijenaz-1 (HO-1) protein seviyelerini de artırarak inflamasyona ve hücre içi oksidatif strese yol açmaktadır. Aynı zamanda CO, miyeloperoksidaz (MPO), proteazlar ve oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin salınımını içeren trombosit aktivasyonuna ve nötrofil degranülasyonuna sebep olur. Bu durum da yoğun inflamatuar kaskad, lipid peroksidasyonu ve apoptozisle sonuçlanmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri ve NO'nun oluşturduğu bu inflamatuar kaskad, CO zehirlenmesine bağlı kardiyotoksisiteye katkıda bulunmaktadır (11),(70).



Şekil 1. Karbonmonoksit zehirlenmesinde miyokardiyal hasarın patofizyolojisi (44).

2.4.4. Klinik Belirti ve Bulgular

CO zehirlenmesinde meydana gelen hipoksiye karşı en savunmasız dokular, oksijen ihtiyacı en yüksek ve metabolik depoları en düşük dokulardır. Bunlar da başlıca beyin, serebral korteks, beyin beyaz cevheri, bazal ganglionlar ve kalptir (44). Akut CO zehirlenmesinin klinik belirtileri ve prognozu hastaneye yatış esnasındaki karboksihemoglobin düzeyi ile zayıf bir şekilde ilişkili ve oldukça da değişken bulunmuştur. Zehirlenmenin prognozu daha çok inhale edilen toksik madde miktarı ile ilişkili gibi görünmektedir (71). Karboksihemoglobin seviyeleri genellikle klinik tabloyu yansıtmasa da zehirlenmenin belirteci olarak kullanılır. İlk ortaya çıkan semptom çoğunlukla baş ağrısı olup %10 civarındaki karboksihemoglobin seviyelerinde kendini gösterir. Çok daha yüksek karboksihemoglobin seviyelerinde (%50-70) ise nöbet, koma ve ölüm görülebilmektedir (72) .

CO zehirlenmesinde en sık görülen belirti ve semptomlar şunlardır (73):

1. Baş ağrısı
2. Baş dönmesi

CO 100 ppm> ya da %0,01 hava konsantrasyonu >

3. Konfüzyon
4. Oryantasyon bozukluğu

CO 200 ppm> ya da %0,02 hava konsantrasyonu >

5. Mide bulantısı
6. Kusma
7. Yorgunluk
8. Konfüzyon
9. Oryantasyon bozukluğu
10. Görme bozukluğu
11. Senkop, koma

CO 800-12.800 ppm ya da %0,08 - %1,28 hava konsantrasyonu

CO'nun hem koroner arter hastalığı (KAH) olan hastalarda hem de sağlıklı bireylerde kardiyotoksisiteye neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (12,13). CO zehirlenmesinin neden olduğu kardiyotoksisitenin klinik belirtileri spesifik değildir (11). CO zehirlenmesinin, hafif ve geçici kardiyak hasardan nekroza kadar bir dizi değişikliğe, kontraktil disfonksiyona ve kalp hızı değişikliklerine neden olduğu 1865 yılında Klebs tarafından ortaya konulmuştur (74,44).

Literatürde incelenen otopsi örneklerinde CO zehirlenmesinin kalpte farklı patolojik bulgulara sebep olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular; dağınık ve noktasal nekrotik alanları, sol ventrikülde subendokardiyal kanamaları, papiller ve diğer kasların dejeneratif değişikliklerini ve fokal miyokardiyal nekrozu içermektedir (75). İskemi ve myokardiyal tutulum orta ve şiddetli CO zehirlenmelerinde sık olarak gözlenmekte olup mortalite için önemli bir göstergedir (6,16). CO zehirlenmesinde karşımıza çıkan kardiyovasküler problemler Tablo 1. de özetlenmiştir: (14,50,51)

Tablo 1. CO zehirlenmesinde ortaya çıkan kardiyovasküler semptom ve bulgular

Aritmiler	Anjina atağı
Pulmoner ödem	Myokardiyal fibrozis
Kalp yetmezliği	Atriyal trombüs
Myokard infarktüsü	Ventriküler disritmi
Kardiyomiyopati	Kardiyak arrest

CO zehirlenmesinde en sık ölüm nedenleri arasında ventriküler disritmilere bağlı kardiyak arrest görülmektedir (14).

2.4.5. Tanı

Akut CO zehirlenmesinde tanı büyük oranda hastanın öyküsü ve dikkatli klinik muayene ile konulabilir. Kronik CO zehirlenmesinde ise tanının konması daha zordur (9,78). Şüpheli öyküsü olan hastalarda öykü ve fizik muayenenin yanı sıra epidemiyolojik veriler, arteriyel ya da venöz kan gazından elde edilen artmış karboksihemoglobin (COHb) düzeyleri de tanıyı kesinleştirmek adına kullanılabilmektedir (79). COHb seviyelerinin yüksek çıkması tanıyı desteklese de zehirlenmenin derecesi ile tam korele olmadığı unutulmamalıdır. Aynı şekilde COHb düzeyleri, gecikmiş nörolojik sekel (GNS) hakkında da fikir verememektedir (80,81).

Karbonmonoksit zehirlenmesi olan hastalarda kalp tutulumunu değerlendirmede EKG ile birlikte rutinde çok uygun görülmese de ekokardiyografi, koroner anjiyografi ve miyokardiyal biyopsi, SPECT sintigrafisi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) tercih edilebilecek yöntemlerdir (82). Bunun yanısıra

kardiyospesifik troponinlerin değerlendirilmesi de, miyokardiyal hasarın teşhisinde kullanılabilecek bir yöntem olarak görülür (83).

2.4.6. Tedavi

Akut karbonmonoksit zehirlenmesinin mevcut literatürdeki en önemli tedavisi kontamine ortamdan izolasyon ve %100 oksijendir (84).Oksijen tedavisi %100 normobarik oksijen (NBO_2) ya da hiperbarik oksijenin (HBO_2) solutulması şeklindedir (47). NBO_2 ve HBO_2 tedavisinde amaç, oksijenin kısmi basıncının artırılarak CO'nun kandan uzaklaştırılmasını hızlandırmak, bu sayede de CO'nun hemoglobinden ayrışma oranının artırılmasını sağlamaktır (85,86,87).

NBO_2 tedavisi, CO'nun eliminasyon yarı ömrünü oda havasında 320 dakikadan 74 dakikaya düşürür (85,86). NBO_2, kolay uygulanabilirliği ve maliyetinin düşük olması sebebiyle genellikle ilk tedavi seçeneğini oluşturmakta (85,88); hasta asemptomatik olana ve karboksihemoglobin seviyeleri %5-10'un altına düşene kadar da uygulanması önerilmektedir (15,44). Bunun yanında, karbon monoksit zehirlenmesi olan hastalarda kalp tutulumu ile ilgili yapılan sınırlı randomize çalışmalar, rutin inhale oksijen tedavisinin mortalite veya ağrı giderme açısından hiçbir fayda sağlamadığını göstermektedir (18).

HBO_2 tedavisinde deniz seviyesindeki atmosferik basıncın 2–3 katı basınçta % 100 oksijen verilerek COHb'nin yarı ömrü 20 dakikaya kadar indirilebilir (89,79,90). Ayrıca HBO_2'nin, CO zehirlenmesinin neden olduğu inflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyon üzerinde de iyileştirici etki gösterdiği düşünülmektedir (47,91,92,93). HBO_2, tüm bu etkileri göz önünde bulundurulduğunda; bilinç kaybı, iskemik kardiyak değişiklikler, nörolojik bozukluklar, belirgin metabolik asidoz veya COHb'nin %25'ten yüksek olduğu durumlar dahil olmak üzere tüm ciddi akut CO zehirlenmesi vakalarında düşünülmesi gereken bir tedavi seçeneği olmaktadır (85). Bununla birlikte Amerikan Acil Hekimleri Birliği (ACEP, American College of Emergency Physicians) CO zehirlenmesi için HBO_2 tedavisini terapötik bir seçenek olarak kabul etmiş olsa da, HBO_2 kullanımını tedavide zorunlu saymamaktadır (20). Ayrıca HBO_2 tedavisinin özel bir alan gerektirmesi ve ulaşılabilirliğinin zor olması (47), tedavide kullanılacak ideal oksijen dozunun ve tedavinin etki mekanizmalarının belirsizliği bu tedavinin hala tartışmalı yönlerinin olduğunu ortaya koyar (94).

2.5. GANODERMA LUCİDUM

Dünyada bilinen yaklaşık 10.000 mantar türü bulunmaktadır ve bunlardan yaklaşık 300 tanesini tıbbi özelliklere sahip mantarlar oluşturmaktadır (21). Kültür mantarları arasında, Gonaderma Lucidum (GL), besin değerinden ziyade farmasötik değerinin ön planda olması bakımından benzersiz olduğu düşünülen bir mantar türüdür (22).

Ganoderma lucidum esas olarak Asya, Avrupa, Afrika ve Amerika gibi subtropikal ve ılıman iklim bölgelerinde yetişmekte olup (95) Çin, Japonya ve diğer Asya ülkelerinde de uzun yıllardır sağlık ve uzun ömürlülük amacıyla kullanılır. Böbrek şeklinde bir başlığı, parlak bir dış yüzeyi ve odunsu bir dokusu bulunan bu mantar büyük boyutlarda ve koyu renge sahiptir. Meyve gövdelerinin renklerine göre GL kırmızı, siyah, mavi, beyaz, sarı ve mor Reishi olarak sınıflandırılabilmekte ve en önemli sağlığı iyileştirici etkileri bulunan türü de kırmızı Reishi (GL) olarak bilinmektedir (96). GL, Ganodermataceae familyasından olmakla birlikte Çin'de bilinen adı "Ling Zhi" ; Japonya'da ise "Reishi" veya "Mannentake"dir (97). GL; Çin Farmakopesi'ne (*Chinese Pharmacopoeia*) , Amerikan Bitkisel Farmakopesi'ne (*American Herbal Pharmacopoeia)* ve Terapötik Özet'e (*Therapeutic Compendium*) dahil edilmiştir (98).

GL ile ilgili yapılan araştırmalar bu mantar türünün başta polisakkaritler ve triterpenoidler olmak üzere steroidler, yağ asitleri, amino asitler, nükleositler, proteinler ve alkaloidler de dahil 400'den fazla biyoaktif bileşik içerdiğini ortaya koyar (96). Güncel çalışmalar, GL'nin geleneksel farmakolojik aktivitelerine esas katkıda bulunan bileşiklerin; bağışıklığı güçlendirici ve yaşlanmayı geciktirici etkileri bulunan GL polisakkaritleri (GLP'ler) ve Ganoderma triterpenoidleri (GT'ler) olduğunu göstermektedir (97,98). GL ürünleri tozlar (ekstrakt), diyet takviyeleri ve çay gibi çeşitli ticari formlarda bulunmaktadır. Bu ticari formlar; miçelyum, sporlar ve meyve gövdesi dahil olmak üzere mantarın farklı kısımlarından üretilir (22).

Yapılan çok sayıda klinik ve pre-klinik çalışmalar GL'nin; antioksidan, anti-kanser, immünmodülatör, kardiyoprotektif, antiinflamatuvar, antiallerjik, antiviral pek çok etkisini ortaya koymaktadır (24–30,99). GL ekstraktı ile tedavi uygulanan nefrit modelinde inflamasyon ile ilişkili gen ekspresyonunda ve proinflamatuvar IL-21, TNF-alfa, IL-6 ve IL-7A seviyelerinde azalma tespit edilmiştir (100). Ganoderma

lucidumun antioksidan potansiyeli ile hidrojen peroksit ile oluşturulmuş sitotoksisiteye karşı hücreleri koruduğu ve reaktif oksijen türlerinin baskılanması ile miyoblastlarda DNA hasarını engellediği gösterilmiştir (101).

İn vivo çalışmalardan elde edilen verilere göre GL kalp, karaciğer, timus, dalak, gözler ve iskelet kası gibi farklı dokularda antioksidan aktivitelere sahiptir; ve kan dolaşımındaki oksidatif stres parametrelerini düzenleyerek oksidatif strese karşı korur (102). GL, antioksidatif etkilerini antioksidan enzimleri (süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-Stransferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), mitokondriyal süksinat dehidrojenaz (SDH) ve Mn-SOD artırarak ve oksidatif streste yer alan enzimleri (nitrik oksit sentaz (NOS), sitokrom P450 2E1 (CYP2E1), ksantin oksidaz (XOD) ve miyeloperoksidaz (MPO)) inhibe ederek gösterir. GL ayrıca lipid peroksidasyon seviyelerini, ileri oksidasyon protein ürünlerini (AOPP'ler) ve malondialdehit (MDA) seviyelerini önemli ölçüde azaltmaktadır (102).

Ganoderma Lucidum polisakkaritlerinin; MDA'yı azaltarak, kalp dokularında antioksidan enzimleri (GSH-Px, CAT, SOD ve NO) aktive ederek ve tip II DM sıçanlarında lipid peroksidasyonunu azaltarak miyokardiyal ultrayapıyı iyileştirdiği gözlenmiştir (31).

GL ekstraktının kardiyoprotektif etkilerinin gözlenmesi için yapılan başka bir invivo çalışmada GL ekstraktının kardiyomiyositlerin apoptozisini azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda araştırmacıların genel kanısı, kalp üzerindeki kardiyoprotektif etkilerin büyük ölçüde GLun antioksidan özellikleri aracılığıyla gerçekleştiği yönündedir (32). Bununla birlikte çalışmacılar, GL ekstraktının geniş bir klinik kullanıma sahip alternatif bir bitkisel ajan olarak literatürde yerini alabilmesini; bu ekstraktın kardiyoprotektif etkisinin daha fazla in vivo deneyle desteklenmesi gereğine bağlamışlardır (32).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Gülhane Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış 01.11.2021 tarihli ve ETİK-2021/34 kayıt nolu 21/49 karar nolu "Farelerde Oluşturulan Karbonmonoksit Zehirlenmesi Modelinde Ganoderma Lucidumun Beyindeki Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması" isimli çalışmada beyin dokuları kullanılmış olan 20 adet farenin arşivlenmiş kalp dokuları kullanılmıştır. Çalışma bütçesi, 2022/178 no'lu proje kapsamında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından; TUNEL testi, görüntülenmesi ve analizi için bütçe '123S101' numaralı TÜBİTAK 1002-B projesi kapsamında TÜBİTAK tarafından karşılanmıştır.

3.1. SAKRİFİKASYON ÖNCESİ FARELERE UYGULANMIŞ YÖNTEMLER

Tez çalışmamızda kullanılan arşiv kalp dokuları; 6-7 haftalık, 20-30 gram ağırlığında toplam 20 adet Balb/c türü erkek fareden (Gülhane Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi) tarafımca diseke edilmiş dokulardır.

3.1.1. Deney Grupları

Çalışmamızda, her grupta (G-POWER analizi ile belirlenmiş) 5 deney hayvanı olacak şekilde 4 grup oluşturulmuştur:

1. **Negatif Kontrol Grubu (n=5):** Karbonmonoksit maruziyeti uygulanmayan ve tedavi verilmeyen gruptur. Diğer deney grupları ile aynı koşullar altında atmosfer havası solutulmuştur.
2. **Pozitif Kontrol Grubu (n=5):** Karbonmonoksit maruziyeti uygulanan ve tedavi verilmeyen gruptur.
3. **Optimum (düşük) Doz Ganoderma Lucidum Tedavi Grubu (n=5):** Karbonmonoksit maruziyeti uygulanan ve oral gavaj ile günde tek doz 200 mg/kg Ganoderma lucidum ekstraktı verilen gruptur.
4. **Yüksek Doz Ganoderma Lucidum Tedavi Grubu (n=5):** Karbonmonoksit maruziyeti uygulanan ve oral gavaj ile günde tek doz 400 mg/kg Ganoderma lucidum ekstraktı verilen gruptur.

3.1.2. Deney Modeli

Pozitif kontrol grubu, optimum doz Ganoderma Lucidum tedavi grubu (200 mg/kg/gün) ve yüksek doz Ganoderma Lucidum tedavi grubu (400 mg/kg/gün) olan 3 deney grubundaki deney hayvanlarına karbonmonoksit zehirlenme modeli oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubuna ise aynı şartlar altında aynı sürede ortam havası solutulmuştur.

1,6 lt hacmindeki ve gaz girişi/çıkışı için 2 adet ayrı açıklığı bulunan plastik bir kabine hayvanlar tek tek konularak zehirlenme gerçekleştirilmiştir. Zehirlenecek her hayvan, önce 40 dakika boyunca bir Flow-metre ile akışı takip edilerek (0,5lt/dk) 1000 ppm karbonmonoksit gazına maruz bırakılmıştır. Hemen sonrasında da 50.000 ppm karbonmonoksit gazı maruziyeti başlatılmıştır. 50.000 ppm karbonmonoksit gazı, hayvanlar bilinçlerini kaybedene kadar uygulanmıştır (103). Hayvanlar bilinçlerini kaybedince, hemen gaz akışı sonlandırılarak hayvanlar kabin dışına, önceden ısıtılmış (37˚C) bir platforma (soğuk havanın nöroprotektif etkisini önlemek için vücut ısılarını korumak amacıyla) alınmıştır. Bu süreçte yeterince ortam havası soluyup bilinçlerini tekrar kazanmalarına izin verilmiştir. Zehirlenme sonrası bilinç kaybının oluşması ile, karbonmonoksit zehirlenme modelinin oluştuğu teyid edilmiştir. CO zehirlenmesinin doğrulanması için gereken karboksihemoglobin seviyeleri aralığı %60-76'dır (104). Söz konusu projenin (Farelerde Oluşturulan Karbonmonoksit Zehirlenmesi Modelinde Ganoderma Lucidumun Beyindeki Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması) ön çalışmasında CO zehirlenmesi yapılan farelerin COHb seviyesi %80'in üstünde bulunarak ve akut klinik belirtilerle (zehirlenme ile eksitasyonların ve sonra da bilinç kaybının oluşması) birlikte CO zehirlenmesi modelinin teyidi sağlanmıştır.

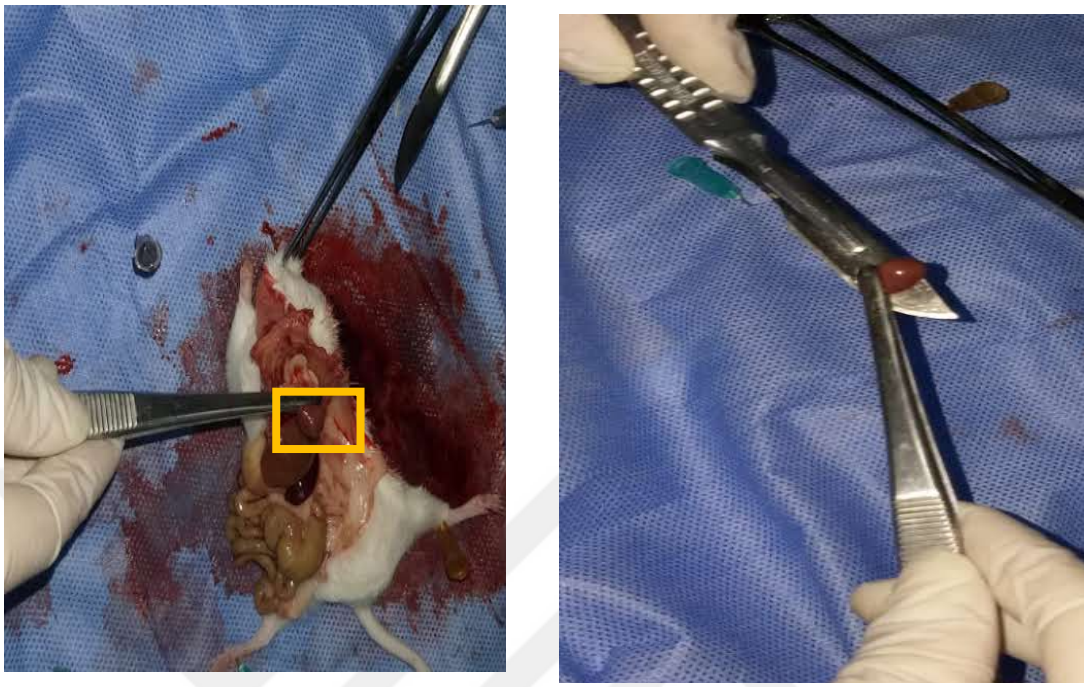
Zehirlenmeden hemen sonra Optimum doz (200 mg/kg/gün) ve Yüksek doz (400 mg/kg/gün) tedavi gruplarındaki farelere günde tek doz olacak şekilde Ganoderma Lucidum ekstraktı verilmeye başlanmıştır. Ganoderma lucidum ekstraktı (1288372 SIGMA), farelerin ağırlıklarına göre hesaplanıp içme suyu (maksimum 0,5 ml) ile süspansiyon haline getirilerek, oral gavaj yoluyla verilmiştir. Tedavi, 9 gün boyunca devam etmiştir. Bu süre zarfında (9 gün boyunca) negatif ve pozitif kontrol grubundaki farelere ise aynı miktarda içme suyu (maksimum 0,5 ml) verilmiştir.
Deneyin 10. gününde; tüm deney hayvanları genel anestezi altında eksanguinasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiştir.

3.2. SAKRİFİKASYON VE KALP DOKULARININ ALINMASI

Arşiv dokularını kullandığım, "Farelerde Oluşturulan Karbonmonoksit Zehirlenmesi Modelinde Ganoderma Lucidumun Beyindeki Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması" isimli tez çalışmasının tüm deney aşamalarına ve uygulanan histolojik yöntemlere, uzmanlık eğitimim dahilinde katılmış olup farelerin kalplerinin tez çalışmamın amacına uygun bir şekilde eksizyonu ve saklanması için uygun şartların oluşturulması tarafımca sağlanmıştır.

Deneyin 9. Günü tamamlandıktan sonra; tüm deney hayvanları intraperitoneal ksilazin ve ketamin enjeksiyonunu takiben sakrifiye edilmiştir. Hayvanlara intrakardiyak 20 ml PBS (Phosphate buffered saline) ile perfüzyon yapılmıştır. Perfüzyon yıkama sonrası diseke edilen farelerin kalp dokuları eksize edilerek (Resim 9) ışık mikroskobik, elektron mikroskobik ve biyokimyasal inceleme için ayrılmıştır. Biyokimyasal inceleme için kalplerin atriyumları (sağ ve sol) alınarak alüminyum folyoya sarılmış ve üzerine ilgili hayvan ve deney grubu bilgileri not edilmiş şekilde -80°C'de; biyokimyasal analizin yapılacağı zamana kadar muhafaza edilmiştir. Kalplerin apeks bölgeleri ise elektron mikroskobik inceleme için ayrılmıştır. Bu amaçla dokular primer fiksasyon için %2,5 tamponlu gluteraldehit solüsyonuna alınarak +4 ºC'ye kaldırılmıştır.

Her bir hayvanın kalan kalp dokuları (sağ ve sol ventrikül) kriyotomda transvers frozen kesit alınabilecek şekilde OCT (Optimal Cutting Temperature) solüsyonu içerisine gömülmüştür. Bu gömme işlemi; alüminyum folyodan yapılan ve bir kalp dokusunun sığacağı büyüklükte olan mini kaplara dondurma medyumunun (OCT-Optimal Cutting Temperature) eklenip sonrasında hemen bu medyumun içerisine dokuların gömülmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Ardından içerisinde dokuların bulunduğu her bir alüminyum folyo kap, bir straforun içinde bulunan -196°C sıvı azot buharının hızla soğutmuş olduğu, içi izopentan dolu bir metal kaba daldırılmıştır. Alüminyum folyo içerisindeki OCT'nin donmasının gözlenmesiyle (birkaç dakika sonra) dokuların bulunduğu kaplar izopentandan alınmıştır. Bu şekilde hızlı dondurma işlemine tabi tutulan her bir kalp dokusu OCT içerisinde vakit kaybedilmeden, üzerine ilgili hayvan ve deney grubu bilgileri not edilmiş şekilde -80°C'ye kaldırılıp histolojik kesitlerin alınacağı zamana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.



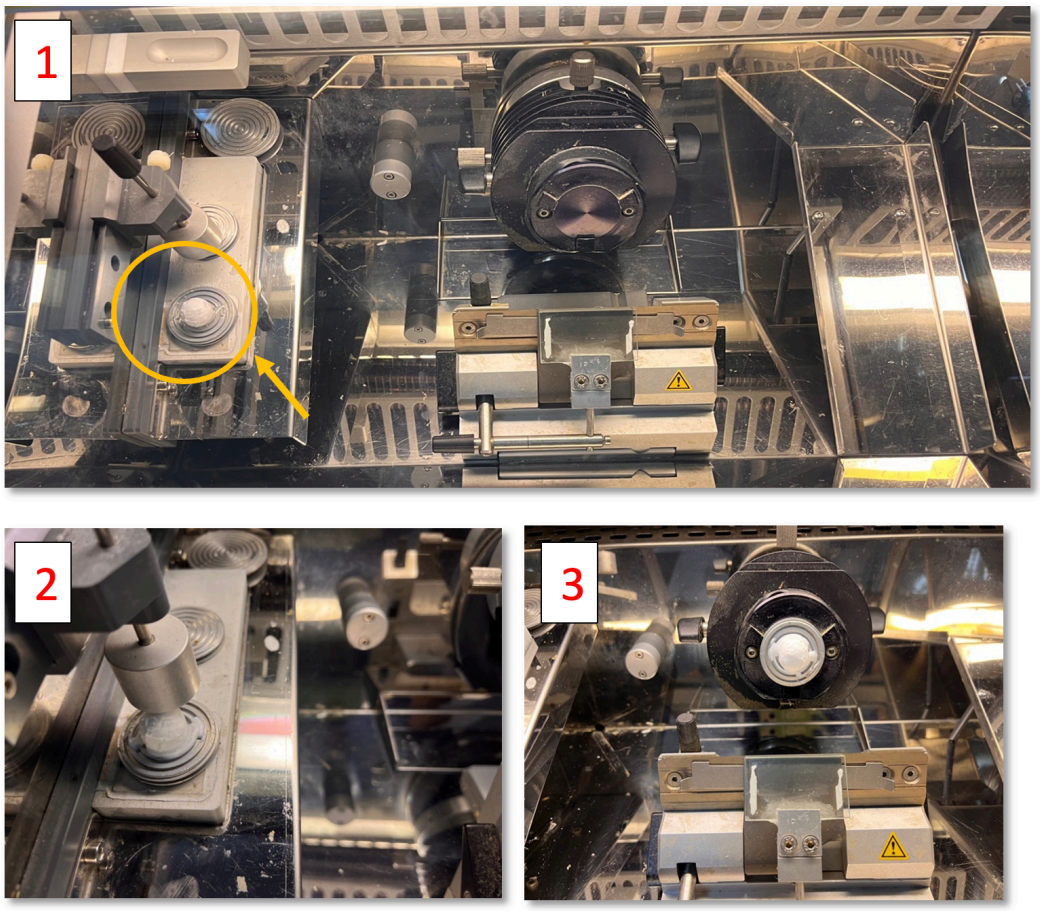
Resim 9. Fareden eksize edilen kalp dokusu

3.3. IŞIK MİKROSKOBİK YÖNTEM

3.3.1. Histolojik Kesitlerin Alınması

Işık mikroskobik inceleme için -80°C'de saklanan ve OCT (Optimal Cutting Temperature) içerisinde frozen kalp dokularının (sağ ve sol ventriküller) tamamından kriyotom ile 5 mikron kalınlığında 1/100 örnekleme olacak şekilde kesitler alınmıştır. Bunun öncesinde kriyotomun (Thermo Shandon Cryotome SME) sıcaklık ayarları yapılarak çalışma sıcaklığının ve numune sıcaklığının -20°C'ye, kriyobar sıcaklığının ise -40°C'ye gelmesi beklenmiştir. -80°C'de muhafaza edilmiş OCT içerisindeki kalp dokusu iç sıcaklığı -20°C olan kriyotomun içerisine alınmıştır. Yaklaşık yarım saat beklenilerek dokunun sıcaklığının kriyotomun sıcaklığına ulaşması sağlanmıştır. Sonrasında numune tutucu diske (plate) oda sıcaklığında bulunan OCT dökülerek, üzerine de kalp dokusunun yapışması sağlanmış ve kriyotomun kriyobar kısmında donmasına izin verilmiştir (Resim 10). Dokunun diske (plate) yapışması sağlandıktan sonra doku, kriyotomun numune tutucusu kısmına yerleştirilip sabitlenmiştir. Ardından kalp ventriküllerini içeren dokunun tamamından 10 adet lama (her lamda 8

kesit) her lam arasında 10 kesit atlanarak transvers şekilde 5 mikron kalınlığında histolojik kesitler alınmıştır. Alınan kesitler fikse olmadıkları için işlem süresince kriyotomun içerisinde bekletilmiş; işlem bitince önceden soğutulmuş olan lam kutuları içerisine konularak -40°C'de muhafaza edilmiştir.



Resim 10. Dokunun kriyotom içerisinde kesit alma işlemi öncesinde gömülmesi

3.3.2. Picrosirius Red Boyama Yöntemi

Işık mikroskobik analiz için ayrılan, fikse edilmemiş, -40°C'de saklanan 1/100 sistematik rastgele örnekleme ile alınmış kesitlerin bir kısmına (her hayvandan iki lam) kollajen artışının (fibrozisin) gösterilebilmesi amacıyla frozen kesitler için uygun Picrosirius Red boyama prosedürü uygulanmıştır (Tablo 3).

-40°C'den çıkarılan kesitler oda sıcaklığında 5 dakika kurutulduktan sonra pH=7.35 olarak ayarlanmş PFA ile 30 dakika fikse edilmiştir. Sonrasında distile su ile yıkanıp

1 saat kurutulan kesitler %70 etanole 10 dakika daldırılmıştır. Distile su ile tekrar yıkanan kesitler Weigert Hematoksilen boyası ile 10 dakika boyanmıştır. Boyama sonrası lamlar su dolu bir şaleye yerleştirilerek akan su altında 10 dakika yıkama işlemi yapılmıştır. Kesitler daha sonra 1 saat Picrosirius boyama solüsyonunda bekletilmiştir. Bir saatin sonunda distile sudan geçirilmiştir. Yıkama işlemi sonrası kesitler 1 dakika asetik asit solüsyonunda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda lamlar sallanarak kuruması sağlanmış ve %100 etanol içerisine alınmıştır. 5 dakika %100 etanol içerisinde bekletildikten sonra aynı işlem temiz başka bir etanol içerisinde tekrarlanmıştır. Sonrasında ksilene alınan kesitler 3-4 dakika kadar ksilende durup bu işlem temiz başka bir ksilende tekrarlanmıştır. Bütün işlemler tamamlandıktan sonra her lama entellan damlatılarak kesitler kapatılmıştır.

Tablo 2. Picrosirius Red Boyama Protokolü

KİMYASAL MADDE (UYGULAMA ADI)	UYGULAMA ŞEKLİ VE SÜRESİ
1. PFA- Paraformaldehit (Fiksasyon)	30 dakika
2. Distile su (Yıkama)	30 saniye daldırıp çıkarma
3. Havada kurutma	1 saat
4. Etanol %70	10 dakika
5. Distile su (Yıkama)	5-10 saniye daldırıp çıkarma
6. Weigert's Hematoksilen (Boyama adımı)	10 dakika
7. Akan çeşme suyu (Yıkama)	10 dakika
8. Picrosirius Boyama Solüsyonu (Boyama adımı)	1 saat
9. Distile su (Yıkama)	5-10 saniye daldırıp çıkarma
10. Asetik Asit Solüsyonu (Boyama Adımı)	1 dakika
11. Etanol %100 (Dehidrasyon)	5 dakika
12. Etanol %100 (Dehidrasyon)	5 dakika
13. Ksilen	5 dakika
14. Ksilen	3 dakika
15. Entellan ile kapama	

3.3.3. Toluidin Mavisi Boyama Yöntemi

Elektron mikroskobik inceleme için gerekli doku takip protokolü uygulanan örneklerden; ışık mikroskobu altında hem ince kesitlerin alınacağı uygun bölgenin tespiti için hem de kardiyomiyosit çapı ölçümleri için her hayvandan 4 adet lama 1/10 örnekleme ile yarı ince kesit alınmıştır. Her hayvan için 2 lam (10 kesit) toluidin mavisi ile boyanmıştır. Bunun için yarı ince kesitler lamlara alındıktan sonra kuruması için önce ısıtıcı tabla üstünde bekletilmiş sonra da ısıtıcı tabla üzerinden alınarak tekrar soğuması sağlanmıştır. Lamlar soğuduktan sonra kesitlerin üzerini kaplayacak şekilde toluidin mavisi solüsyonu (Tablo 3) damlatılmıştır. Sonrasında boya kuruyuncaya kadar lamlar hot-plate üzerinde bekletilmiştir. Yarı ince kesitlerin üzerindeki toluidin boyası kuruyunca lamlar soğuk bir yüzeye alınarak soğutulmuş ve distile su ile dolu iki farklı şalede 5'er dakika yıkanmıştır. Yıkanan lamlar ksilene daldırılıp çıkarılıp entellan damlatılarak lamel ile kapatılmıştır.

Tablo 3. Toluidin Mavisi Boyama Solüsyonu

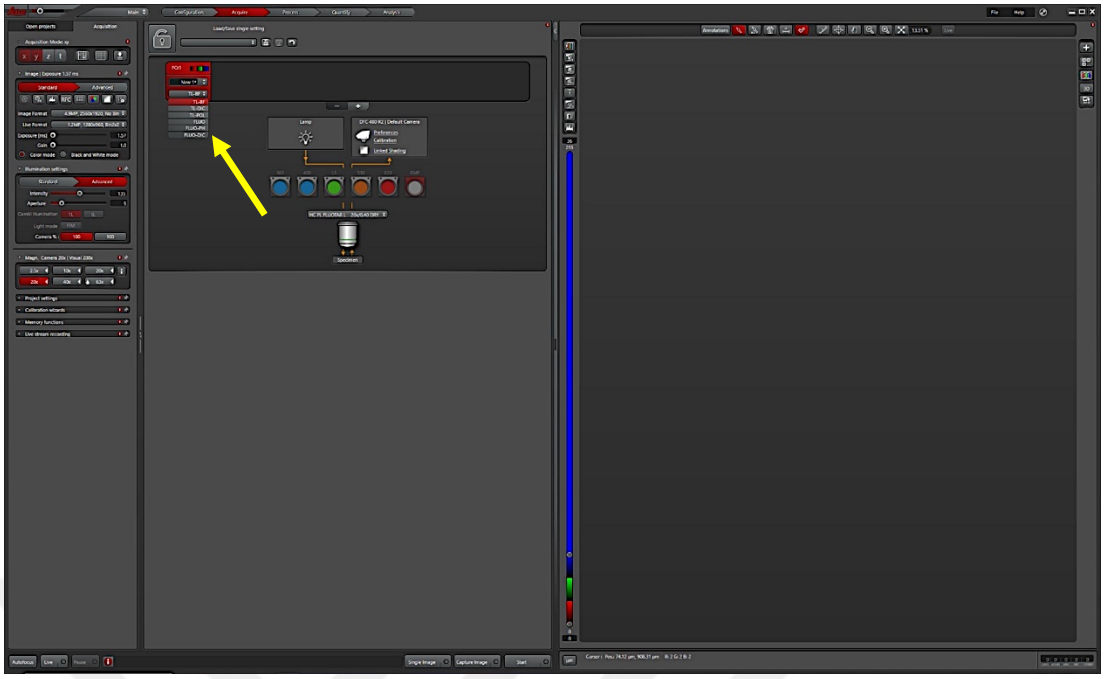
KİMYASAL MADDE	MİKTARI
1. Borax	1 gr
2. Toluidin Mavisi	1 gr
3. Azur 2	1 gr
4. Distile su	100 ml

3.3.4. Görüntüleme ve Analiz

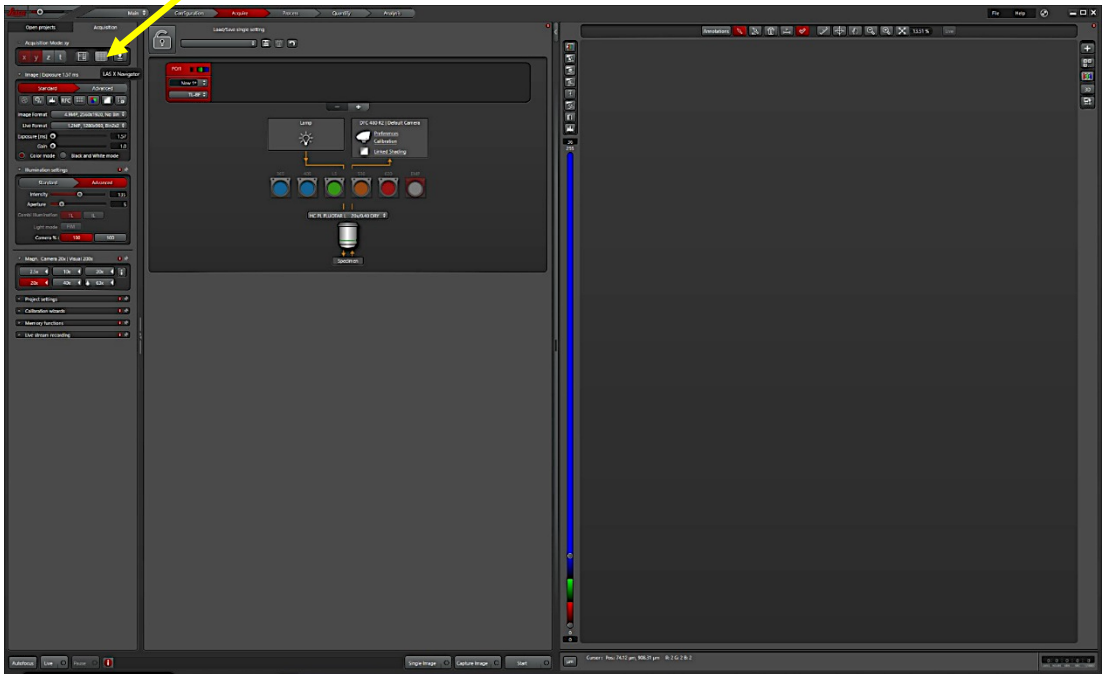
Işık mikroskobik incelemede; picrosirius red ve hematoksilen eozin boyalı frozen kesitler ile toluidin mavisi ve polikromatik boyanan yarı ince kesitler görüntülenmiştir. Picrosirius red ve toluidin mavisi boyalı kesitlerin görüntülemeleri sonrası analizleri yapılmıştır.

3.3.4.1. Picrosirius Red ile Boyanan Frozen Kesitlerin Görüntülenmesi ve Analizi

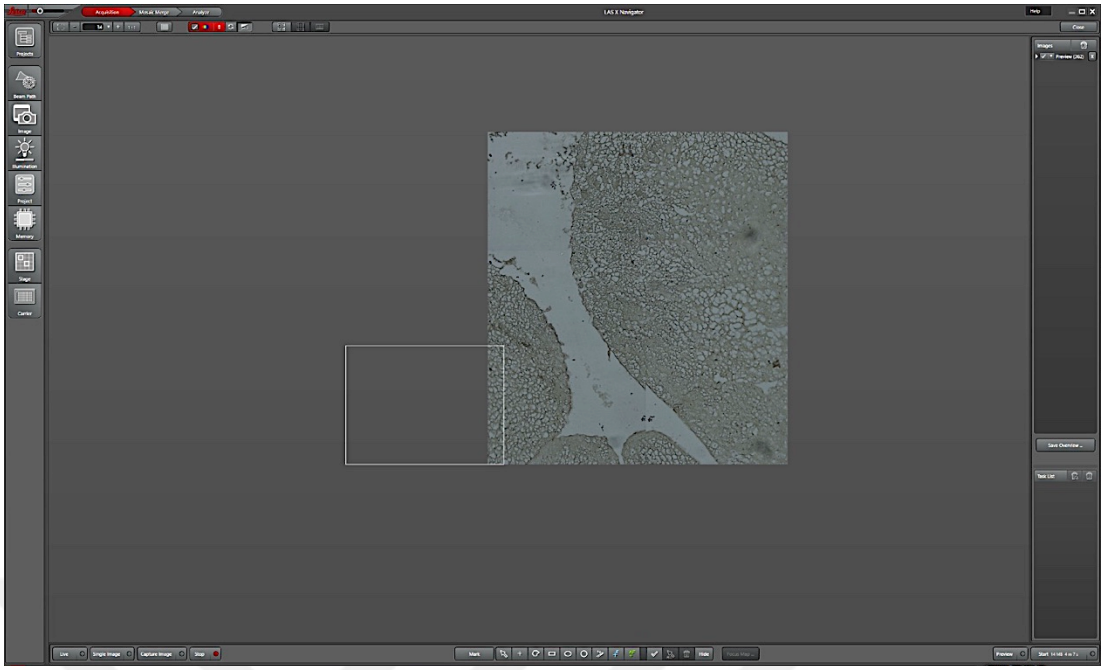
Picrosirius ile boyanan frozen kesitlerin görüntülemesi, Ana Bilim Dalımızda bulunan floresan mikroskobu (LEICA DMI6000) ile *Leica Application Suite* X yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Floresan mikroskop ve ilgili yazılım açılarak lamel objektife bakacak şekilde mikroskobun tablasına yerleştirilmiştir. Program açıldıktan sonra sol alt kısımdaki *Live* butonuna basılarak canlı seçeneği aktive edilmiş ve tabla x-y ekseninde hareket ettirilerek inceleyeceğimiz kesitin tam ortasına ışık düşecek şekilde ayarlama yapılmıştır. *Acquire* sekmesi açılarak bu sekmede mikroskobun aydınlatma türü *TL-BF (Bright Field)* yani aydınlık alan olarak seçilmiştir (Resim 10). Netlik ayarı mikroskobun mikrovidası ile kameranın verdiği görüntüye göre ekrandan yapılmıştır. Sonrasında *Acquisition* alanına girilmiş ve bu alanda bulunan parametreler *objektif büyütmesi* 20X, *exposure* 1,57, *gain* 1, *intensity* de 135 olarak ayarlanarak görüntü ayarları tamamlanmıştır. *Acquisition* sekmesinin altında yer alan sembollerden *LAS X Navigator* seçilerek ilgili alana girilmiştir (Resim 12). Bu alandayken sol alttaki tuşlardan *Spiral* tuşuna basılarak lamdaki bir kalp kesitinin önce spiral taraması yaptırılarak (Resim 13) bir kesit alanının sınırları belirlenmiş ve çevresi işaretleyici ile çizilmiştir (Resim 14). Sınırları belirlenen kesitin üzerinde *Focus map point* seçilerek 10-15 odak noktası işaretlenmiş (Resim 15) ve işaretli odak noktalarının her birinin netlik ayarı manuel olarak yapılmıştır (Resim 16). Sağ alttaki *Start* tuşu ile tarama başlatılmıştır. Tarama sonucunda her kesitin yüksek çözünürlükte birleştirilmiş görüntüleri (.lif uzantılı) elde edilmiştir (Resim 17). Her hayvan için bir lam ve her lamdan ortalama 6 kesitin bu şekilde görüntülemesi yapılmıştır.



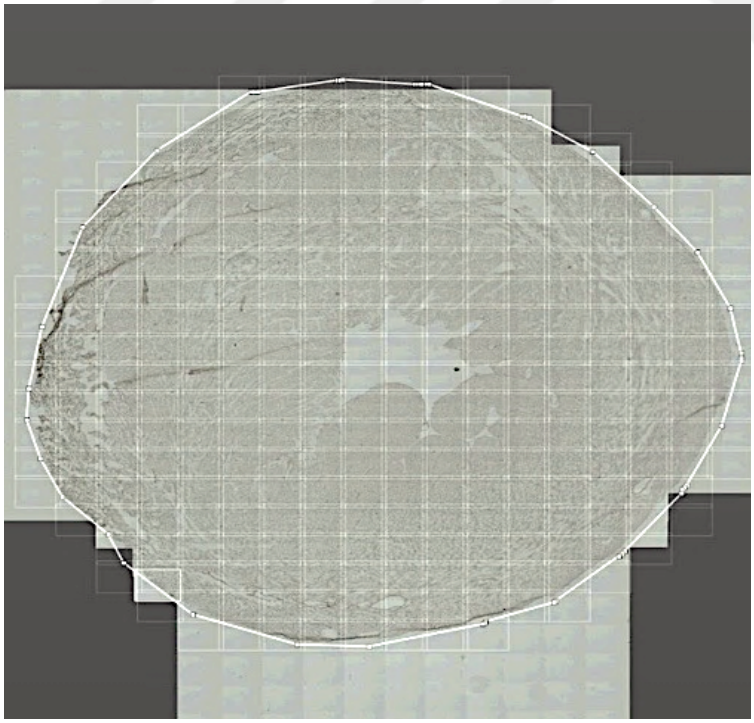
Resim 11. *Leica Application Suite* X yazılımında aydınlık ayarın (*TL-BF)* seçilmesi



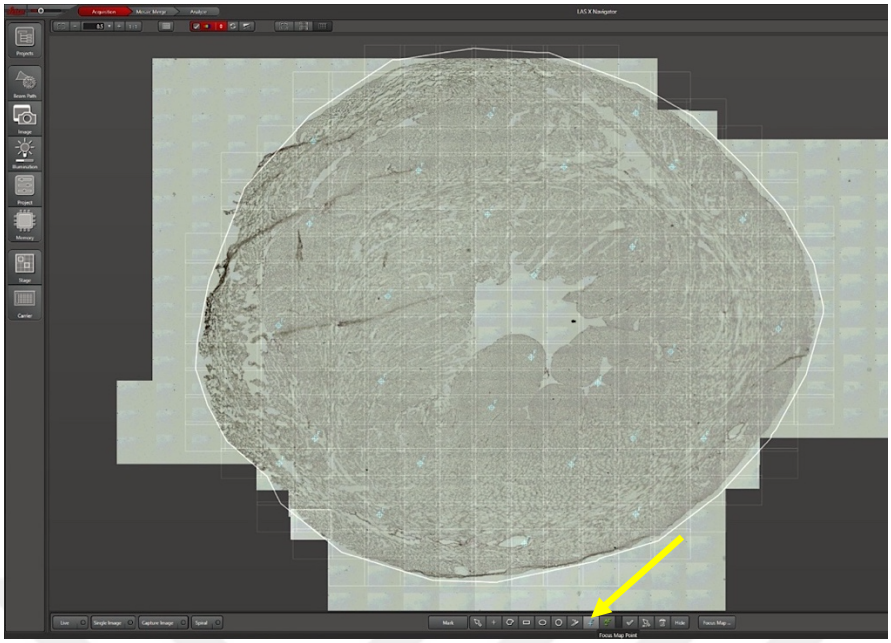
Resim 12. *LAS X Navigator* alanına giriş



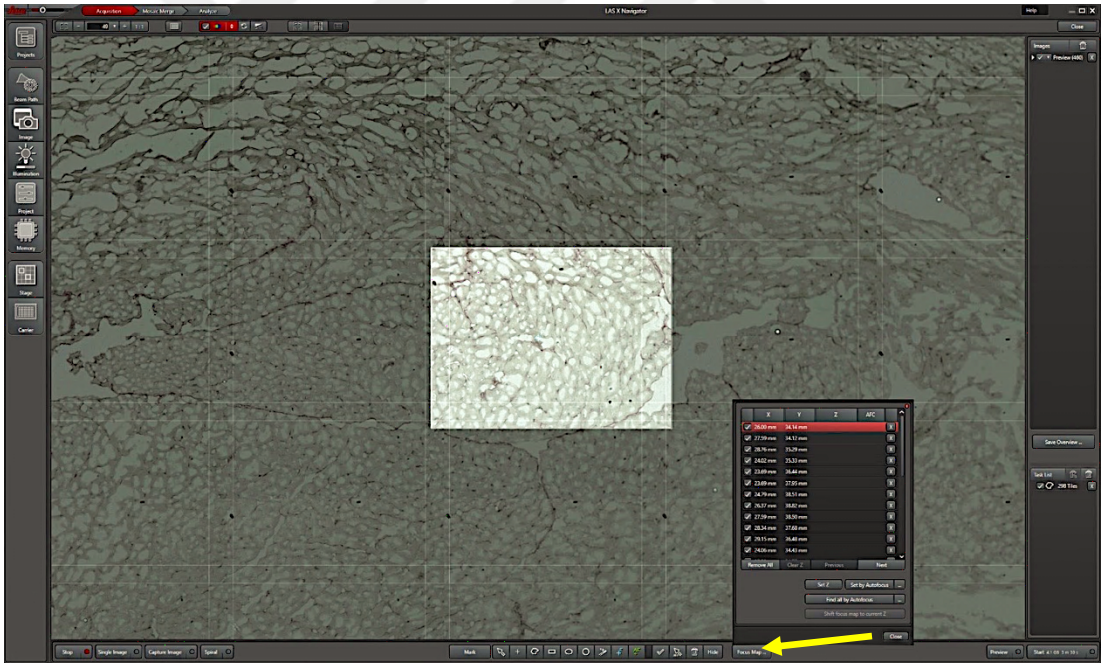
Resim 13. Kesitin spirallenerek görüntülemesinin başlatılması



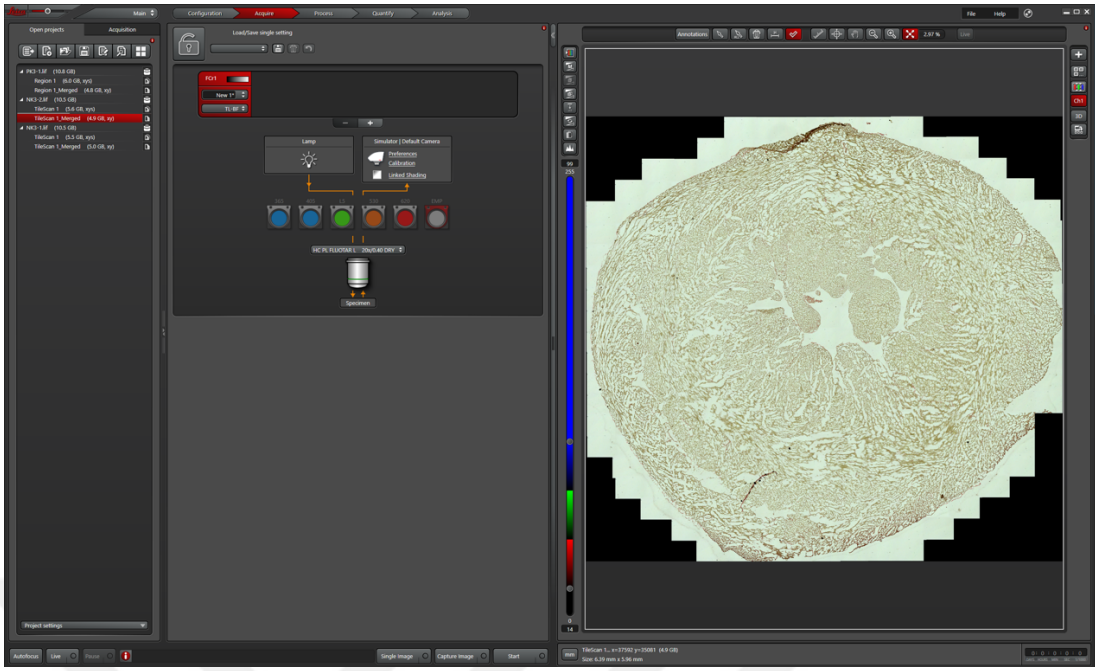
Resim 14. Taratılacak alanın sınırlarının çizilmesi



Resim 15. Odak noktalarının eklenmesi işlemi



Resim 16. Odak noktalarının netlik ayarının yapılması

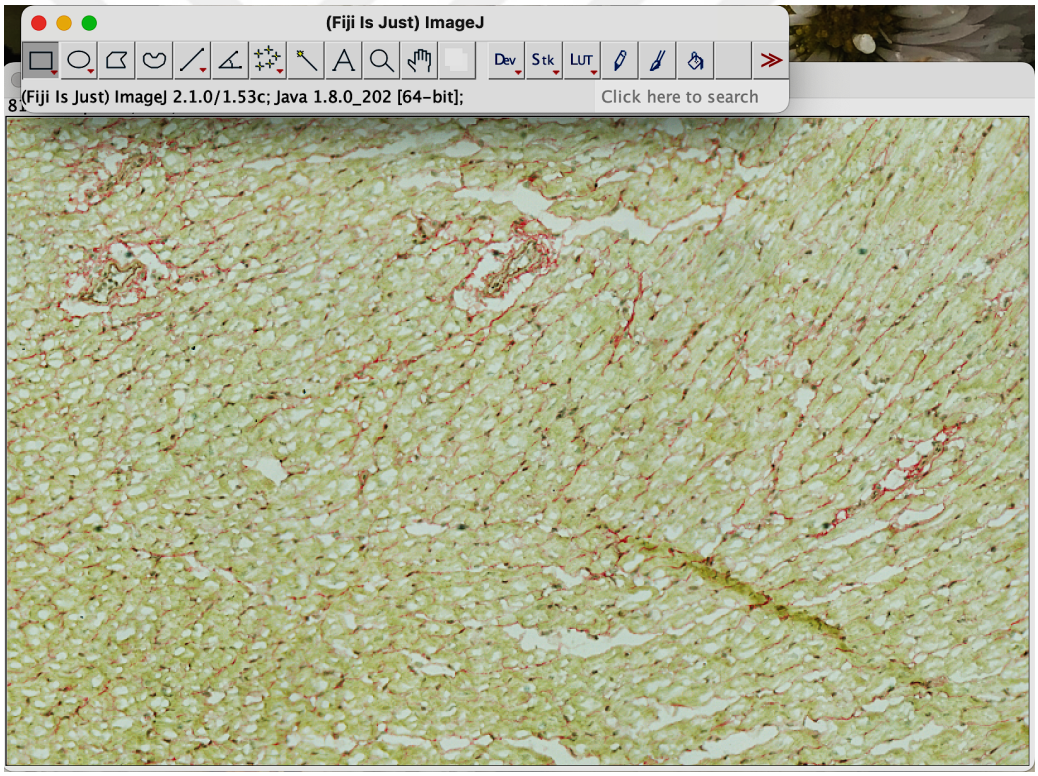


Resim 17. Taranmış temsili bir kesit görüntüsünün son hali

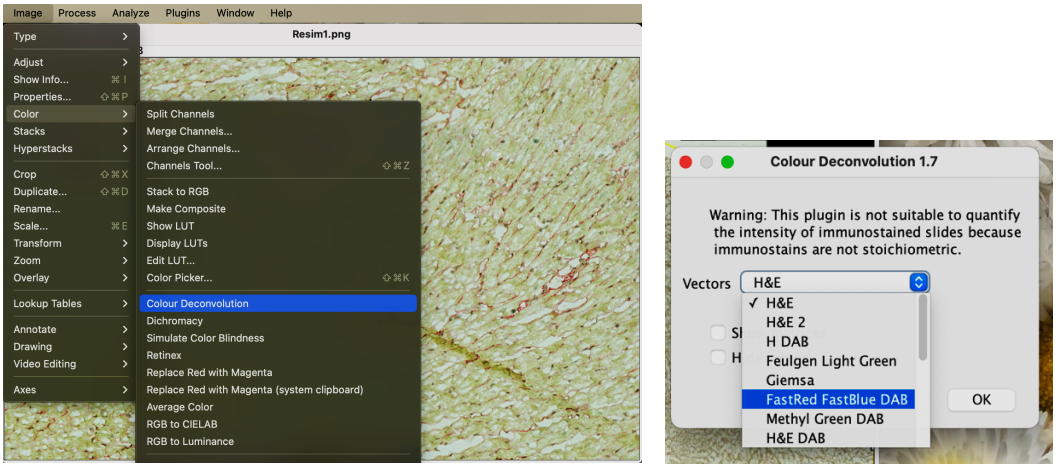
Leica Application Suite X yazılımı ile elde edilip kaydedilen görüntüler analiz için FIJI (Image J) 2.1.0 sürümlü programına aktarılmıştır. FIJI programı açıldıktan sonra *File> Open* tıklanarak ilgili fotoğraf seçilmiş ve programda açılmıştır (Resim 18). Görüntü üzerinde *Image> Type> RGB Color* ayarı yapılmıştır. Daha sonra *Image> Color> Colour Deconvolution* ayarına gidilerek (Resim 19) *Vectors> Fast Red Fast Mavisi* (Picrosirius Red seçeneklerde olmadığı için Picrosiriusdaki kırmızı renkli kanal ile uyumlu kırmızı kanalı bulunduğundan ve bize de kırmızı alanın analizi gerektiğinden bu boya ayarı tercih edilmiştir.) seçilmiştir. Bu seçimden sonra ekranda 3 farklı boya komponenti (kanalı) penceresi açılmıştır. Bunlardan ikisi kapatılarak sadece *Colour 1 (Red) ekranı* üzerinden analiz yapılmıştır. Colour 1 penceresinde Picrosirius Red boyalı kesitlerdeki sadece kırmızı alanlar (kollajen liflere denk gelen alanlar) gösterilmektedir. Amacımız bu kesitlerdeki fibrozis alanı oranının (kollajen liflerinin kapladığı alanın kesit yüzeyine oranı) hesaplanması ve gruplar arasında karşılaştırılması olduğu için bu kırmızı bölgelerin toplam alanı ölçülmüştür. Bu ölçüm için de *Image> Adjust> Threshold* seçilerek kırmızı alanların en doğru ve objektif

şekilde ölçümü için uygun aralık (0/250) belirlenmiş ve bütün kesitlerin analizinde aynı ölçüm aralığı kullanılmıştır (Resim 20-21).

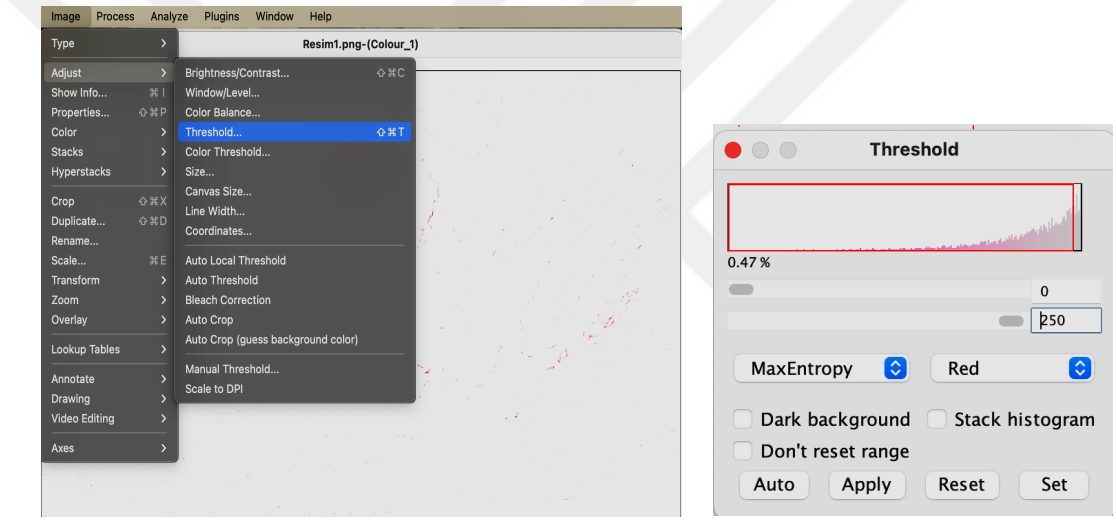
Ölçüm yapmadan önce *Analyze>Set Measurements* tıklanılarak açılan parametrelerden *Area Fraction* parametresi seçilmiştir (✓ atılmıştır.). Bu parametre, her kesitteki fibrozis alanının kesitin toplam yüzey alanına oranının hesaplanmasını sağlamaktadır. Daha sonra *Analyze >Measure* tıklanılarak ölçüm yapılmıştır (Resim 22). Açılan pencerede her bir kesit için hesaplanmış *% Area* ölçüm sonuçları *File> Save as* sekmesinden kaydedilmiştir. Her bir hayvanın ölçüm sonuçları farklı dosyalar halinde (.csv uzantısı ile) kaydedilmiş olup daha sonra bu sayısal değerler tek bir Excel (.xslx) dosyasına aktarılmıştır.



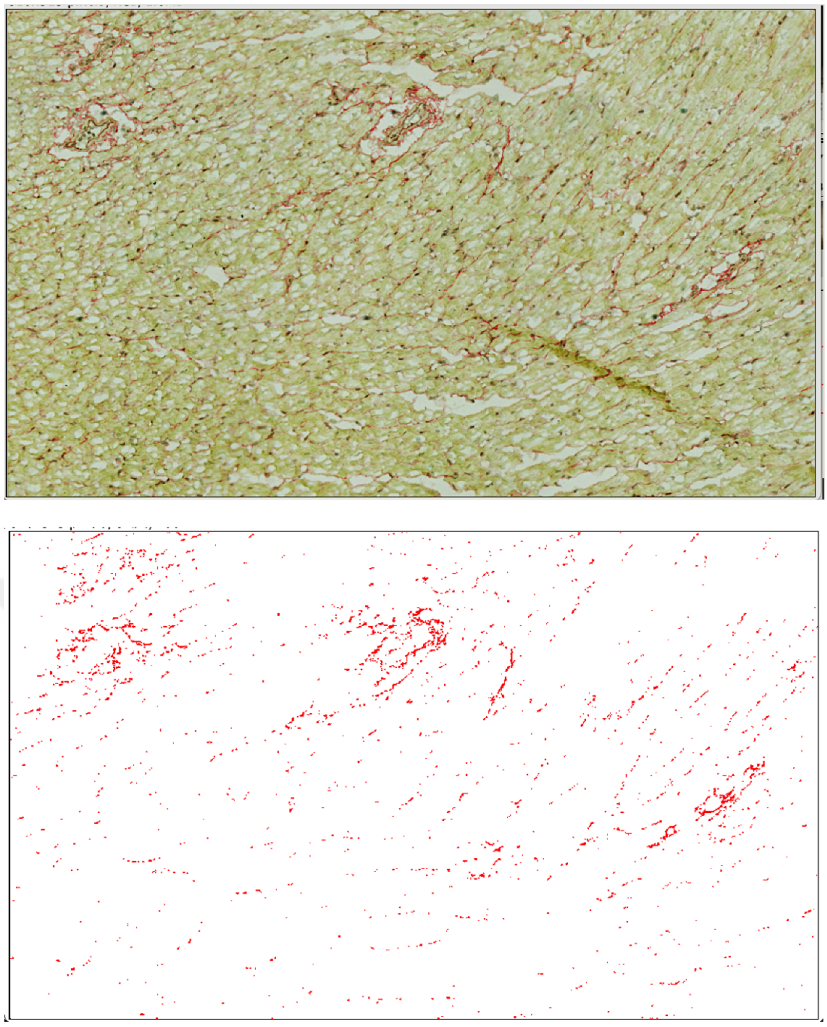
Resim 18. Temsili görüntünün *FIJI* programında açılması



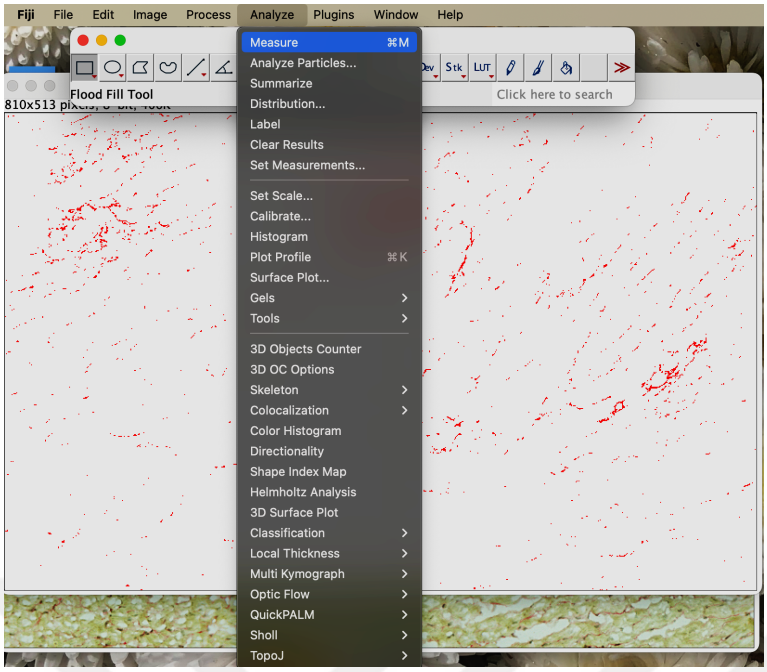
Resim 19. *FIJI* programında *Color Deconvolution* işlemi



Resim 20. Temsili görüntü üzerinde *Threshold* işleminin yapılması



Resim 21. *Threshold* ayarı sonrası görüntü



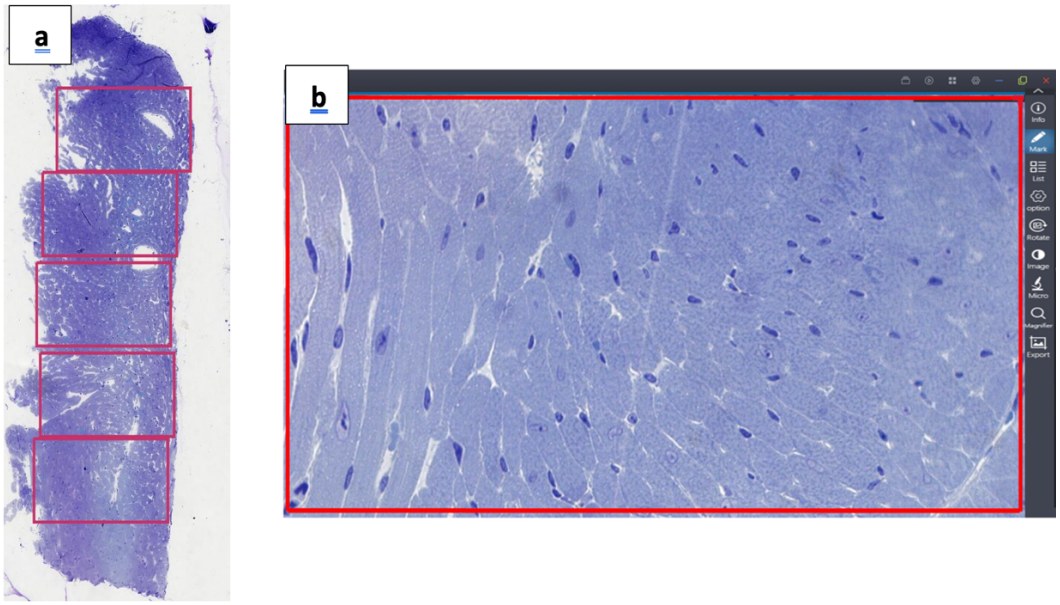
Resim 22. Kırmızı alanların *Analyze* butonundan hesaplanması işlemi

3.3.4.2. Toluidin Mavisi ile Boyanan Yarı İnce Kesitlerin Görüntülemesi ve Analizi

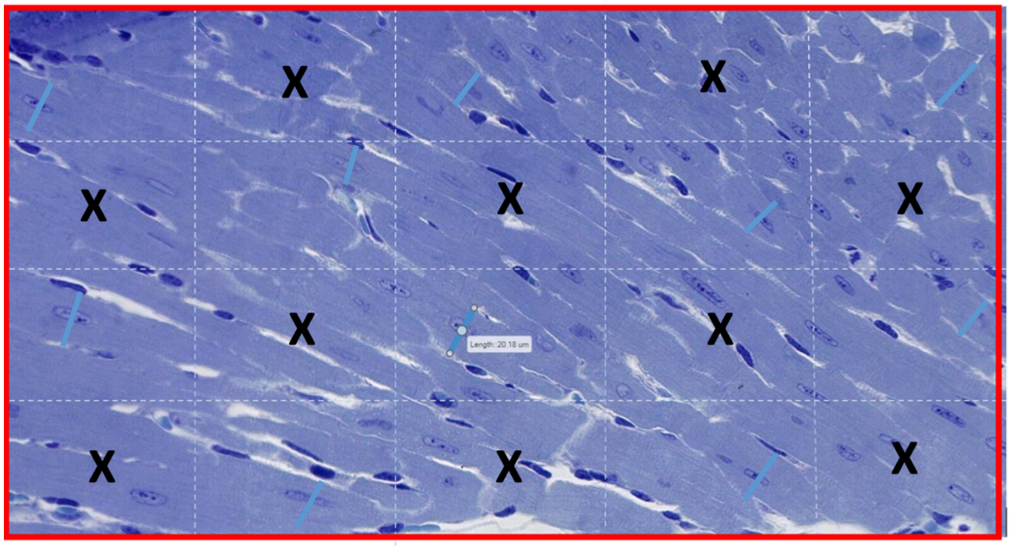
Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitlerin bulunduğu 20 adet lam (her hayvana ait 1 lam ve her lamda 10 kesit), Gülhane Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda dijital patoloji slayt tarama cihazı olan Magscanner KF-PRO-020 (Konfoong Biotech Internatıonal Co., Ltd, Çin)'nin 40X objektif ile taranmış ve taranan görüntüler .kfb uzantılı olarak kaydedilmiştir. Ardından görüntüler, KF Viewer (1.7.0.23 sürüm, Windows için) programında incelenerek analiz edilmiştir.

Her hayvana ait 10 kesit analiz edilmiş olup her kesitten de ekrandaki 40X'lik büyütme ayarında rastgele 5 farklı alan belirlenmiştir. Alanların büyüklüğü, 40X'lik büyütme ayarında ekranın görüntüsünün boyutu kadar olacak şekilde belirlenmiştir (Resim 23). Bu belirlenmiş alanlarda rastgele seçilmiş ve nükleusu kesite girmiş olan 10 farklı kardiyomiyositin çapı ölçülmüş olup toplamda 10.000 kardiyomiyositin çapı hesaplanmıştır. Çap ölçümleri için KF Viewer programında ilgili klasör seçilmiş ve görüntü açılmıştır. Görüntüde, işaretlenmiş alanlara (x40 büyütme) gelebilmek için yakınlaştırma sağlanmıştır. Belirlenen bu alanlarda sağ sütunda bulunan seçeneklerden *Mark* butonu ile ölçüm aracı seçilerek rastgele belirlenmiş (Resim 24) (seçili alanlara çizilen kılavuz çizgileriyle 20 kare oluşturulmuş ve bu karelerden bir tane atlanılıp bir

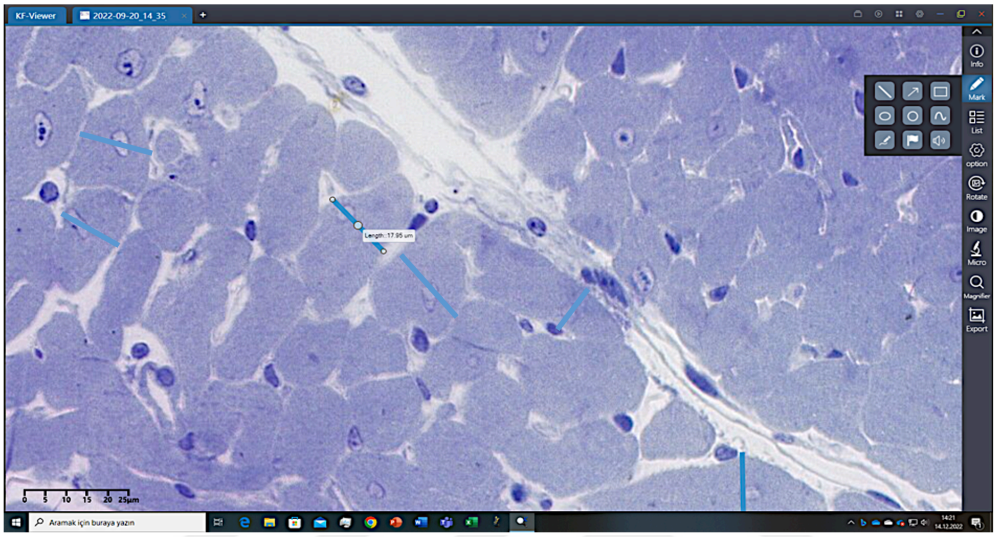
tanesindeki kardiyomiyosit seçilmiştir.) 10 farklı kardiyomiyositin nükleusundan geçecek şekilde enine çizgi çizilmiştir. Çizilen çizginin uzunluğu her kardiyomiyosit için çap uzunluğu olarak not edilmiş (Resim 25) ve ilgili hayvana ait tüm kesitlerdeki kardiyomiyosit çapları ayrı bir Excel (.xslx) dosyasına kaydedilmiştir. Ölçümler sonucunda önce her hayvanın daha sonra her deney grubunun ortalama kardiyomiyosit çapı hesaplanmıştır.



Resim 23. Toluidin boyalı kesitlerin analizi. **a)** Kesit içerisinde çerçeveyle işaretlenmiş 5 adet alan. **b)** Çerçeveli alanın daha büyük büyütmede görüntüsü. (40X görüntü büyütmesi)



Resim 24. Toluidin boyalı kesitlerin analizinde bir alanda ölçüme katılacak kardiyomiyositlerin seçildiği kareler. (Çarpı olan alanlar atlanan alanları temsil etmektedir.)



Resim 25. *KF Viewer* yazılımında kardiyomiyosit çapı ölçümü (Mavi çizgiler çapı temsil etmektedir).

3.4. TUNEL YÖNTEMİ (İN SİTU APOPTOZİSİN TESPİTİ)

Işık mikroskobik analiz için ayrılan, fikse edilmemiş, -40°C'de saklanan 1/100 sistematik rastgele örnekleme ile alınmış frozen kesitlerin bir kısmına apoptozisin gösterilmesi için TUNEL testi uygulanmıştır. Kesitler alındıktan sonra TUNEL testinin uygulanması, görüntülenmesi ve analizinin bütçesi '123S101' proje no'lu TÜBİTAK 1002-B acil destek projesi kapsamında TÜBİTAK tarafından karşılanmış olup Labart Medikal Ar Ge laboratuvarında benim gözetimimde hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Apoptozisin gösterilmesi için yapılan ve DNA kırıklarını histokimyasal olarak oraya koyan Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) analizi için TUNEL kit (Elabscience, USA), işaretleme solüsyonu olarak FITC ve karşıt boyama için DAPI kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak; hem daha önce apoptozis oluştuğu gösterilmiş bir meme dokusu hem de kitten çıkan DNaz solüsyonu ve DNaz çalışma solüsyonu ile muamele edilen bir doku örneği kullanılmıştır. Negatif kontrol için ise işaretleme öncesi sadece DNaz solüsyonu ile inkübasyon yapılmıştır. Frozen kesitler oda sıcaklığına çıkarılıp zaman kaybedilmeden % 4'lük PBS tamponlu PFA ile yarım saat boyunca fikse edilmiştir. Ardından PBS ile 2x5 dakika yıkanıp antijen açığa çıkarma işlemi için, Proteinaz K çalışma solüsyonu ile 10 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında tekrar PBS ile 3x5 dakika yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra işaretleme için; önce TdT dengeleme solüsyonu ile 37°C'de 30 dakika, sonrasında ise işaretleme solüsyonu ile yine 37°C'de 90 dakika nemli ve karanlık ortamda inkübe edilmiştir. 3x5 dakika PBS ile yıkanan kesitlere DAPI damlatılarak, oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek yine PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyanan kesitler, su bazlı kapama medyumu ile kapatılmıştır. Daha sonra kesitler, floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Leica DM 5000 ve LAS analiz yazılımı) altında görüntülenerek, rastgele seçilen 5 farklı alandan 40X objektifte dijital mikrofotoğrafları çekilmiştir. FITC için uygun dalga boyu 490nm/520nm, DAPI için uygun dalga boyu 350nm/470nm olarak kullanılmıştır. Overlay tekniği ile görüntü birleştirmesi yapılarak (Adobe Photoshop 6.0, USA) aynı mikroskop alanında immunopozitif bölgeler yeşil floresan, nükleus boyanması ise mavi floresan renklerle temsil edilmiştir**.**

Analiz için, Apoptotik indeks= (TUNEL pozitif hücre sayısı/ Total hücre sayısı) X 100 olarak hesaplanmıştır (Soledad GLR ve ark 2021). Buna göre, gruplardaki her hayvan için 1/100 örnekleme ile alınmış olan 3 frozen kesit kullanılmıştır. Bir kesitte, 20x büyütmede 3 farklı mikroskop sahası analiz edilmiş ve toplam hücre sayısı ile Tunel pozitif hücre sayıları belirlenerek apoptotik indeks hesaplanmıştır.

3.5. ELEKTRON MİKROSKOPİ YÖNTEMİ

3.5.1. Doku Takibi

Elektron mikroskobik yöntem için sakrifikasyon sonrası 1-2 mm^3 boyutlarındaki dokular (kalp apeksleri) primer fiksasyon amacıyla üzerinde hayvan ve deney grubu bilgilerinin kod şeklinde yazıldığı ve içerisinde fiksatif tamponu solüsyonu (Tablo 4) olan kaplara alınıp +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Sonraki adım için +4 °C'den çıkarılan ve primer fiksasyonu gerçekleşmiş dokular üzerine silinmeyecek şekilde numune kodları kazınarak 0,1 M PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) yıkama solüsyonunun olduğu 1,5 ml'lik ependorflara alınmıştır. Dokular PBS içinde 3 kez 15'er dakika karıştırıcıda çalkalanmıştır. Bu süreçte her yıkamada PBS yenisiyle değiştirilmiştir. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra Osmiyum stok solüsyonu (Tablo 5) hazırlanmıştır. Hazırlanan Osmiyum stok solüsyonu (4 ml), eşit hacimdeki 0,2 M PBS (4 ml) ile dilüe edilerek Osmiyum çalışma solüsyonu elde edilmiştir. Sonrasında PBS dökülerek sekonder fiksasyon amacı ile her ependorfa 1 ml Osmiyum çalışma solüsyonu eklenmiş ve ependorflar tekrar karıştırıcı üzerine alınarak 2 saat karanlık ortamda çalkalanmaya bırakılmıştır. Sonrasında ependorfların içindeki Osmiyum solüsyonu dökülerek dokular 3 kez 15'er dakika PBS ile yıkanmıştır. Son PBS'den sonra dokular Uranil asetat solüsyonuna (Tablo 6) alınarak 1 gün boyunca +4°C'de bekletilmiştir.

Ertesi gün dokular dehidrasyon amacıyla sırasıyla %70, %96, %100 etanolden 2'şer kez geçirilmiştir. Propilen oksit'e alınan dokular 20 dakika bekletilmiş ve Propilen oksit yenilenerek işlem tekrarlanmıştır. Propilen oksitten sonra Propilen oksit (5 ml) ve Araldit solüsyonu (5 ml) (Tablo 7) eşit hacimde karıştırılarak dokular bu karışım solüsyonunda 1 saat bekletilmiştir. 1 saat sonra dokular Araldit solüsyonuna alınmıştır. Dokular Araldit'e alındıktan sonra 40°C'ye ayarlanmış etüvde 1 saat çevrilmiş, 1 saat de vakumlanmıştır (toplam 2 saat araldite kalmıştır.). Vakumlama işlemi bitince Araldit'e gömülen dokular 70°C'ye ayarlanmış etüvde 2 gün bekletilmiştir. Sonrasında kesit alma işlemine geçilmiştir.

Tablo 4. Fiksatif Tamponu Solüsyonu (100 ml)

KİMYASAL MADDE	MİKTARI
1. Fosfat Tamponu	50 ml (0,2 M)
2. Gluteraldehit % 25	10 ml
3. Paraformaldehit %10	20 ml
4. Distile su	20 ml

Tablo 5. Osmiyum Tetroksit Stok Solüsyonu (50 ml)

KİMYASAL MADDE	MİKTARI
1. Osmiyum Tetroksit	1 gr
2. Distile su	50 ml

Tablo 6. Uranil asetat solüsyonu (50 ml)

KİMYASAL MADDE	MİKTARI
1. Fosfotungustik asit	500 mg
2. Uranil Asetat	250 mg
3. Etanol %70	50 ml

Tablo 7. Araldit Solüsyonu

KİMYASAL MADDE	MİKTARI
1. Araldite	10 birim
2. Dodecenylcuccinic anhidril	10 birim
3. Dibutyl phthalate	1 birim
4. Dimetilbenzilamin	0,530 birim

Tablo 8. Elektron Mikroskobu Doku Takibi Protokolü

KİMYASAL MADDE (UYGULAMA ADI)	UYGULAMA ŞEKLİ VE SÜRESİ
1. % 2,5 Gluteraldehitli fiksatif tamponu (Primer fiksasyon)	Min. 4 saat +4°C
2. PBS - 0,1M (Yıkama)	3 X 15 dakika
3. Osmiyum tetroksit solüsyonu (Sekonder fiksasyon)	2 saat karanlık ortamda
4. PBS - 0,1M (Yıkama)	3 X 15 dakika
5. Uranil asetat solüsyonu	Min. 2 saat +4°C

6. Etanol %70 (Dehidrasyon)	2 X 15 dakika
7. Etanol %96 (Dehidrasyon)	2 X 20 dakika
8. Etanol %100 (Dehidrasyon)	2 X 20 dakika
9. Propilen oksit	2 X 20 dakika oda ısısında
10. Propilen oksit + Araldit karışımı	1 saat oda ısısında
11. Araldit	1 saat döndürme +40°C etüvde
12. Araldit	1 saat vakumlama +40°C etüvde
13. Araldite gömme	2 gün +70°C etüvde

3.5.2. Yarı ince ve İnce Kesitlerin Alınması

Elektron mikroskobik inceleme için gerekli doku takip basamakları (Tablo 8) tamamlanan dokulardan hem ışık mikroskop altında görüntüleme/analiz yapılabilmesi hem de elektron mikroskop için gerekli bölgenin tespiti için önce yarı ince (~800 nm) kesitler; sonra da elektron mikroskop görüntülemeleri için ince (~80 nm) kesitler alınmıştır. Kesitler alınmadan önce doku trim cihazında her bir gömülmüş dokuya; tüm yüzeyleri piramit olacak ve yüzeyde doku görünecek şekilde trimleme işlemi yapılmıştır. Trimlenmiş dokudan eski bir cam bıçak ile birkaç kesit alınmış ve kesit yüzeyi pürüzsüz hale gelince eski bıçak yeni cam bıçakla değiştirilmiştir. Cam bıçaktaki su havuzu distile su ile doldurularak ultra mikrotom ile yarı ince kesitler (~800 nm) alınmaya başlanmış ve su havuzundan da sivri uçlu bir fırça yardımı ile lam

üzerindeki su damlasına kesitler aktarılmıştır. Daha sonra her hayvandan 4 adet lama 1/10 örnekleme ile 10'ar kesit alınmıştır.

Kesitler lama alındıktan sonra 40-50°C'ye ayarlanmış ısıtıcı tabla üzerinde bekletilerek kurumaları sağlanmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında soğutularak toluidin mavisi boyama yöntemine geçilmiştir. Toluidin mavisi boyanmış yarı ince kesitler de ışık mikroskobu altında bakılarak incelenecek bölümler tespit edilmiş ve ince kesitlerin alınabilmesi için ultra mikrotom altında dokular daha küçük boyutlara getirilmiştir.

Uygun boyutlara küçültülen dokulardan ultramikrotom ile 70-80 nm kalınlığında ince kesitler alınmıştır. Daha sonra ince kesit boyama protokolü (Tablo 10) uygulanmıştır. Boyanan gridler kurumaları için kurutma kağıdına alınmış, ve sonrasında grid kutusuna yerleştirilmiştir. Görüntülemeler, Hitachi HT7800 markalı TEM ile yapılmıştır.

Tablo 9. İnce Kesit Boyama Protokolü

KİMYASAL MADDE (UYGULAMA ADI)	UYGULAMA ŞEKLİ VE SÜRESİ
1. Kesitler boyama setine yerleştirilmiştir.	
2. Distile su	1-2 dakika
3. %8'lik Uranil asetat	45 dakika
4. Distile su	1-2 dakika
5. 0,1 N NaOH	
6. %0,7 Kurşun sitrat + %0,9 Sodyum sitrat solusyonu	20 dakika
7. %0,1 N NaOH'da yıkama	
8. Distile su	1-2 dakika

3.5.3. Polikromatik Boyama Yöntemi

Her hayvan için 2'şer lama (her lamda 10 kesit) 1/10 örnekleme ile alınmış yarı ince kesitlerin 1'er lamı toludin mavisi boyaması için kullanılmıştır. Kalan lamlar ise kesitlerdeki yapıların farklı renk/tonlarda boyanmasını (kollajen parlak pembe, miyositler mor, sitoplazma açık mor vb.) sağlayarak yarı ince kesitlerin morfolojisinin daha iyi anlaşılmasına olanak tanıyan polikromatik boyamaya (105,106) ayrılmıştır. Öncelikle boyama solüsyonu (Tablo 11) hazırlanmıştır. Bunun için monobazik sodyum fosfat, bazik fuksin ve metilen mavisi 15 ml % 0,5'lik borik asit solüsyonunda (metal karıştırıcıyla sürekli çalkalanması sağlanarak) çözdürülmüştür. Çözünme tamamlanınca karışıma 70 ml distile su eklenmiştir. Sonrasında 10 ml %0,72'lik NaOH (sodyum hidroksit) eklenerek ph: 6,8 olması sağlanmıştır. Yarı ince kesitlerin üzerine 1 ml polikromatik boyama solüsyonu damlatılıp lamlar 4-5 sn kadar 45-50°C'ye ayarlı ısıtıcı tabla üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra distile su ile dolu bir şaleye daldırılıp çıkarılarak 5-10 sn yıkanmıştır. Yıkanan kesitler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kesitler kuruyunca entellan damlatılarak lamelle kapatılmıştır.

Tablo 10. Polikromatik Boyama Solüsyonu

KİMYASAL MADDE	MİKTARI
1. Monobazik sodyum fosfat	0,5 gr
2. Bazik fuksin	0,25 gr
3. Metilen mavisi	0,2 gr
4. Borik asit % 0,5	15 ml
5. Distile su	70 ml

3.6. OKSİDATİF HASARIN (MDA) ÖLÇÜMÜ

Oksidatif hasarın ölçümü, MDA kiti ile (CEA597Ge ELISA Kit for Malondialdehyde 96T) çalışılmış olup bütün işlem basamakları Gülhane Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Kalp örnekleri, çalışmaya başlanmadan tartılmış ve yaklaşık 20 mg olacak şekilde ayarlanarak üzerine 200 mikrolitre soğuk PBS eklenmiştir. Örnekler bilyeli homojenizatöre alınıp 10 dakika homojenize edilmiştir. Sonrasında numunedeki bilyeler alınıp santrifüj cihazında (HERMLE Z 323 K) 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası; yeni ve üzerinde ilgili hayvanın grubuna ait kodlamanın olduğu ependorflara süpernatanlar alınmıştır. Standart solüsyonlar, kit protokolünde belirtildiği şekli ile hazırlanmış olup 200 µL standart ve 200 µL örnek içeren her flakona veya kuyucuğa 600 µL TBA (Thiobarbituric acid) reaktifi eklenmiştir. 95°C'de 60 dakika inkübe edildikten sonra, bir buz banyosunda 10 dakika boyunca soğutulmuştur. 200 µL süpernatant (MDA-TBA eklentisi içerir) alınıp, analiz için 96 kuyucuklu bir kültür kabına eklenip otomatik 'mikroplaka' okuyucu (Molecular Devices Filter Max F5, USA) ile 450 nm absorbansta sonuçlar değerlendirilmiştir. Her hayvan için ng/ug cinsinden protein değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sayısal veriler Excel (.xslx) dosyasına aktarılmıştır.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Elde edilen verilerin analizi Jamovi-2.3.21.0 programı ile yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler kategorik değişkenler için yüzde, sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma ve ortanca, en küçük değer, en büyük değer şeklinde verilmiştir. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılıma uyan parametreler çoklu gruplar arasında (kardiyomiyosit çapı ölçüm analizi ve TUNEL testi analizinde) tek yönlü ANOVA testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunan durumlarda, ikişerli post-hoc karşılaştırmalar yapılmıştır. Normal dağılıma uymayan (MDA ölçümü analizi) veya Levene testi istatistiksel olarak anlamlı çıkan (<0.05) parametreler (picrosirus red ölçüm analizi) ise çoklu gruplar arasında non parametrik tek yönlü ANOVA (Kruskal-Wallis) testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu parametreler için ikili grup

karşılaştırılmasında ise Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip 1 hata düzeyi %5 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirilmiştir ve $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

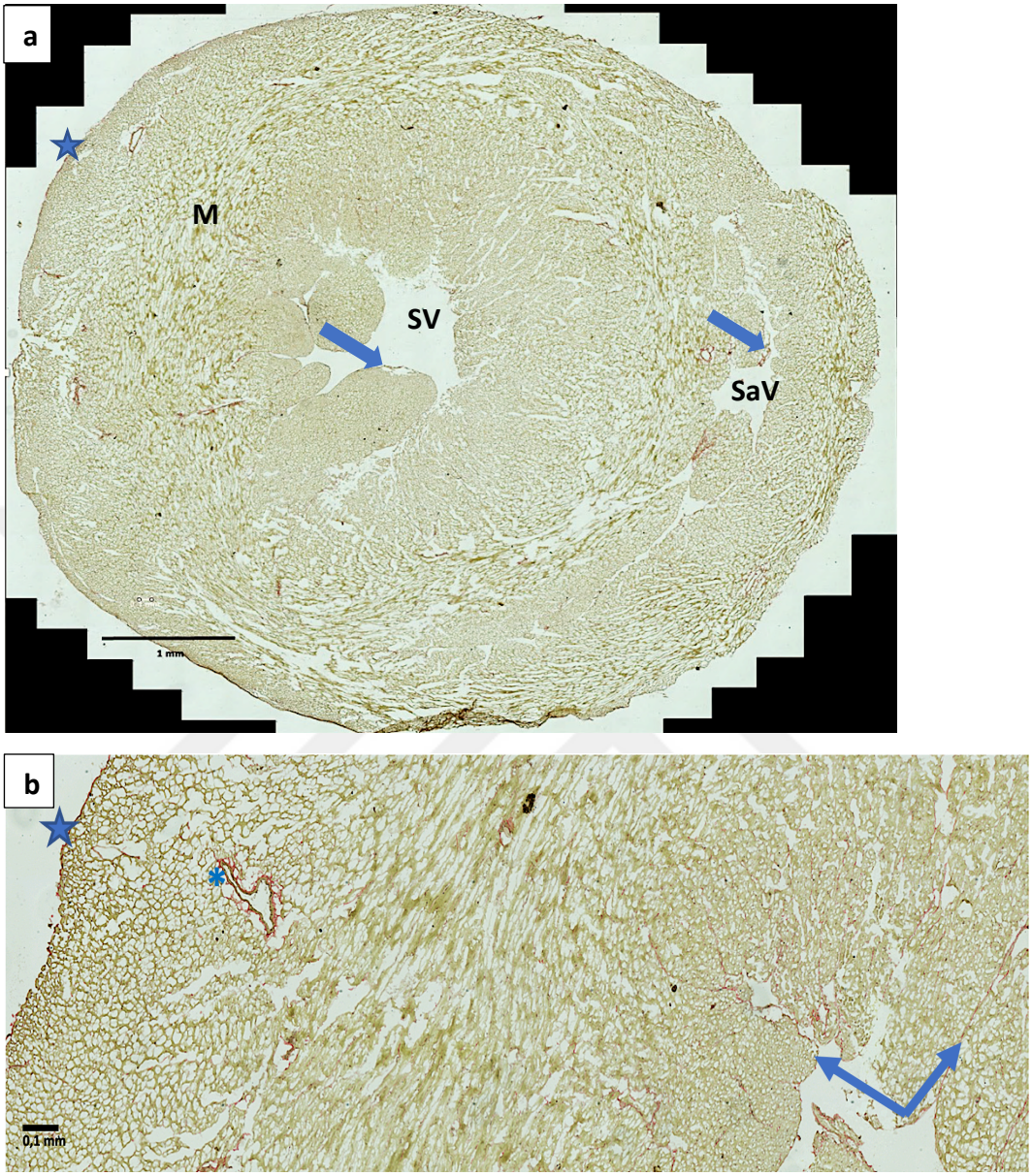
4. BULGULAR

4.1. IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME BULGULARI

4.1.1. Picrosirius Red Boyama Bulguları

Karbonmonoksit zehirlenmesinin kalpte meydana getirdiği kollajen lif artışı/fibrozisin tespiti ve GLun etkisinin incelenebilmesi için frozen kesitler Picrosirius Red ile boyanmıştır. Kalpteki kollajen liflerinin yoğun olduğu yerler (perivasküler alan, endokardiyumun subendoteli, miyokardiyum interstisyumu, epikardiyum) Picrosirius Red boyası ile spesifik olarak kırmızıya; kas lifleri (miyofibriller) ise sarı/kahverengiye boyanmıştır (Resim 26).

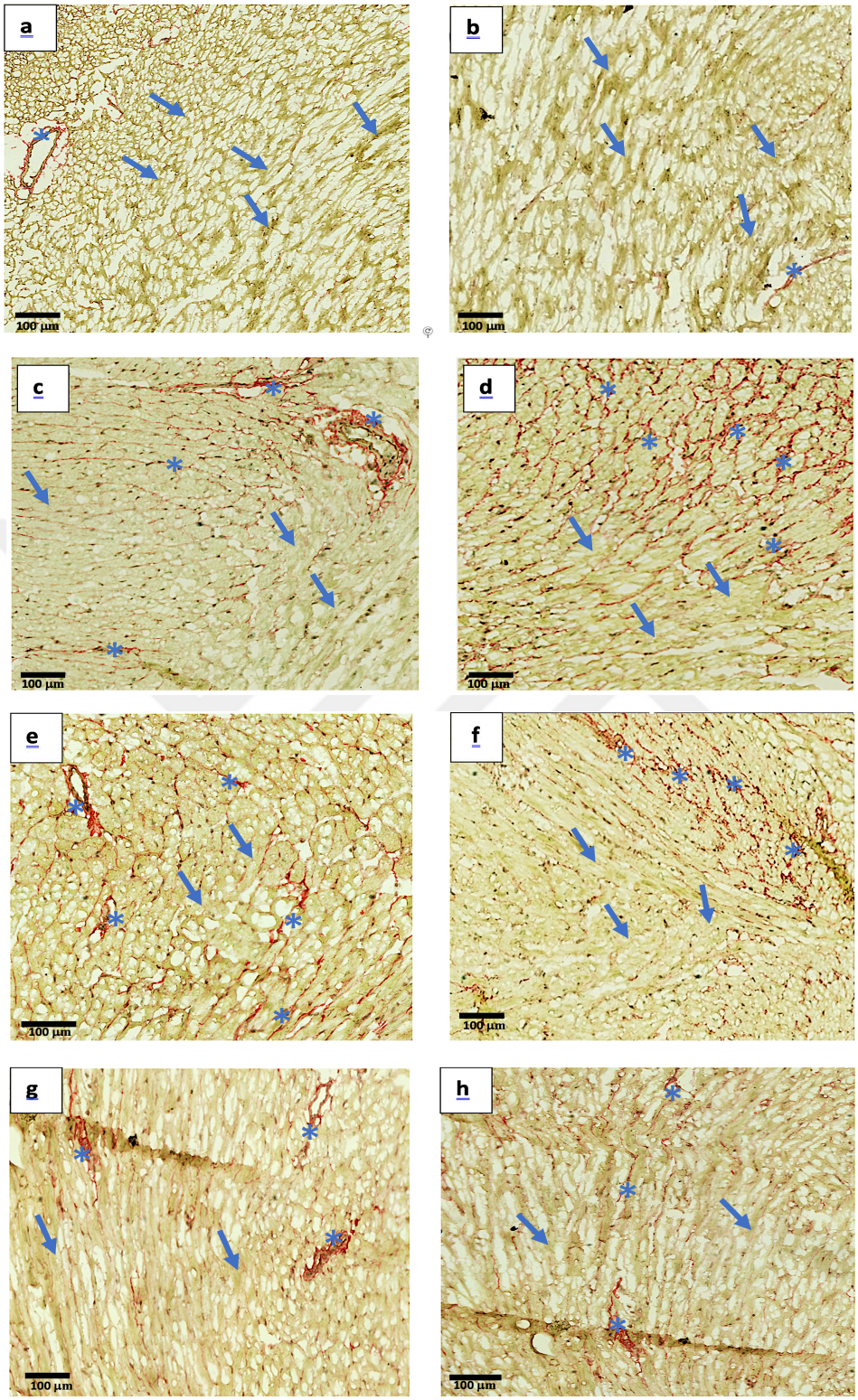
Picrosirius red boyalı kalp kesitleri morfolojik olarak gruplar arasında karşılaştırıldığında; pozitif kontrol grubu ve optimum (düşük) doz tedavi grubuna ait farelerin kalp kesitlerinde negatif kontrol grubuna kıyasla özellikle interstisyel alanda ve bazı perivasküler alanlarda kollajen lif miktarının artışına bağlı kırmızı renkli alanların arttığı gözlenmiştir (Resim 27). Picrosirius ile boyalı kesitlerdeki kollajen liflerinin kapladığı alanın, kesit yüzey alanına oranına bakıldığında ve gruplar arasında bu oran karşılaştırıldığında; kollajen lif oranının (fibrozis) en az olduğu grup negatif kontrol grubu olarak saptanmıştır. En fazla kollajen lif oranı (fibrozis) ise pozitif kontrol grubunda gözlenmiştir. Bu iki kontrol grubu arasındaki ortalama kollajen lif oranının sayısal değerlerinin farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p< 0.05$). Negatif kontrol grubu ile optimum doz tedavi grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca pozitif kontrol grubu ile yüksek doz GL tedavi grubu arasında da ortalama kollajen lif miktarı (fibrozis) bakımından anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0.05$).



Resim 26. Negatif kontrol grubuna ait fare kalp dokusunun Picrosirius Red ile boyanmış 2 farklı transvers kesitinin ışık mikroskobik görüntüsü.

a. Fare kalp dokusunun Picrosirius Red ile boyanmış transvers kesitindeki epikardiyum, miyokardiyum (M), tabakaları ile sağ ventrikül (SaV) ve sol ventrikül (SV). Yıldız işareti: epikardiyum, oklar: subendotelyal alan.

b. Fare kalp dokusunun Picrosirius Red ile boyanmış başka bir transvers kesitindeki sol ventrikülünden bir kısım. Yıldız işareti: epikardiyum, * işareti: perivasküler bölge, oklar: subendotelyal alan.



Resim 27. Picrosirius Red ile boyanmış fare kalp dokusu kesitlerinden sol ventrikül miyokardiyum tabakasına ait ışık mikroskobik görüntüler. Kollajen lifleri kırmızı, kas lifleri sarı-kahverengi boyanmıştır.

* işaretleri: kollajen lifleri, oklar:kas liflerini göstermektedir.

a-b: Negatif kontrol grubu

(a: Perivasküler bölgede bulunan ince kollajen lifleri, b: miyokardiyumda interstisyel alandaki çok ince kollajen lifleri)

c-d: Pozitif kontrol grubu

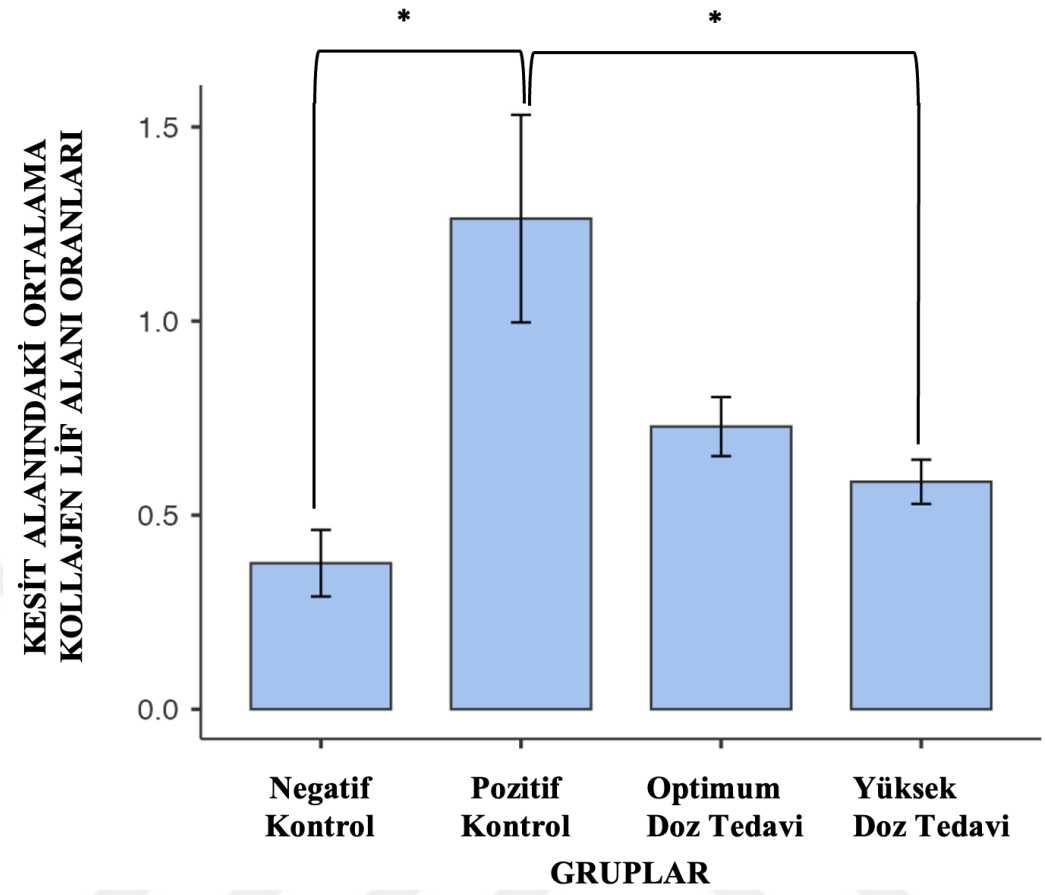
(c: Perivasküler bölgede bulunan negatif kontrol grubuna göre nispeten artmış kollajen lifleri, d: miyokardiyumda interstisyel alandaki negatif kontrol grubuna göre artmış ve kalınlaşmış kollajen lifleri)

e-f: Optimum doz tedavi grubu

(e: Perivasküler bölgede bulunan negatif kontrol grubuna göre nispeten artmış fakat pozitif kontrol grubuna göre daha ince yapıda olan kollajen lifleri, f: miyokardiyumda interstisyel alandaki artmış ve kalınlaşmış kollajen lifleri)

g-h: Yüksek doz tedavi grubu

(g: Perivasküler bölgede bulunan negatif kontrol grubuna göre nispeten kalınlaşmış kollajen lifleri, h: miyokardiyumda interstisyel alandaki artmış ve hafif belirginleşmiş kollajen lifleri)



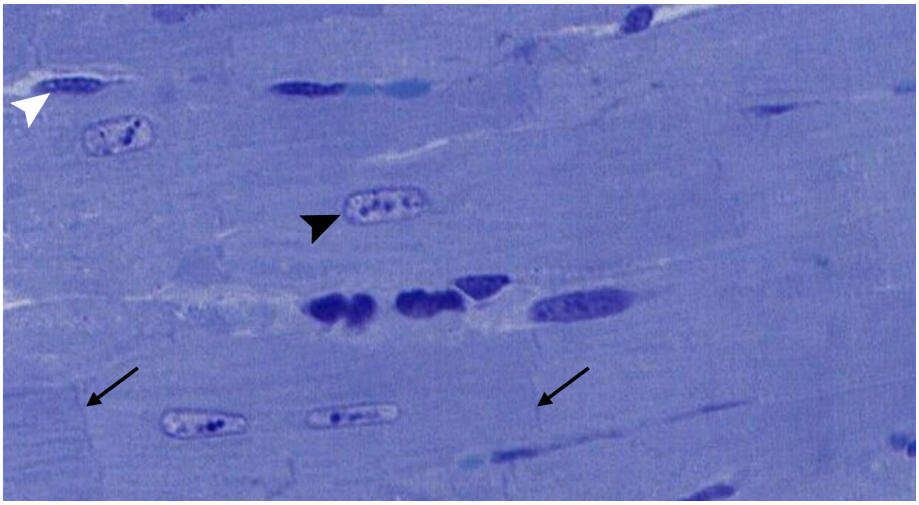
Grafik 1. Kesitlerdeki birim alana düşen kollajen liflerinin (kollajen lif alanı/kesit alanı) gruplar arası karşılaştırılması
(*: $p<0.05$ İstatiksel anlamlı farkı ifade etmektedir.)

4.1.2. Toluidin Mavisi Boyama Bulguları

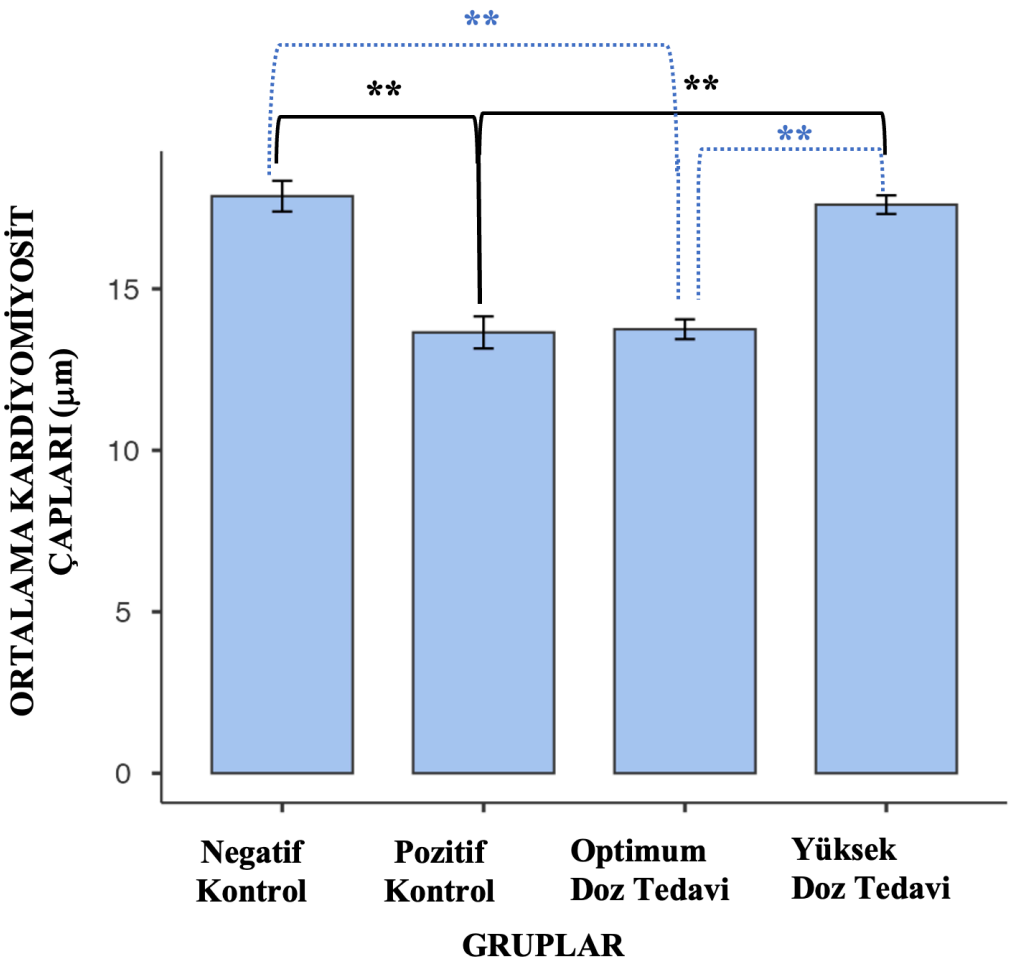
Karbonmonoksit zehirlenmesinin kardiyomiyositlerde meydana getirdiği dejenerasyonun tespiti ve GLun kardiyomiyosit dejenerasyonuna etkisinin incelenebilmesi için yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanmıştır. Toluidin mavisi ile boyanan kalp kesitlerinin ışık mikroskobik incelemesinde; kardiyomiyosit (miyofibriller) sitoplazması mavi, nükleusları soluk mor, nükleus kromatinleri koyu mor-siyah, fibroblast nükleusları koyu mavi, bağ dokusu ise soluk mavi olarak boyanmıştır (Resim 28). Toluidin mavisi boyalı yarı ince kesitlerin ışık mikrograflarındaki kardiyomiyosit çapları gruplar arasında karşılaştırılmıştır (Resim 29).

Negatif kontrol grubunda (Resim 30); normal morfolojide kardiyomiyositler (miyofibriller) ve kardiyomiyositler arasında seçilebilen dar interstisyel aralıklar (endomisyum) gözlenmiştir. Pozitif kontrol grubunda (Resim 31); kesitlerde yer yer kardiyomiyosit dejenerasyonunu gösteren sitoplazmik parçalanma ve miyofibrillerde kayıp, düzensiz dağılım, enine çizgilenme kaybı ve interstisyel ödem gözlenmiştir. Optimum (düşük) doz tedavi grubunda (Resim 32); kesitlerin bazı alanlarında miyofibril düzensizliği ve kıvrımlı-dalgalı yapının artışı, artmış kıvrımlı yapıya sahip miyofibrillerde enine çizgilenme kaybı ve bu alanlarda interstisyel ödem fark edilmiştir. Yüksek doz tedavi grubunda ise (Resim 33); kardiyomiyositlerin çoğu normal morfolojilerini korumuş görünümdedir ve kardiyomiyositlerin arasında hafif interstisyel ödem gözlenmiştir. Toluidin mavisi boyalı kesitlerin ışık mikroskobik görüntüleri gruplar arasında kıyaslandığında (Resim 34-35); miyofibril dejenerasyonu (sitoplazmik parçalanma ve miyofibril kaybı) en fazla pozitif kontrol grubunda; en az ise negatif kontrol grubunda gözlenmiştir. Ayrıca interstisyel ve perivasküler alanda ekstraselüler matriks artışı ve ödemin en fazla gözlendiği grup pozitif kontrol grubu; en az gözlendiği grup ise negatif kontrol grubu olmuştur. Düşük doz tedavi grubunda miyofibril kaybı ve interstisyel ödem pozitif kontrol grubuna kıyasla daha az gözlenmiştir fakat miyofibrillerdeki kıvrımlı-dalgalı görünüm ve düzensizlik diğer gruplara göre artmış bulunmuştur. Yüksek doz tedavi grubunda, interstisyel ve perivasküler ödem ile miyofibrillerde bozulma ve düzensizlik negatif kontrol grubuna göre daha fazla; pozitif kontrol ve optimum doz tedavi grubuna göre ise daha az miktarda görülmüştür.

Kesitler taratıldıktan sonra görüntülerin analizinde; ölçümü yapılan kardiyomiyositlerin ortalama çapları gruplar arasında karşılaştırıldığında (Resim 29, Grafik 2); ortalama kardiyomiyosit çapı en fazla olan grup negatif kontrol grubu; kardiyomiyosit çapı en düşük grup ise pozitif kontrol grubu olarak saptanmıştır. Bununla birlikte pozitif kontrol ve optimum doz tedavi grubundaki ortalama kardiyomiyosit çapı negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı şekilde ($p<0.001$) düşük bulunmuştur. Pozitif kontrol grubu ve optimum doz tedavi grubu, yüksek doz GL tedavi grubu ile kıyaslandığında da ortalama kardiyomiyosit çapı bakımından istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı ($p<0.001$) azalma izlenmiştir.

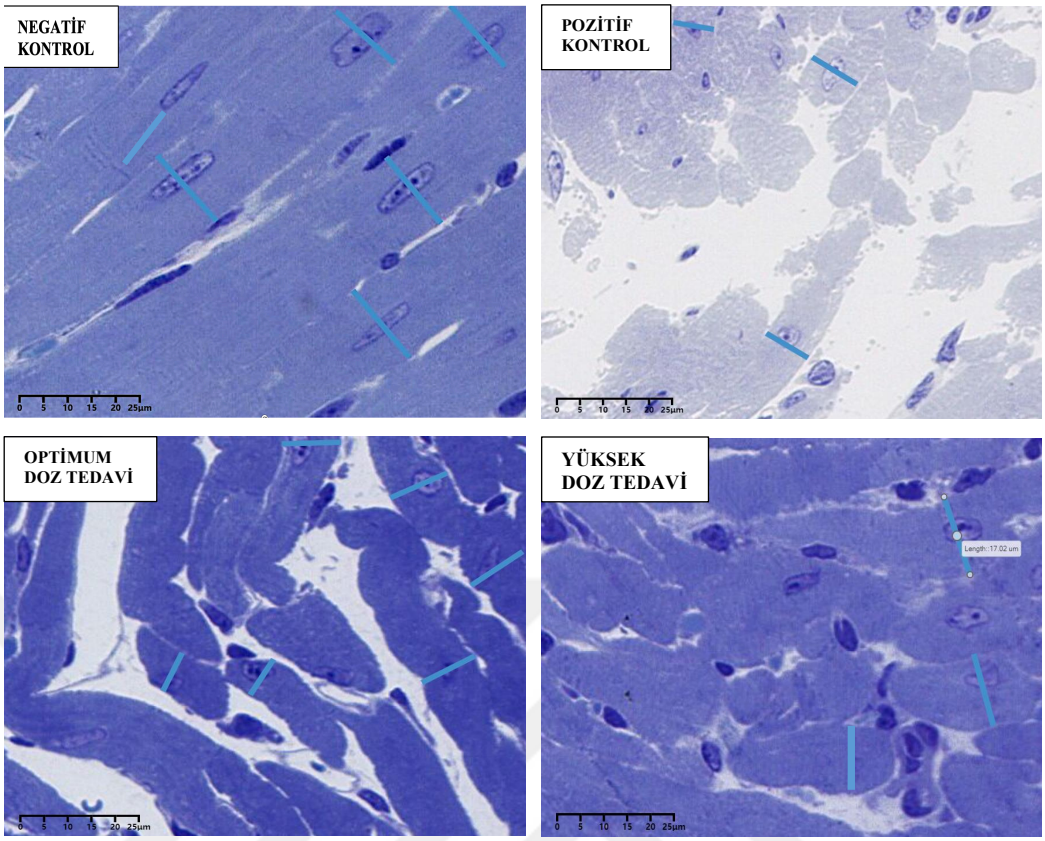


Resim 28. Negatif kontrol grubuna ait fare kalp dokusunun toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitindeki bir kardiyomiyositin ışık mikroskobik görüntüsü (X300). Normal morfolojiye sahip kardiyomiyositlerin; sitoplazması mavi, santral yerleşimli tek olan nükleus açık mavi (siyah ok başı), nükleolus koyu mavi-siyah renkte gözlenmektedir. İnterstisyel alanda yerleşmiş olan fibroblast nükleusları (beyaz ok başı) ise koyu mavi-mor renkte boyanmıştır. Hücreler arasındaki bağlantı noktaları olan interkalar diskler (siyah ince oklar), miyofibril seyrine dik şekilde ince koyu çizgiler olarak seçilmektedir.

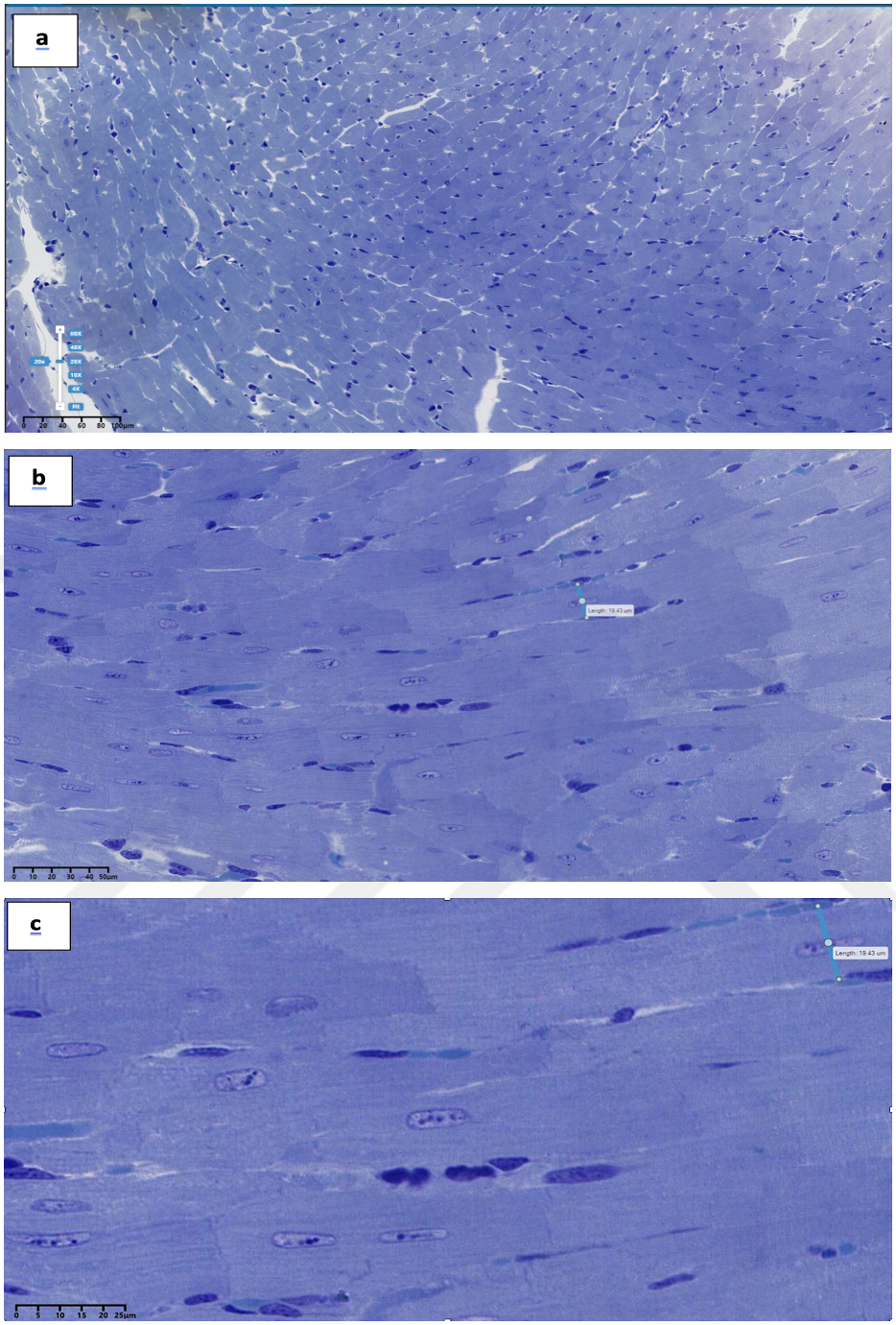


Grafik 2. Kesitlerdeki ortalama kardiyomiyosit çaplarının gruplar arası karşılaştırılması

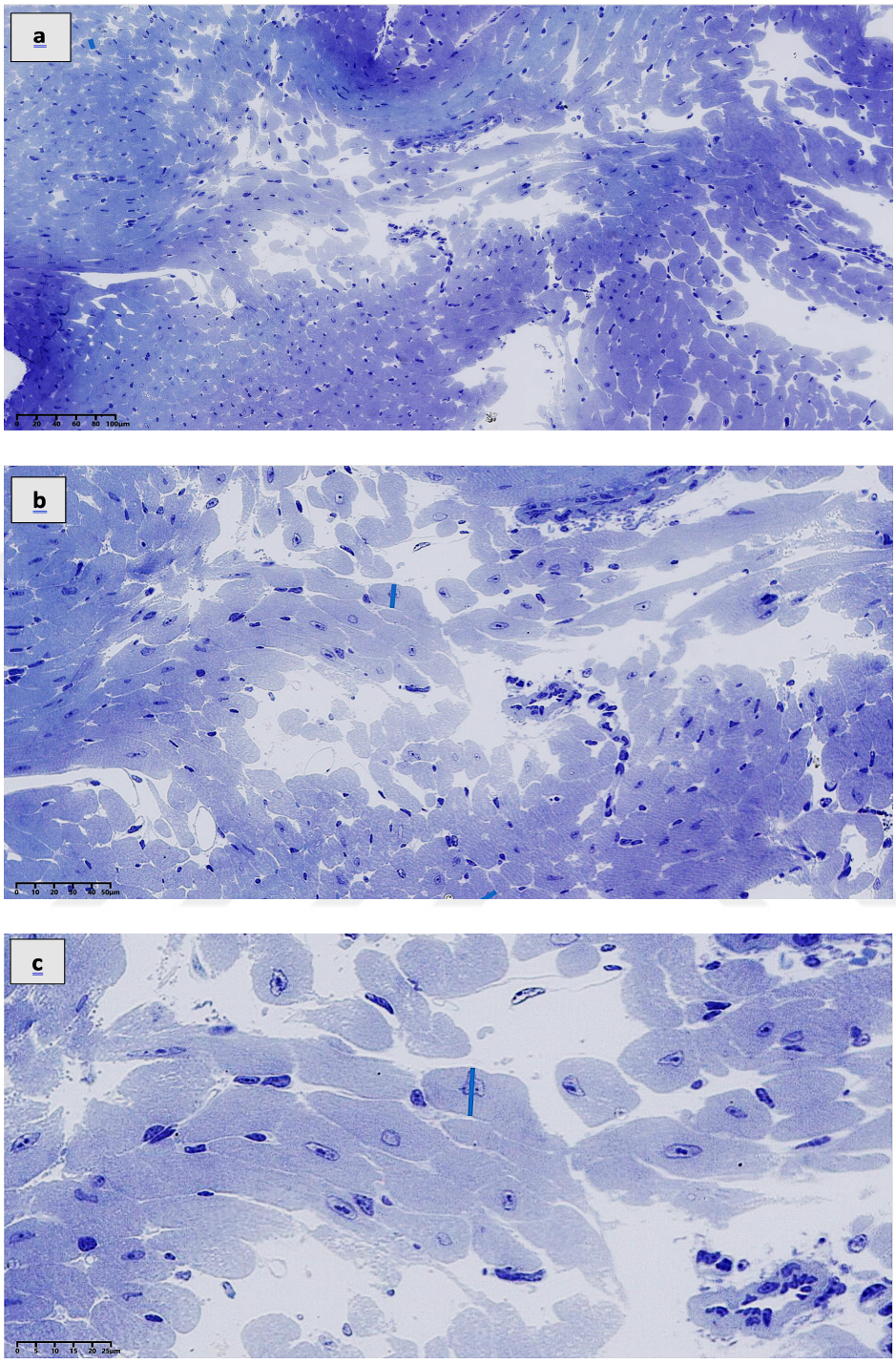
(**: $p<0.001$ istatiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı farkı ifade etmektedir).



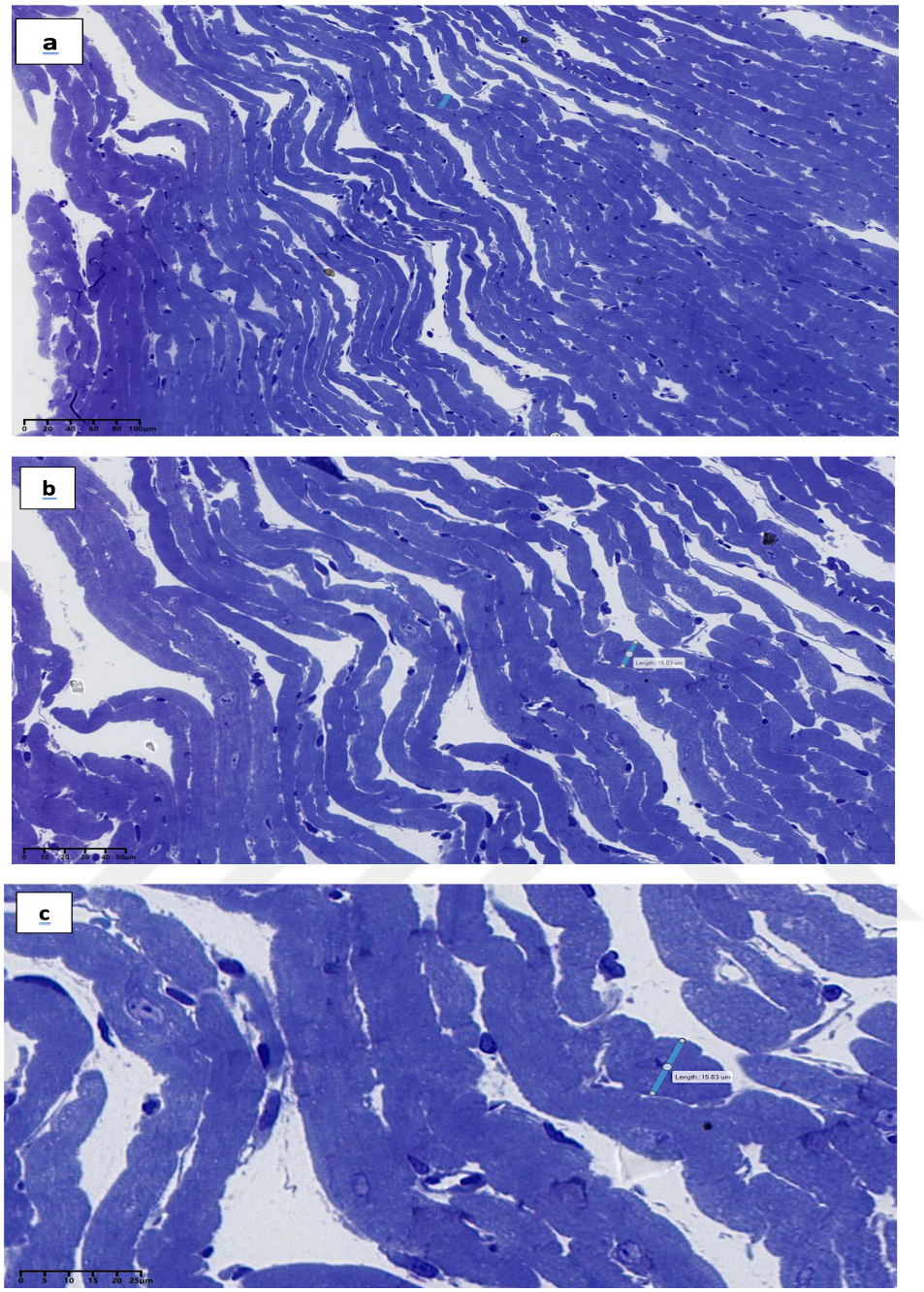
Resim 29. Toluidin mavisi ile boyanmış kalp dokusu (apeks miyokardiyumu) yarı ince kesitlerindeki kardiyomiyosit çaplarının eşit büyütmeli ışık mikroskobik görüntülerinin gruplar arası karşılaştırması. Pozitif kontrol ve optimum doz tedavi gruplarındaki farelere ait yarı ince kesitlerde, negatif kontrol ve optimum doz tedavi grupları ile kıyaslandığında; miyofibril dejenerasyonuna bağlı kardiyomiyosit çaplarında azalma görülmüştür. (Mavi çizgiler: temsili kardiyomiyositlerin çaplarını göstermektedir.)



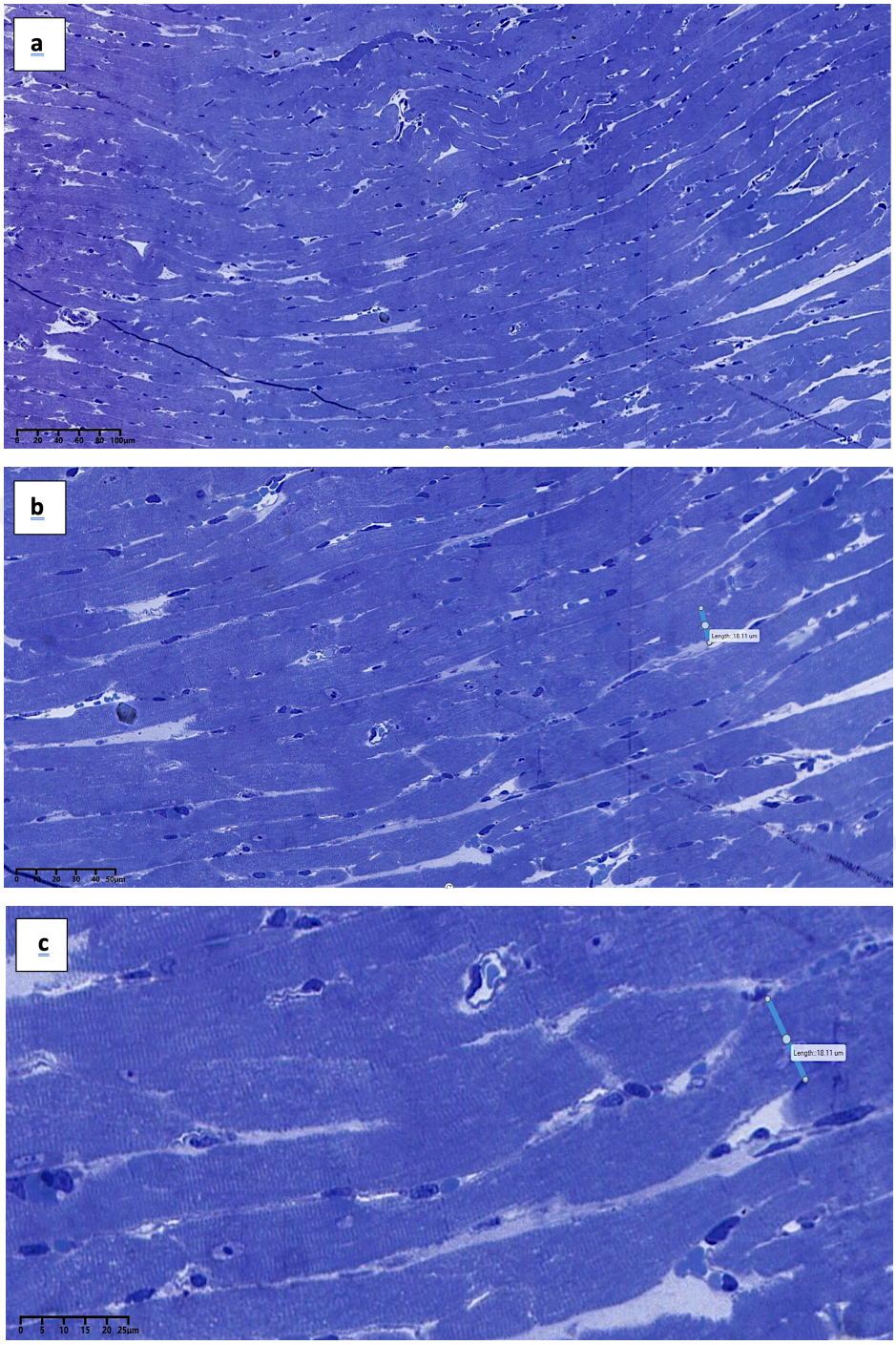
Resim 30. Negatif kontrol grubuna ait fare kalp dokusunun toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitinin görüntüsü. **a)** Fare kalp dokusunun apeks bölgesinin miyokardiyumuna ait yarı ince kesit. **b)** Şekil a'daki kesitin 2x büyütülmüş görüntüsü, normal morfolojide kardiyomiyositler ve dar interstisyel alanlar. **c)** Şekil a'daki kesitten çap ölçümü yapılmış temsili bir kardiyomiyosit. Kardiyomiyositlerin düzenli dizilişi ve hücreler arasındaki interkalar diskler seçilebilmektedir.



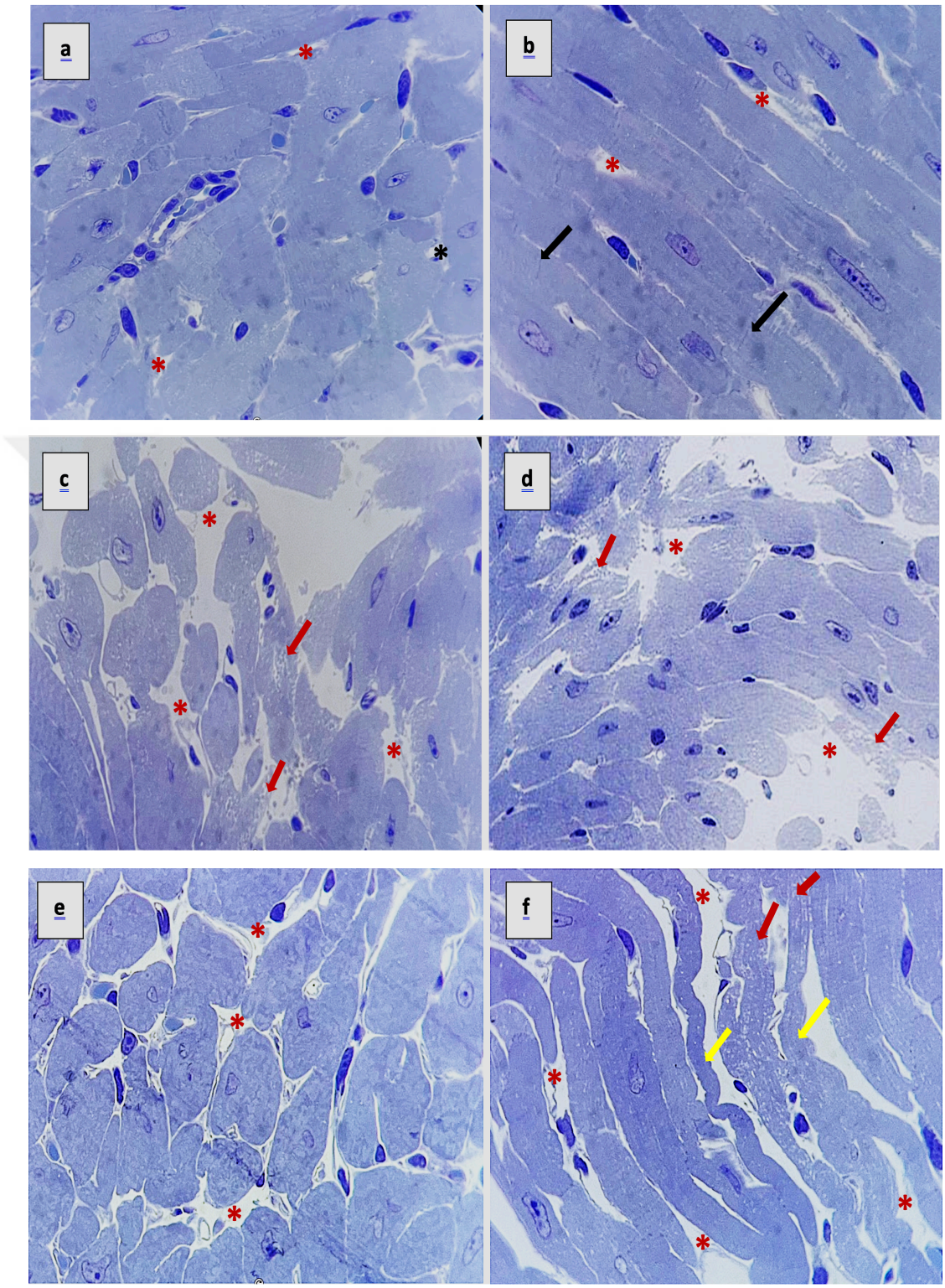
Resim 31. Pozitif kontrol grubuna ait fare kalp dokusunun toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitinin ışık mikroskobik görüntüsü. **a)** Fare kalp dokusunun apeks bölgesinin miyokardiyumuna ait yarı ince kesit. **b)** Şekil a'daki görüntünün 2x daha büyütülmüş görüntüsü, yer yer dejenere, dağınık kas lifleri ve artmış interstisyel alan. **c)** Şekil a'daki kesitten çap ölçümü yapılmış temsili bir kardiyomiyosit. Mikrografta kardiyomiyosit dejenerasyonunu gösteren sitoplazmik parçalanmalar (kırmızı ok) ve miyofibrillerin düzensizliği fark edilmiştir.

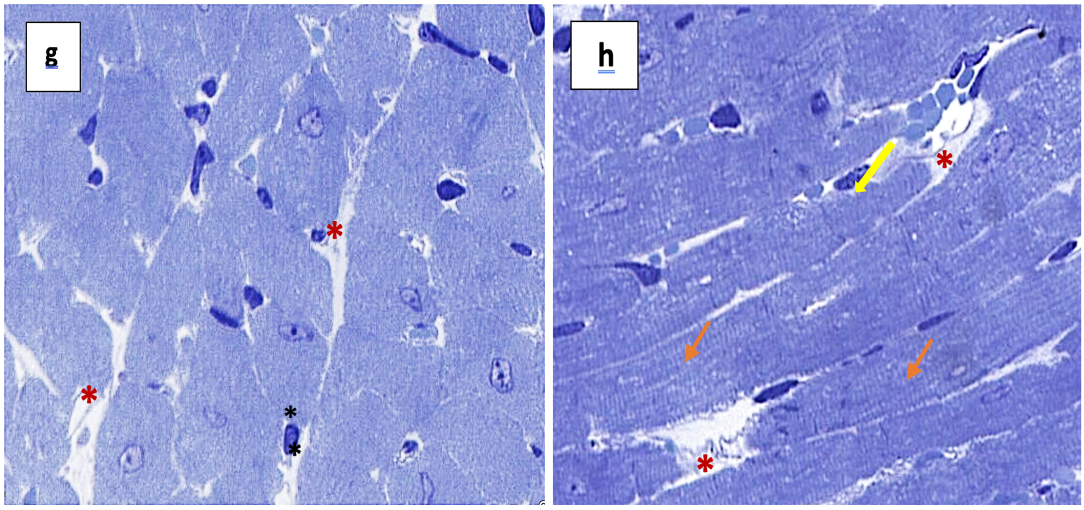


Resim 32. Optimum doz tedavi grubuna ait fare kalp dokusunun toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitinin ışık mikroskobik görüntüsü. **a)** Fare kalp dokusunun apeks bölgesinin miyokardiyumuna ait yarı ince kesit. **b)** Şekil a'daki görüntünün 2x daha büyütülmüş görüntüsü. Dağınık, yer yer incelmiş ve morfolojisi bozulmuş kontrakte kas lifleri ve artmış interstisyel alan. **c)** Şekil a'daki kesitten çap ölçümü yapılmış temsili bir kardiyomiyosit. Daha büyük büyütmeli bu mikrografta bazı kas liflerinde kıvrımlı (dalgalı) yapının artmış olduğu ve kardiyomiyositlerin düzensizleştiği görülmüştür.



Resim 33. Yüksek doz tedavi grubuna ait fare kalp dokusunun toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitinin ışık mikroskobik görüntüsü. **a)** Fare kalp dokusunun apeks bölgesinin miyokardiyumuna ait yarı ince kesit. **b)** Şekil a'daki görüntünün 2x daha büyütülmüş görüntüsü. Çoğu normal morfolojide kas lifleri ve hafif interstisyel ödem. **c)** Şekil a'daki kesitten çap ölçümü yapılmış temsili bir kardiyomiyosit.


a
b
c
d
e
f

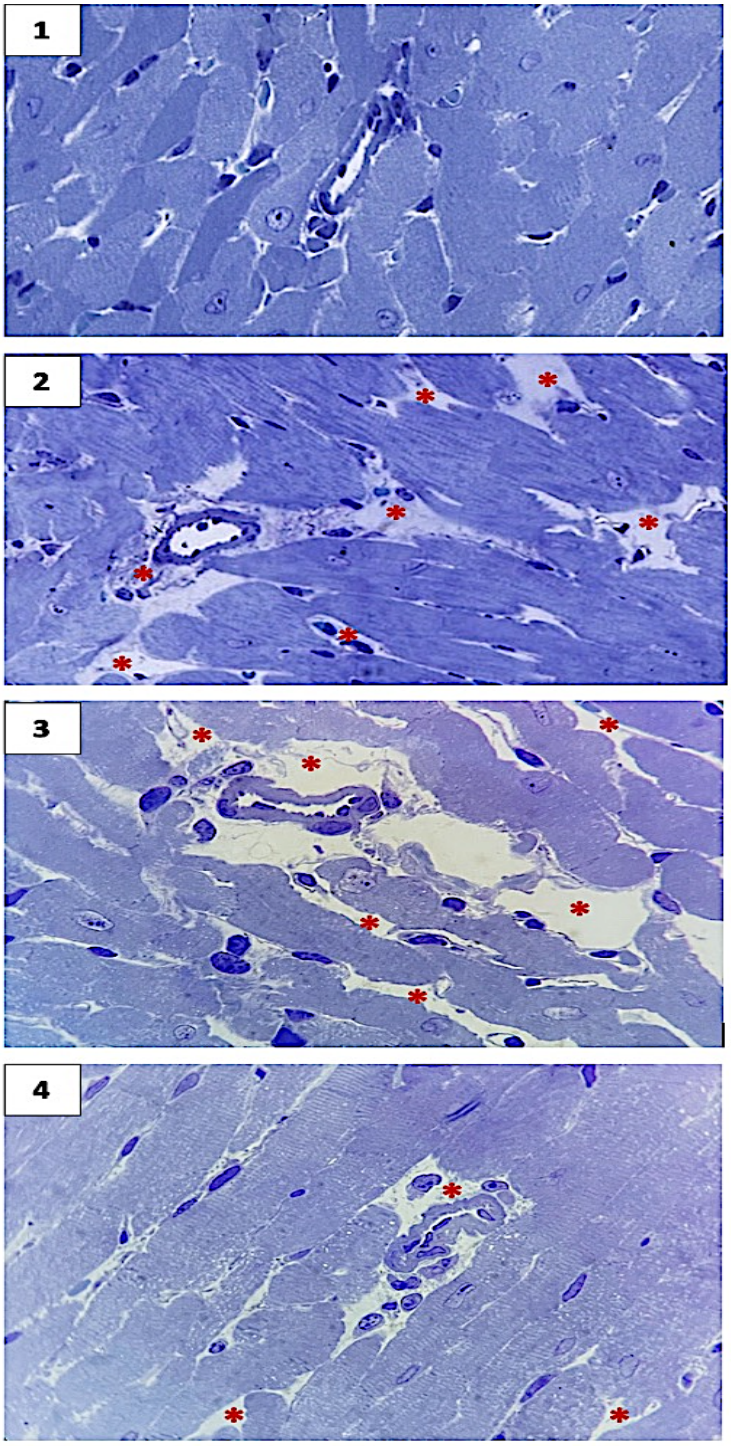


Resim 34. Toluidin mavisi ile boyanmış kalp dokusu yarı ince kesitlerinin (apeks miyokardiyumu) ışık mikroskobik görüntüsünün gruplar arası karşılaştırması (X200). **a-b)** Negatif kontrol grubuna ait fare kalbi kardiyomiyositlerinin transvers ve longitudinal görüntüleri (X200). Normal morfolojide kardiyomiyositler, enine çizgilenmeler, interkalar diskler (siyah oklar) ve dar interstisyel alanlar (* işaretleri) görülmüştür.

c-d) Pozitif kontrol grubuna ait fare kalbi kardiyomiyositlerinin transvers ve longitudinal görüntüleri (X200). Negatif kontrol grubundakilere kıyasla yer yer incelmiş; dejenere-sitoplazması parçalanmış (kırmızı oklar), dağınık miyofibriller, artmış interstisyel alan (* işaretleri) ve enine çizgilenmede bozulma görülmüştür.

e-f) Optimum doz tedavi grubuna ait fare kalbi kardiyomiyositlerinin transvers ve longitudinal görüntüleri (X200). Negatif kontrol grubundakilere kıyasla yer yer incelmiş, düzensiz, sitoplazması dejenere olmuş (kırmızı ok), kıvrımlı-dalgalı yapı gösteren miyofibriller (sarı oklar) ve artmış interstisyel alanlar (* işaretleri) seçilmektedir. Kıvrımlı (dalgalı) yapı gösteren miyofibrillerde enine çizgilenmenin bozulduğu görülmüştür.

g-h) Yüksek doz tedavi grubuna ait fare kalbi kardiyomiyositlerinin transvers ve longitudinal görüntüleri (X200) Negatif kontrol grubuna benzer şekilde çoğunluğu normal morfolojide kardiyomiyositler, enine çizgilenmeler (turuncu oklar) ve hafif interstisyel ödem (* işaretleri) görülmüştür. Kıvrımlı-dalgalı yapıda bozulmuş miyofibrillere (turuncu ok) düşük doz tedavi grubundakilere kıyasla daha az rastlanmıştır.



Resim 35. Toluidin mavisi ile boyanmış fare kalp dokusu yarı ince kesitlerinde (apeks miyokardiyumu) perivasküler alanların ışık mikroskobik görüntüsünün gruplar arası karşılaştırması.

1) Negatif kontrol grubuna ait temsili bir fare kalp dokusu kesitindeki perivasküler alan (X200). Perivasküler bölgede de interstisyel alanlarda da normal morfolojide ve miktarda bağ dokusu gözlenmiştir.

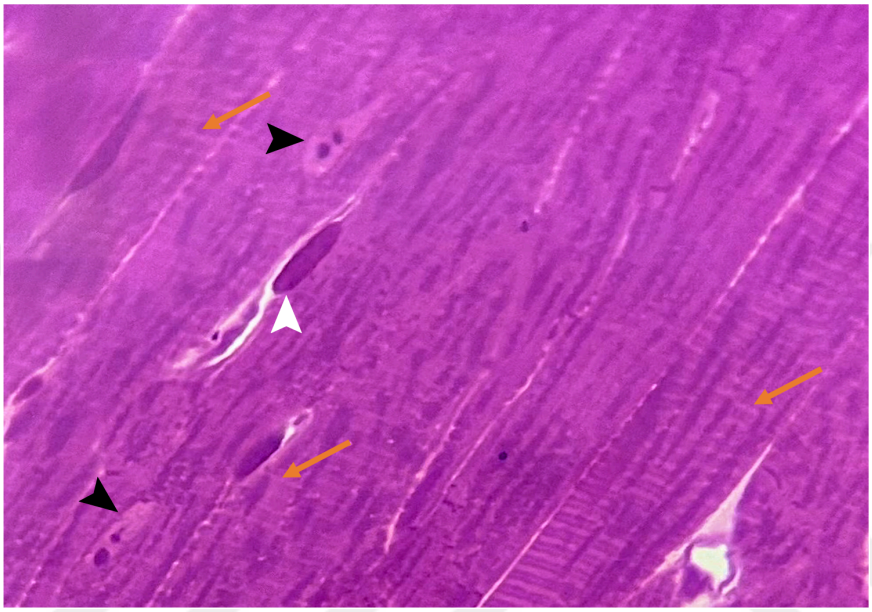
2) Pozitif kontrol grubuna ait temsili bir fare kalp dokusu kesitindeki perivasküler alan (X200). Negatif kontrol grubundakilere kıyasla perivasküler alanda da interstisyel alanda da miyofibril kaybı ve ödem (* işaretleri) gözlenmiştir.
3) Optimum doz tedavi grubuna ait temsili bir fare kalp dokusu kesitindeki perivasküler alan (X200). Negatif kontrol grubundakilere kıyasla perivasküler alanda da interstisyel alanda da genişleme (ödem) (* işaretleri) belirgin olarak gözlenmiştir.
4) Yüksek doz tedavi grubuna ait temsili bir fare kalp dokusu kesitindeki perivasküler alan (X200). Negatif kontrol grubundakilere kıyasla perivasküler alanda da interstisyel alanda da hafif ödem ve ekstraselüler matriks artışı (* işaretleri), kardiyomiyositlerde hafif sitoplazmik dağılmalar gözlenmiştir. Bu artış pozitif kontrol grubuna göre oldukça az miktardadır.

4.1.3. Polikromatik Boyama Bulguları

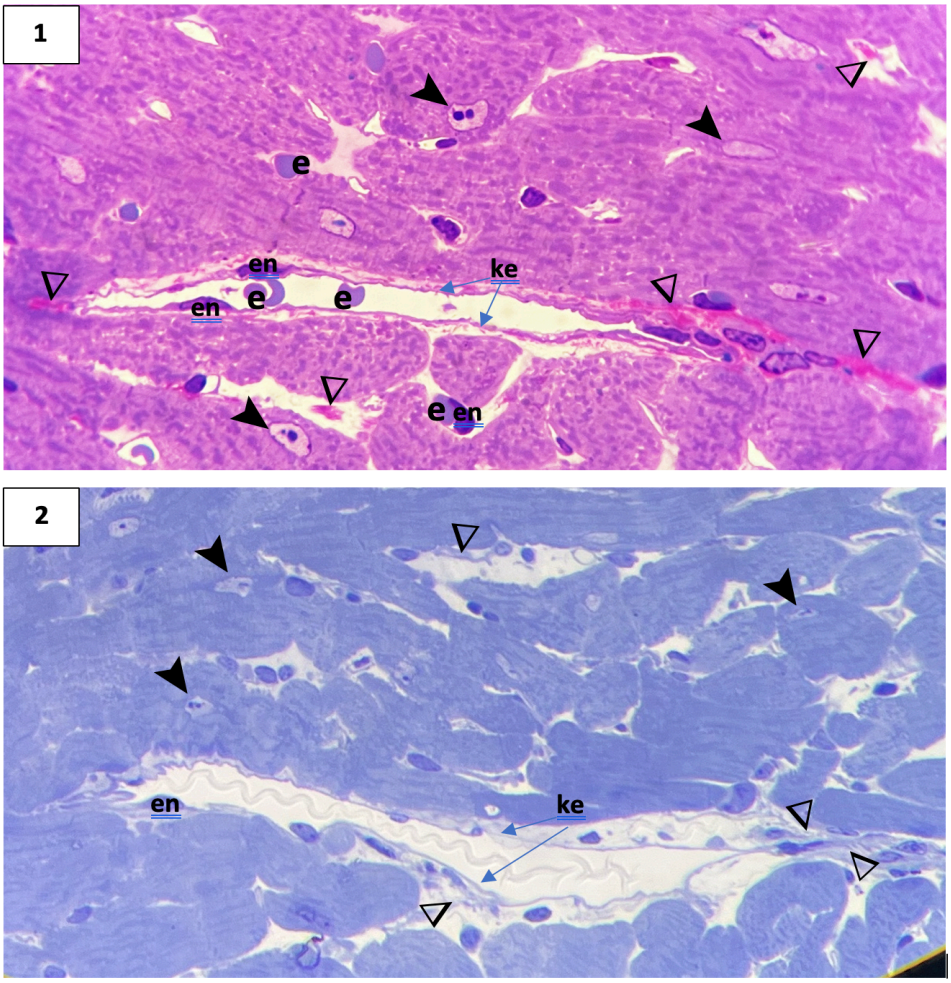
Yarı ince kesitlerin ışık mikroskobik görüntülenmesinde; hücresel yapıların morfolojik olarak daha iyi incelenebilmesi ve ayırt edilebilmesi için toluidin mavisine alternatif olarak polikromatik boyama (106) yapılmıştır.

Fare kalplerinden alınan yarı ince kesitlerin polikromatik boyamasında; miyofibriller mor, sitoplazma açık mor, nüklear kromatinler çok koyu mor (siyaha dönük), mitokondriler koyu mor, eritrositler mor-pembe, kollajen lifleri canlı -kırmızı pembe renkte görüntülenmiştir. Kardiyomiyositlerin nükleusları fibroblast nükleuslarına göre daha açık renkte boyanmıştır (Resim 36). Polikromatik boyamada, toluidin mavisi boyamadan farklı olarak bağ dokusundaki kollajen liflerinin ayırt edilmesinin daha kolay olduğu gözlenmiştir (Resim 37). Polikromatik boyanan kesitlerin ışık mikroskobik görüntüleri (Resim 38-39-40-41-42) gruplar arasında karşılaştırıldığında; toluidin mavisi boyama bulgularına benzer şekilde miyofibril dejenerasyonu (sitoplazmik parçalanma ve miyofibril kaybı), interstisyel ve perivasküler ödem en fazla pozitif kontrol grubunda; en az ise negatif kontrol grubunda gözlenmiştir. Düşük doz tedavi grubunda miyofibril dejenerasyonu, interstisyel ve perivasküler ödem pozitif kontrol grubuna kıyasla daha az; negatif kontrol ve yüksek doz tedavi grubuna göre ise daha fazla fark edilmiştir. Miyofibrillerdeki kıvrımlı-dalgalı görünüm ve düzensizlik de aynı şekilde negatif kontrol grubu ve yüksek doz tedavi grubuna kıyasla belirgin şekilde artış göstermiştir. Yüksek doz tedavi grubunda,

negatif kontrol grubuna göre daha fazla interstisyel ve perivasküler ödem, miyofibrillerde bozukluk ve düzensizlik görülürken; bu morfolojik değişiklikler pozitif kontrol ve optimum doz tedavi grubuna göre belirgin şekilde az tespit edilmiştir.



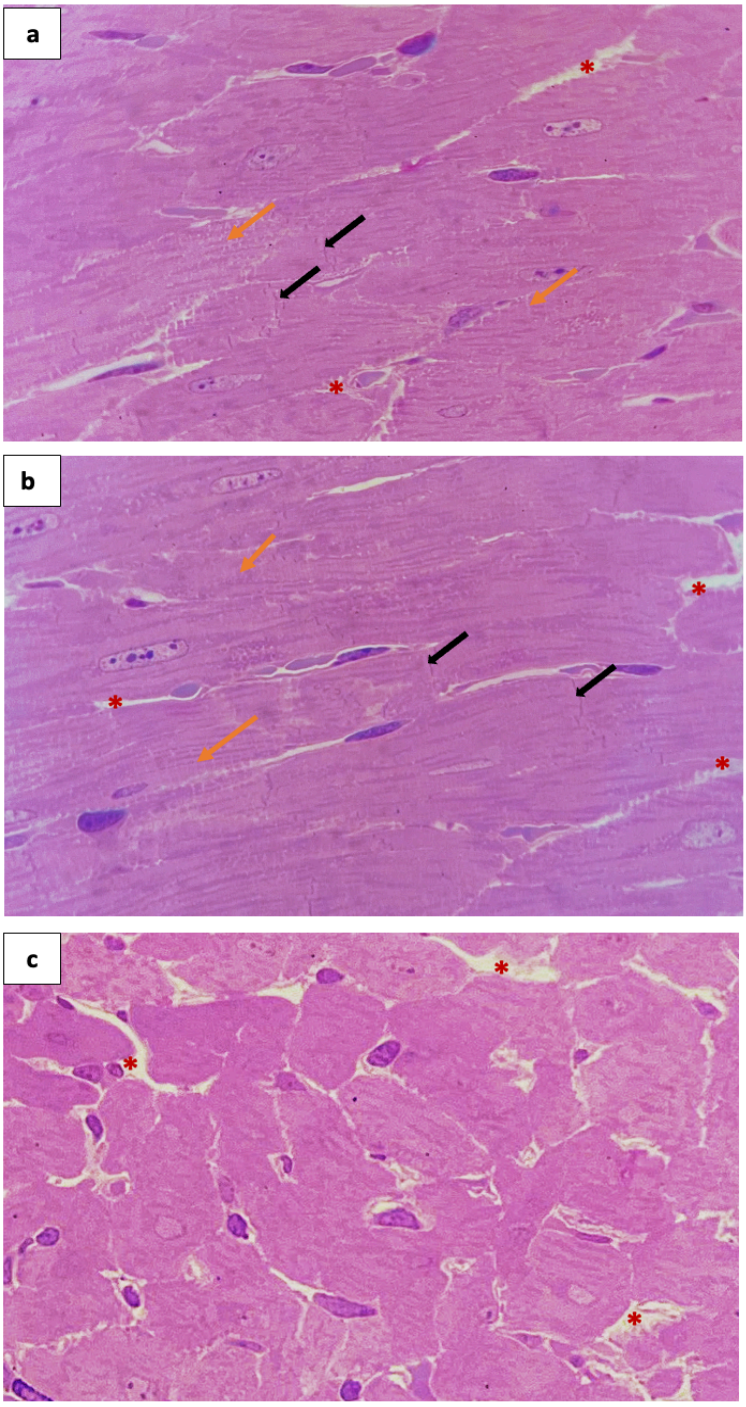
Resim 36. Fare kalbi yarı ince kesitinin polikromatik boyama ile boyanmış ve ışık mikroskobu ile görüntülenmiş mikrografı (X300). Miyokardiyum tabakasında bulunan kardiyomiyositlerin longitudinal görüntüsü. Açık mor renkte kardiyomiyosit nükleusları (siyah ok başı) ve koyu mor-siyah renkte nüklear kromatinleri, kardiyomiyosit sitoplazmasında belirgin şekilde seçilebilen koyu mor miyofibriller ve açık renkte enine çizgilenmeler (turuncu oklar) gösterilmiştir. Kardiyomiyositler arasındaki interstisyel alanda (endomisyum) daha koyu mor nükleuslere sahip fibroblastlar da (beyaz ok başı) gözlenmiştir.



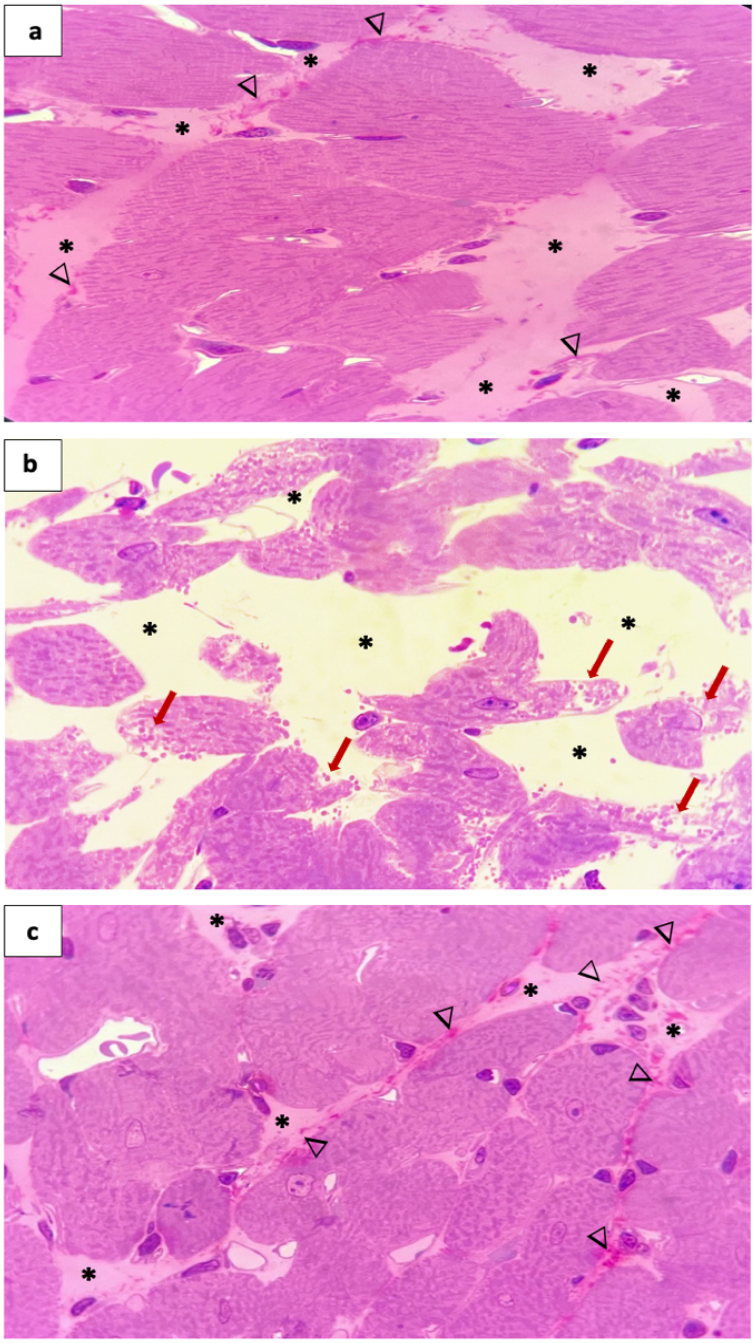
Resim 37. Optimum doz tedavi grubuna ait fare kalbi yarı ince kesitindeki perikapiller bölgenin polikromatik boyama (1. görsel) ve toluidin mavisi ile boyanmış (2. görsel) ve ışık mikroskobu ile görüntülenmiş mikrograflarının karşılaştırması (X300).

1: Fare miyokardiyumunda perikapiller bölgede ve interstisyel alanlarda bulunan kollajen liflerinin polikromatik boyama ile spesifik canlı pembe-kırmızı renkte boyanması. Polikromatik boyamada kollajen lifler, nükleuslar ve kardiyomiyositleri oluşturan miyofibriller toluidin mavisi boyamaya göre çok daha kontrastlı ve ayırt edilebilir şekilde boyanıp gösterilebilmektedir. (kollajen lifler: ∇ işaretleri, kardiyomiyosit nükleusleri: siyah ok başları, eritrositler: e, kapiller endoteli: ke, kapiller endoteli nükleusu: en olarak gösterilmiştir.)

2: Fare miyokardiyumunda perikapiller bölgede ve interstisyel alanlarda bulunan kollajen liflerinin toluidin mavisi boyama ile soluk mavi renkte boyanması. Polikromatik boyamaya göre farklı hücresel yapıların birbirinden ayırt edilmesi daha zordur.



Resim 38. Polikromatik boyanan ve ışık mikroskobik olarak görüntülenmiş negatif kontrol grubuna ait fare kalbi kesitlerindeki kardiyomiyositlerin longitudinal ve transvers görüntüleri (X200). Normal morfolojide kardiyomiyositlerin longitudinal **(a-b)** ve transvers **(c)** görüntüsü; enine çizgilenmeler (turuncu oklar), interkalar diskler (siyah oklar) ve dar interstisyel alanlar (* işaretleri) gözlenmiştir.

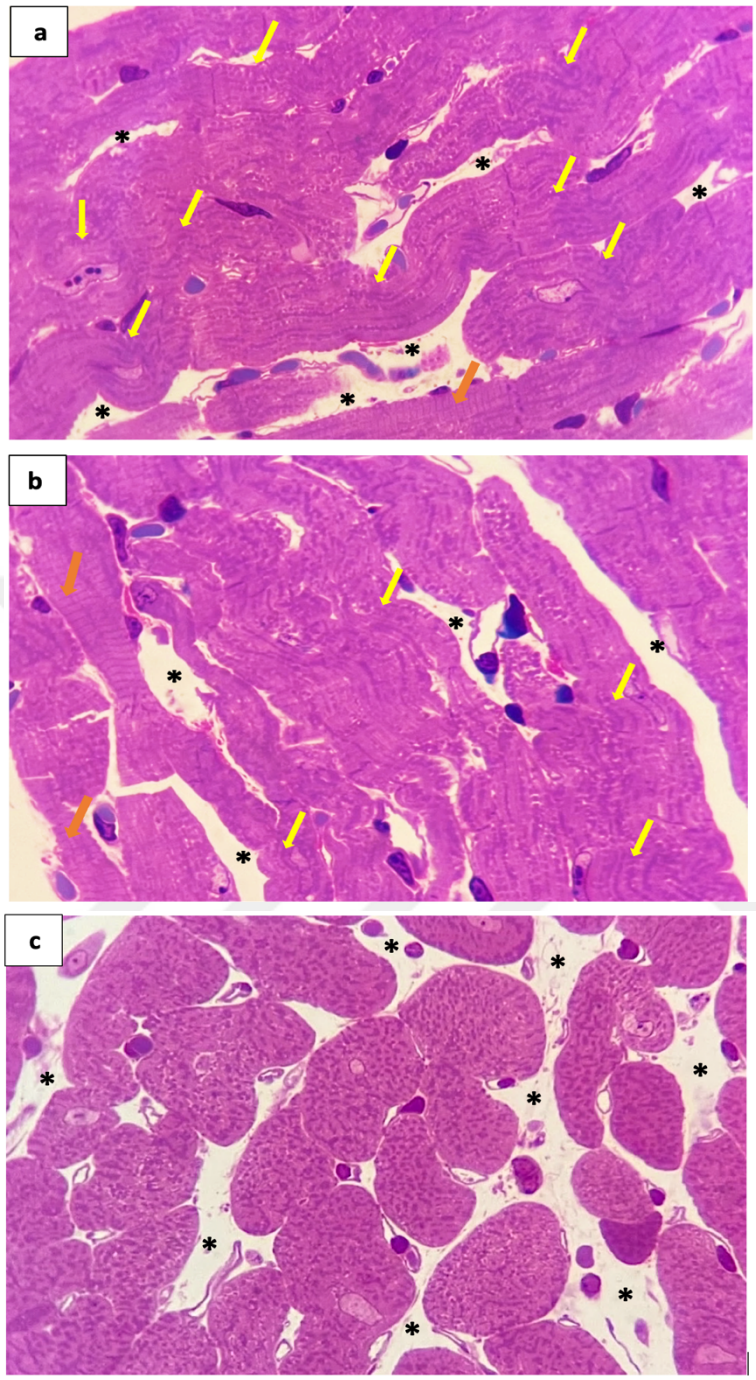


Resim 39. Polikromatik boyanan ve ışık mikroskobik olarak görüntülenmiş pozitif kontrol grubuna ait fare kalbi kesitlerindeki kardiyomiyositlerin longitudinal **(a-b)** ve transvers **(c)** görüntüleri (X200).

a) Miyofibril kaybı görülen kardiyomiyositler ve interstisyel aralıkta (* işaretleri) ekstraselüler matriksin (soluk pembe alanlar) belirgin artışı. İnterstisyel aralıkta seçilebilen, kesite denk gelen parlak pembe renkte kollajen lifleri (∇ işaretleri).

b) Dejenere-sitoplazması parçalanmış (kırmızı oklar), dağınık halde bulunan miyofibriller, artmış interstisyel alanlar (* işaretleri) ve kardiyomiyositlerin normal yapısında bozulma gözlenmiştir.

c) Kardiyomiyositler arasındaki interstisyel alanda (* işareti) artmış ekstraselüler matriks ve kollajen lifleri (∇ işaretleri) görülmüştür.

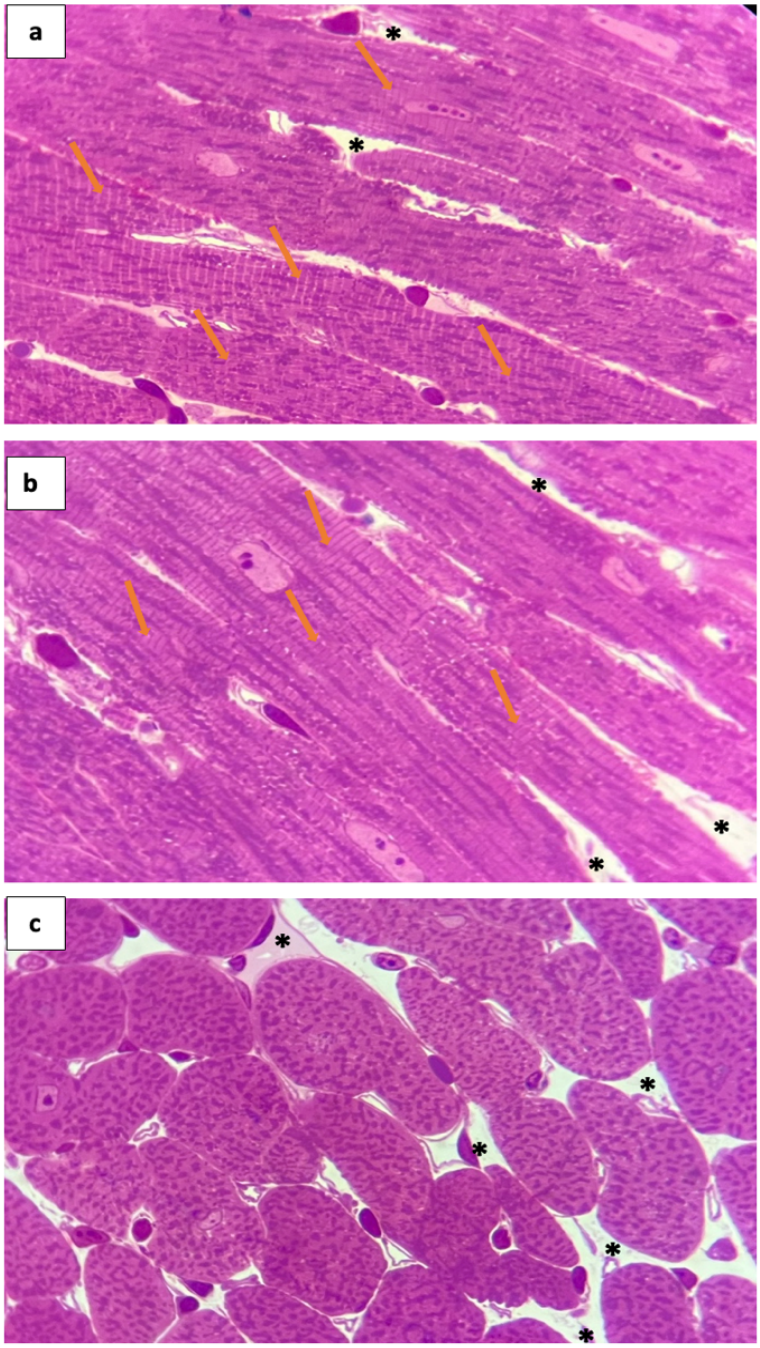


Resim 40. Polikromatik boyanan ve ışık mikroskobik olarak görüntülenmiş optimum (düşük) doz tedavi grubuna ait fare kalbi kesitlerindeki kardiyomiyositlerin longitudinal **(a-b)** ve transvers **(c)** görüntüleri (X200).

a-b) Düzensiz, sitoplazması dejenere olmuş (kırmızı ok), artmış kıvrımlı-dalgalı yapı gösteren miyofibriller (sarı oklar) ve artmış interstisyel alanlar (* işaretleri) seçilmektedir. Kıvrımlı (dalgalı) yapı gösteren miyofibrillerde (sarı oklar) enine

çizgilenmenin bozulduğu; aradaki bazı kardiyomiyositlerin ise morfolojisini ve enine çizgilenmesini koruduğu (kırmızı ok) gözlenmiştir.

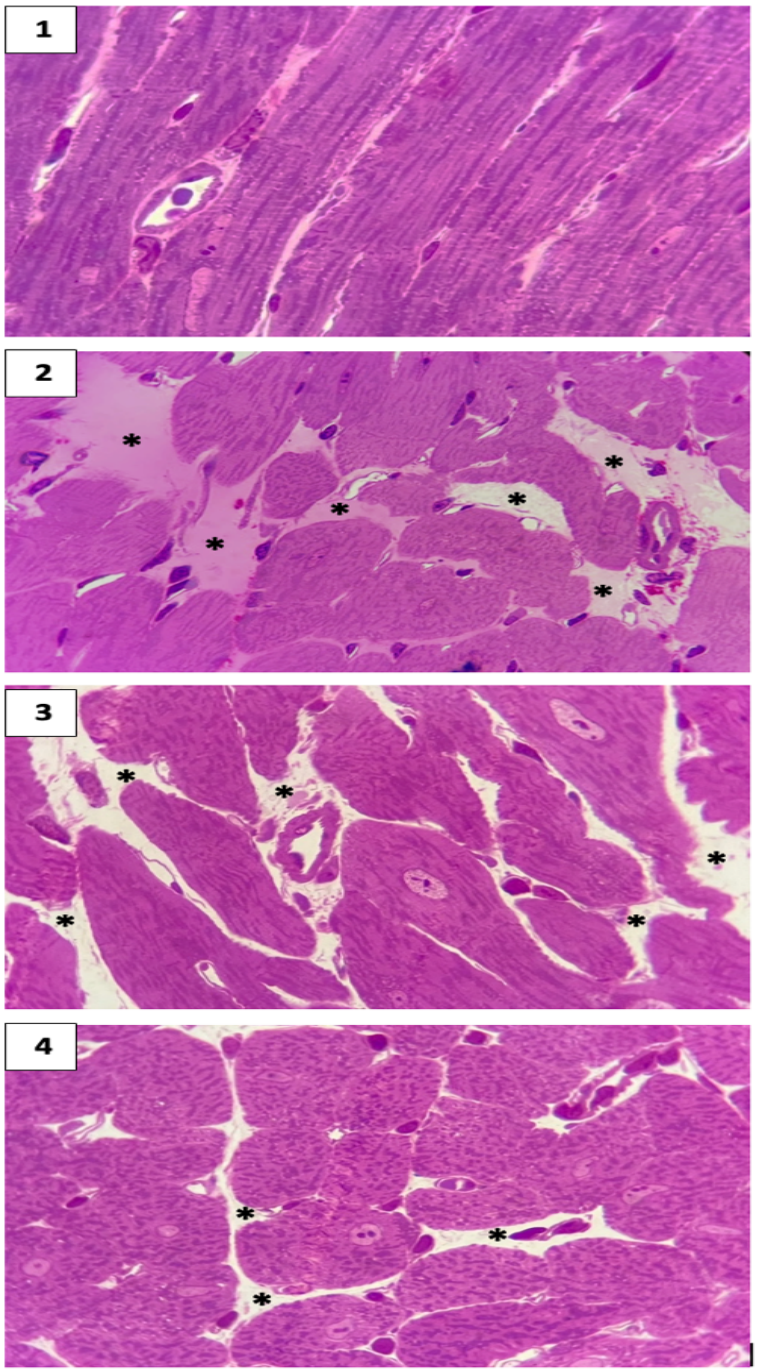
c) Kardiyomiyositlerin transvers görüntüsü olan bu mikrografta; kardiyomiyositlerin birbirlerinden ayrılarak interstisyel alanların genişlemesi ve ekstraselüler matriks artışı (* işaretleri) izlenmiştir.



Resim 41. Polikromatik boyanan ve ışık mikroskobik olarak görüntülenmiş yüksek doz tedavi grubuna ait fare kalbi kesitlerindeki kardiyomiyositlerin longitudinal **(a-b)** ve transvers **(c)** görüntüleri (X200)

a-b) Negatif kontrol grubuna benzer şekilde çoğunluğu normal morfolojide kardiyomiyositler, enine çizgilenmeler (turuncu oklar) ve yer yer hafif interstisyel ödem (* işaretleri) gözlenmiştir.

c) Kardiyomiyositlerin transvers görüntüsü olan bu mikrografta; kardiyomiyositlerin arasındaki interstisyel alanlarda hafif derecede ödem (* işaretleri) izlenmiştir.



Resim 42. Polikromatik boyama ile boyanmış kalp yarı ince kesitlerinde (apeks miyokardiyumu) perivasküler alanların ışık mikroskobik görüntüsünün gruplar arası karşılaştırması.

1) Negatif kontrol grubuna ait temsili bir fare kalbi kesitindeki perivasküler alan (X100). Perivasküler bölgede ve interstisyel alanlarda normal morfolojide ve miktarda bağ dokusu gözlenmiştir.

2) Pozitif kontrol grubuna ait temsili bir fare kalbi kesitindeki perivasküler alan (X100). Diğer gruplara kıyasla perivasküler alanda ve interstisyel alanlarda ekstraselüler matriks artışı (interstisyel ödem) (* işaretleri) belirgin olarak daha fazla gözlenmiştir.

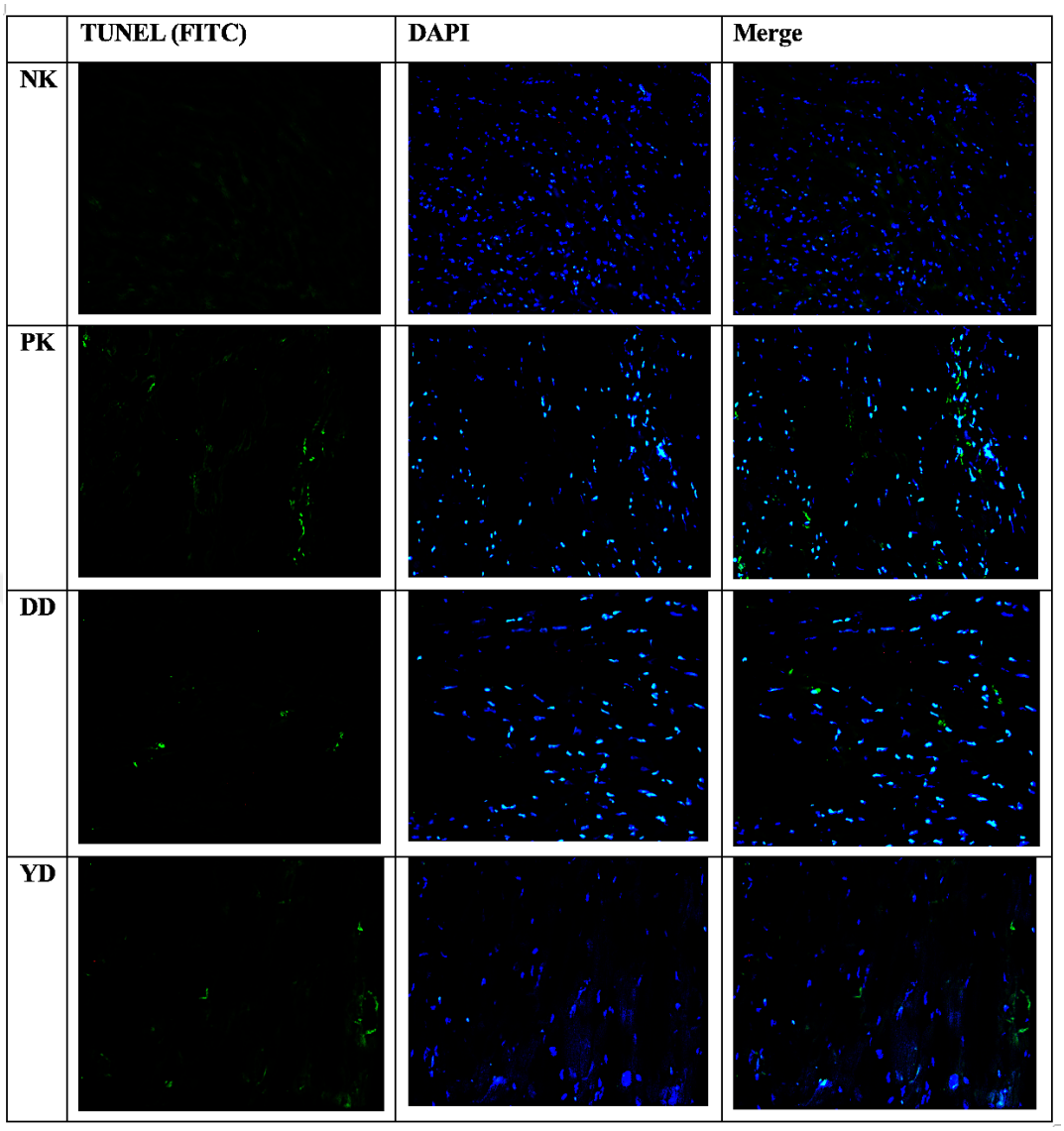
3) Optimum doz tedavi grubuna ait temsili bir fare kalbi kesitindeki perivasküler alan (X100). Negatif kontrol ve yüksek doz tedavi grubundakilere kıyasla perivasküler alanda da interstisyel alanda da genişleme (ödem) (* işaretleri) daha belirgin gözlenmiştir.

4) Yüksek doz tedavi grubuna ait temsili bir fare kalbi kesitindeki perivasküler alan (X100). Negatif kontrol grubundakilere kıyasla perivasküler alanda belirgin bir ödem ve ekstraselüler matriks artışı (* işaretleri) gözlenmese de hafif interstisyel ödem fark edilmiştir. Bu artış pozitif kontrol ve optimum doz grubuna göre az miktardadır.

4.2. TUNEL TESTİ BULGULARI

CO zehirlenmesinin kalp dokusunda meydana getirdiği apoptozisin ve GL'nin apoptozis üzerindeki etkisinin tespiti için TUNEL testi yapılmış ve apoptotik indeks gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

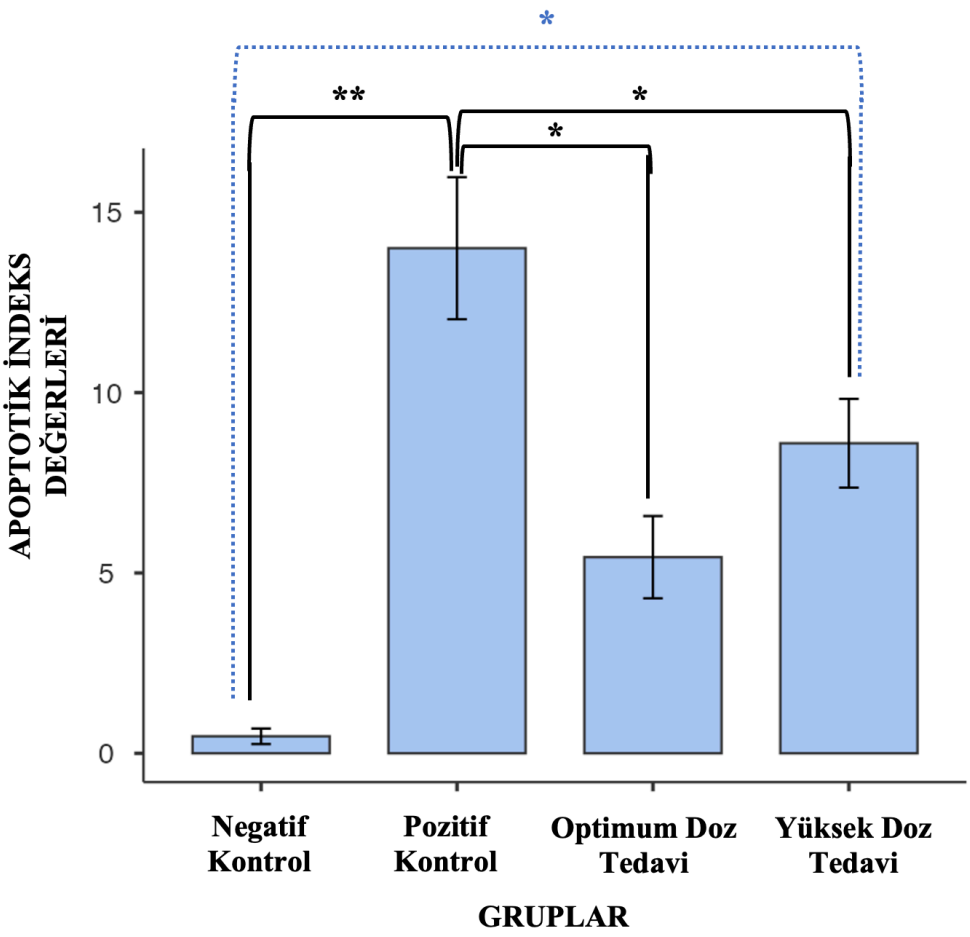
TUNEL testi analizi sonucunda; pozitif kontrol grubunda apoptotik indeks, negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0.001$) yüksek bulunmuştur. Apoptotik indeks pozitif kontrol grubunda; optimum doz ve yüksek doz tedavi grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek doz tedavi grubunda apoptotik indeks, negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0.05$) artmış bulunmuştur.



Resim 43. Fare kalp dokusu kesitlerinin TUNEL işaretleme sonrası floresan mikroskopi görüntüleri ve gruplar arası karşılaştırması (X40 büyütme).

Tüm gruplar karşılaştırıldığında TUNEL pozitif (apoptotik) hücre oranının en fazla görüntülendiği grup pozitif kontrol grubu; en az görüntülendiği grup ise negatif kontrol grubu olmuştur.

(NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, DD: düşük (optimum) doz tedavi, YD: yüksek doz tedavi grubu)



Grafik 3. TUNEL işaretli fare kalp dokusu kesitlerindeki apoptotik indekslerin gruplar arası karşılaştırması.

(**: $p<0.001$ istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı farkı,

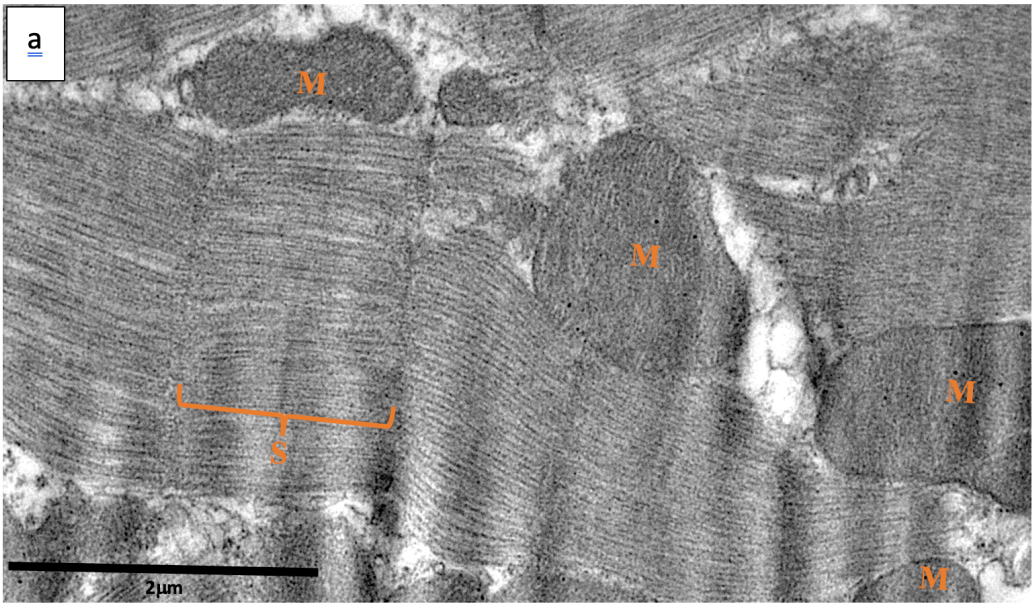
*: $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir.)

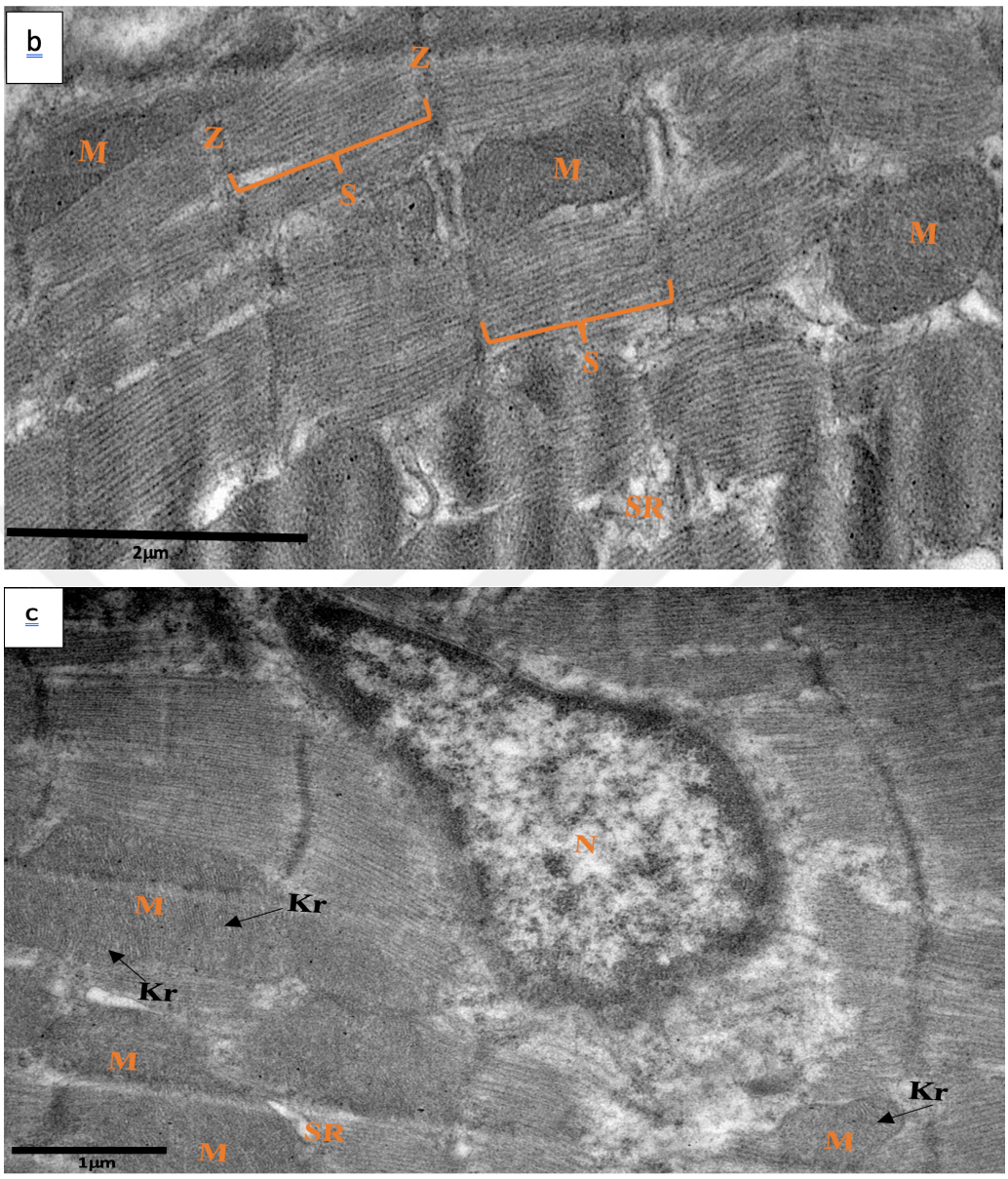
4.3. ELEKTRON MİKROSKOBU BULGULARI

Tüm gruplardaki farelerin kalp dokusu apeksinden alınan ince kesitlerin elektron mikroskop incelemesinde; miyokardiyumda bulunan kardiyomiyositler ve nükleusları, kardiyomiyositleri oluşturan miyofibriller, sarkomer yapıları, kardiyomiyositler arasındaki discus interkalarisler, mitokondriyonlar, sarkoplazmik retikulumlar, perivasküler ve interstisyel alandaki ekstraselüler matriks (kollajen lifler) görüntülenmiştir (Resim 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51,52)

Kardiyomiyositlerin sitoplazması sarkomerlerden meydana gelen miyofibrillerle doludur. Sarkomerler, iki Z çizgisi arasında bulunan birimler şeklinde görüntülenmiştir. Miyofibriller düzenli, mitokondriyonlar da kristalı yapıda gözlenmiştir.

Mikrografların incelemesinde; pozitif kontrol grubuna ait fare kalp dokusu kesitlerinde, diğer gruplara kıyasla perivasküler ve interstisyel alanlarda kollajen lifi artışı ve ödem gözlenmiştir. Ayrıca bu gruba ait kesitlerde, kondanse mitokondriler ve mitokondriyal krista kaybı göze çarpmıştır. Optimum doz tedavi gubuna ait fare kalp dokusu kesitlerinde ise; perivasküler ve interstisyel alanlarda pozitif kontrol grubundaki kadar olmasa da kollajen lif artışı ve belirgin interstisyel ödem gözlenmiştir. Ayrıca bu gruba ait kesitlerde diğer gruplardan farklı olarak mitokondrilerde küçük vakuolizasyonlar göze çarpmıştır.



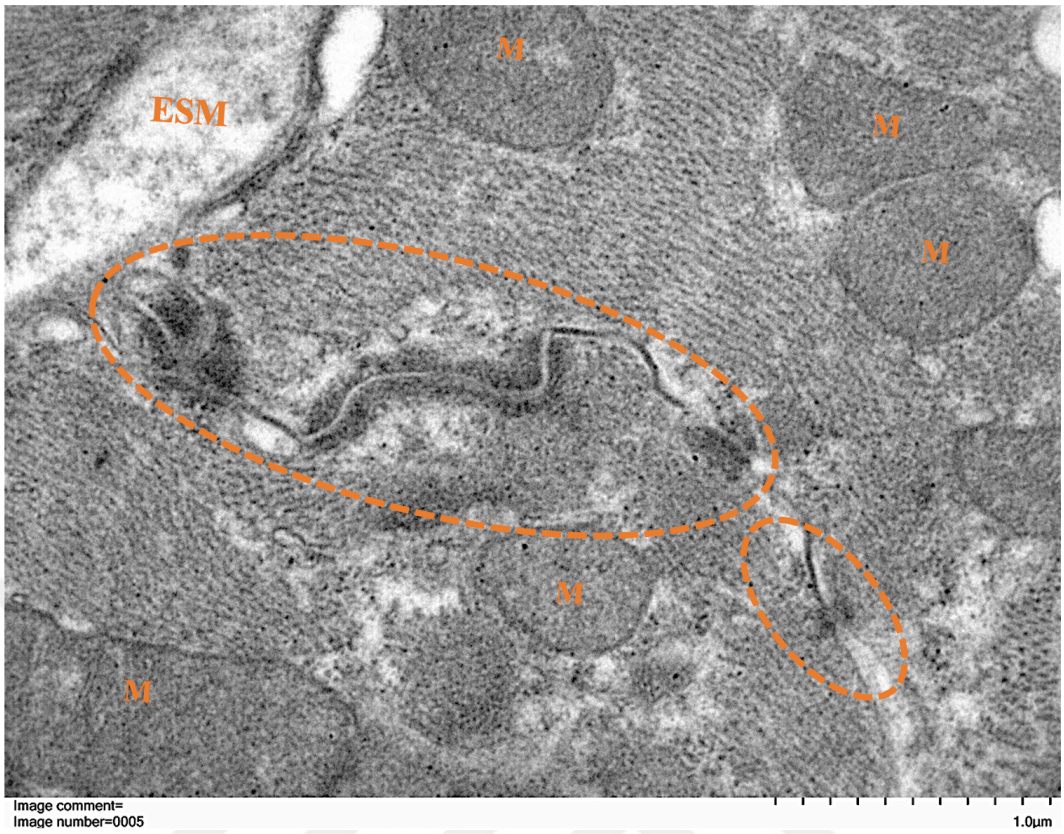


Resim 44. Negatif kontrol grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografları.

a-b) Kardiyomiyosit sitoplazmasında bulunan miyofibrilleri oluşturan normal morfolojide, düzenli sarkomerler görüntülenmiştir. Sitoplazmada bulunan mitokondriyonlar da normal morfolojidedir ve kristalar seçilebilmektedir (X10.0k).

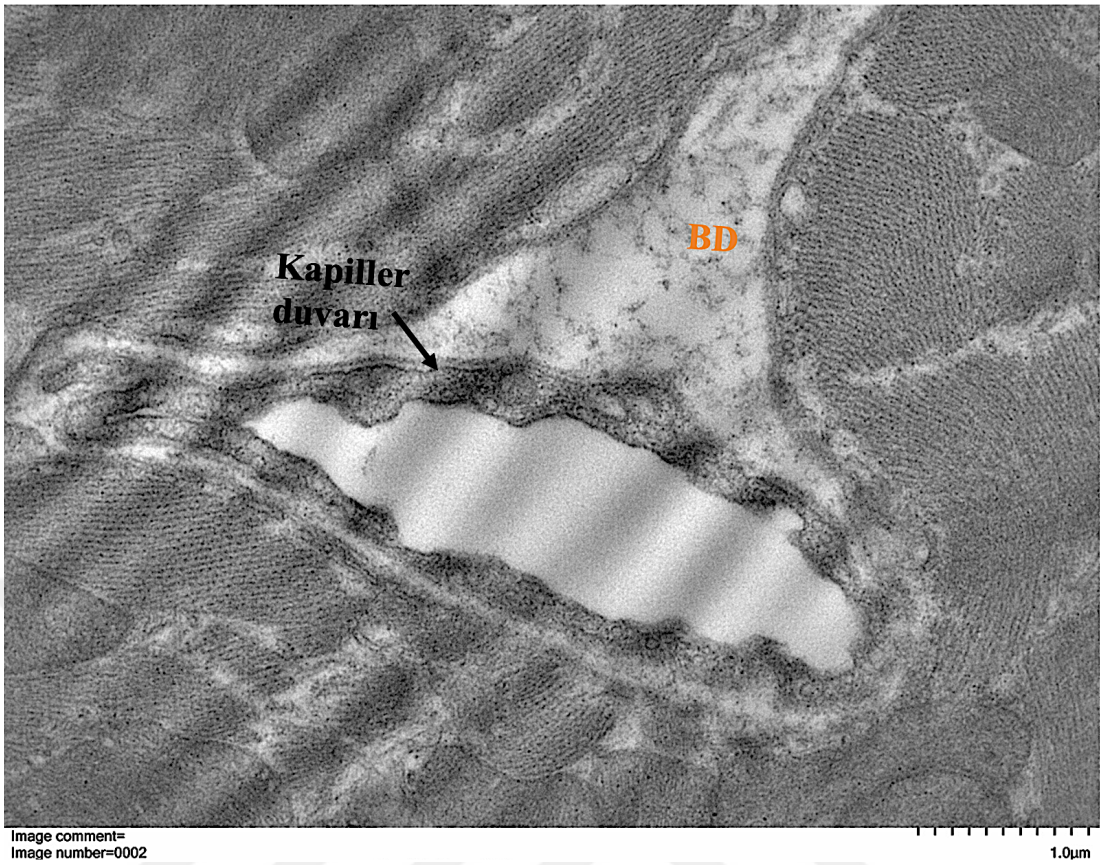
c) Kardiyomiyosit nükleusu, kardiyomiyosit sitoplazmasındaki sarkomerler ve mitokondriyonlar görüntülenmiştir (X12.0k).

(S: Sarkomer, M:Mitokondriyon, Kr:Krista, SR:Sarkoplazmik retikulum, N:Nükleus, Z: Z diski)

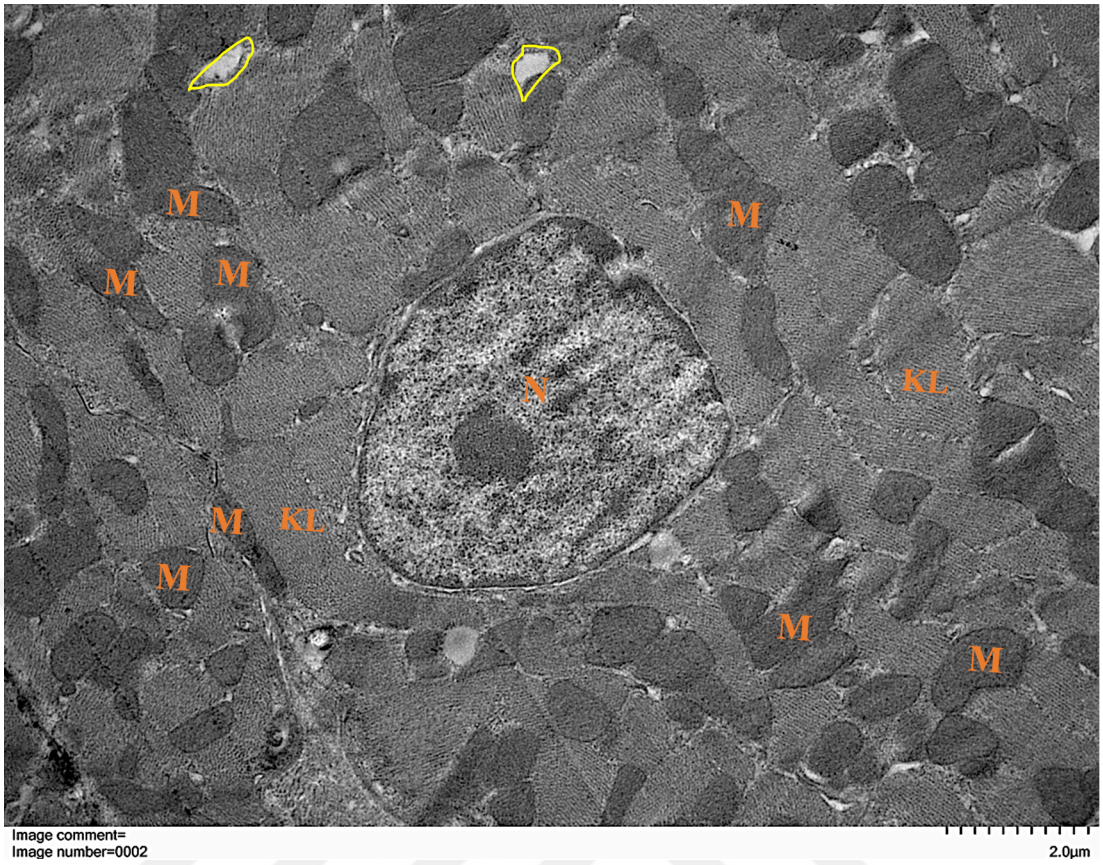


Resim 45. Negatif kontrol grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografı (X20.0k). Kardiyomiyositler arasındaki diskus interkalarisi (kesikli çizgiler) oluşturan bağlantı kompleksleri (fasiya adherens, makula adherens ve gap junctionlar) görüntülenmiştir.

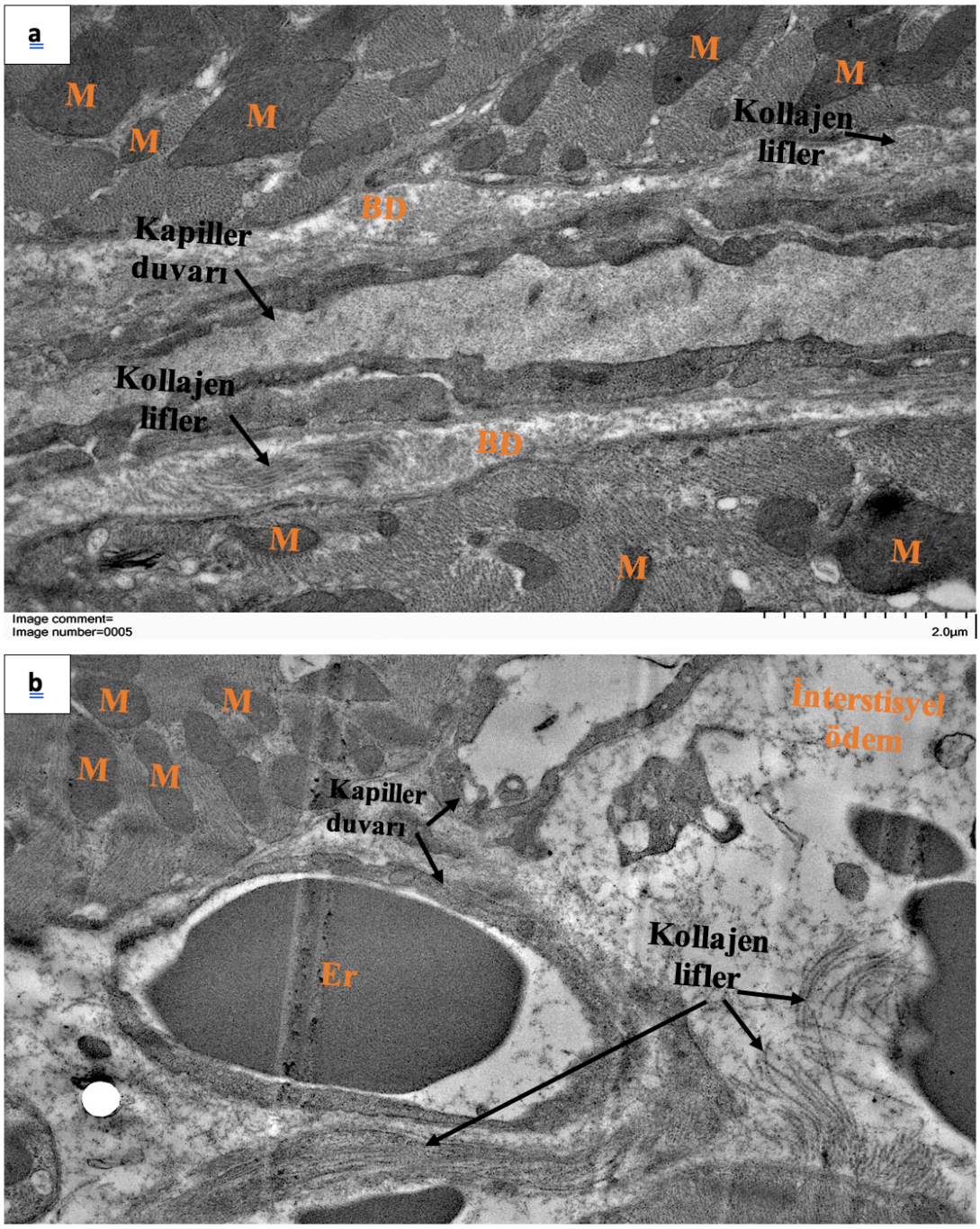
M: Mitokondriyon, ESM: Ekstaselüler matriks (bağ dokusu)



Resim 46. Negatif kontrol grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitinde bulunan perikapiller alandaki bağ dokusunun (BD) transmisyon elektron mikrografı (X12.0k).



Resim 47. Pozitif kontrol grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografı (X5.0k). Kardiyomiyosit nükleusu, kardiyomiyosit sitoplazmasındaki transvers kalp kası lifleri ve kondanse mitokondriyonlar görüntülenmiştir. Sarı çizgiyle sınırları işaretli alanlar sarkoplazmik retikulumlardır. (KL: Kas lifleri, M: Mitokondri, N:Nükleus, SR: Sarkoplazmik retikulum)

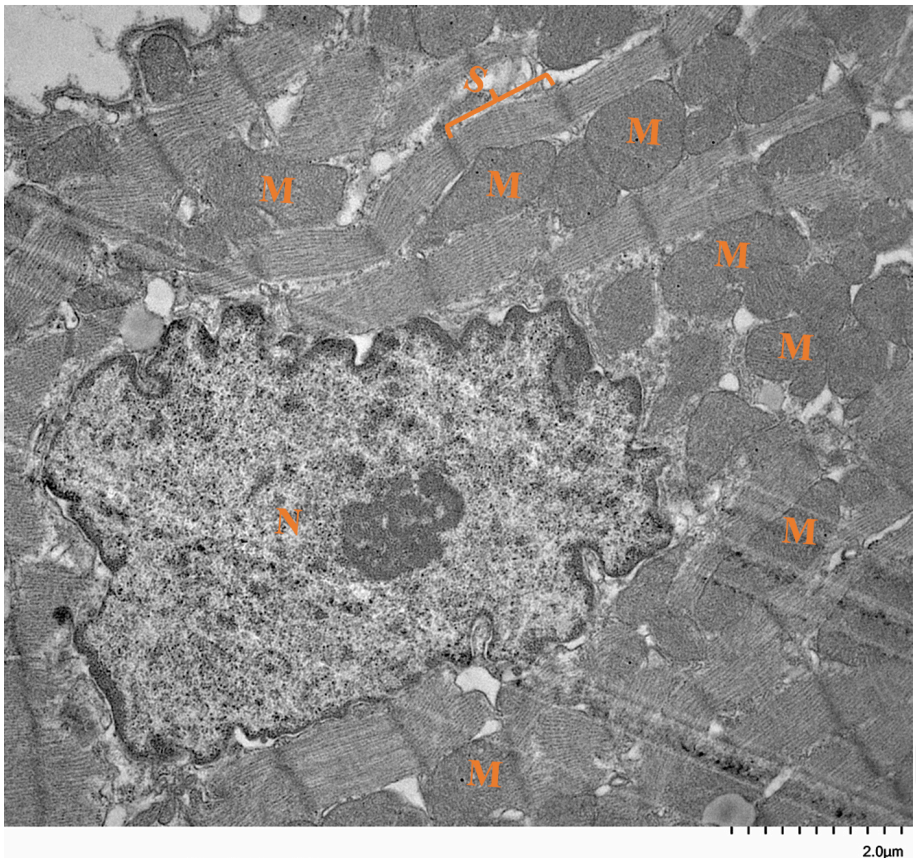


Resim 48. Pozitif kontrol grubuna ait farenin kalp dokusunun ince kesitinde bulunan kalp kası lifleri ve komşuluğundaki perikapiller bağ dokusunun (BD) transmisyon elektron mikrografları.

a) Perikapiller bağ dokusunda artmış ve demet halinde bulunan kollajen lifleri (X8.0k).

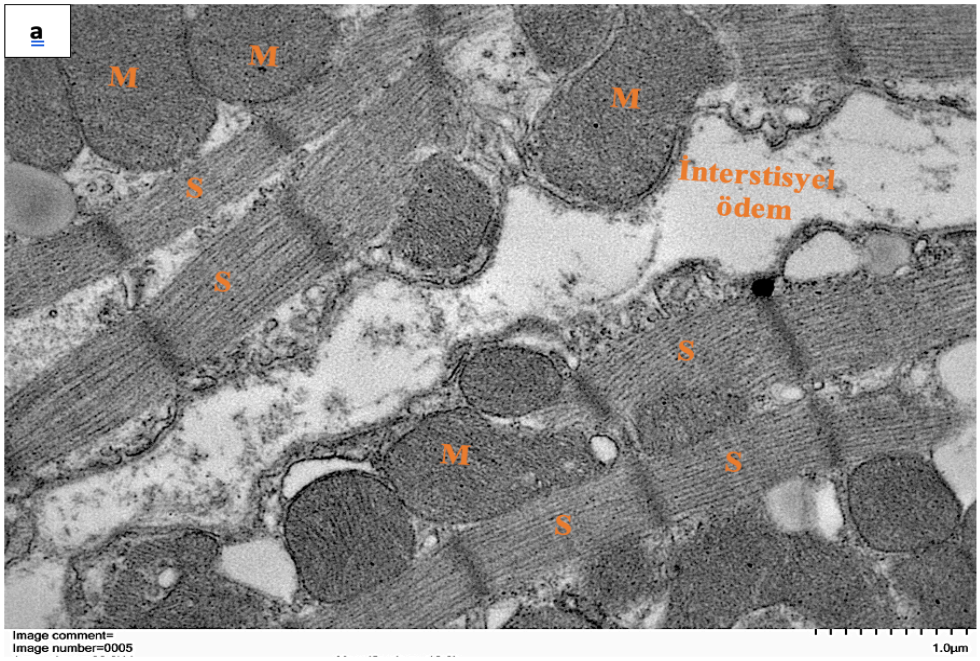
b) Perikapiller alanda ödem, artmış kollajen lifleri ve kondanse, krista kaybı gözlenen mitokondriyonlar (X7.0k).

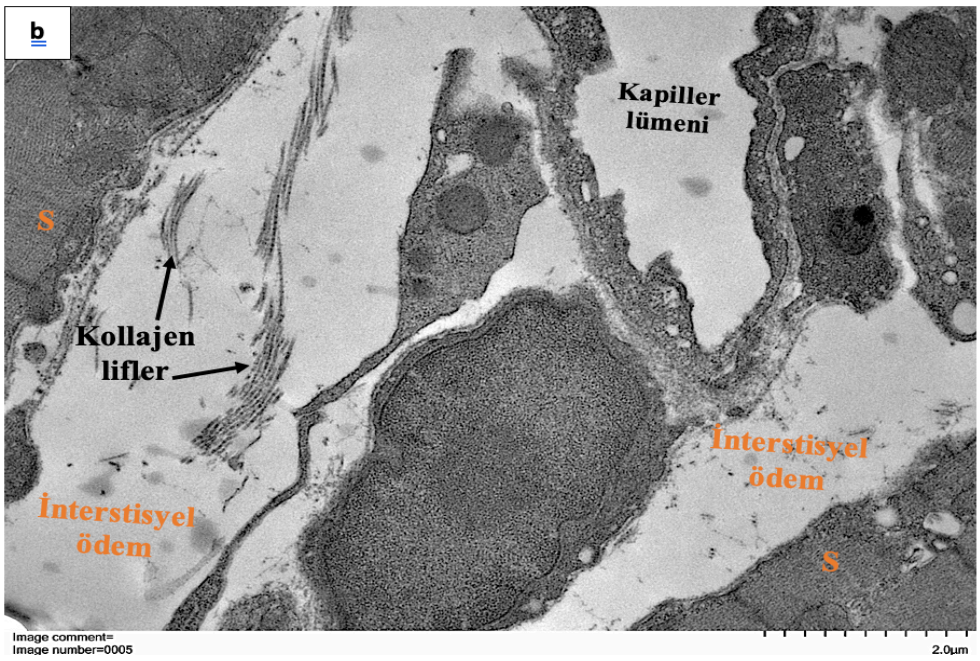
(K: Kollajen lifler, BD: Bağ dokusu, M: Mitokodriyonlar, Er: Eritrosit)



Resim 49. Optimum (düşük) doz tedavi grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografı (X6.0k). Kontrakte kardiyomiyosit nükleusu, kardiyomiyosit sitoplazmasındaki longitudinal kalp kası lifleri ve mitokondriyonlar görüntülenmiştir.

(KL: Kas lifleri, M: Mitokondri, N:Nükleus, S: Sarkomer)



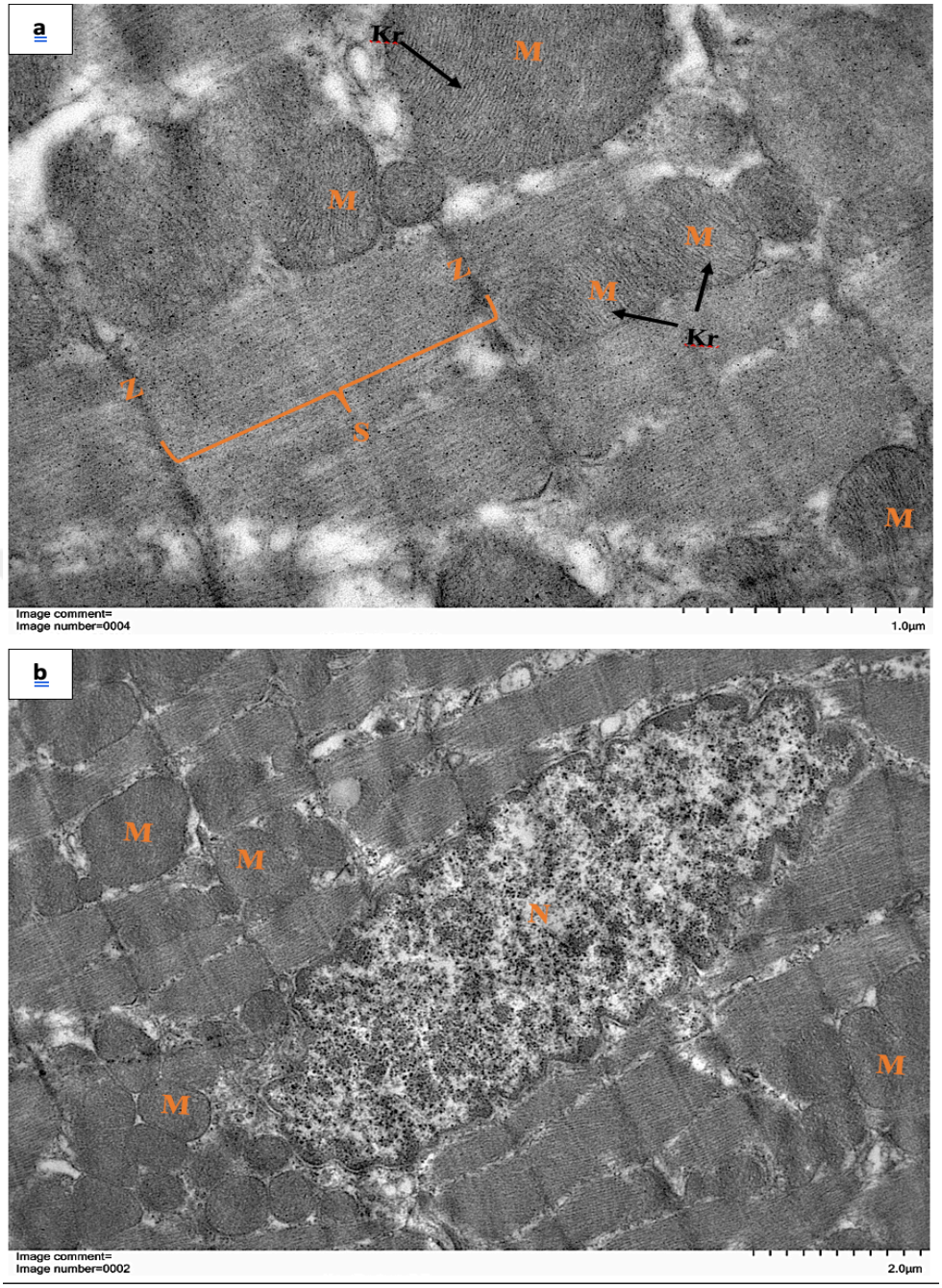


Resim 50. Optimum (düşük) doz tedavi grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografları.

a) Kalp kası lifleri, sarkomer yapıları ve mitokondriyonlar görüntülenmiştir. İnterstisyel ödem ve mitokondriyonlarda krista kaybı gözlenmektedir (X12.0k).

b) Perikapiller alanda ödem, artmış kollajen lifleri görülmektedir (X8k).

(M: Mitokondri, S: Sarkomer)

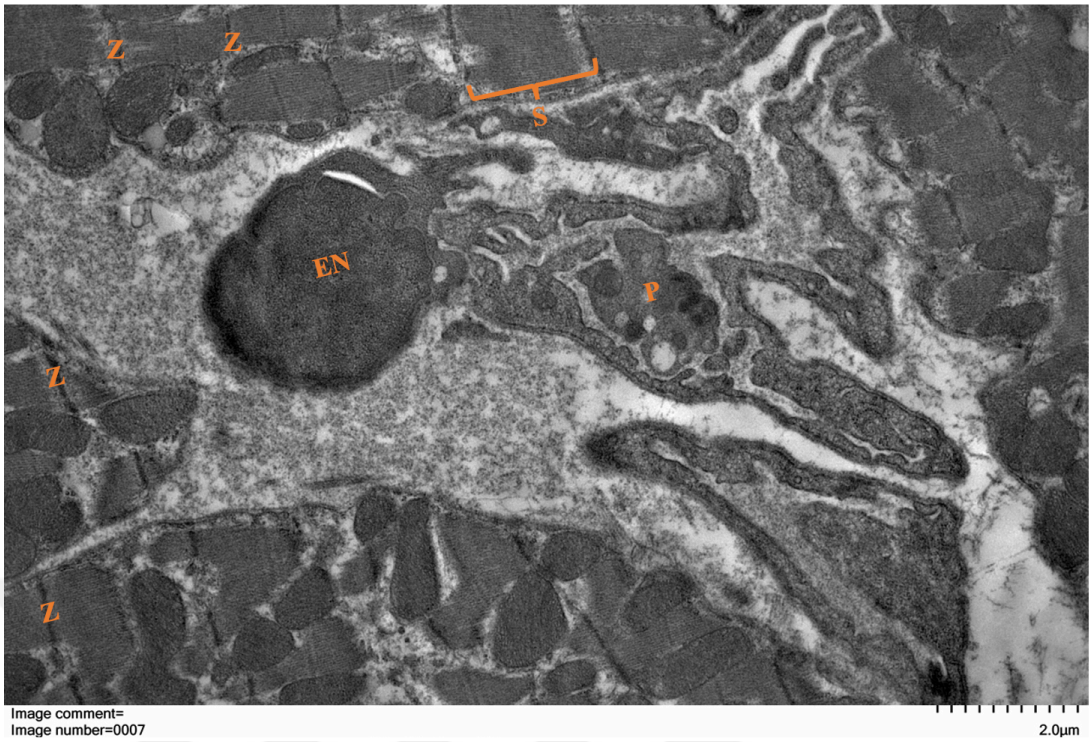


Resim 51. Yüksek doz tedavi grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografları.

a) Kardiyomiyosit sitoplazmasında bulunan miyofibrilleri oluşturan normal morfolojide, düzenli sarkomerler görüntülenmiştir. Sitoplazmada bulunan mitokondriyonlar kristalı ve normal morfolojidedir (X20.0k).

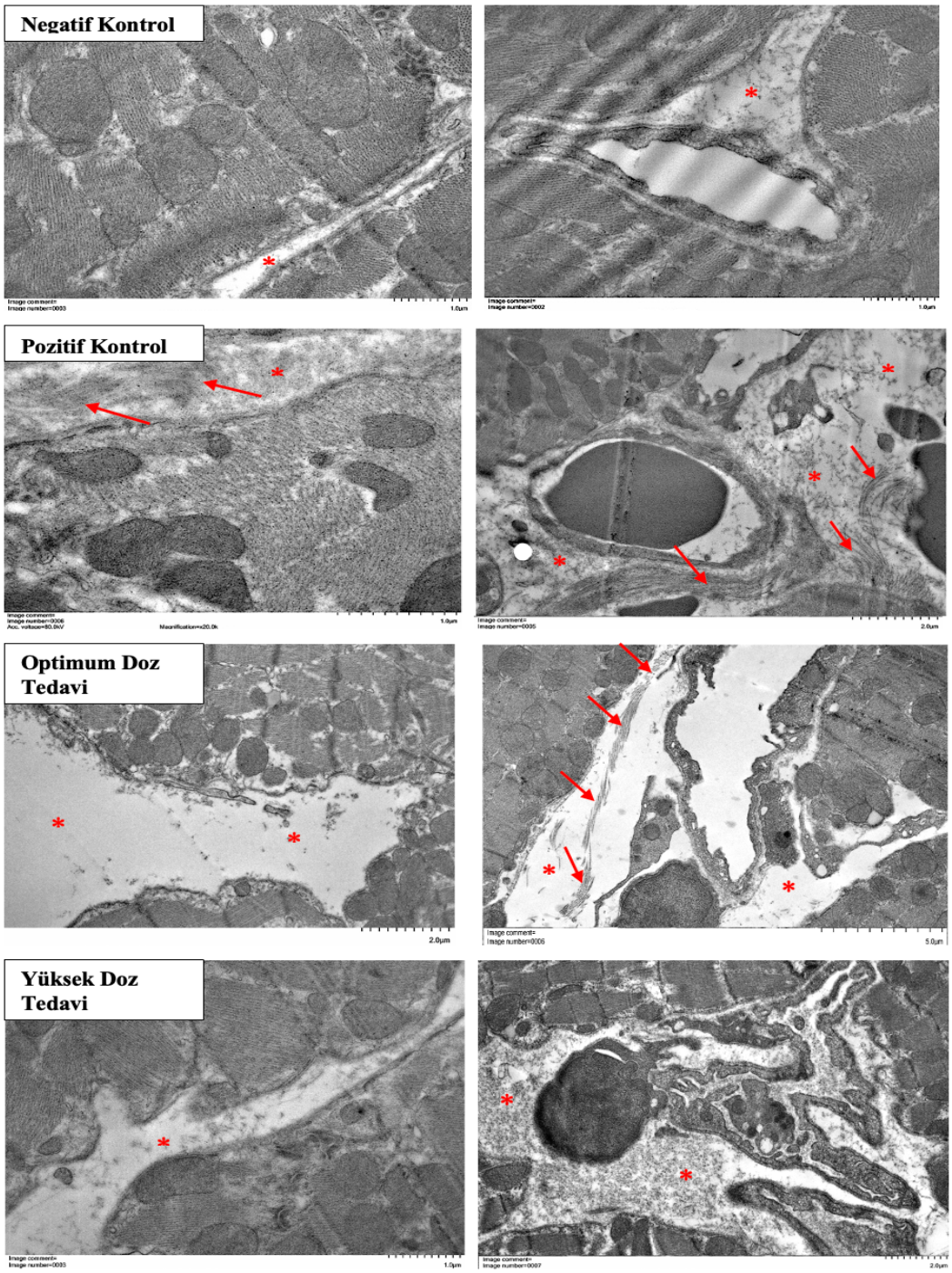
b) Mikrografta kardiyomiyosit nükleusu, kardiyomiyosit sitoplazmasındaki sarkomerler ve mitokondriyonlar görüntülenmiştir (X7.0k).

(S: Sarkomer, M:Mitokondriyon, Kr:Krista, N:Nükleus, Z: Z diski)



Resim 52. Yüksek doz tedavi grubuna ait farenin kalp dokusundan alınmış ince kesitin transmisyon elektron mikrografı (X5.0k). Vasküler yapı içerisinde bir platelet ve perivasküler alanda hafif ödem gözlenmektedir.

EN: Endotel hücresi nükleusu, P: Platelet, S: Sarkomer, Z: Z çizgisi)



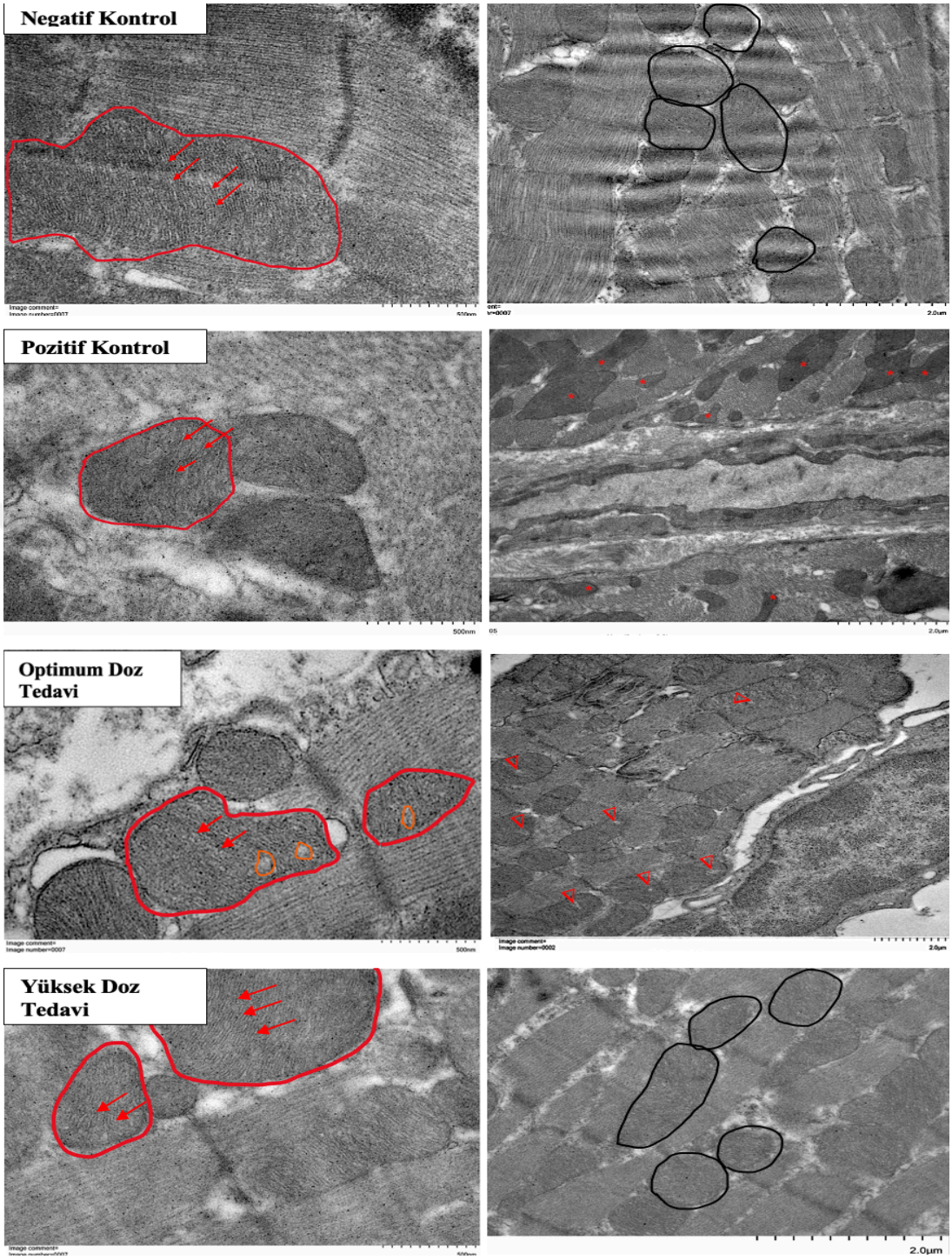
Resim 53. Fare kalp dokusu ince kesitlerinin transmisyon elektron mikrograflarındaki interstisyel ve perivasküler bağ dokusunun gruplar arası karşılaştırması.

Negatif Kontrol Grubu (1. SIRA): Soldaki mikrografta kalp kası lifleri arasında normal morfolojideki interstisyel bağ dokusu alanı (* işareti); sağdaki mikrografta ise perivasküler alan (* işareti) görüntülenmiştir.

Pozitif Kontrol Grubu (2. SIRA): Soldaki mikrografta kalp kası lifleri arasında bulunan interstisyel alanda (* işareti) kollajen lif artışı (oklar) belirgindir; sağdaki mikrografta ise perivasküler alan (* işareti) genişlemiştir. Perivasküler alanda da kollajen lif artışı(oklar) göze çarpmaktadır.

Optimum Doz Tedavi Grubu (3. SIRA): Soldaki mikrografta kalp kası lifleri arasında bulunan interstisyel alanda (* işareti) belirgin genişleme (ödem) gözlenmektedir; sağdaki mikrografta ise perivasküler ödem (* işareti) ve pozitif kontrol grubuna göre daha hafif kollajen lif artışı (oklar) bulunmaktadır.

Yüksek Doz Tedavi Grubu (4. SIRA): Soldaki mikrografta kalp kası lifleri arasında bulunan interstisyel alanda (* işareti) hafif genişleme (ödem) gözlenmektedir; sağdaki mikrografta ise negatif kontrol grubuna göre hafif perivasküler ödem (* işareti) bulunmaktadır.



Resim 54. Fare kalp dokusu ince kesitlerinin transmisyon elektron mikrograflarındaki mitokondriyonların morfolojilerinin gruplar arası karşılaştırması. **Negatif Kontrol Grubu:** Solda; miyofibriller arasında normal morfolojideki mitokondriyon ve lameller şeklinde kristaları (oklar) görüntülenmiştir. Sağdaki mikrografta ise miyofibrillerin arasındaki çok sayıda normal görünümde mitokondriyonların birkaçı siyah çerçeve içine alınmıştır.

Pozitif Kontrol Grubu: Miyofibriller arasında bulunan mitokondriyonlarda membran ve matriks genellikle normal morfolojide olup, bazılarında (kırmızı çerçevelenmiş alan) krista kaybı gözlenmiştir. Oklar, negatif kontrol grubuna kıyasla seyrek yerleşimli kristaları göstermektedir. Sağdaki mikrografta ise perivasküler bölgenin üst ve alt kısmında çok sayıda kondanse mitokondriyon (* işareti) yer almaktadır.

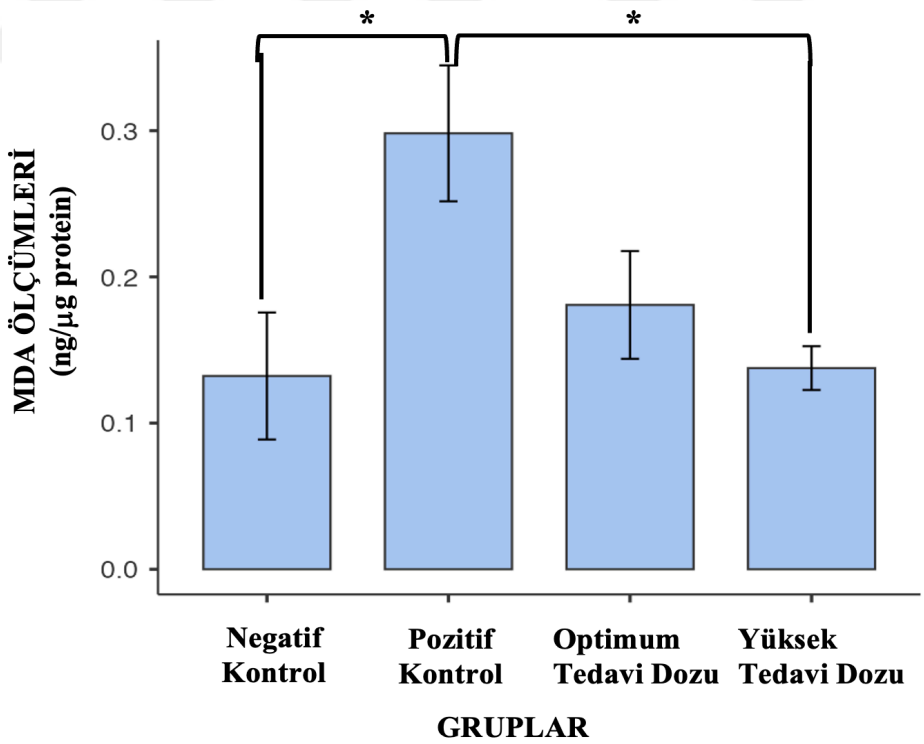
Optimum Doz Tedavi Grubu: Sarkomerler arasında yerleşmiş birkaç mitokondriyon ve kristaları (oklar) normal morfolojidedir. Bazı mitokondriyon matrikslerinde vakuolizasyonlar (turuncu çerçevelenmiş alanlar) seçilmektedir. Sağdaki mikrografta; matriksinde vakuolizasyonun görüldüğü (ok başları) mitokondriyonlar yer almaktadır.

Yüksek Doz Tedavi Grubu: Düzenli dizilimli sarkomerler arasında yerleşmiş mitokondriyonlar çoğunlukla normal morfolojidedir. Oklar, düzenli krista yapılarını göstermektedir. Sağdaki mikrografta siyah çerçevelenmiş normal görünümlü mitokondriyonlar yer almaktadır.

4.4. BİYOKİMYASAL İNCELEME BULGULARI

4.4.1. MDA (Malondialdehyde) ölçümü Sonuçları

Karbonmonoksit zehirlenmesinin kalp dokusunda meydana getirdiği oksidatif hasarın tespiti ve GL'nin kalpteki oksidatif hasar üzerindeki etkisinin incelenebilmesi amacıyla her hayvandan alınan kalp dokusu örneklerinde MDA (Malondialdehyde) miktarı ölçülmüştür. Her hayvan için elde edilen protein miktarı hesaplanarak bu sayısal değerlerin deney grupları arasında karşılaştırması yapılmıştır. Bunun sonucunda ortalama MDA miktarı en düşük olan grup negatif kontrol grubu, ortalama MDA miktarı en yüksek grup ise pozitif kontrol grubu olarak bulunmuştur. Gruplar ortalama MDA miktarı bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında pozitif kontrol grubunun değerleri, negatif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p<0.05$) yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubunun ortalama MDA miktarı değeri, yüksek doz GL tedavi grubu ile kıyaslandığında da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



Grafik 4. Kalp dokularından alınan örneklerdeki ortalama MDA miktarlarının gruplar arası karşılaştırılması. (*: $p<0.05$ istatistiksel anlamlı farkı ifade etmektedir.)

5.TARTIŞMA

Karbonmonoksit (CO), dünya genelinde zehirlenmeye bağlı mortalite ve morbiditenin en sık etkenlerinden olup intihar amaçlı, kaza veya çevresel maruziyet ile inhale edilebilir (3,4,26,27). Kalp ve beynin oksijen gereksinimi, bu yüzden de CO'ya duyarlılığı diğer organlara göre nispeten fazladır. Kardiyovasküler tutulum, CO zehirlenmesinde morbidite ve mortalitenin önemli sebeplerinden biridir (6). CO zehirlenmesinin prognozunun, daha çok inhale edilen CO dozu ve süresi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (71).

CO zehirlenmesinde temel tedavi, %100 normobarik oksijen solutulması veya hiperbarik oksijen (HBO_2) uygulamasıdır (1). Bununla beraber, bu tedavi yöntemlerinin hiçbiri CO zehirlenmesinde meydana gelen kardiyotoksisitenin kesin tedavisini oluşturmamakta ve uygulamada tartışmalı yönler barındırmaktadır (18, 19, 20). CO zehirlenmesinde sıklıkla mortaliteden sorumlu kardiyotoksisitenin, özellikle de miyokardiyal tutulumun mekanizmalarının aydınlatılması; etkin bir kardiyoprotektif tedavinin ortaya konmasında önem arz etmektedir. Literatürde bu amaçla antioksidan, antiinflamatuvar, anti-iskemik özellikleri bulunan hesperidin, magnezyum sülfat, resveratrol gibi bileşikler çalışılmıştır (10,107,108).

CO zehirlenmesinin neden olduğu kardiyotoksisitenin araştırılmasında, literatürdeki deneysel çalışmalar akut zehirlenme modeli olarak; 40 dk-1 sa süreyle 3000 ppm CO gazı ya da 40 dk-1 sa süreyle 1000 ppm CO maruziyeti şeklinde hayvan zehirlenme modellerini kullanmıştır (10,107,108). Literatürdeki çalışmalarda yüksek COHb (karboksihemoglobin) (çoğunlukla %40'ın üzerinde), CO zehirlenmesinin akut toksisitesini değerlendirmek için başarılı bir model olarak kabul edilmektedir (109),(110),(111).

Tez çalışmamda kalp dokularını çalışmış olduğum fareler, "Farelerde Oluşturulan Karbonmonoksit Zehirlenmesi Modelinde Ganoderma Lucidumun Beyindeki Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması" isimli tez çalışmasından elde edilen arşiv dokulardır. Bu yüzden farelere, bahsi geçen çalışmanın amacına uygun olarak (nörodavranışsal defisit meydana getirebilmek için), Gilmer ve ark.'nın çalışmasında kullandıkları; 40 dk 1000 ppm ve senkop gelişinceye kadar 50.000 ppm olacak şekilde CO gazının iki aşamalı verildiği zehirlenme modeli uygulanmıştır

(103). Şiddetli CO zehirlenmesinin oluşturulduğu bu deney modelinde; zehirlenme sonrasında bilinç kaybının gelişmesi ile karbonmonoksit zehirlenme modelinin oluştuğu teyid edilmiştir. Ayrıca söz konusu çalışmanın ön çalışmasında CO zehirlenmesi yapılan farelerin COHb seviyesinin %80'in üstünde bulunması da zehirlenme modelinin oturduğunu desteklemiştir.

Bu zehirlenme modeli, CO zehirlenmesinde meydana gelen kardiyotoksisitenin gösterilmesinde literatürde daha önce hiç kullanılmamıştır. Fakat diğer zehirlenme modellerine göre COHb seviyesinde ciddi yükselmeye (>%70) sebep olması, 1000 ppm CO verildikten sonra bilinç kaybı oluşana kadar çok yüksek dozda (50.000 ppm) CO gazı verilmesi, nörodavranışsal ve histolojik defisite sebep olduğunun gösterilmesi, bu modelin kardiyotoksisite meydana getirebilecek kadar ve diğer modellere göre daha şiddetli bir CO zehirlenme modelini temsil edebileceğini düşündürmüştür (103).

Miyokardiyum, kalp duvarının en kalın tabakası olup, temel kalp kası hücreleri olan kardiyomiyositlerin oluşturduğu kalbin esas fonksiyon gören kısmını meydana getirir (35). CO zehirlenmesi kalpte iskemi yoluyla (dolaylı olarak) veya toksik hasar yoluyla (direkt olarak) kardiyotoksisiteye sebep olur. Bu kardiyotoksisitede; miyokardiyumun iskemiye duyarlılığının fazla olması ve CO'nun kardiyomiyositler üzerinde direk hasar oluşturması, miyokardiyumu temel hedef haline getirmektedir (44,112).

Literatürde; özellikle orta ve şiddetli CO zehirlenmesinin miyokardiyal iskemi, miyokardiyal fibrozis ve kardiyomiyosit apoptozisini içeren miyokardiyal hasara sebep olduğu gösterilmiştir (14,15,16,44,113).

CO'nun sebep olduğu miyokardiyal fibrozisin, tek bir (akut) şiddetli CO zehirlenmesi epizodundan sonra gelişebileceği literatürde gösterilmiştir (114, 115) . Bu fibrozisin iskemiden mi yoksa CO'nun sebep olduğu direk hasardan mı kaynaklandığı netleştirilememiştir. Ayrıca CO zehirlenmesi sonrası miyokardiyal fibrozis oluşumunun en erken ne zaman başladığı ile ilgili yeterince veri bulunmamaktadır. Dong ve ark. nın CO zehirlenmesindeki myokardiyal hasar ve fibrozis ile ilgili yaptığı prospektif çalışmada; CO maruziyeti sonrası ilk 7 gün içinde görüntüleme teknikleri ile miyokardiyumda fibrozis ile ilişkili değişikliklerin gözlemlenebildiği ve fibrozis değişikliklerinin 4-5. aylardaki görüntülerde giderek

arttığı ifade edilmiştir (115). Çalışmamda, kalp dokularını kullanmış olduğum hayvanlar, CO maruziyetinden sonra 10. günde sakrifiye edilmiştir. Bu göz önünde bulundurulduğunda; şiddetli CO zehirlenmesini takiben ilk 10 günlük süreçte meydana gelebilecek miyokardiyal fibrozise dair bulguların, ilk kez bir hayvan çalışmasında gösterilmesi ve gruplar arasında karşılaştırılması da amaçlanmıştır. Bu amaçla tüm deney gruplarındaki farelerin kalplerinden alınmış ve picrosirius red ile boyanmış kesitlerde yapılan kollajen lif miktarı ölçümlerinde; pozitif kontrol ve optimum doz tedavi grubundaki kollajen liflerinin kapladığı oran, negatif kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek tespit edilmiştir. Bu sonuç, CO zehirlenmesi sonrası ilk 10 günde myokardiyal fibrozisin gösterilebilecek bir düzeye gelebildiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca yüksek doz tedavi grubu ile negatif kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmaması da; zehirlenmeden hemen sonra uygulanmaya başlanan yüksek doz Ganoderma Lucidum'un, CO zehirlenmesinin tetiklediği miyokardiyal fibrozis henüz şekillenmeden, koruyucu/önleyici bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Farelere ait ince kesitlerin elektron mikroskobik incelemesinde elde ettiğimiz görüntülerde pozitif kontrol grubunda negatif kontrol grubuna göre perivasküler ve interstisyel alanlarda artmış kollajen liflere ve ödeme rastlanmıştır. Optimum doz tedavi grubunda da, negatif kontrol grubuna göre hafif artmış fakat pozitif kontrol grubundakinden az kollajen lif artışı ve interstisyel ödem görülmüştür. Yüksek doz tedavi grubunda ise kollajen miktarında negatif kontrol grubuna kıyasla belirgin bir fark gözlenmemiştir. Ultrastrüktürel olarak elde ettiğimiz bu sonuçlar Picrosirius Red boyama analizi sonuçlarını desteklemekle birlikte, literatürdeki; Ganoderma Lucidum'un, miyokardiyal iskemi sonucunda gelişen fibrozisi (kollajen lif artışını) önlediği çalışma ve miyokardiyal kollajenlerin çapraz bağlanmasını önleyerek fibrozise karşı kalbi koruduğu gösterilen diğer çalışmalarla da uyumludur (116), (117).

Literatürdeki kardiyotoksisite çalışmalarında (CO, Doxorubicin, Siklofosfamid) myokardiyal hasarın gösterilmesinde; kardiyomiyosit (miyofibril) dejenerasyonunun morfolojik olarak (elektron mikroskobik ya da ışık mikroskobik) incelenmesi de kullanılmıştır (118,119,120,121). İskemik hasar ve toksisitede kardiyomiyositlerde incelmenin (miyofibriler kayıp) nicel olarak ortaya konulması da

kardiyomiyosit hasarının gösterilmesinin daha kantitatif bir yoludur (122,123,124). Kardiyomiyosit çaplarının ölçümü, literatürde CO zehirlenmesindeki kardiyotoksisitenin değerlendirilmesinde başka bir hayvan çalışmasında kantitatif olarak değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda, pozitif kontrol ve optimum doz tedavi grubundaki kardiyomiyosit çapı ortalamaları, negatif kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük tespit edilmiştir. Ayrıca toluidin mavisi boyalı yarı ince kesitlerin morfolojik incelemesinde pozitif kontrol grubunda belirgin bir şekilde artmış miyofibriler (sitoplazmik) parçalanma ve miyofibriler kayıplara bağlı interstisyel alanlarda genişleme; optimum doz tedavi grubunda ise henüz dejenere olup parçalanmamış fakat belirgin şekilde dalgalı-kıvrımlı miyofibriler yapı ve interstisyel ödem görülmüştür. Bu sonuçlar, CO zehirlenmesinin miyofibril dejenerasyonuna yol açtığını elektron mikroskobik olarak gösteren çalışmaları destekler niteliktedir (118,125,113,126). Aynı zamanda literatürdeki; CO'ya maruz kalan hücrelerin daha az miyofibril içerdiğini ultrastriktürel olarak ortaya koyan invitro çalışmaları da desteklemektedir (127). CO zehirlenmesinde kardiyomiyosit morfolojisi ile ilgili bilgiler çok sınırlı olmakla beraber; kıvrımlı-dalgalı yapıda miyofibriller , literatürde başka zehirlenmelerle ilişkili olarak iskemi veya mitokondriyal oksidatif hasara atfedilmiştir (128,129,130,131). Yüksek doz CO'nun da bu mekanizmalar yoluyla kardiyomiyositlerde benzer morfolojik değişimlere yol açtığı düşünülebilir.
Yüksek doz tedavi grubunun ortalama kardiyomiyosit çaplarının da pozitif kontrol ve optimum doz tedavi grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunması; Ganoderma Lucidum'un doza bağlı olarak miyofibril dejenerasyonunu önleyici/azaltıcı etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Yarı ince kesitlerin morfolojisinin daha iyi incelenip, ayırt edilmesini sağlamak amacıyla yaptığımız polikromatik boyamanın görüntülerinde; toluidin mavisi boyama görüntülerine benzer sonuçlar görülmüştür. Bununla birlikte interstisyel ve perivasküler alanlarda toluidin mavisi boyamasına göre çok daha iyi ayırt edilebilen ekstraselüler matriks (ara madde) artışları ve ödem dikkat çekmiştir. Ekstraselüler matrikste belirgin değişiklikler ve ödemin görülmesi de kalp üzerindeki toksisitenin bir belirteci olarak bilinmektedir (128). Özellikle pozitif kontrol grubunda diğer gruplara kıyasla interstisyel alanlardaki ödem (artmış ara madde), şiddetli CO zehirlenmesinin myokardiyumda meydana getirdiği diğer hasar bulgularını

desteklemektedir. Optimum doz tedavi grubunda da yüksek doz tedavi grubunda da; pozitif kontrol grubuna göre ekstraselüler matriks ara maddesinde belirgin genişlemeler gözlenmemiştir bu da Ganoderma Lucidum'un toksisiteye bağlı olası ara madde (ekstraselüler matriks) artışını yani interstisyel ödemi önleyebileceğini gösterir. Çalışmada kullandığım toluidin mavisi ve polikromatik boyalı yarı ince kesitlerdeki en önemli kısıtlılık ise; kesitlerin kalbin tamamından örneklenmeyip tüm hayvanlarda sadece apeks bölgesinden alınmış kalp dokusuna ait olmasıdır.

Elektron mikroskopi bulgularına göre pozitif kontrol grubuna ait fare kesitlerinde negatif kontrol grubuna kıyasla; interstisyel ve perivasküler alanlarda kollajen lif artışına ek olarak, yer yer mitokondrilerde kondensasyon ve krista kaybı gözlenmiştir. Diğer gruplarda belirgin bir mitokondriyal krista kaybı tespit edilmemiştir. Optimum doz tedavi grubunda ise küçük mitokondriyal vakuolizasyonlara rastlanmıştır. Literatürde CO zehirlenmesinin sebep olduğu kardiyotoksisitede; miyofibril dejenerasyonu, glikojen birikimlerinin yanında mitokondriyonve sarkoplazmik retikulumlarda şişme, mitokondriyal kristaların bozulması ve kaybı, mitokondriyal matriks yoğunluğunda azalma gibi iskemik ve anoksik kalp dokusundaki ultrastriktürel değişikliklere benzer etkiler gözlenebildiği ortaya konulmuştur (132,118,133). Literatürde iskemik kalp hastalıklarının hayvan modellerinde mitokondriyal kondensasyon ve küçülmenin ortaya çıktığı da ifade edilmiştir (134). Aynı zamanda mitokondriyonlarda vakuolar dejenerasyonun ve krista kaybının; literatürde oksidaif stres ve ROS (reaktif oksijen radikalleri) artışına bağlı meydana gelebildiği ve mitokondriyal hasarın erken evrelerini temsil ettiği yer almaktadır (135). Pozitif kontrol grubunda mitokondriyon kristalarında görülen erken dejeneratif değişiklikler literatürdeki bulguları desteklemektedir. Tedavi gruplarında (özellikle yüksek doz tedavi grubunda) mitokondriyal morfolojinin pozitif kontrol grubuna kıyasla korunmuş olması ise; esasen iskemiye ve oksidatif hasara bağlı olduğu düşünülen mitokondriyal dejenerasyonun erken safhalarının önlenmesinde antioksidan bir ajan olan Ganoderma Lucidum'un yüksek dozunun koruyucu bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde CO'nun tetiklediği kardiyotoksisitede, oksidatif stres artışının rol oynadığı gösterilmiştir (136). Başka bir çalışmada nispeten düşük CO dozu (90 dk süre ile 200 ppm ve COHb: %10) ile hayvan zehirlenmesi gerçekleştirilmesine rağmen,

CO'nun kalpte önemli ölçüde ROS (reaktif oksijen türleri) artışına sebep olduğu ortaya konulmuştur (137). Çalışmamda her grupta bulunan fare kalplerinden alınan dokulara (atriyumlar) uygulanan MDA (oksidatif hasar belirteci) ölçüm testi sonuçlarına göre; MDA miktarı pozitif kontrol grubu ve optimum doz tedavi grubunda, negatif kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, CO'nun kalpte oksidatif hasarı arttırdığını gösteren literatürdeki çalışmalarla uyumludur (136,119). Ayrıca yüksek doz tedavi grubunda; MDA miktarında pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde az olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte yüksek doz tedavi grubun ile negatif kontrol grubu arasında anlamlı fark olmaması da yüksek doz Ganoderma Lucidum'un, CO zehirlenmesinde kalpte meydana gelen oksidatif hasarın azaltılmasında etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

CO zehirlenmesinin neden olduğu kardiyotoksisitenin araştırılmasında yapılan sınırlı sayıdaki hayvan çalışmalarında 40 dk 1000 ppm CO maruziyetinin de (COHb: %20-45), 40 dk 3000 ppm CO maruziyetinin de (COHb:%60-75) myokardiyal apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (138,107,10). Çalışmamda bütün deney gruplarındaki farelerden alınan frozen kesitlere uygulanan TUNEL in situ apoptozis testinde pozitif kontrol grubundaki apoptotik hücre oranının negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olması, CO'nun kalpte apoptozisi artırdığını ortaya koyan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Optimum doz ve yüksek doz GL tedavi grubundaki apoptotik hücre oranı ise pozitif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar GL'nin; antioksidatif mekanizmalarla myokardiyal ultrayapıyı koruyarak kardiyomiyosit apoptozisini azalttığı gösterilen çalışmaları desteklemektedir (101**,** 102, 31**,** 32)**.**

Yüksek doz GL tedavi grubunda, pozitif kontrol grubuna kıyasla hem MDA miktarının hem de apoptotik hücre oranının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunması; GL'nin bu dozda, MDA'yı azaltma yoluyla apoptozisi önleyebileceğini gösteren çalışmalarla uyumludur (102,31). Optimum doz tedavi grubunda ise, pozitif kontrol grubuna kıyasla apoptotik hücre oranının anlamlı derecede düşük fakat MDA miktarının anlamlı bir fark göstermemesi; GL'nin optimum dozda antiapoptotik etkisini diğer oksidatif stres parametrelerini etkileyerek gösterebileceği ihtimalini düşündürmektedir (102). Ganoderma Lucidum'un (GL), karbonmonoksit zehirlenmesinde oksidatif hasar üzerine etkilerinin daha net ortaya konulabilmesi için

daha fazla oksidatif stres parametresinin değerlendirileceği ve daha büyük örnekleme (n>5) sahip çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Miyokardiyal tutulumun (miyofibril dejenerasyonu, oksidatif hasar, apoptozis, fibrozis) oluşturduğu kardiyotoksisite, karbonmonoksit zehirlenmesinde mortalite ve morbiditenin önemli sebeplerindendir. Karbonmonoksite bağlı gelişen bu kardiyotoksisitenin kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Ganoderma Lucidum, antioksidan, antiinflamatuvar özellikleri ön planda olan kardiyoprotektif bir mantar türüdür. Karbonmonoksit zehirlenmesinde bu mantar türünün doza bağlı olarak; kardiyomiyosit dejenerasyonu, oksidatif hasar ve fibrozise karşı koruyucu etkileri ile miyokardiyum hasarını önlemede ya da tedavi etmede kullanılması önerilebilir. Özellikle karbonmonoksit zehirlenmesinde meydana gelen olası miyokardiyal fibrozisi önlemede/tedavi etmedeki yerinin aydınlatılabilmesi için fibrozis tablosunu daha net ortaya çıkaracak uzun süreli deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca Ganoderma Lucidum'un karbonmonoksit zehirlenmesinde, doz bağımlı kardiyoprotektif etkisinin de daha net anlaşılabilmesi adına farklı dozlarda kullanımını içeren deneysel çalışmalara gerek vardır.

KAYNAKLAR

1. Kaya E, Ergözen S. Karbonmonoksit Zehirlenmesi Carbon Monoxide Poisoning. 2019;6 (1):52–5.
2. Gupta R. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 2nd ed. Gupta RC, editor. Academic Press, Elsevier; 2015.
3. Goldstein M. Carbon Monoxide Poisoning. J Emerg Nurs [Internet]. 2008 Dec 1;34(6):538–42.
4. Badem ND, Cömertpay E, Coşkun F. How much apoptosis does carbon monoxide poisoning cause? Primary clinical soluble TWEAK protein level study: https://doi.org/101177/0960327119845038. 2019 Apr 28;38(8):974–82.
5. Ernst A, Zibrak JD. Carbon monoxide poisoning. N Engl J Med. 1998 Nov 26;339(22):1603–8.
6. Metin Süleyman. Karbonmonoksit Zehirlenmesinin Özel Yönleri. Süleyman Metin GATA Hava-Uzay Hekimliği Merkez ve Anabilim Dalı. IV. Ulusal Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Kurultayı 2011;42–7.
7. Hall JE. Guyton and Hall: Textbook of Medical Physiology. 13th ed. Hall JE, editor. 2016.
8. Wald G, Allen DW. The Equilibrium Between Cytochrome Oxidase and Carbonmonoxide. The EquJ Gen Physiol. 1957 Mar 20;40(4):593–608.
9. Kao LW , Nanagas KA . Carbon monoxide poisoning. Emerg Med Clin North Am. 2004 Nov;22(4):985–1018.
10. Rezaee R, Sheidary A, Jangjoo S, Ekhtiary S, Bagheri S, Kohkan Z, et al. Cardioprotective effects of hesperidin on carbon monoxide poisoned in rats. Drug Chem Toxicol. 2019;0(0):1–6.
11. Marchewka J, Gawlik I, Dębski G, Popiołek L, Marchewka W, Hydzik P. Cardiological aspects of carbon monoxide poisoning. Folia Med Cracov. 2017;57(1):75–85.
12. Balzan M V., Cacciottolo JM, Mifsud S. Unstable angina and exposure to carbon monoxide. Postgrad Med J. 1994;70(828):699.
13. Ebisuno S, Yasuno M, Yamada Y, Nishino Y, Hori M, Inoue M, Kamada T et al. Myocardial infarction after acute carbon monoxide poisoning: case report. Angiology. 1986 Aug;37(8):621–4.
14. Burney RE, Wu SC, Nemiroff MJ. Mass carbon monoxide poisoning: clinical effects and results of treatment in 184 victims. Ann Emerg Med . 1982 Aug;11(8):394–9.
15. Henry CR, Satran D, Lindgren B, Adkinson C, Nicholson CI, Henry TD. Myocardial Injury and Long-term Mortality Following Moderate to Severe Carbon Monoxide Poisoning. JAMA. 2006 Jan 25;295(4):398–402.
16. Kaya H, Coşkun A, Beton O, Zorlu A, Kurt R, Yucel H, Gunes H, Yılmaz MB. COHgb levels predict the long-term development of acute myocardial infarction in CO poisoning. Am J

Emerg Med. 2016 May 1;34(5):840–4.
17. Eichhorn L, Thudium M, Jüttner B. The diagnosis and treatment of carbon monoxide poisoning. Dtsch Arztebl Int. 2018 Dec 24;115(51–52):863–70.
18. Weston C. Oxygen Therapy in Acute Myocardial Infarction - Too Much of a Good Thing? Cochrane Database Syst Rev. 2010 Jun 16;(6).
19. Atalay H, Aybek H, Koseoglu M, Demir S, Erbay H, Bolaman AZ, et al. The effects of amifostine and dexamethasone on brain tissue lipid peroxidation during oxygen treatment of carbon monoxide - Poisoned rats. Adv Ther. 2006;23(2):332–41.
20. Wolf SJ, Lavonas EJ, Sloan EP, Jagoda AS. Clinical Policy: Critical Issues in the Management of Adult Patients Presenting to the Emergency Department with Acute Carbon Monoxide Poisoning. J Emerg Nurs. 2008 Apr 1;34(2):e19–32.
21. Copot O, Tanase C. Maxent modelling of the potential distribution of Ganoderma lucidum in north-eastern region of Romania. J Plant 2017 Res. 2017 Nov;24(2017):133–43.
22. Wachtel-Galor S, Yuen J, Buswell JA, Benzie IFF. Ganoderma lucidum (Lingzhi or Reishi). Herb Med Biomol Clin Asp Second Ed. 2011 Mar 28;175–99.
23. Wasser SP, Coates P, Blackman M, Cragg G, Levine M, Moss J. Reishi or Lingzhi (Ganoderma lucidum) Encyclopedia of Dietary Supplements, Marcel Dekker, New York,. Encycl Diet Suppl. 2005;680–90.
24. Krishna K V., Karuppuraj V, Perumal K. Antioxidant activity and Folic acid content in indigenous isolates of Ganoderma lucidum . Asian J Pharm Anal. 2016;6(4):213.
25. Lakshmi B, Ajith TA, Jose N, Janardhanan KK. Antimutagenic activity of methanolic extract of Ganoderma lucidum and its effect on hepatic damage caused by benzo[a]pyrene. J Ethnopharmacol. 2006 Sep 19;107(2):297–303.
26. Ishimoto Y, Ishibashi K, Yamanaka D, Adachi Y, Ito H, Igami K, et al. Enhanced Release of Immunostimulating beta-1,3- Glucan by Autodigestion of the Lingzhi Medicinal Mushroom, Ganoderma lingzhi (Agaricomycetes). Int J Med Mushrooms. 2017;19(1):1–16.
27. Rajasekaran M, Kalaimagal C. Cardioprotective effect of a medicinal mushroom, Ganoderma lucidum against adriamycin induced toxicity. Int J Pharmacol. 2012;8(4):252–8.
28. Cai Q, Li Y, Pei G. Polysaccharides from Ganoderma lucidum attenuate microglia-mediated neuroinflammation and modulate microglial phagocytosis and behavioural response. J Neuroinflammation 2017 141. 2017 Mar 24;14(1):1–13.
29. Ji Z, Tang Q, Zhang J, Yang Y, Jia W, Pan Y. Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from Ganoderma lucidum. J Ethnopharmacol. 2007 Jul 25;112(3):445–50.
30. Wang Y, Zhang L, Li Y, Hou X, Zeng F. Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a β-glucan from Poria cocos sclerotium. Carbohydr Res. 2004 Oct 20;339(15):2567–74.
31. Xue H, Qiao J, Meng G, Wu F, Luo J, Chen H, Zheng H, Xu J et al. Effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on hemodynamic and antioxidation in T2DM rats. Zhongguo Zhong

Yao Za Zhi. 2010 Feb;35(3):339–43.
32. Lasukova T V., Maslov LN, Arbuzov AG, Burkova VN, Inisheva LI. Cardioprotective activity of ganoderma lucidum extract during total ischemia and reperfusion of isolated heart. Bull Exp Biol Med. 2015;158(6):739–41.
33. Ross M, Pawlina W. Histology: A Test and Atlas with Correlated. Cell and Molecular Biology. 7th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.; 2015.
34. Arackal A, Alsayouri K. Histology, Heart. StatPearls. 2022 May 8; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545143/
35. Eşrefoğlu M. ÖZEL HİSTOLOJİ. 3rd ed. İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık Hiz. Tic. Ltd. Şti; 2021.
36. WikiJournal of Medicine/Medical gallery of Blausen Medical 2014. WikiJournal Med. 2014;1(2).
37. NUS (National University of Singapore). Heart Histology- NUS Pathweb.
38. Junqueira LC, Carneiro J. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 11th ed. 2009. 217–218 p.
39. GÜRSES MK. Kardiyovasküler Sistem. In: KURUŞ M, editor. HİSTOLOJİ Teknikler, Hücre, Doku, Sistemler, Moleküller, Laboratuvar, Klinik Yönleriyle Yaklaşımlar. Akademisyen Kitabevi; 2020. p. 607–44.
40. Pansky B. Review of Medical Embryology . In: Review of Medical Embryology . McMillan, NewYork; 1982. p. 291–355.
41. Eşrefoğlu M. EMBRİYOLOJİ. In: Eşrefoğlu M, editor. EMBRİYOLOJİ. İstanbul; 2022. p. 205–30.
42. Akkuş M. SAĞLIK & BİLİM 2022: Genel Embriyoloji-1 . Efe Akademi Yayınları; 2022.
43. Sadler T. Langman Medikal Embriyoloji. 11. Baskıd. Ankara: Palme Yayıncılık; 2011.
44. Lippi G, Rastelli G, Meschi T, Borghi L, Cervellin G. Pathophysiology, clinics, diagnosis and treatment of heart involvement in carbon monoxide poisoning. Clin Biochem. 2012;45(16–17):1278–85.
45. Qiao L, Zhang N, Huang JL, Yang XQ. Carbon monoxide as a promising molecule to promote nerve regeneration after traumatic brain injury. Med Gas Res. 2017 Jan 1;7(1):45.
46. Sjöstrand T. Endogenous Formation of Carbon Monoxide in Man. Nat 1949 1644170. 1949;164(4170):580–1.
47. Rose JJ, Wang L, Xu Q, McTiernan CF, Shiva S, Tejero J, et al. Carbon monoxide poisoning: Pathogenesis, management, and future directions of therapy. Am J Respir Crit Care Med. 2017 Mar 1;195(5):596–606.
48. MMWR. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Carbon monoxide poisoning after hurricane Katrina–Alabama, Louisiana, and Mississippi. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2005;(54):996–8.
49. Broder J, Mehrotra A, Tintinalli J. Injuries from the 2002 North Carolina ice storm, and strategies for prevention. Injury. 2005 Jan 1;36(1):21–6.

50. Kao LW, Nañagas KA. Toxicity Associated with Carbon Monoxide. Clin Lab Med. 2006 Mar 1;26(1):99–125.
51. Owens EO. Endogenous carbon monoxide production in disease. Clin Biochem. 2010 Oct 1;43(15):1183–8.
52. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1968;61(2):748.
53. Çakır Z, Toksoy A. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Kliniği'ne Karbonmonoksit Zehilenmesiyle Başvuran Hastaların Kardiyak Etkilenim Yönünden Retrospektif Olarak Analizi 2017.
54. Penney DG. Carbon Monoxide Poisoning 2007. 1st ed. Penney DG, editor. CRC Press; 2007. 808 p.
55. Cruickshank W. Some observations on different hydrocarbonates and combinations of carbone with oxygen. J Nat Philos Chem art. 1801;5(1).
56. Cruickshank W. Some additional observations on hydrocarbonates and the gaseous oxide of carbon. J Nat Philos Chem Arts. 1801;5(1):201–11.
57. Waring RH, Steventon GB, Mitchell SC. Molecules of death, second edition. Molecules of Death, Second Edition. Imperial College Press; 2007. 1–430 p.
58. Van Meter KW, Weiss L, Harch PG, Clayton Andrews L, Simanonok JP, Staab PK, et al. Should the pressure be off or on in the use of oxygen in the treatment of carbon monoxide-poisoned patients? Ann Emerg Med. 1994 Aug 1;24(2):283–8.
59. Haldane J. The Relation of the Action of Carbonic Oxide to Oxygen Tension. J Physiol. 1895 Jul 18;18(3):201–17.
60. Goldbaum OR, Ergal ESD. Mechanism of the Toxic Action of Carbon Monoxide*. 1976;
61. Hampson N, Weaver LK. Carbon monoxide poisoning: a new incidence for an old disease - PubMed. Undersea Hyperb Med. 2007;34(3):163–8.
62. Metin S, Yıldız Ş, Çakmak T, Demirbaş Ş. 2010 Yılında Türkiye ' de Karbonmonoksit Zehirlenmesinin Sıklığı [Frequency of Carbon Monoxide Poisoning in Turkey in 2010]. TAF Prev Med Bull. 2011;10(5):587–92.
63. Can G, Sayılı U, Sayman ÖA, Kuyumcu ÖF, Yılmaz D, Esen E, et al. Mapping of carbon monoxide related death risk in Turkey: a ten-year analysis based on news agency records. BMC Public Health. 2019 Jan 3;19(1).
64. Kandiş H, Katırcı Y, Karapolat BS. Karbonmonoksit Zehirlenmesi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi. 2009 Dec 1;11(3):54–60.
65. Akköse Ş, Türkmen N, Bulut M, Akgöz S, Işcimen R, Eren B. An analysis of carbon monoxide poisoning cases in Bursa, Turkey. East Mediterr Heal J. 2010;16(1):101–6.
66. Piantadosi C. Diagnosis and treatment of carbon monoxide poisoning . Respir Care Clin North Am. 1999 Jun;5(2):183–202.
67. Hardy KR, Thom SR. Pathophysiology and treatment of carbon monoxide poisoning. J Toxicol Clin Toxicol. 1994;32(6):613–29.

68. Gozubuyuk AA, Dag H, Kacar A, Karakurt Y, Arica V. Epidemiology, pathophysiology, clinical evaluation, and treatment of carbon monoxide poisoning in child, infant, and fetus. North Clin Istanbul. 2017 May 10;4(1):100–7.
69. Omaye ST. Metabolic modulation of carbon monoxide toxicity. Toxicology. 2002 Nov 15;180(2):139–50.
70. Thom SR, Bhopale VM, Han ST, Clark JM, Hardy KR. Intravascular neutrophil activation due to carbon monoxide poisoning. Am J Respir Crit Care Med. 2006 Dec 1:1239–48.
71. Raub JA, Mathieu-Nolf M, Hampson NB, Thom SR. Carbon monoxide poisoning — a public health perspective. Toxicology. 2000 Apr 7;145(1):1–14.
72. Henz S, Maeder M. Prospective study of accidental carbon monoxide poisoning in 38 Swiss soldiers. Swiss Med Wkly. 2005 Jul 16;135(2728):398–408.
73. Blumenthal I. Carbon monoxide poisoning. J R Soc Med. 2001 Nov 23;94(6):270–2.
74. Klebs E. Über die Wirkung des kohlenoxyds auf den thierische organisms. Virchows Arch Path Anat. 1865;32:450–517.
75. Barış VÖ, Dinçsoy AB, Gedikli E, Zırh S, Müftüoğlu S, Erdem A. Empagliflozin Significantly Prevents the Doxorubicin-induced Acute Cardiotoxicity via Non-antioxidant Pathways. Cardiovasc Toxicol. 2021;21(9):747–58.
76. Rastelli G, Callegari S, Locatelli C, Vezzani G. [Myocardial injury in carbon monoxide poisoning]. G Ital Cardiol (Rome). 2009 Apr 1;10(4):227–33.
77. Yanir Y, Shupak A, Abramovich A, Reisner SA, Lorber A. Cardiogenic shock complicating acute carbon monoxide poisoning despite neurologic and metabolic recovery. Ann Emerg Med. 2002 Oct 1;40(4):420–4.
78. Bozeman WP, Myers RAM, Barish RA. Confirmation of the pulse oximetry gap in carbon monoxide poisoning. Ann Emerg Med. 1997 Nov 1;30(5):608–11.
79. Prockop LD, Chichkova RI. Carbon monoxide intoxication: An updated review. J Neurol Sci. 2007 Nov 15;262(1–2):122–30.
80. Lopez DM, Weingarten-Arams JS, Singer LP, Conway EE. Relationship between arterial, mixed venous, and internal jugular carboxyhemoglobin concentrations at low, medium, and high concentrations in a piglet model of carbon monoxide toxicity. Crit Care Med. 2000 Jun 1;28(6):1998–2001.
81. Hampson NB. Noninvasive pulse CO-oximetry expedites evaluation and management of patients with carbon monoxide poisoning. Am J Emerg Med. 2012 Nov 1;30(9):2021–4.
82. Hubalewska-Hoła A, Pach D, Pach J, Sowa-Staszczak A, Winnik L, Huszno B. Clinical and scintigraphic (99mTc-MIBI SPECT) heart evaluation in young acutely carbon monoxide poisoned patients. Przegl Lek 2003 Jan 1;60(4):226–32.
83. Lippi G, Cervellin G. The clinical role of high-sensitive troponin assays: update, interpretation, and perspectives. Recenti Prog Med. 2010 Nov 1;101(11):423–8.
84. Kinoshita H, Türkan H, Vucinic S, Naqvi S, Bedair R, Rezaee R, et al. Carbon monoxide poisoning. Toxicol Reports. 2020 Jan 1;7:169–73.

85. Hampson NB, Piantadosi CA, Thom SR, Weaver LK. Practice recommendations in the diagnosis, management, and prevention of carbon monoxide poisoning. Am J Respir Crit Care Med . 2012 Dec 1;186(11):1095–101.
86. Weaver LK, Howe S, Hopkins R, Chan KJ. Carboxyhemoglobin half-life in carbon monoxide-poisoned patients treated with 100% oxygen at atmospheric pressure. 2000 Mar 1;117(3):801–8.
87. Weaver LK. Hyperbaric oxygen therapy for carbon monoxide poisoning. Undersea Hyperb Med. 2014 Jul 1;41(4):339–54.
88. Weaver LK. Carbon Monoxide Poisoning. https://doi.org/101056/NEJMcp0808891 [2009] Mar 19;360(12):1217–25.
89. Garg J, Krishnamoorthy P, Palaniswamy C, Khera S, Ahmad H, Jain D, et al. Cardiovascular abnormalities in carbon monoxide poisoning. Am J Ther. 2018;25(3):e339–48. A
90. Pace N, Strajman E, Walker EL. Acceleration of carbon monoxide elimination in man by high pressure oxygen. 1950 Jun 16 ;111(2894):652–4.
91. Thom SR, Bhopale VM, Fisher D. Hyperbaric oxygen reduces delayed immune-mediated neuropathology in experimental carbon monoxide toxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 2006 Jun 1;213(2):152–9.
92. Garrabou G, Inoriza JM, Morén C, Oliu G, Miró Ò, Martí MJ, et al. Mitochondrial Injury in Human Acute Carbon Monoxide Poisoning: The Effect of Oxygen Treatment. https://doi.org/101080/105905012011551316. 2011 Jan;29(1):32–51.
93. Jurič DM, Finderle Ž, Šuput D, Brvar M. The effectiveness of oxygen therapy in carbon monoxide poisoning is pressure- and time-dependent: A study on cultured astrocytes. Toxicol Lett. 2015 Feb 17;233(1):16–23.
94. Stoller KP. Hyperbaric oxygen and carbon monoxide poisoning: a critical review. https://doi.org/101179/016164107X181770. 2013 Mar;29(2):146–55.
95. Siwulski M, Sobieralski K, Golak-Siwulska I, Sokół S, Sękara A. Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) Karst. – health-promoting properties. A review . Herba Pol. 2015 Sep 1;61(3):105–18.
96. Cör D, Knez Ž, Hrnčič MK. Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of Ganoderma Lucidum Terpenoids and Polysaccharides: A Review. Mol 2018, Vol 23, Page 649. 2018 Mar 13 ;23(3):649.
97. Yang Y, Zhang H, Zuo J, Gong X, Yi F, Zhu W, et al. Advances in research on the active constituents and physiological effects of Ganoderma lucidum. Biomed Dermatology 2019 31. 2019 Nov 29;3(1):1–17.
98. Hapuarachchi KK, Elkhateeb WA, Karunarathna SC, Cheng CR, Bandara AR, Kakumyan P, et al. Current status of global Ganoderma cultivation, products, industry and market. Mycosphere. 2018;9(5):1025–52.
99. Wang C, Shi S, Chen Q, Lin S, Wang R, Wang S, et al. Antitumor and Immunomodulatory Activities of Ganoderma lucidum Polysaccharides in Glioma-Bearing Rats. Integr Cancer Ther. 2018 Sep 1 ;17(3):674–83.

100. Hasnat MA, Pervin M, Cha KM, Kim SK, Lim BO. Anti-inflammatory activity on mice of extract of Ganoderma lucidum grown on rice via modulation of MAPK and NF-κB pathways. Phytochemistry. 2015 Jun 1;114:125–36.
101. Lee Y, Kim J, Song C, Jang K, kim C, Kang J-S, et al. Ethanol Extract of Ganoderma lucidum Augments Cellular Anti-oxidant Defense through Activation of Nrf2/HO-1. J Pharmacopuncture. 2016 Mar 1;19(1):59.
102. Shaher F, Qiu H, Wang S, Hu Y, Wang W, Zhang Y, et al. Associated Targets of the Antioxidant Cardioprotection of Ganoderma lucidum in Diabetic Cardiomyopathy by Using Open Targets Platform: A Systematic Review. Biomed Res Int. 2020;2020.
103. Gilmer B, Kilkenny J, Tomaszewski C, Watts JA. Hyperbaric Oxygen Does Not Prevent Neurologic Sequelae after Carbon Monoxide Poisoning. Acad Emerg Med. 2002 Jan 1;9(1):1–8.
104. Ghorbani M, Mohammadpour AH, Abnous K, Movassaghi AR, Sarshoori JR, Shahsavand S, et al. G-CSF administration attenuates brain injury in rats following carbon monoxide poisoning via different mechanisms. Environ Toxicol. 2017 Jan;32(1):37–47.
105. Morikawa S, Sato A, Ezaki T. A simple, one-step polychromatic staining method for epoxy-embedded semithin tissue sections. Microscopy. 2018 Dec 1;67(6):331.
106. Sato T, Shamoto M. A Simple Rapid Polychrome Stain For Epoxy Embedded Tissue. Stain Technol. 1973;48(6):223–7.
107. Tabrizian K, Khodayari H, Rezaee R, Jahantigh H, Bagheri G, Tsarouhas K, et al. Magnesium sulfate protects the heart against carbon monoxide-induced cardiotoxicity in rats. Res Pharm Sci. 2018;13(1):65–72.
108. Hashemzaei M, Barani AK, Iranshahi M, Rezaee R, Tsarouhas K, Tsatsakis AM, et al. Effects of resveratrol on carbon monoxide-induced cardiotoxicity in rats. Environ Toxicol Pharmacol. 2016;46:110–5.
109. Baharara H, Ghasemi H, Samadi S, Roohshad B, Jomehzadeh V, Ravankhah Moghaddam K, et al. The effect of preconditioning agents on cardiotoxicity and neurotoxicity of carbon monoxide poisoning in animal studies: a systematic review. https://doi.org/101080/0148054520212021931. 2022;
110. Dong G, Ren M, Wang X, Jiang H, Yin X, Wang S, et al. Allopurinol reduces severity of delayed neurologic sequelae in experimental carbon monoxide toxicity in rats. Neurotoxicology. 2015 May 1;48:171–9.
111. Bi MJ, Sun XN, Zou Y, Ding XY, Liu B, Zhang YH, et al. N-Butylphthalide improves cognitive function in rats after carbon monoxide poisoning. Front Pharmacol. 2017 Feb 9;8(FEB).
112. Suner S, Jay G. Carbon Monoxide Has Direct Toxicity on the Myocardium Distinct from Effects of Hypoxia in an Ex Vivo Rat Heart Model. Acad Emerg Med. 2008 Jan 1;15(1):59–65.
113. Ehrich WE, Bellet S, Lewey FH. Cardiac Changes From CO Poisoning. Am J Med Sci.

1944;(208):511–23.

114. Henry TD, Lesser JR, Satran D. Myocardial fibrosis from severe carbon monoxide poisoning detected by cardiac magnetic resonance imaging. Circulation. 2008 Aug 12;118(7):792.

115. Cho DH, Ko SM, Son JW, Park EJ, Cha YS. Myocardial Injury and Fibrosis From Acute Carbon Monoxide Poisoning: A Prospective Observational Study. JACC Cardiovasc Imaging. 2021 Sep 1;14(9):1758–70.

116. Meng J, Ma A, Zhang S, Lin D, Lin S, Li M, et al. Ganoderma Lucidum Polysaccharide Peptide attenuates post myocardial infarction fibrosis via down-regulating TGF-β1/SMAD and relieving oxidative stress. Pharmacol Res - Mod Chinese Med. 2022 Sep 1;4:100152.

117. Meng G, Zhu H, Yang S, Wu F, Zheng H, Chen EE, et al. Attenuating effects of Ganoderma lucidum polysaccharides on myocardial collagen cross-linking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. Carbohydr Polym. 2011 Feb 11;84(1):180–5.

118. Asgharian Rezaee M, Moallem SA, Mohammadpour AH, Mahmoudi M, Sankian M, Farzadnia M, et al. Histopathological study of erythropoietin protective effect on carbon monoxide-induced cardiotoxicity in rat. Iran J Basic Med Sci. 2017;20(11):1189–93.

119. Forrest GL, Gonzalez B, Tseng W, Li X, Mann J. Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. Cancer Res. 2000 Sep 1;60(18):5158–64.

120. Maciej Serda, Becker FG, Cleary M, Team RM, Holtermann H, The D, et al. Effect of melatonin on the cardiotoxicity of doxorubicin. G. Balint, Antala B, Carty C, Mabieme J-MA, Amar IB, Kaplanova A, editors. Histol Histopathol. 2004;19(4):343–54.

121. Chakraborty M, Bhattacharjee A, Kamath JV. Cardioprotective effect of curcumin and piperine combination against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. Indian J Pharmacol. 2017 Jan 1;49(1):65–70.

122. Zilinyi R, Czompa A, Czegledi A, Gajtko A, Pituk D, Lekli I, et al. The Cardioprotective Effect of Metformin in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: The Role of Autophagy. Mol 2018, Vol 23, Page 1184. 2018 May 15;23(5):1184.

123. Asouzu Johnson J, Ihunwo A, Chimuka L, Mbajiorgu EF. Cardiotoxicity in African clawed frog (Xenopus laevis) sub-chronically exposed to environmentally relevant atrazine concentrations: Implications for species survival. Aquat Toxicol. 2019 Aug 1;213:105218.

124. Gupta SK, Garg A, Avramopoulos P, Engelhardt S, Streckfuss-Bömeke K, Batkai S, et al. miR-212/132 Cluster Modulation Prevents Doxorubicin-Mediated Atrophy and Cardiotoxicity. Mol Ther. 2019 Jan 2;27(1):17–28.

125. Gandini C, Castoldi AF, Candura SM, Locatelli C, Butera R, Priori S, et al. Carbon monoxide cardiotoxicity. J Toxicol - Clin Toxicol. 2001;39(1):35–44.

126. Thomsen HK, Kjeldsen K. Threshold Limit for Carbon Monoxide-Induced Myocardial Damage. Environ Heal An Int Journal. 1974;29(2):73–8.

127. Nag AC, Chen KC, Cheng M. Effects of carbon monoxide on cardiac muscle cells in culture.

https://doi.org/101152/ajpcell19882553C291. 1988;255(3).

128. El-Deeb MEE, Abd-El-Hafez AAA. Can vitamin C affect the KBrO3 induced oxidative stress on left ventricular myocardium of adult male albino rats? A histological and immunohistochemical study. J Microsc Ultrastruct. 2015 Sep;3(3):120–36.
129. Cataldi A, Zara S, Rapino M, Zingariello M, Giacomo V di, Antonucci A. p53 and telomerase control rat myocardial tissue response to hypoxia and ageing. Eur J Histochem. 2009 Dec 9;53(4):e25.
130. Shaoyu Z, Starkov A, Froberg MK. Cumulative and Irreversible Cardiac Mitochondrial Dysfunction Induced by Doxorubicin1 | Cancer Research | American Association for Cancer Research. Cancer Res. 2001 Jan 1;61(2):771–7.
131. Fishbein M, Maclean D, MD, MB. Experimental Myocardial Infarction in the Rat. Am J Pathol. 1978;90(1).
132. Tritapepe L, Macchiarelli G, Rocco M, Scopinaro F, Schillaci O, Martuscelli E, et al. Functional and ultrastructural evidence of myocardial stunning after acute carbon monoxide poisoning. Crit Care Med. 1998;26(4):797–801.
133. Suzuki T. Effects of Carbon Monoxide Inhalation on the Fine Structure of the Rat Heart Muscle. Tohoku J Exp Med. 1969;97(3):197–211.
134. Collins HE, Kane MS, Litovsky SH, Darley-Usmar VM, Young ME, Chatham JC, et al. Mitochondrial Morphology and Mitophagy in Heart Diseases: Qualitative and Quantitative Analyses Using Transmission Electron Microscopy. Front Aging. 2021 May 6;2:9.
135. Chaanine AH. Morphological Stages of Mitochondrial Vacuolar Degeneration in Phenylephrine-Stressed Cardiac Myocytes and in Animal Models and Human Heart Failure. Medicina (B Aires). 2019 Jun 1;55(6).
136. M. Ismail M. Some Biomarkers in Carbon Monoxide-Induced Cardiotoxicity. J Environ Anal Toxicol. 2013;03(04).
137. Jang DH, Piel S, Greenwood JC, Kelly M, Mazandi VM, Ranganathan A, et al. Alterations in cerebral and cardiac mitochondrial function in a porcine model of acute carbon monoxide poisoning. https://doi.org/101080/1556365020201870691. 2021;59(9):801–9.
138. Rezaee MA, Mohammadpour AH, Imenshahidi M, Mahmoudi M, Sankian M, Tsarouhas K, et al. Protective effect of erythropoietin on myocardial apoptosis in rats exposed to carbon monoxide. Life Sci. 2016;148:118–24.

EKLER

TEZ KONUSU ONAY FORMU (V.3)

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı: **Telefon:** **E-Posta:**	Tuğba YILMAZ
Uzmanlık Dalı:	Histoloji ve Embriyoloji
Eğitim Kurumu:	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi
Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi:	02/08/2019
Uzmanlık Eğitiminin Öngörülen Bitirme Tarihi :	02/08/2022
Program Yöneticisinin Adı Soyadı:	Barış BAYKAL
Tez Danışmanının Adı Soyadı: **Telefon:** **E-Posta:**	Ayten TÜRKKAN

***Araştırma/Tez Konusu**

Ganoderma Lucidum Ekstraktının Karbonmonoksit Zehirlenmesi Oluşturulmuş Farelerde Kalp Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

1-Araştırma Sorusu

- Karbonmonoksit zehirlenmesinde kardiyak hasar neden meydana gelmektedir?
- Bu kardiyak hasar nasıl azaltılabilir /engellenebilir ?

2-Arka Plan ve Gerekçe

CO vücutta birçok sistemi etkilemesine rağmen yüksek metabolik aktiviteleri ve artmış oksijen gereksinimleri nedeniyle kalp ve beyin zehirlenmeye karşı daha duyarlıdır. CO zehirlenmesinde nörolojik ve kardiyovasküler tutulum morbidite ve mortaliteden önemli ölçüde sorumludur (1).

CO zehirlenmesinin, hafif ve geçici kardiyak hasardan nekroza, kontraktil disfonksiyona ve kalp hızı değişikliklerine neden olduğu tanımlanmıştır (2).

İskemi ve myokardiyal tutulum orta ve şiddetli CO zehirlenmelerinde sık olarak gözlenir ve mortalite için önemli bir göstergedir (1),(3). CO zehirlenmesinde aritmiler, pulmoner ödem, kalp yetmezliği, myokard infarktüsü, myokardiyal fibrozis, atriyal trombüs ve kardiyak arrest gibi farklı kardiyovasküler problemler ortaya çıkabilir. CO zehirlenmesinde en sık ölüm nedenleri arasında ventriküler disritmilere bağlı kardiyak arrest görülmektedir (4).

CO inhalasyon yolu ile alınıp hızlıca kan dolaşımına geçer. Hemoglobinin bağlanma bölgeleri için oksijenle yarışır çünkü hemoglobine olan afinitesi oksijenden 230-270 kat daha fazladır, bu durum oksijen disosiyasyon eğrisinin sola kaymasına neden olur ve oksijenin dokulara ulaşmasını zorlaştırır, sonuçta değişen derecelerde hipoksiye neden olur (2),(5). CO'in, hemoglobinin yanı sıra miyoglobin, nitrik oksit sentetaz, sitokrom c oksidaz gibi hem proteinlerine bağlanması ve doğrudan hücresel hasara neden olması toksisite patofizyolojisinin temelini oluşturur (6). CO zehirlenmesinin iki ana mekanizma yoluyla kardiyomiyosit apoptozisine neden olduğu düşünülmektedir: Birincisi,elektron zincirindeki sitokrom C oksidaza bağlanarak hücresel düzeyde asfiksiye yol açması; ikincisi, nötrofillerin degranülasyonunu indükleyerek ve böylece miyeloperoksidazın dolaşım seviyelerini ve reaktif oksijen türlerini artırarak oksidatif strese neden olmasıdır . Şu anda mevcut literatürde CO kaynaklı toksisitenin kesin bir antidotu bulunmamaktadır (7).

Karbonmonoksitin kardiyotoksisitesinin altında yatan mekanizmanın büyük oranda oksidatif stres ve reaktif oksijen radikalleri(ROT) birikimi ile ilişkili olması tedavisinde kardiyoprotektif ve antioksidan özellik

gösteren ajanlara yönelişi artırmıştır. Kültür mantarları arasında, besin değerinden ziyade farmasötik değerinin benzersiz olduğu düşünülen Gonaderma Lucidum (8), antioksidan, anti-kanser, immünmodülatör, kardiyoprotektif, antiinflamatuvar, antiallerjik, antiviral özellikleri literatürde ortaya konmuş bir mantar türüdür (9–15). Aynı zamanda Ganoderma Lucidum polisakkaritlerinin; MDA'yı azaltarak, kalp dokularında antioksidan enzimleri (GSH-Px, CAT, SOD ve NO) aktive ederek ve tip II DM sıçanlarında lipid peroksidasyonunu azaltarak miyokardiyal ultrayapıyı iyileştirdiği gözlenmiştir (16). Yapılan başka bir invivo çalışmada Ganoderma lucidum ekstraktının antioksidan özelliği aracılığıyla kardiyomiyositlerin apopitozisini azalttığı gösterilmiştir (17).

3-Araştırmanın amacı

Amacımız, kalp hasarına neden olan fakat henüz net bir tedavisi bulunamayan karbonmonoksit zehirlenmesinde kardiyotoksik hasarın azaltılıp tedavi edilmesine yönelik yeni bir bitkisel ajanın etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda karbonmonoksit zehirlenmesine maruz kalan farelerin kalp dokusundaki hasar histolojik (Elektron Mikroskopi, İmmunflöresan, TUNEL) ve biyokimyasal yöntemler aracılığıyla gösterilecektir. Ayrıca Ganoderma lucidum uygulanan gruplar ile kontrol gruplarının kalp dokusundaki histopatolojik değişiklikler karşılaştırılarak hasarın durumu izlenecek ve hasarın azalması durumunda da Ganodema lucidum'un doz bağımlı etkisi belirlenmeye çalışılacaktır.

4-Hipotez

Karbonmonoksit zehirlenmesinde kullanılan Ganoderma Lucidum ekstraktı kardiyoprotektif özellik göstererek kardiyak hasarı azaltmaktadır.

5-Araştırma türü/tasarım

Prospektif olarak arşivde bulunan fare kalplerinden kontrol grupları ve tadavi grupları oluşturularak deneysel tanımlayıcı bir araştırma planlanmaktadır.

6- Araştırmanın gerçekleştirileceği yer

Gülhane Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Laboratuvarı

7- Araştırmanın uygulanacağı popülasyon

Deney hayvanı arşiv dokusu.

8- Birincil ve ikincil sonlanım noktaları

Araştırmanın birincil sonlanım noktası cryotom cihazında kesitlerin alınması ve histolojik/biyokimyasal yöntemlerin uygulanmasıdır.

Araştırmanın ikincil sonlanım noktası ise kesitlerin görüntü analizlerinin yapılıp gruplar arası farklılıkların ortaya konulması aşamasıdır.

9- Araştırma Basamakları

Çalışmamızda Gülhane Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış 01.11.2021 tarihli ve ETİK-2021/34 kayıt nolu 21/49 karar nolu "Farelerde Oluşturulan Karbonmonoksit Zehirlenmesi Modelinde Ganoderma Lucidumun Beyindeki Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması " isimli çalışmada beyinleri kullanılan farelerin arşivde bulunan kalp dokuları kullanılacaktır.

Fareler sakrifiye edilmeden önce bizim çalışmamızın amacıyla da uyumluluk gösterecek şekilde (negatif kontrol, pozitif kontrol, optimum doz Ganoderma Lucidum tedavi grubu ve yüksek doz Ganoderma Lucidum tedavi grubu olmak üzere) 4 gruba ayrılmıştır.
Bizim çalışmamızda kullanacağımız gruplar şu şekilde oluşturalacaktır:

NEGATİF KONTROL GRUBU: Bu gruptaki kalpler karbonmonoksit zehirlenmesi uygulanmamış ancak, diğer gruplardaki karbonmonoksit gazı uygulama süresi kadar aynı kabinde tutularak ortam havası solutulan hayvanlara aittir Ayrıca bu gruptaki kalplerin alındığıhayvanlara herhangi bir tedavi verilmemiş olup sadece tedavi gruplarındaki hayvanlara verilen miktarda saf içme suyu (maksimum 0,5 ml) 9 gün boyunca oral gavaj yolu ile verilmiştir.

POZİTİF KONTROL GRUBU: Bu gruptaki kalpler ilk aşamada 40 dakika boyunca 1.000 ppm'lik karbonmonoksit gazına maruz bırakılan, hemen sonrasında bilinç kaybı oluşturacak şekilde 50.000 ppm'lik karbonmonoksit gazına maruziyet sağlanan hayvanlara aittir. Bu gruptaki kalplerin sahibi hayvanlar ada negatif kontrol grubunda olduğu gibi herhangi bir tedavi verilmemiş olup sadece tedavi gruplarındaki hayvanlara verilen miktarda saf içme suyu (maksimum 0,5 ml) 9 gün boyunca oral gavaj yolu ile verilmiştir.

OPTİMUM DOZ GANODERMA LUCİDUM TEDAVİ GRUBU: Bu gruptaki kalpler ilk aşamada 40 dakika boyunca 1.000 ppm'lik karbonmonoksit gazına maruz bırakılan, hemen sonrasında bilinç kaybı oluşturacak şekilde 50.000 ppm'lik maruziyet sağlanan hayvanlara aittir. Ayrıca bu guptaki kalplerin sahibi hayvanlara, ağırlıklarına göre hesap edilmiş miktarda 200 mg/kg/gün Ganoderma lucidum ekstraktı, içme suyu (maksimum 0,5 ml) kullanılarak hazırlanmış süspansiyonlar içinde, 9 gün boyunca günde tek doz halinde gavaj yoluyla verilmiştir.

YÜKSEK DOZ GANODERMA LUCİDUM TEDAVİ GRUBU: Bu gruptaki kalpler ilk aşamada 40 dakika boyunca 1.000 ppm'lik karbonmonoksit gazına maruz bırakılan, hemen sonrasında bilinç kaybı oluşturacak şekilde 50.000 ppm'lik maruziyet sağlanan hayvanlara aittir. Ayrıca, bu guptaki kalplerin sahibi hayvanlara ağırlıklarına göre hesap edilmiş miktarda 400 mg/kg/gün Ganoderma lucidum ekstraktı, içme suyu (maksimum 0,5 ml) kullanılarak hazırlanmış süspansiyonlar içinde, 9 gün boyunca günde tek doz halinde gavaj yoluyla verilmiştir.

1-) Arşivden alınan kalp dokuları floresan mikroskobik, elektron mikroskobik inceleme ve biyokimyasal analizler için ayrılacaktır.

2-)Biyokimyasal analizde örneklenen kalp dokusu homojenatında elisa yöntemi kullanılarak oksidatif stres belirteçleri bakılacaktır .

3-)Floresan mikroskop altında incelenmek üzere immunohistokimyasal yöntem uygulanması amacıyla sistematik rastgele örnekleme ile kalp kesitleri alınacaktır.

4-)Kesitlerde kardiyak hasar ve rejenerasyonla ilişkili hücreler olan telositler anti c-kit/ CD117 ve anti CD34 antikorları ile çift işaretleme yapılarak immunflöresan olarak gösterilecektir.

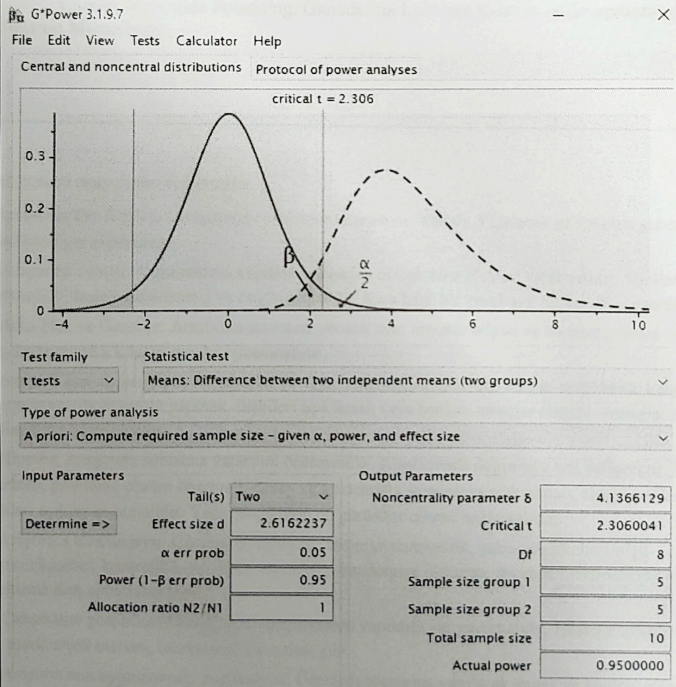
5-)Kesitlerin bir kısmı in situ myokardiyal apopitozisi göstermek amacıyla TUNEL yöntemi kullanılarak işaretlenecek floresan mikroskop altında görüntülenecektir.

6-)Aynı zamanda elektron mikroskobik inceleme için ayrılmış kalp dokularından uygun prosedürler çerçevesinde alınmış yarı ince kesitlerde kardiyomiyosit ve telositlerdeki kardiyak hasarla ilişkili değişiklikler ultrastrüktürel olarak incelenecektir.

7-) Elde edilen veriler, negatif ve pozitif kontrol grupları arasında istatistiksel olarak karşılaştırılıp etken maddenin kardiyak hasar üzerindeki engelleyici- koruyucu özellikleri araştırılacaktır.

10-Örneklem büyüklüğü ve istatistiksel güç

Gruplarımızdaki örneklem büyüklüğünü tespit etmek amacıyla örneklem büyüklüğü ve istatistiksel güç hesaplamasında yaygın kullanımı olan G*Power Version 3.1.9.6 programı kullanılmıştır. Gerekli etki büyüklüğünün hesaplanmasında literatürde bulunan ''Farelerde doksorubisine bağlı kardiyotoksisite ve testis toksisitesine karşı atorvastatinin koruyucu rolü''nün incelendiği ve 4 gruptan oluşan bir çalışma referans alınmıştır (18) . Bahsi geçen çalışmadaki grup verileri ele alındığında etki büyüklüğü: 2.6162237 iken bu etki büyüklüğü ile tip 1 hata 0.05 ve çalışma gücü 0.95 olarak hedeflenerek örneklem büyüklüğü hesaplandığında grup başına 5 kalp gereksinimi ortaya çıkmaktadır.
Kullanılan Gpower program çıktıları aşağıda verilmiştir.



11- İstatistiksel yöntemler

Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde ANOVA testi ve Tekrarlı Ölçümler İçin ANOVA testi kullanılacaktır. ANOVA sonrasında ikili grupların karşılaştırmasında uygun post hoc test kullanılacaktır.

12-Etik Öngörü

Çalışmamızda Gülhane Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış 01.11.2021 tarihli ve ETİK-2021/34 kayıt nolu 21/49 karar nolu "Farelerde Oluşturulan Karbonmonoksit Zehirlenmesi Modelinde Ganoderma Lucidumun Beyindeki Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması " isimli çalışmada beyinleri kullanılan farelerin arşivde bulunan kalp dokuları kullanılacaktır.

13- Anahtar kelimeler

Carbon Monoxide Poisoning, Ganoderma Lucidum Extract, Histopathology, Cardioprotection, Electron Microscopy

Tez konusu onay formu açıklamalar:

*Araştırma/Tez Konusu: Araştırmayı yeterince tanımlayıcı olmalı. Yapılacak çalışmanın tanımlayıcı özellikleri yer almalıdır.

1-Araştırma sorusu: Araştırmanın yapılmasına neden olacak soru cümlesi yazılmalıdır. Sorular "neden ve nasıl" içermelidir, hedefe odaklanmış ve özgün olmalıdır. Soru basit bir evet/hayır ile açıklanamamalıdır.

2-Arka Plan ve Gerekçe: Araştırma sorusuna yönelik özet literatür bilgisi ve bu araştırmanın yapılmasını haklı kılacak gerekçe yazılmalıdır.

3-Araştırmanın amacı: Spesifik amaçlar ve ve hedefler belirlenmelidir. Bunlar tanımlama, karşılaştırma, uyum/benzerlik kontrolü yapmak, ilişkileri açıklamak veya benzeri amaçlar olabilir. Amaçlar bu gibi kelimelerle bitirilmelidir.

4-Hipotez: Araştırma sorusuna varsayım önermesidir. Araştırmada doğruluğu test edilecektir. Bir varsayım içermeli, probleme çözüm önermeli, deney ve gözlemlere sınanmaya açık olmalı, eldeki verilerle uyumlu ve bunları açıklayıcı olmalıdır. Yeni gerçeklerin ön görüsüne olanak sağlamalıdır.

5-Araştırma türü/tasarım: Gözlemsel/deneysel, tanımlayıcı/analitik, vaka serisi/kohort/olgu-kontrol/kesitsel, kontrollü/kontrolsüz, randomize/randomize olmayan, prospektif/retrospektif vb. araştırma türü tanımlanmalıdır.

6- Çalışmanın gerçekleştirileceği yer: Araştırmanın yapıldığı yer yazılmalıdır. Hastane tabanlı/toplum tabanlı, tek merkez/çok merkez, laboratuvar çalışması gibi.

7- Araştırmanın uygulanacağı popülasyon: Üzerinde araştırma yapılacak deney ve kontrol gruplarının özellikleri, nereden bulunacakları, nasıl seçilecekleri belirtilmelidir. Gruplar yapılacaksa grupların eşleştirilme ve seçim kriterlerini belirtiniz. Keza dahil edilme ve hariç tutulma kriterleri yazılmalıdır.

8- Birincil ve ikincil sonlanım noktaları: Birincil sonuç değişkeni araştırma sorusuna cevap aranılacak, sonuç göstergesidir/ölçüttür. Bu aynı zamanda örnek/popülasyon büyüklüğü, güç hesabı ve hipotezi test etmede kullanılacaktır. Bir adet veya en fazla iki adet önceden belirlenmiş olmalıdır. Birincil sonuç değişkeni çeşitli şekillerde ölçülebilir. Örnek: iki seçenekli değişken (caesarean/no caesarean, blood loss ≥500mL/blood loss

<500mL); sürekli değişken (e.g. weight - kg, blood loss - mL); skor (pain - mild, moderate, severe); olayın ortaya çıkışı (survival), ve sayılar (number of infections number of events occurring). Daha sonra ikincil sonuç değişkenleri yazılmalıdır. İkincil sonuç değişkeni, birincil sonuç değişkenleri içinde gruplanmış unsurlardan biri olabilir ya da tamamlayıcı bilgi sağlayabilecek bir başka değişken olabilir.

9- Araştırma Basamakları: Araştırmanın nasıl olacağı, aşama aşama belirtilmelidir. Katılımcıların çalışmaya alınma yöntemi, grupların oluşturulması, randomizasyon yapılıp yapılmayacağı, randomizasyon yapılacak ise detaylı açıklaması yazılmalıdır. Katılımcılara/deneklere hangi müdahalelerin, incelemelerin ve testlerin yapılacağı, tam anlaşılır detayda belirtilmelidir. Araştırmanın birincil ve ikincil sonuç değişkenlerini ölçmek için hangi araçların (anket formları, tıbbi cihazlar, göstergeler, skalalar, vb.) kullanılacağı açık bir şekilde belirtilmeli ve bu araçların geçerliliği (validity) hakkında bilgi verilmelidir.

10-Örneklem büyüklüğü ve istatistiksel güç: Araştırmada örnek büyüklüğü hesaplanmalıdır. Örnek büyüklüğü, kabul edilen bir istatistiksel güçte, hipotezin test edilmesi için gerekli asgari sayıdır.

11- İstatistiksel yöntemler: Araştırma sorusu cevaplandırılmalı, hipotez test edilmeli ve değerlendirmeler için kullanılacak istatistiksel yöntemler belirtilmelidir.

12-Etik Konular: Araştırmanın Helsinki deklarasyonu, İyi Klinik Uygulama (Good Clinical Practice) ilkelerine uygunluğu ve denek araştırma etik kuralları ile çelişmeyeceği belirtilmelidir.

13- Anahtar kelimeler: MesH (Medical Subject Heading) ile uyumlu olmalıdır. En az 3, en fazla 5 kelimeden oluşmalıdır.

KAYNAKÇA

1. Metin Süleyman. KARBONMONOKSİT ZEHİRLENMESİNİN ÖZEL YÖNLERİ. Dalı GH-UHM ve A, editor. 2011;42–7. Available from: http://sualti.org/wp-content/uploads/2016/02/HITAM-4.pdf
2. Lippi G, Rastelli G, Meschi T, Borghi L, Cervellin G. Pathophysiology, clinics, diagnosis and treatment of heart involvement in carbon monoxide poisoning. Clin Biochem [Internet]. 2012;45(16–17):1278–85. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.06.004
3. H K, A C, O B, A Z, R K, H Y, et al. COHgb levels predict the long-term development of acute myocardial infarction in CO poisoning. Am J Emerg Med [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Aug 1];34(5):840–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26947364/
4. RE B, SC W, MJ N. Mass carbon monoxide poisoning: clinical effects and results of treatment in 184 victims. Ann Emerg Med [Internet]. 1982 Aug [cited 2021 Aug 1];11(8):394–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7103154/
5. Piantadosi C. Diagnosis and treatment of carbon monoxide poisoning . Respir Care Clin North Am [Internet]. 1999 Jun [cited 2021 Jul 30];5(2):183–202. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10333448/
6. LW K, KA N. Carbon monoxide poisoning. Emerg Med Clin North Am [Internet]. 2004 Nov [cited 2021 Jul 30];22(4):985–1018. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15474779/
7. Rezaee R, Sheidary A, Jangjoo S, Ekhtiary S, Bagheri S, Kohkan Z, et al. Cardioprotective effects of hesperidin on carbon monoxide poisoned in rats. Drug Chem Toxicol [Internet]. 2019;0(0):1–6. Available from: https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1650753
8. Wachtel-Galor S, Yuen J, Buswell JA, Benzie IFF. Ganoderma lucidum (Lingzhi or Reishi). Herb Med Biomol Clin Asp Second Ed [Internet]. 2011 Mar 28 [cited 2021 Aug 15];175–99. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92757/
9. Krishna K V., Karuppuraj V, Perumal K. Antioxidant activity and Folic acid content in indigenous isolates of Ganoderma lucidum . Asian J Pharm Anal. 2016;6(4):213.
10. Lakshmi B, Ajith TA, Jose N, Janardhanan KK. Antimutagenic activity of methanolic extract of Ganoderma lucidum and its effect on hepatic damage caused by benzo[a]pyrene. J Ethnopharmacol. 2006 Sep 19;107(2):297–303.
11. Ishimoto Y, Ishibashi K, Yamanaka D, Adachi Y, Ito H, Igami K, et al. Enhanced Release of Immunostimulating beta-1,3- Glucan by Autodigestion of the Lingzhi Medicinal Mushroom, Ganoderma

lingzhi (Agaricomycetes). Int J Med Mushrooms [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 15];19(1):1–16. Available from: https://www.dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52,7cc3420179d0cddd,2d531c6e513de3b3.html

12. Rajasekaran M, Kalaimagal C. Cardioprotective effect of a medicinal mushroom, Ganoderma lucidum against adriamycin induced toxicity. Int J Pharmacol. 2012;8(4):252–8.
13. Cai Q, Li Y, Pei G. Polysaccharides from Ganoderma lucidum attenuate microglia-mediated neuroinflammation and modulate microglial phagocytosis and behavioural response. J Neuroinflammation 2017 141 [Internet]. 2017 Mar 24 [cited 2021 Aug 15];14(1):1–13. Available from: https://link.springer.com/articles/10.1186/s12974-017-0839-0
14. Ji Z, Tang Q, Zhang J, Yang Y, Jia W, Pan Y. Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from Ganoderma lucidum. J Ethnopharmacol. 2007 Jul 25;112(3):445–50.
15. Wang Y, Zhang L, Li Y, Hou X, Zeng F. Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a β-glucan from Poria cocos sclerotium. Carbohydr Res. 2004 Oct 20;339(15):2567–74.
16. H X, J Q, G M, F W, J L, H C, et al. [Effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on hemodynamic and antioxidation in T2DM rats]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi [Internet]. 2010 Feb [cited 2021 Aug 15];35(3):339–43. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20423001/
17. Lasukova T V., Maslov LN, Arbuzov AG, Burkova VN, Inisheva LI. Cardioprotective activity of ganoderma lucidum extract during total ischemia and reperfusion of isolated heart. Bull Exp Biol Med. 2015;158(6):739–41.
18. Svvs R, Trivedi PP, Kushwaha S, Vikram A, Jena GB. Protective role of atorvastatin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and testicular toxicity in mice. J Physiol Biochem. 2013;69(3):513–25.

TEZ SAVUNMA SINAV SONUÇ TUTANAĞI

Tez Adı	Ganoderma Lucidum Extraktının Karbon Monoksit Zehirlenmesi Oluşturulmuş Fare Modelinde Kalp Üzerindeki Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi
Uzmanlık Öğrencisi Adı Soyadı	Dr.Tuğba YILMAZ
Eğitim Kurumu	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Savunması Tarihi	01.06.2023
1.Jüri üyesi değerlendirmesi	(X) YETERLİ (.....) YETERSİZ Tez değerlendirme formu eklenecek
2.Jüri üyesi değerlendirmesi	(X) YETERLİ (.....) YETERSİZ Tez değerlendirme formu eklenecek
2.Jüri üyesi değerlendirmesi	(X) YETERLİ (.....) YETERSİZ Tez değerlendirme formu eklenecek
Tez Savunmasının Sınav Sonucu	(X) YETERLİ (.....) YETERSİZ

1.JÜRİ ÜYESİ ADI SOYADI	2.JÜRİ ÜYESİ ADI SOYADI	3.JÜRİ ÜYESİ ADI SOYADI
Prof.Dr.Ayten TÜRKKANI	Prof.Dr.Esra ERDEMLİ	Prof.Dr.Barış BAYKAL

DR. TUĞBA YILMAZ UZMANLIK TEZİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%7	%2	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	www.sualti.org İnternet Kaynağı	%1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.sbu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	web.citius.technology İnternet Kaynağı	<%1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
8	sualti.org İnternet Kaynağı	<%1
9	burkonturizm.com İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Tuğba YILMAZ

Doğum yeri ve tarihi:

Uyruğu:

Medeni durumu:

İletişim adresi ve telefonu: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Anatomi binası Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı

Mail:

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi

Gülhane Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Eğitimi (2019-)

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Lisans Eğitimi (2011-2017)

Ankara Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi (2008-2011)

III- Ünvanları

Stj. Dr.

İntörn Dr.

Pratisyen Dr.

Arş. Gör.

IV- Mesleki Deneyimi

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Araştırma Görevlisi

V- Bilimsel Etkinlikleri

Projeleri: Tübitak 1002-B Acil Destek Projesi (Yürütücü)- Ganoderma Lucidum Ekstraktının Karbonmonoksit Zehirlenmesi Oluşturulmuş Farelerde Kalp üzerindeki Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi

VI- Diğer Bilgiler

Aldığı kurslar ve Sertifikalar:

Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYTE) Laboratuvar Sorumlusu Eğitimi Sertifikası

Kırıkkale Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu

Medipol Üniversitesi & AviceRNA Biyoteknoloji Kök Hücre Eğitimi Sertifikası

İstinye Üniversitesi Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Sempozyumu Sertifikası