

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**AÇIK KALP AMELİYATI YAPILAN KONJENİTAL KALP HASTALIĞI OLAN
ÇOCUK HASTALARDA MİYOKARDİYAL MİTOKONDRI
FONKSİYONLARININ HİSTOPATOLOJİK VE ENZİMATİK
DEĞİŞİKLİKLERLE OLAN İLİŞKİSİ**

Dr. Zeynep Uçar

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Ankara
Ocak 2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**AÇIK KALP AMELİYATI YAPILAN KONJENİTAL KALP HASTALIĞI OLAN
ÇOCUK HASTALARDA MİYOKARDİYAL MİTOKONDRI
FONKSİYONLARININ HİSTOPATOLOJİK VE ENZİMATİK
DEĞİŞİKLİKLERLE OLAN İLİŞKİSİ**

Dr. Zeynep Uçar

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Metin Demircin

Ankara

Ocak 2019

Konu: Dr. Zeynep UÇAR Tıpta Uzmanlık Tezi Kabulü

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Araştırma Görevlimiz Dr.Zeynep UÇAR 19/12/2018 tarihinde , "Açık Kalp Ameliyatı Yapılan Konjenital Kalp Hastalığı Olan Çocuk Hastalarda Miyokardiyal Mitokondri Fonksiyonlarının Histopatolojik ve Enzimatik Değişikliklerle Olan İlişkisi " isimli Tıpta uzmanlık tez sınavını başarı ile geçmiştir.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla arz ederim.

DANIŞMAN

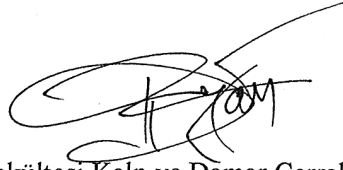
Prof. Dr. Metin DEMİRCİN



Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi A.D.

ÜYE

Prof. Dr. Rıza DOĞAN



Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi A.D.

ÜYE

Prof. Dr. Levent GÖKGÖZ



Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi A.D.



Prof. Dr. Bülent ALTUN
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Başta tez danışmanım Prof. Dr. Metin Demircin olmak üzere bu meslekte bana ne olmam ve ne olmamam gerektiğini öğreten Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyelerine..

Yanımda olan asistan arkadaşlarım ve istisnasız tüm mesai arkadaşlarıma..

Tezimde bana inanan ve hayalimi gerçekleştirmemde büyük destekleri olan Doç. Dr. Burcu Hayta ve Doç.Dr. Banu Peynircioğlu'na..

Kırk yıl geçse de hatırı baki olan, kapısını çaldığımda ben hiç geri çevirmeyen ve tanıdığım en kıymetli insanlardan olan Doç. Dr. Sevgen Önder'e..

Tezime olan destekleri için Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne..

Zor olan her anımı kolaya çeviren, hep olduğum yerde olduğum gibi durduğum için beni gönlüyle seven Ümit Hanım'a..

Beni koşulsuz seven, kış günlerimde hiç bırakıp gitmeyen, döndüğümde gördüğüm, geldiğimde vardığım, dünyanın neresinde olursam olayım, günümde ve gecemde yanımda olan aileme..

Vasat ve riyakar olmadığım, vazgeçmediğim ve var olan inancıma tek bir gün dahi ihanet etmediğim için kendime müteşekkirim.

Ve Prof. Dr. İlhan Paşaoğlu...

Kandan korkmamayı, ölümüne ameliyat yapmamayı, nerede durmam gerektiğini öğretti bana...

Mesleğimin son gününe kadar kalbe attığım tüm düşümler O'nun için...

Erkek dişi sorulmaz muhabbetin dilinde
Hakk'ın yarattığı her Őey yerli yerinde
Bizim nazarımızda erkek kadın farkı yok
Eksiklik noksanlık senin görüşlerinde

Hacı Bektaş-ı Veli

İlim ilim bilmektir,
İlim kendin bilmektir.
Sen kendini bilmezsın,
Ya nice okumaktır.

Yunus Emre

Muasır medeniyeti yaratacak bilim yapma özgürlüğüne sayesinde sahip olduğum, dünümde, bugünümde ve yarınımda hep yanımda olan Kemal Atatürk'e Őükran duygularıyla. Bu tez, isimlerini dahi bilmediğim çocuklarda atan yeryüzündeki tüm kalpler için yazılmıştır.

Zeynep

ÖZET

Uçar Z., Açık Kalp Ameliyatı Yapılan Konjenital Kalp Hastalığı Olan Çocuk Hastalarda Miyokardiyal Mitokondri Fonksiyonlarının Histopatolojik ve Enzimatik Değişikliklerle Olan İlişkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Uzmanlık Tezi, Ankara 2019. Siyanotik ve asiyanotik olarak iki gruba ayrılan konjenital kalp hastalıklarında mitokondriyal transplantasyon gibi inovatif yaklaşımlar çocuk kalp hastaları için yeni cerrahi alternatifler yaratmaktadır. Prospektif çalışmamızdaki amaç mitokondri transplantasyonunun belirli bir grup konjenital kalp hastalığı için cerrahi tedavi sırasında rutin uygulanabilecek bir yaklaşım olup olmayacağını araştırmaktır. Çalışmamıza 5 siyanotik-5 asiyanotik konjenital kalp hastalığı olan çocuk hasta dahil edilmiştir. Siyanotik ve Asiyanotik olarak iki grupta değerlendirilen hastalarda mitokondri fonksiyon bozukluğu, fibrozis, nükleer atipi ve kardiyak enzim değerleri ana parametre olarak kabul edilmiş ve hepsinin ayrı ayrı siyanotik grup ve mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkisinin olup olmadığına bakılmıştır. Ayrıca, kardiyopulmoner baypas ile aort klemp süreleri, yoğunbakım takip süreleri, hospitalizasyon süreleri ve inotropik ajan kullanım ihtiyaçları kaydedilmiştir ve siyanotik grup ile mitokondri fonksiyon bozukluğuyla olan ilişkisine bakılmıştır. Araştırmanın sonucunda siyanotik hasta grubundaki tüm hastalarda mitokondriyal disfonksiyon tespit edilmiştir. Asiyanotik grupta ise hiç bir hastada mitokondri fonksiyon bozukluğu görülmemiştir. Mitokondriyal disfonksiyon olan siyanotik grupta kardiyopulmoner baypas ile aort klemp süresi, yoğunbakım takip ve hospitalizasyon süreleri ve inotropik ajan kullanım ihtiyacının asiyanotik gruba göre fazla olduğu görülmüştür. Hem siyanotik hem asiyanotik grupta tüm

biyopsi örneklerinin normal doku ve normal nükleer yapıdan ciddi fibrozis ve skor 4 nükleer atipiye kadar değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Son olarak, postoperatif kardiyak enzim artış miktarının mitokondri disfonksiyonu olan siyanotik grupta istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Araştırmamız Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde çocuk kalbinde mitokondriyal fonksiyonların ve enzimatik sonuçlarının incelendiği ilk ve tek çalışmadır. Sonuç olarak siyanotik konjenital kalp hastalıklarında mitokondri fonksiyon bozukluğunun olduğu görülmüş, bu disfonksiyonun intraoperatif ve postoperatif sonuçlarla ilişkisi değerlendirildiğinde mitokondri transplantasyonunun siyanotik konjenital kalp hastalığı olan çocuk hastalar için rutin uygulanabilecek ve cerrahi başarı oranını arttırabilecek bir yaklaşım olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Konjenital, kalp, cerrahi, mitokondri, kardiyak enzim

Destekleyen Kuruluş: T.C. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi, Hızlı Destek Projesi, Proje No: THD-2018-16687

ABSTRACT

Ucar Z., Mitochondrial Functions of Myocardium in Children with Congenital Heart Disease, and Their Correlation with Histopathological and Enzymatic Changes, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Cardiovascular Surgery Graduate Thesis, Ankara 2019

The most current innovative approaches such as mitochondria transplantation are promising options for children with congenital heart disease (CHD). In this study, we aimed to determine whether there is a potential pediatric patient group for this surgical option. This prospective study was conducted with 2 groups: children with cyanotic and acyanotic CHD, with 5 patients in each group. Mitochondrial dysfunction, fibrosis, nuclear atypia, and cardiac enzyme levels were evaluated as major parameters of the study. Additionally, the cardiopulmonary bypass duration, aortic clamp duration, intensive care unit follow-up, inotropic agent usage, and hospitalization duration of all patients were recorded. We evaluated the relationship of each parameter with cyanosis and mitochondrial dysfunction. The results showed that mitochondrial dysfunction was positive in all patients in the cyanotic group. However, there was no sign of mitochondrial dysfunction in acyanotic patient group; this finding may be assumed as a strong evidence for the relationship between cyanotic CHD and mitochondrial dysfunction. The cyanotic group with mitochondrial dysfunction had significantly longer cardiopulmonary bypass and aortic clamp duration, and their intensive care unit follow-up and hospitalization time were much longer than those of the acyanotic patient group. The cyanotic patient group with mitochondrial dysfunction also had higher usage of inotropic agent. We classified the fibrosis and nuclear atypia on a scale of 1 to 4, with 1 as normal tissue structure and 4 as severely

damaged tissue. All grades of tissue damage in terms of fibrosis and nuclear atypia were noted for both groups. Lastly, the postoperative cardiac enzyme levels and mitochondrial dysfunction relationship was determined to be statistically significant. Our present research is the first and the only scientific study at Hacettepe University Faculty of Medicine for the investigation of mitochondrial dysfunction and cardiac enzyme level in children with cyanotic CHD. As the pediatric patient group with cyanotic CHD showed mitochondrial dysfunction, mitochondrial transplantation may be considered as a routine approach during surgery for surgical success in patients with cyanotic CHD with mitochondrial dysfunction.

Keywords: Congenital, heart, surgery, mitochondria, cardiac enzyme

Supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit, Project Number: THD-2018-16687

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolarLAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnsan Vücudunun Organizasyonu	4
2.2. Ökaryotik Hücre Organizasyonu	4
2.3. Ökaryotik Hücre Organelleri	6
2.4. Mitokondri	11
2.5. Kalpte Mitokondri	22
2.6. İnsan Kalbi	24
2.7. Konjenital Kalp Hastalıklarında Mitokondrinin Yeri	30
3. GEREÇ ve YÖNTEM	37
3.1. Etik Kurul Onamı	37
3.2. Hasta Seçimi	37
3.3. Hasta Grupları	38
3.4. Cerrahi Prosedür ve Biyopsi Materyallerinin Alınması	40
3.5. Postoperatif İzlem	42
3.6. Histopatolojik İnceleme	43

3.7. Doku Kesitlerinde İmmunfloresan Boyama	43
3.8. Doku Kesitlerinde COX/SDH İkili Boyama	45
3.9. Doku Örneklerindeki ATP Miktarının Analizi	45
3.10. Doku Örneklerinde Protein Miktar Tayini	46
3.11. Verilerin Değerlendirilmesi	48
4. BULGULAR	49
4.1. Hasta Grupları	49
4.2. Hastaların İntraoperatif Değerleri ve Postoperatif Takibi	49
4.3. Histopatolojik Değerlendirme	57
4.4. Mitokondriyal Fonksiyonların Değerlendirilmesi	64
4.5. Mitokondriyal Disfonksiyonun Fibrozis ile İlişkisi	71
4.6. Mitokondriyal Disfonksiyonun Nükleer Atipi İle İlişkisi	73
4.7. Mitokondriyal Disfonksiyonun Postoperatif Kardiyak Enzim Değerlerinin Artışı ile İlişkisi	74
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	83
7. KAYNAKLAR	89
EKLER	
EK1: ETİK KURUL ONAYI	

KISALTMALAR

ACT	Activated coagulation time
ADP	Adenozin difosfat
ASD	Atrial septal defekt
ATP	Adenozin trifosfat
AVCD	Atriyoventriküler kanal defekti
BSA	Bovine serum albumin
CK-MB	Kreatin kinaz- MB
COX	Sitokrom C Oksidaz
CPB	Kardiyopulmoner baypas
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DCMP	Dilate kardiyomiyopati
DNA	Deoksiribonükleik asit
DORV	Çift çıkımlı sağ ventrikül
ECMO	Extracorporeal membrane oxygenation
FADH ₂	Flavin adenin dinükleotid
FSGS	Fokal sklerotik glomerüloskleroz
GT	Gomori trikrom
HE	Hematoksilen eozin
KCFT	Karaciğer fonksiyon testi
LVAD	Left ventricular assist device
MELAS	Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes
MERRF	Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
MR	Mitral yetmezlik

MS	Mitral stenoza
mtDNA	Mitokondriyal deoksiribonukleik asit
MT	Masson trikrom
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
nDNA	Nükleer DNA
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehit
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribosomal ribonükleik asit
RRF	Ragged Red Fibers
SDH	Süksinat dehidrogenaz
TGA	Transposition of great arteries
TOF	Fallot tetralojisi
TNF α	Tümör nekroz faktörü alfa
tRNA	Transfer ribonükleik asit
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
VSD	Ventriküler septal defekt

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1.1. Leonardo da Vinci Kalp Eskizleri.	3
2.1. Ökaryotik Hücre İllüstrasyonu.	6
2.2. Mitokondri İllüstrasyonu.	13
3.1. Araştırmaya Dahil Edilen Hasta Grupları.	39
3.2. Araştırmaya Dahil Edilen Hastaların Tanıları.	39
4.1. Siyanotik ve Asiyanotik Grupların Aort Klemp ve Kardiyopulmoner Baypas Süreleri.	50
4.2. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Aort Klemp ve Kardiyopulmoner Sürelerinin Mean ve Median Değerleri.	51
4.3. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Yoğunbakım Takip ve Hospitalizasyon Süreleri.	55
4.4. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Yoğunbakım Takip ve Hospitalizasyon Süreleri Mean ve Median Değerleri.	56
4.5a. Miyosit Atipisinin Histolojik Değerlendirmesi ve Skorlaması.	58
4.5b. Miyositer Fibrozis Histolojik Değerlendirmesi ve Skorlaması.	59
4.6. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Nükleer Atipi Değerlendirmesi.	61
4.7. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Fibrozis Değerlendirmesi.	62

- 4.8. Siyanotik ve Asiyanotik Konjenital Kalp Hastalığı Olan Bireylere Ait Kalp Kası Biyopsi Örneklerinden Alınan Boyuna ve Enine Kesitlerde Mitokondri Morfolojisinin Floresan Mikroskobu Görüntüleri. 67
- 4.9. Siyanotik ve Asiyanotik Konjenital Kalp Hastalığı Olan Bireylere Ait Kalp Kası Biyopsi örneklerinden Enine Kesitlerde COX/ SDH İkili Boyama Görüntüleri. 68
- 4.10. Siyanotik ve Asiyanotik Konjenital Kalp Hastalığı Olan Bireylere Ait Kalp Kası Biyopsi Örneklerinde ATP Miktarının Analizi. 69
- 4.11. Siyanotik ve Asiyanotik Konjenital Kalp Hastalığı Olan Bireylere Ait Kalp Kası Biyopsi Örneklerinde Miktarlarının Karşılaştırılması ve Hastalardaki Total Protein Miktarlarına Göre Normalize Edilmiş ATP Miktarları. 70
- 4.12. Mitokondri Fonksiyon Bozukluğu Olan ve Olmayan Hastalarda Preoperatif ve Postoperatif Kardiyak Enzim Değerleri. 75

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. Mitokondriyal Disfonksiyon Klinik Semptomları.	33
2.2. Kardiyovasküler Semptomları Olan Mitokondriyal Sendromlar.	34
2.3. Mitokondriyal Hastalıklar Tanı Kriterleri.	35
3.1. Kardiyak Panel Referans Aralığı ve Birimi.	42
4.1. Siyanotik ve Asiyantotik Grup Aort Klemp ve CPB Sürelerinin Mann-Whitney U Testi ile Analizi.	52
4.2. Siyanotik ve Asiyantotik Grup İnotropik Ajan Kullanımının Fisher Exact Testi ile Analizi.	53
4.3. Siyanotik ve Asiyantotik Grup Yoğunbakım Takip ve Hospitalizasyon Sürelerinin Mann-Whitney U Testi ile Analizi	54
4.4. Siyanotik ve Asiyantotik Grupların Nükleer Atipi ve Fibrozis ile İlişkisinin Fisher Exact Testi ile Analizi.	63
4.5. Mitokondriyal Fonksiyonların Fibrozis ile İlişkisinin Fisher Exact Testi ile Analizi.	72
4.6. Mitokondriyal Fonksiyonların Nükleer Atipi ile İlişkisinin Fisher Exact Testi ile Analizi.	73
4.7. Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğunun Postoperatif Dönemde Kardiyak Enzim Değerlerindeki Artışı ile İlişkisinin Mann-Whitney U Testi ile Analizi.	76

1. Giriş

Siyanotik ve asiyanotik konjenital kalp hastalıkları gelişim mekanizması ve tedavi yaklaşımı açısından gerek cerrahi gerekse temel bilimler bakış açısıyla bir çok çalışma ve araştırma alanı içeren geniş bir hastalık grubudur.

Kalbin tarihçesi çok eski yıllara dayanmaktadır. Aristotle'ın inancına göre "can" kan olarak vücutta dolaşmaktadır ve kalp kan üretmektedir. Dolayısıyla can ve ruh kalpte bulunmaktadır (1). Plato kalbi dolaşımın kaynağı olarak tanımlamışken Hipokrat ise vücutta dolaşan kanın kalpten geçerek akciğerlere ulaştığını söylemiştir (1, 2). Yunan hekim Galen ise venöz ve arteriyel kanı, koyu kırmızı ve parlak kırmızı olarak ayrı ayrı tanımlamış kalbin ise vücuttaki en yüksek ısıya sahip organ olduğunu söylemiştir (1, 2). Konjenital kalp hastalıklarıyla ilgili tarihte bilinen ilk çizimler ise eskizleri ile Leonardo da Vinci'ye aittir (3, 4) (Şekil 1.1.).

Kalp cerrahisinin tarihinde ilk perikardiyostomi ameliyatı perikardiyal efüzyon için 19. yüzyılda Francisco Romero tarafından gerçekleştirilmiştir (5). Konjenital kalp cerrahisinde ise ilk başarılı ekstrakardiyak düzeltme ameliyatı olan PDA kapatılması 1938'de Gross ve Hubbard tarafından Boston Çocuk Hastanesi'nde gerçekleştirilmiştir (6). Günümüzde ise dünyada birçok merkezde kompleks konjenital kalp hastalıklarının cerrahi tamiri başarı ile gerçekleştirilmektedir.

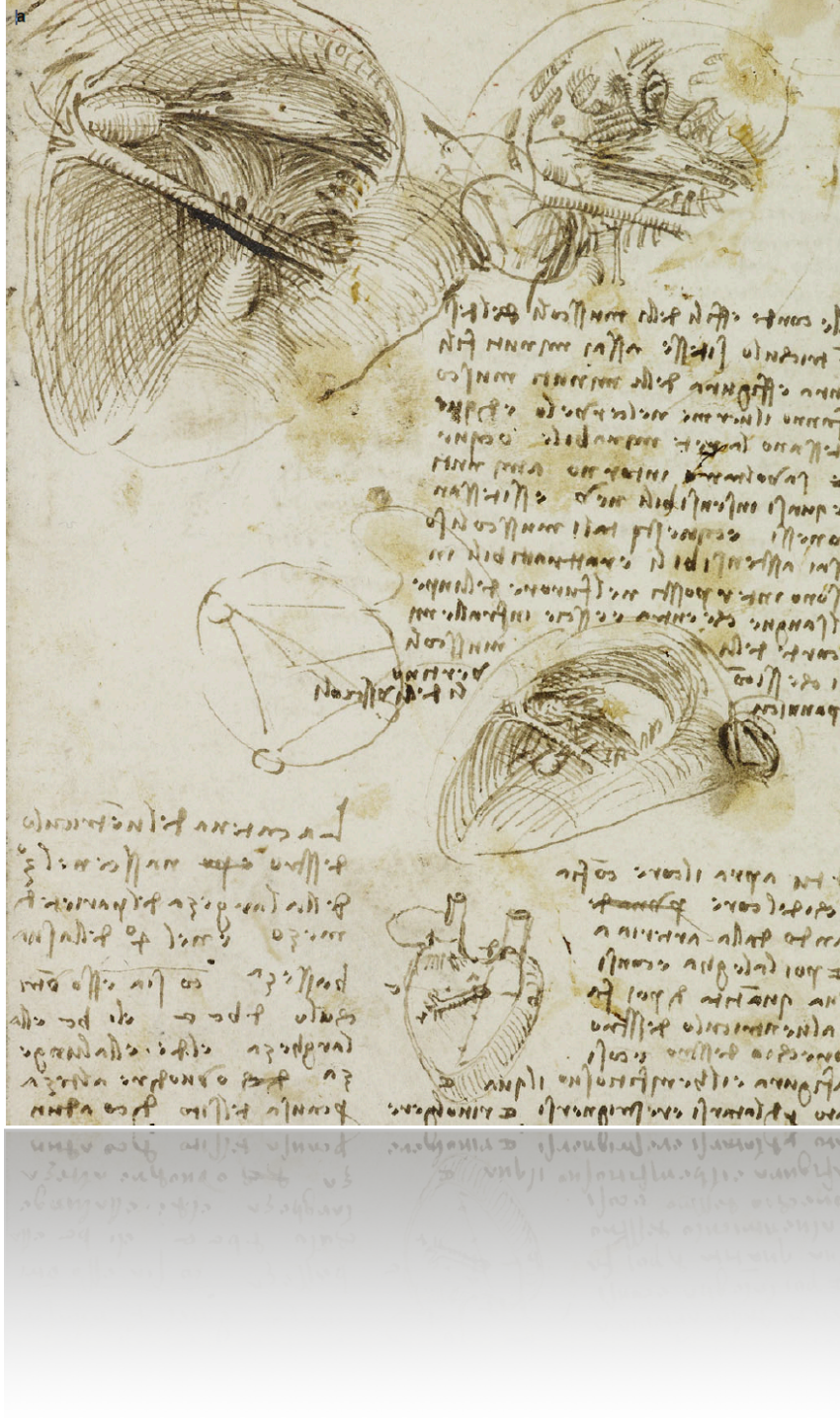
Konjenital kalp hastalıklarının tedavisinde en önemli basamaklardan biri kalp kasının yapısını ve fizyolojisini bilmektir. Kalp kası sürekli olarak çalışan dolayısıyla yüksek miktarda enerji ihtiyacı olan özelleşmiş bir kas grubudur. Bu sebeple, hücrelerin ve dokuların enerji üretim merkezi olan mitokondri organeli miyositlerde büyük öneme sahiptir.

Günümüzde siyanotik ve asiyanotik konjenital kalp hastalıkları için birçok medikal ve cerrahi tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Diğer yandan dünyada önemli merkezlerde otolog mitokondri transplantasyonu gibi inovatif çalışmalar yürütülmektedir (7, 8). Bu çalışmalar geleneksel kalp cerrahisi yaklaşımlarına katkıda bulunarak konjenital kalp hastalıklarının geleceğini şekillendirecek olan araştırmalardır.

Çocuk hasta grubunda yürüttüğümüz bu prospektif çalışmamızda siyanotik ve asiyanotik konjenital kalp hastalığı olan kalpte miyosite ait yapısal farklar ile mitokondriyal fonksiyonları ve bunların enzimatik ve histopatolojik yansımaları araştırılmış ve tüm parametrelerin birbirleri ile ilişkisi olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Yaptığımız bu araştırma ile konjenital kalp hastalığı sebebiyle ameliyat endikasyonu olan çocuk hastalara yeni bir perspektif yaratarak var olan cerrahi tedavi seçeneklerinin sonuçlarını güçlendirecek yaklaşımlar yaratmayı ve isimlerini dahi bilmediğimiz kalp hastası olan dünyadaki tüm çocukların hayat kalitelerini artıracak alternatifler geliştirerek cerrahi bilime ve çocuk kalp cerrahisine katkıda bulunmayı hedefledik.

Şekil 1.1. Leonardo da Vinci Kalp Eskizleri¹



¹The Heart of Leonardo by Francis C. Wells; ISBN 978-1-4471-4530-1 ISBN 978-1-4471-4531-8 (eBook), DOI 10.1007/978-1-4471-4531-8, Springer London Heidelberg New York Dordrecht

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNSAN VÜCUDUNUN ORGANİZASYONU

Tek hücreli bakterilerden kompleks organizmalara kadar tüm canlılar hücrelerden meydana gelmektedir. Taksonomik olarak *Homo Sapiens* olarak tanımlanan insanın fizyolojisini ve sistemlerinin birbirleri ile olan etkileşimini hücreden başlayarak tümüyle anlamak, bilimin ve tıbbın omurgasıdır. Evrimsel olarak morfolojik, fizyolojik, gelişimsel ve davranışsal adaptasyonlar geçirerek bugünkü halini alan insan bedeni, yaklaşık olarak 100 trilyon hücreden oluşmaktadır (9, 10). İnsan vücudunu oluşturan hücreler ortalama 10-100 mikrometre genişliğindedir. En büyük hücrelerden biri ovum iken en küçük insan hücresi ise spermidir. İnsan evrimi boyunca tüm hücreler spesifik fonksiyonlar için özelleşerek adaptasyon göstermişlerdir. Özellikle tüm organ ve sistemlerin en temel fonksiyonu, *homeostaz* terminolojisi ile ifade edilen ve hayati öneme sahip olan stabilizeyi sağlamaktır (10). Ancak homeostaz sağlandığı sürece hücreler canlılığını korur ve hücre, doku, organ ve sistem bütünlüğünde insan fonksiyonel bir şekilde hayatını devam ettirir.

2.2. ÖKARYOTİK HÜCRE ORGANİZASYONU

Etimolojik kökeni Latince *cella* olan hücre kelimesi 'küçük oda' anlamına gelmektedir. Nobel ödüllü bilim insanı Francois Jacob'un dediği gibi hücrenin keşfedilmesiyle biyoloji ile uğraşanlar kendi atomlarını bulmuşlardır. Her hücrenin hayali iki hücre olabilmektir diyerek aslında hayatın anlamını da özetlemiştir.

Hücreler ökaryotik ve prokaryotik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Nükleus, organel ve sitoplazma içeren, membranı olan hücreler ökaryotik hücre olarak tanımlanmaktadır. Nükleus ve organelleri içerecek şekilde tanımlanan sitoplazmaya ise protoplazma denilmektedir.

Protoplazma ilk olarak 1839 yılında kalpteki Purkinje hücrelerini de keşfeden Çek fizyolog Jan Evangelista Purkinje tarafından tüm hayati olayların gerçekleştiği temel madde olarak tanımlanmıştır (11, 12).

Standart bir hücrenin içeriğine bakıldığında 70-85% oranında su; 10-20% oranında çoğunluğu enzim olan yapısal ve fonksiyonel protein; 1% oranında özellikle hücrede temel enerji kaynağı olarak rol alan karbonhidrat; 2% oranında fosfolipid, kolesterol, trigliserid ve nötral yağlar alt gruplarıyla yağ; sodyum, potasyum, magnezyum, fosfat, sülfat, bikarbonat, klor ve kalsiyum gibi hücresel reaksiyonlarda önemli olan elektrolitlerin olduğu görülmektedir (10).

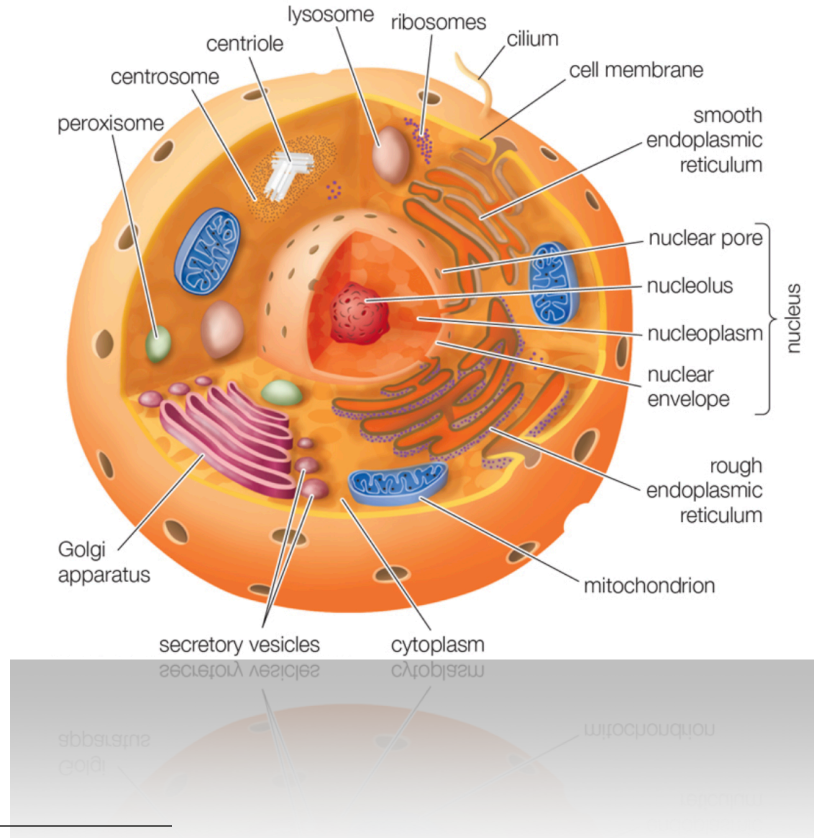
Yapısal açıdan değerlendirildiğinde ise hem sitoplazma hem de nükleusun özelleşmiş membranlar ile çevrili olduğu görülmektedir. Bu membranlar, suyun ve suda çözünen inorganik maddelerin hücre kompartmanları arasında kontrolsüz geçişini önlemek için bariyer görevi görmektedir (10).

Ancak bir bütün olarak hücre fonksiyonunun temel felsefesini anlayabilmek için hücre kompartmanları ve onların spesifik özellikleri incelenmelidir.

2.3. ÖKARYOTİK HÜCRE ORGANELLERİ

Ökaryotik hücrelerde sitoplazma internal membranlar ile çeşitli kompartmanlara ayrılmıştır. Bu kompartmanların her biri organel olarak tanımlanmaktadır. Organeller fonksiyonel olarak birbirlerinden bağımsız, kendi mikro alanları olan, spesifik protein ve enzimleri bulunan yapılardır. Bu yapılanma, programlanmış kompleks organizasyonu oluşturmaktadır. Lokal kimyasal alanlarla beraber programlanmış kompleks reaksiyonların devamlılığı homeostazı sağlamaktadır. Bu sebeple, homeostaz için her bir organel ayrı öneme sahiptir (Şekil 2.1.).

Şekil 2.1. Ökaryotik Hücre İllüstrasyonu²



²Illustration. Encyclopædia Britannica Online. Web. 22 Sep. 2018.

<<https://www.britannica.com/science/mitochondrion/media/386130/112877>>

2.3.1. Plazma Membranı

Plazma membranı tüm hücrelerde bulunan, organizasyon derecesi son derece yüksek biyokimyasal reaksiyonların gerçekleştiği hücre içi ile dış çevre arasındaki fiziksel bariyerdir. Dinamik yapısını fosfolipidler ve integral proteinler ile glikolipid, glikoprotein yapısında karbonhidratlar oluşturmaktadır. Çift tabakalı olan fosfolipid yapısı membranın akışkan ve esnek olma özelliğini sağlamaktadır. Bu özelliğe '*akışkan mozaik model*' adı verilmektedir (13). Tüm hücreleri sararak dış bariyer oluşturan plazma membranı, aynı zamanda hücre içi ve hücre dışı çevre arasındaki geçişin kontrollü şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır. Membranda bu geçişi sağlayan fizyolojik kapılar bulunmaktadır. Plazma membranını penetre ederek bu kapıları oluşturan proteinlere ise integral proteinler adı verilmektedir (10).

2.3.2. Nükleus

Ökaryotik hücreler kendi deoksiribonükleik asitini (DNA) içeren ve nükleus adı verilen membranla çevrili intraselüler bir yapıya sahiptir. Nükleus, bir hücrenin sahip olabileceği en özelleşmiş organeldir ve evrimin temel sonucudur.

Nükleus, stoplazmadan nükleer membran ile ayrılmaktadır. Bu çift tabakalı membran üzerinde nükleer por adı verilen geçişler bulunmaktadır. Porlar makromoleküllerin geçişi için birer fizyolojik kapıdır. Nükleusun en önemli özelliği ise hücrenin genomunu içermesi ve DNA ve ribonükleik asit (RNA) moleküllerinin sentezlendiği yer olmasıdır (10).

2.3.3. Sitoplazma

Sitoplazma nükleus dışındaki hücre içi tüm yapıları saran ve hücre içi zemini oluşturan temel maddedir. Yoğunluğu yüksek ve akışkan bir yapıya sahiptir. Enzimlerin ve moleküllerin hücre içi difüzyonu sitoplazma aracılığıyla sağlanmaktadır. Sitoplazma, standart bir hücre hacminin yaklaşık olarak yarısını oluşturmaktadır (10). Renksiz olan sitoplazmanın yaklaşık 80%'ini su oluşturmaktadır (14). Ek olarak, protein sentezi ve degradasyonu, glikoliz gibi kompleks biyokimyasal reaksiyonlar da sitoplazma da gerçekleşmektedir (10).

2.3.4. Hücre İskeleti

Sitoskeleton olarak da bilinen hücre iskeleti aktin ve mikrotübül gibi protein filamentlerinden meydana gelmektedir. Hücre içi bağlantıları sağlayan ana çatıyı oluşturmaktadır. Sitoplazma boyunca nükleustan plazma membranına kadar uzanan ağ kompleksidir (15).

2.3.5. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum, birbiri ile bağlantılı membran keselerinden oluşan geniş bir ağıdır. Endoplazmik retikulum 'granüllü endoplazmik retikulum' ve 'düz endoplazmik retikulum' olarak ikiye ayrılmaktadır (10, 16).

Granüllü endoplazmik retikulumun sitoplazma tarafındaki yüzünde ribozomlar bulunmaktadır. Bu sebeple 'granüllü' olarak sınıflandırılmaktadır. Bu ribozomlar sekrete edilerek serbestleştirilecek olan membran proteinlerinin sentezinden sorumludur (10, 16, 17).

Proteinler, endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlarda sentezlendikten sonra yine endoplazmik retikulumun ya lümeninde ya da membranında birilmektedirler. Ardından Golgi organeline transfer olurlar (10, 16, 17). Golgi, proteinleri hedef hücreye yönlendirmek için gereken biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştirmektedir (10, 16, 17).

Düz endoplazmik retikulum ise hücre içinde kullanılacak olan lipid ve steroidlerin sentezinden ve metabolizmasından sorumludur (10, 16, 17).

2.3.6. Golgi Cisimciği

Golgi organeli hücre içindeki en dinamik organellerden biridir. Memeli canlıların hücrelerinde nükleusa yakın yerde lokalize olmuştur. Endoplazmik retikulumdan köken alan veziküllerden oluşan ve sisterna adı verilen yapılardan oluşmuştur (10, 16). Temel olarak, hücre yüzeyinde eksprese edilecek kompleks yapılı karbonhidratların sentezinden ve sekrete edilecek olan proteinlerin paketlenmesinden sorumludur (10).

2.3.7. Lizozom

Lizozom, boyutu 1 mikrometreden küçük olan lizozomal enzimlere sahip organeldir. Hidrolitik enzimleri bulunan sferik yapılardır. Hücre içi protein, karbonhidrat ve yağlar lizozomal enzimler tarafından yıkılmaktadır (10). Lizozomlar hidroliz için optimal asidoza sahiptir ve lizozomal pH 4.5-5.0'dir (10, 18). 60 farklı çeşitte enzim içermektedir ve boyutları değişkenlik göstermektedir (19, 20). Hücre için gerekli olmayan ürünleri endositoz ile organel içine alan lizozom, otofaji ile yıkım sağlayarak hücresel sindirimi gerçekleştirmiş olur (16, 20).

2.3.8. Mitokondri

Çalışmamızda fonksiyonlarını öncelikli olarak incelediğimiz mitokondri organeli hücrenin reaksiyonları yürütmek için ihtiyacı olan kimyasal enerjiyi sağlamada kritik rol oynamaktadır. İnsan vücudunda yüzlerce hücre bulunmaktadır ve hepsinin fonksiyonlarına spesifik özelleşmiş yapıları vardır (10, 16). Özellikle, kalp kası hücresi için belli bir düzeyde enerji sürekli olarak hazır bulunmalıdır (10). Organizmanın canlılığa ait fonksiyonlarını stabil koşullar ile yürütmesinde mitokondri kilit organel olarak görev yapmaktadır (16, 21). Bu sebeple, hayatın dengesini daha iyi anlayabilmek için mitokondrinin detaylı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir.

2.4. MİTOKONDRI

2.4.1. Mitokondrinin Evrimi

Mitokondri terimi literatürde ilk defa 1898 yılında kullanılmıştır (22). Mitokondriyal evrimin tarihçesi milyarlarca yıl öncesine dayanmaktadır. İlk belirtileri 3.5 milyar yıl öncesine dayanan primitif hücrelerin bazıları, atmosferde serbest oksijen olmaması sebebiyle ihtiyaçları olan enerjiyi direkt olarak abiyotik moleküllerden elde ederken, bazıları ise güneş ışığı ve su moleküllerini enerji kaynağı olarak kullanmakta ve fotosentez yapmaktaydı (23, 24). Ancak, bu reaksiyonun sonucu olarak ortaya çıkan oksijen atmosferin kimyasal yapısında değişime yol açmış ve birçok prokaryot hücrenin canlılık kapasitesini etkileyerek evrim süreci içinde yok olmasına sebep olmuştur ve doğada ilk defa ökaryotik hücreler kendini göstermeye başlamıştır (23).

Diğer yandan oksijenden zengin ortamda yaşayabilen ve oksijeni enerji kaynağı olarak kullanan küçük boyutlu yeni bir hücre grubu ihtiyacı doğmuştur (23). Fakat bu hücreler kendileri için gerekli olan kimyasal besin maddelerini sağlayamamaktaydılar. Evrimsel süreç içinde daha büyük boyutlu hücre grubu ve oksijen kullanan bu küçük hücre grubu endositoz ile birleşmişlerdir. Büyük taşıyıcı hücre, küçük boyutlu hücrenin canlılığı için gerekli olan besin maddelerini sağlarken ürettiği enerjiyi de kendi ihtiyacı için kullanmıştır ve ortak fayda sağlanan bir canlılık ilişkisi ortaya çıkmıştır (23, 25).

Yüzyıllar süren bu ortak yaşamda bu iki hücrelerden ev sahipliği yapan büyük hücre ve diğer hücreye endositozla yerleşen küçük hücre canlılıklarını sürdürebilmek için birbirlerine bağımlı hale gelmişlerdir (23, 25). Bu evrimsel sürece '*endosimbiosis*' denilmektedir.

Endosimbiosis bizim ökaryot olarak bildiğimiz, organeli ve nükleusu olan özelleşmiş hücre grubunu meydana getiren temel olaydır. Endositozla içeri alınan ve oksijen kullanarak enerji üreten küçük hücreler zaman içinde adaptasyon geliştirmişler ve hücrenin enerji üretim merkezi olan mitokondri haline gelmişlerdir (23, 25).

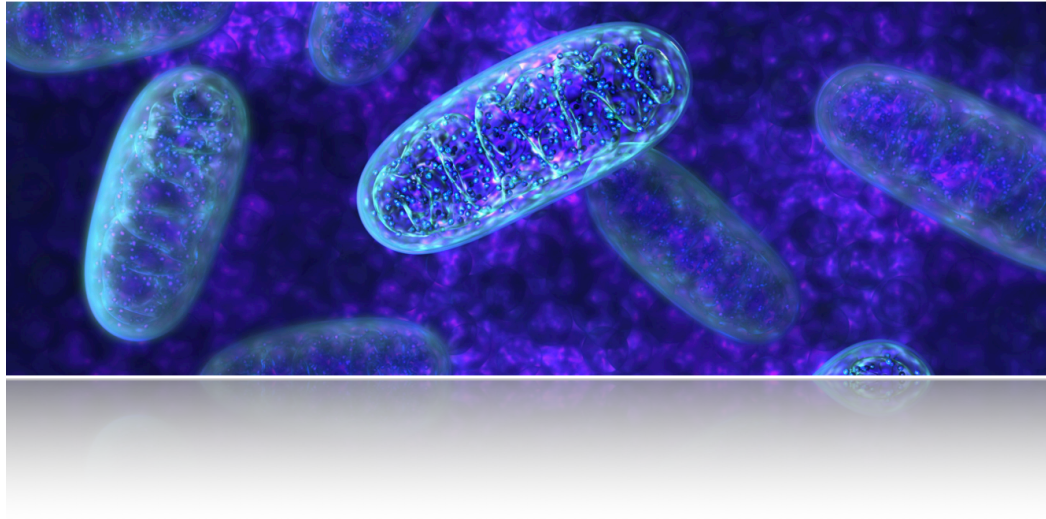
Günümüz organizasyonunda bir vücutta mitokondri yaklaşık 30 milyon voltmetre elektrik üretmektedir. Bu potansiyel enerji miktarı gökyüzünü aydınlatabilecek düzeydedir.

Özetle, bugün hepimizin yaşamını sürdürmesine sebep olan olay milyarlarca yıl önce meydana gelen ve sürekli olarak değişip yenilenen evrimsel olasılıklar bütünü sayesinde oluşmuştur.

2.4.2. Ökaryotik Hücrede Mitokondri

Ökaryotik hücrede bulunan ve adenzin trifosfat (ATP) üretmesi sebebiyle hayati öneme sahip olan mitokondri, fosfolipid ve protein yapıda iç ve dış membrana sahiptir ve boyutları 0.75-3 mikrometre arasında değişmektedir (26, 27) (Şekil 2.2.). Bir de matriks adı verilen ve iç membran tarafından çevrili, mitokondriyal reaksiyonların gerçekleştirildiği bir iç alana sahiptir (26). Total mitokondriyal proteinin 2/3'ü matrikse aittir (26). Bu organel, kendi DNA'sına sahiptir ve nükleustan bağımsız olarak replikasyon yapabilme özelliği vardır (10, 16). Mitokondriyal DNA (mtDNA), ribozom, transfer ribonükleik asit (tRNA) ve yüzlerce enzim ile birlikte matrikste bulunmaktadır (26). Enerji üretiminin yanı sıra hücre siklusu ve büyümesinin kontrolü, farklılaşması ve ölümünde de görevi bulunmaktadır (28). ATP'nin canlılık için evrensel tüketim birimi olduğu düşünüldüğünde, mitokondriyi hücrenin jeneratörü olarak isimlendirmek ise yanlış olmaz.

Şekil 2.2. Mitokondri İllüstrasyonu³



Mitokondri hücre içinde ATP ihtiyacının çok olduğu yerlere yerleşmiştir. Mitokondri sayısı ise bulunduğu dokuya göre değişkenlik göstermektedir. Örneğin, tek bir karaciğer hücresinde ortalama 1000-2000 adet mitokondri bulunmaktadır ve hücre hacminin yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadır (26). Aynı şekilde mitokondriyal protein üretimi de dokudan dokuya değişkenlik göstermektedir. Örneğin, kalp hücresinde 615 farklı çeşit mitokondriyal protein üretilmektedir (29). Dinamik bir yapısının olması sebebiyle mikrotübül gibi hücresel iskelet yapılar üzerinde hareket edebilmekte ve hücre içi başka bir lokasyona ulaşabilmektedir (30, 31). Kendi DNA'sını üretmek özelliğinin yanında başka mitokondri ile füzyon gerçekleştirip bölünebilmektedir. Ayrıca, membran geçirgenliğinde meydana gelen değişimler programlı hücre ölümünün erken safhalarıyla ilişkilidir.

³ Older Moms More Likely to Pass Along Mitochondrial DNA with Mutations, Study Finds by Iqra Mumal, June 29, 2018; <https://mitochondrialdiseasenews.com/category/news-posts/page/2/>

Mitokondri hareketi henüz tam olarak bilimsel anlamda açıklanmış değildir ancak mitokondrilerin sitoplazmada statik bir şekilde durmadığı bilinmektedir. Bu dinamik yapılanma acil ATP ihtiyacı olması durumunda mitokondrinin ilgili yere transferini sağlamaktadır. Hücre içi hareketi ise motor proteinler aracılığıyla gerçekleştirmektedir.

Hücre içi işleyişini tam olarak anlayabilmek için mitokondrinin matriks olarak isimlendirilen en iç bölümündeki kimyasal reaksiyonların bilinmesi önemlidir.

2.4.3. Mitokondriyal Enerji Üretimi

Temel fonksiyonunun yüksek enerji potansiyeline sahip adenozin trifosfat (ATP) molekülü üretimi olması sebebiyle mitokondriler hücrelerin elektrik santrali olarak görev yapmaktadır (10, 28). Gün içinde tükettiğimiz besinlerdeki potansiyel enerjiyi ATP'e çevirmektedir. Üretilen ATP canlılığın sağlanması için gereken iş gücünü sağlamaktadır (10, 32). ATP canlılığın devamında kritik role sahip olduğu için bir hücrenin yüksek miktarda ATP üretebilme kapasitesine sahip olması ve bu sürecin kontrollü regülasyonu çok önemlidir (10, 32).

ATP üç çeşit hücre fonksiyonunda görev almaktadır (10, 32):

1. Canlılığın yürütülmesinde fonksiyonu olan kimyasal bileşenlerin hücre içi üretimi
2. Sodyum-potasyum pompası örneğinde olduğu gibi membran transportu
3. Kas kontraksiyonu gibi mekanik iş üretimi

Adenozin trifosfat; hücrede sitozolde gerçekleşen glikoliz ile mitokondride gerçekleşen sitrik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon sonucu üretilmektedir. Tamamına *hücre sel solunum* denilmektedir ve her 1 birim glukozdan yaklaşık olarak 30 birim ATP üretilmektedir (32, 33).

Kimyasal reaksiyonların bir bütünlük halinde devam ettirilmesi, tüketilen enerjinin sağlanmasına bağlıdır. Bu enerji, oksijen kullanılarak bir dizi düzenli reaksiyon ile üç kaynaktan elde edilmektedir: karbonhidrattan elde edilen glukoz, yağdan elde edilen yağ asitleri, ve proteinlerden elde edilen aminoasitler. İlk kullanım tercihi ise glukozdur (32, 33).

Gün içinde tüketilen besinler sindirilerek basit şeker olan glukozla çevrilmektedir. Yüksek miktardaki glukoz, dolaşım sistemi ile her bir hücreye dağıtılmaktadır. Hücre içi enerji üretimi glukozun hücreye girmesi ile başlamaktadır. Sitoplazmada meydana gelen ve 10 basamaktan oluşan bu ilk reaksiyonlar bütününe *glikoliz* adı verilmektedir (10, 32). Glikoliz sonucunda bir birim glukozdan iki birim pürivat ve iki birim ATP üretilmektedir (10, 32). Glikolizin esas amacı sitrik asit döngüsünde kullanılacak olan pürivatın üretimidir. Sitoplazmada glikoliz ile üretilmiş olan pürivat daha fazla ATP üretimi için mitokondri matriksine transfer edilmektedir (10, 32).

Mitokondriyal matrikste meydana gelen sitrik asit döngüsü için üretilmiş olan pürivat Koenzim A ile reaksiyona girerek Asetil KoA oluşturmaktadır. Sitrik asit döngüsünde Asetil KoA hidrojen iyonuna ve karbondioksite ayrışmaktadır (10, 26, 32, 33) . Yüksek düzeyde reaktif olan hidrojen iyonları en son basamakta difüzyon ile mitokondriye gelmiş olan oksijen ile reaksiyona girmektedir (10, 26, 32, 33). Oksidatif fosforilasyonun bir parçası olan ve mitokondri membranında gerçekleşen *Elektron Transport Zinciri'nde Kompleks I-II-III-IV* olarak adlandırılan dört farklı yapı bulunmaktadır (10, 26, 32, 33).

Bu kompleksler ATP üretiminde elektron taşıyıcısı olarak görev yapmaktadırlar (10, 26, 32, 33). Kompleks I-III-IV hem elektron taşıyıcısı hem de proton pompası olarak görev yaparken Kompleks II yalnızca elektron aktarımından sorumludur (10, 26, 32, 33).

Kompleks I ve II glikoliz ve sitrik asit döngüsünde üretilen nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve flavin adenin dinükleotid (FADH₂) moleküllerinden elektron alıp bunları Kompleks III'e Koenzim Q adı verilen ara taşıyıcı ile transfer etmektedirler (10, 26, 32, 33). Kompleks III ise elektronlarını Kompleks IV'e Sitokrom C adı verilen ara taşıyıcı ile transfer etmektedir (10, 26, 32, 33). Kompleks IV, elektron transfer zincirindeki son elektron alıcısıdır ve son basamakta oksijen redüksiyonu ile su molekülü meydana gelir (10, 26, 32, 33). Aerobik gerçekleşen bu zincirin sonunda yüksek miktarda enerji açığa çıkar ve bu sayede adenzin difosfat (ADP) molekülü ATP'e dönüşür (10, 26, 32, 33). Elde edilen en son ürün ise su molekülü ile karbondioksittir (10, 26, 32, 33).

Elektronların bu hareketi her zaman belirli bir sıralamayla ve düzenle oluşmak zorundadır. Elektron transport zincirindeki her bir transfer ile elektronlar enerji kaybetmekte ve düşük enerji seviyesine gelmektedir (10, 26, 32, 33). Bu süreçte açığa çıkan serbest enerji, mitokondriyal matriks ile mitokondriyal intermembranöz alan arasında proton gradientini sağlamaktadır (34). Gradient sayesinde protonlar F₁F₀ ATP Sentaz enzimini harekete geçirip ATP sentezini gerçekleştirmektedir (10, 26, 32, 33). Bu döngünün kusursuz şekilde gerçekleşmesi için bir yandan ATP üretimi devam ederken, diğer yandan üretilen ATP de hücre fonksiyonunda kullanılmak üzere transfer edilmektedir. Elektrokimyasal gradient ile sağlanan tüm bu olaylar bütününe ATP üretiminin kemozmotik mekanizması adı verilmektedir (34).

Özetleyecek olursak, tüketilen besinlerden enerji üretimi glikoliz, sitrik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon denilen metabolik reaksiyonlar ile sitoplazma ve mitokondriyal matrikste gerçekleşmektedir (10, 26, 32, 33). Glikoliz, hücre sitoplazmasında gerçekleşen, bir molekül glikozun iki molekül pürivata çevrildiği ve iki molekül elektron donörü olan yan ürün NADH'ın üretildiği kimyasal zincirdir (10, 26, 32, 33). Pürivat, sitrik asit döngüsünün başlaması için esastır. Sitrik asit döngüsünde ise yüksek miktarda yine elektron donörü olarak görev yapan NADH ve FADH₂ üretilmektedir (10, 26, 32, 33). Her iki molekül de elektron donörü olarak elektron transport zincirine enerji transportu yapmaktadır (10, 26, 32, 33). Aerobik prensiple gerçekleşen oksidatif fosforilasyon oksijen yokluğunda durmaktadır.

Mitokondride ve sitoplazmada gerçekleşen bu kimyasal reaksiyonlar bütünü *hücre solunum* olarak isimlendirilir (10, 26, 32, 33). Oksijen yokluğunda elektron transport zinciri durur ve ATP üretilemez (10, 26, 32, 33). Bu sebeple oksijen, canlılığın devamında rol alan en temel moleküldür ve yokluğunda hayat var olamaz.

2.4.4. Mitokondriyal Hastalıklar

Mitokondri organeli hakkında bugüne kadar bildiklerimiz aslında oldukça sınırlıdır. Endosimbiotik bir ilişki ile evrimsel süreç geçirdiğini, kendi DNA'sı olduğunu ve bu şekilde nükleus bağımlılığı olmadan çoğalabildiğini, hücredeki sayısının doku ihtiyacına göre değişkenlik gösterdiğini, ve hücre canlılığının devamında temel enerji kaynağı olan ATP üretimini gerçekleştirdiğini bilmekteyiz (10, 26, 32, 33).

Diğer yandan modern bilim, mitokondrinin maternal kalıtımını göstermiştir (35, 36). Dolayısıyla mitokondri maternal geçiş ile sahibi olduğumuz bir DNA'ya sahiptir (36). Bu sebeple, olası mutasyonlar düşünülürken maternal ve paternal geçiş gösteren nükleer genomun yanı sıra anne kaynaklı geçiş gösteren mitokondriyal mutasyonlar da hesaba katılmalıdır.

Mitokondriyal hastalıkların yaklaşık 15%'inin mitokondriyal DNA mutasyonlarına bağlı olduğu gösterilmiştir (36) . Mitokondriyal DNA mutasyonları, mitokondriyal protein sentez mutasyonları ve hücre solunum döngüsünde görevli olan proteinlerin mutasyonları olarak iki temel gruba ayrılmaktadır (36). Bu mutasyonun, elektron transport zincirinde görevli protein üretiminin defektine bağlı olması halinde ATP üretimi ciddi miktarda düşmektedir. Enerji üretimindeki bu defekt, enerji metabolizmasındaki her basamakta hasara ya da gecikmeye sebep olmaktadır. Sonuç olarak bu durum tüm hayati fonksiyonları etkilemektedir.

Tipik bir insan hücresinde mitokondri 22 tRNA, 2 ribosomal ribonükleik asit (rRNA) ve 13 adet yapısal protein sentezinden sorumlu gen olmak üzere toplam 37 gen içermektedir (36). Hücrelerde çok sayıda mitokondri bulunmaktadır ve bunların sahip olduğu DNA birbirinden farklıdır (36).

Dolayısıyla bir mutasyon, tüm mitokondrileri etkilememektedir. Mitokondriyal hastalığın fenotipi ve şiddeti ise etkilenen mitokondri oranına bağlıdır.

ATP üretiminin çeşitli basamaklarda etkilenmiş olması sebebiyle mitokondriyal hastalıkların ciddi metabolik etkileri vardır (36). Özellikle kas hücresi gibi ATP bağımlı çalışan dokularda kas güçsüzlüğü gibi hayat kalitesini etkileyen semptomlar ortaya çıkmaktadır. Bunun yanısıra beyin dokusunun ve nöronların ciddi miktarda ATP tüketiyor olması sebebiyle mitokondriyal hastalıklarda zihinsel defektler, beyin dejenerasyonu gibi klinik tablolar ortaya çıkabilir. Ancak mitokondriyal hastalıkların tanısının klinik bulgularla konulması oldukça zordur (36).

Mitokondriyal hastalıkların prevalansı oldukça yüksektir ve en çok görülen genetik hastalıklardan biridir. Günümüz bilgilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık her 5000 doğumun 1'inde görülmektedir (37). İsveç ve Avusturalya'da çocuklarda eş zamanlı yapılan popülasyon araştırmalarında ise yaklaşık 20.000 çocukta 1 oranında mitokondriyal hastalık olduğu, bunların 15%'inin mitokondriyal DNA mutasyonu kaynaklı olduğu ve oksidatif fosforilasyon zincirinde görev alan proteinlerde defekt olduğu saptanmıştır (37). Ülkemizde ise kalbi etkileyen mitokondriyal hastalıklarla ilgili net bir rakam kaydı yoktur.

Mitokondriyal hastalığı olan bir bebeğin hayat beklentisi yaklaşık 2 yıldır fakat bu beklenti hastalığın şiddetine göre artıp azalmaktadır. Semptomlar ise çok geniş bir klinik çeşitliliğe sahiptir. Kalp hastalığının yanında büyüme gelişme geriliği, kas zayıflığı, duyma ve görme problemleri, mental retardasyon, karaciğer ve üriner sistem bozuklukları, nörolojik problemler mitokondriyal hastalıklara bağlı görülebilecek semptomlardan bazılarıdır (38).

The New England Journal of Medicine dergisinde yayınlanan bir makalede ise insülin rezistansı olan Tip 2 diyabetin, oksidatif fosforilasyon zincirini etkileyen bir mutasyondan kaynaklanabileceğini destekleyen bulgular gösterilmiştir (39). Çocuklarda mitokondriyal hastalıkların kardiyak bulguları arasında ise hipertrofik kardiyomyopati, ventriküler hipertrofi ve sistolik disfonksiyon, ileti sistemi anormallikleri ve aritmi bulunmaktadır (40).

Mitokondriyal kalıtıma bağlı ortaya çıkan bu hastalıkların bir sonraki jenerasyona geçişinin önlenebilirliği günümüzde son derece tartışmalıdır. Bu geçişi önleyebilecek bir yöntem "*three-way IVF*" olarak da bilinen mitokondriyal replasman terapisiidir.

Geleneksel in vitro fertilizasyon yönteminde birçok ovum ve sperm hücreleri in vitro ortamda fertilize edilmekte, ardından embriyolar anne uterusuna implante edilmektedir.

Mitokondriyal replasman terapisi ise geleneksel in vitro fertilizasyon yönteminden biraz daha farklıdır. Yine aynı şekilde mitokondriyal defekti olan anneden ovum hücresi, babadan da sperm hücresi alınıp bu hücreler in vitro şekilde fertilize edilmektedir. Ancak yumurta hücresinden, mitokondri defekti olduğu bilindiği için nükleus çıkarılmaktadır. Mitokondriyal hastalığı olmayan bir başka donör anneden de sağlıklı ovum hücresi alınmakta ve sağlıklı nükleus çıkarılmaktadır. Alınan bu nükleus, alıcı annenin nükleusu çıkarılmış olan yumurta hücresine transplante edilmektedir (41). Sonuçta sağlıklı donörden alınmış olan nükleusun transplante edildiği yumurta ile babadan alınan sperm fertilize edilmiş olur (41). Bu şekilde embriyo tamamen sağlıklı bir nükleusa sahip olmaktadır .

Her ne kadar mitokondriyal hastalıklar açısından alternatif bir yaklaşım olsa da bu yöntem beraberinde birçok etik problemi de yaratmaktadır. Günümüzde İngiltere’de kullanılan bu yöntem, doğan çocukların “tasarlanmış bebek” olması, Bebeğin üç ebeveyni mi olur? ya da Optimize edilmiş bebek etik midir?, Nerede durulmalı? gibi birçok soruyu akla getirmektedir. Tartışılmakta olan birçok etik konu başlığı olması sebebiyle mitokondriyal replasman terapisi bilimsel anlamda bir alternatif yaratmış olsa dahi henüz tüm dünyada geçerliliği kabul edilmiş bir yöntem değildir (42).

2.5. KALPTE MİTOKONDRI

Kalp kası için yüksek enerjili molekül olan ATP, kalbin hiç durmayan sistol-diyastol döngüsü ile çalışması ve kasılması sebebiyle hayati öneme sahiptir. İnsan kalbi günlük ortalama 30 kg ATP sentezlemektedir (43, 44). Günlük hayat içinde kardiyomiyositlerde ATP kusursuz bir yol olan oksidatif fosforilasyon ile mitokondri tarafından sentezlenmektedir (10, 26, 32, 33).

Kalp kasında mitokondri izolasyonu kolay bir işlem değildir. Günümüzde hem kalp kası materyalinin optimum koşullarda elde edilmesinin kolay olmaması hem de kardiyomiyositer mitokondrinin izole edilmesindeki zorluk sebebiyle diğer bilimsel alanlara göre çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Yapılan fizyolojik ve patofizyolojik çalışmalarda ise miyosit örnekleri bizim çalışmamızda da olduğu gibi ya atriumdan kanülasyon yerinden alınmakta ya da transplantasyon sırasında alınan biyopsi materyalleri kullanılmaktadır. Ayrıca literatürde postmortem yapılmış olan çalışmalar da bulunmaktadır (45).

İnsan kalbinde kardiyomiyositer mitokondriler subsarkollemanda, perinükleer ve intrafibriler bölgelerde lokalizelerdir (46). ATP üretimi için yüksek mekanizmalı reaksiyonlar olan fizyon, füzyon ve otofaji mitokondri dinamikleri olarak sayılabilir (46-52).

Kalp, insan vücut ağırlığının 0.5%'ini oluşturur ancak toplam günlük ATP üretiminin yaklaşık olarak 8%'ini tüketmektedir (46). Bir günde insan bedeni ortalama kendi vücut ağırlığı kadar ATP üretilip tüketmektedir (46, 53). Özellikle erişkinlerde kullanılan dominant substrat ise kardiyak ATP üretiminin 60-80%'inden sorumlu olan yağ asitidir (46). Yağ asidi yokluğunda ya da yetersizliğinde kullanılan diğer substratlar ise sırasıyla glukoz, laktat ve keton cisimciğidir (46, 54).

Kalp kasını diğer kaslardan ayıran en önemli özelliklerinden biri ise kalbin substrat kullanım oranını fizyolojik ihtiyaçlara göre değiştirebilmesidir (46).

Kalp kasında mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon kaybının hangi mekanizma ile gerçekleştiğini ve patolojik etkilerini anlayabilmek için özellikle oksijen tüketimi ve elektron transport zincirinin incelendiği entegre çalışmalara ihtiyaç vardır (46). Örneğin elektron transport zincirinde görevli olan Kompleks-I ya da Kompleks-IV aktivitesinde azalma ya da dejenerasyon görülebilir. Bu gibi mekanik problemlerin hayvan modellerinde (46) ve insan kalbinde yetmezliğe yol açtığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (46, 55). Elektron transport zinciri proteinlerinin fonksiyonel süperkomplekslerde aggrege olması (46, 56-58) ve mitokondriyal süperkomplekslerin kaybının serbest radikal üretiminde önemli role sahip olması sebebiyle kalp yetmezliğine sebep olabileceği de gösterilmiştir (46, 59).

Kalp kası, sistol-diyastol döngüsünün sürekliliğini sağlayabilmek için günlük toplam ATP üretiminin önemli bir yüzdesini kullanan özelleşmiş bir yapıdır ve ATP üretimini etkileyen tüm basamaklar kalbin işleyişini önemli ölçüde bozan klinik tablolara yol açmaktadır.

2.6. İNSAN KALBI

İnsan kalbi evrim sürecinden geçmiş tüm canlı organizmalar arasında en özelleşmiş ve kompleks yapılardan biridir. Kalp ve dolaşım sistemi ile ilgili herhangi bir çalışmanın yürütülebilmesi ve cerrahinin gerçekleştirilebilmesi için özellikle siyanotik ve asiyanotik konjenital kalp hastalıklarında kalbin yapısal özelliklerinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

2.6.1. Kalp Kası ve İskelet Kası Arasındaki Belirleyici Farklar

İskelet ve kalp kası, çizgili kas yapısı ve aktin-miyozin filamentlerinin kontraksiyonu gibi benzerlikler gösterirken belirleyici farklılıkları da bulunmaktadır (10).

Miyositler arasında bulunan interkalar diskler, kalp kasının sahip olduğu en önemli farklılıklardan biridir (10, 60). Elektriksel rezistansı çok düşük olan interkalar diskler, aksiyon potansiyelinin miyositler arasında çok hızlı bir şekilde ilerlemesine yol açmaktadır (10, 60).

Kalp kası hücresinde çok sayıda mitokondri bulunmaktadır ve hücre dışarıdan membran ile çevrilidir (60). Buna ek olarak, kalp kası membranı birbirleri arasında füzyon yolu ile özelleşmiş boşluklar oluşturmakta ve birçok miyositin birleşerek oluşturduğu sinsityumu meydana getirerek kalp kası fibrillerinin grup olarak kasılmasını sağlamaktadır (10, 60). Bu sinsityum şeklindeki yapılanma da aksiyon potansiyelinin hücreler arasındaki geçişini hızlandırmaktadır (10, 60).

Kalp kasının sahip olduğu bir diğer özellik ise sinoatriyal noddan çıkan elektriksel uyarının ventriküllere atriyoventriküler nod aracılığıyla yavaşlatılarak iletimidir. Bu özellik, özelleşmiş ileti yolu sayesinde olmaktadır.

Normal bir kalpte atrial ve ventriküler sinsityum birbirlerinden fibrotik doku aracılığıyla yalıtılmıştır (10, 60, 61). Miyositin membran potansiyeli yaklaşık olarak -85 ile -95 milivolt arasında değişmektedir (10). Aksiyon potansiyeli ise 105 milivoltur (10). Membran, atriumda 0.2 saniye, ventrikülde ise 0.3 saniye depolarize kalmaktadır (10, 60). Kalp kası hücresi dinlenme potansiyeli -90 mV'tur. Depolarizasyon 2 ms, plato ve repolarizasyon yaklaşık olarak 200 ms sürmektedir (60).

Kalp kasının iskelet kasından farklı olarak sahip olduğu son özellik ise özel yapılanması olan yavaş kalsiyum kanallarıdır (10, 60, 62). Bu kanallardan hücre içine giren kalsiyum ve yine hücre içine yavaş giren sodyum yalnızca kalp kasında görülen aksiyon potansiyeli plato sürecinin temel sebebidir (10, 60). Potasyum geçirgenliğinin miyositlerde azalmış olması da bu plato görüntüsüne katkıda bulunmaktadır (10, 60, 62). En son aşamada gerçekleşen kalsiyum difüzyonu miyofibrillerde kontraksiyonu oluşturmaktadır (10, 60).

Tüm bu özellikler kalp kasının iskelet kası ile arasında bulunan ve kalp kasının üstünlüğünü açıklayan moleküler düzeydeki farklılıklardır.

2.6.2. Kasların Kontraksiyon Mekanizması

İnsan vücudunun toplam kitlesinin 40%'ını iskelet kası; 10%'unu ise düz kas ve kalp kası oluşturmaktadır (10). Her üç tip kas için temel kasılma mekanizması aynıdır ancak kalp kası hayat boyu sürekli olarak kasılması sebebiyle özelleşmiş bir yapıya sahiptir ve diğer kaslardan bu özelliğiyle ayrılmaktadır.

Kas kontraksiyonunun genel mekanizması aşağıdaki gibidir (10):

1. Kontraksiyonu başlatacak olan aksiyon potansiyeli ilgili motor nöron boyunca ilerledikten sonra kas fiberine ulaşmakta ve Asetilkolin sekresyonu gerçekleşmektedir (10, 60).
2. Asetilkolinin kas membranındaki difüzyonu ile diğer Asetilkolin kapılarının açılması tetiklenmektedir. Açılan katyon kapılarından elektrokimyasal gradient doğrultusunda sodyum, potasyum ve kalsiyum hücre içerisine girmektedir. Hücre içinde lokal bir depolarizasyon oluşmaktadır. Oluşan bu end-plate potansiyele jeneratör potansiyel adı verilmektedir. Bu lokal depolarizasyon aynı Asetilkolinin etkisi gibi kas membranında bulunan voltaj bağımlı sodyum kanallarının açılmasını sağlamaktadır ve bu sayede aksiyon potansiyeli oluşmaktadır (10, 60).
3. Kas fibrilinin membranı boyunca ilerleyen aksiyon potansiyeli sarkoplazmik retikulumdan sarkoplazma içine kalsiyum salınımına sebep olmaktadır (10).
4. Kalsiyum, miyofibrildeki aktin ve miyozin filamentleri arasındaki hareketi tetiklemekte ve kontraksiyon başlamaktadır (10, 60).
5. Aynı anda sarkoplazmadaki kalsiyum sarkoplazmik retikuluma bir sonraki kontraksiyonda tekrar salınmak üzere geri pompalanmakta ve depolanmaktadır. Diğer yandan, kalsiyumun sarkoplazmada azalması kontraksiyonun sonlanmasına sebep olmaktadır (10, 60).

2.6.3. Kardiyak Enzim

Kardiyak enzimler, kalpteki hasarı değerlendirmede kullanılan biyobelirteçlerdir. Miyokard hasarı varlığında kandaki seviyelerindeki yükseliş kardiyak fonksiyon hakkında fikir vermektedir. Troponin-I, Miyogloblin ve Kreatin Kinaz-MB (CK-MB) günümüzde en çok kullanılan biyobelirteçlerdendir.

Troponin-I miyokarda spesifiktir ve miyokardiyal hasar sonrasında miyosit sitozolünden serbestleşerek kanda artış göstermektedir. 2-4 saat içinde yükselmeye başlayan kan Troponin-I değeri yaklaşık 12 saat içinde en yüksek değerine ulaşmakta ve ortalama 7 gün yüksek değerde seyretmektedir. Miyokard hasarı tanısında kullanılan enzimler içinde en sensitif ve spesifik olan belirteç Troponin-I'dır.

Miyogloblin, çizgili kas ve kalp kası dokusunun oksijen taşıyıcı, 17.8 kDa boyutundaki monomerik pigmentidir (63). Diğer belirteçlere kıyasla sensitivitesi daha düşüktür. Ancak miyokard hasarında kandaki seviyesinin daha hızlı yükseliyor olması miyogloblini diğer belirteçlere üstün kalan özelliğidir. Ayrıca literatürde intraselüler katalist olan miyogloblinin mitokondriyal fonksiyonlardaki regülasyonu üzerine yapılan birçok çalışma bulunmaktadır (64).

Son değerlendirdiğimiz enzim ise CK-MB'dir. CK-MB keratin kinazın miyokarda spesifik izoformudur. Özellikle çizgili kas hasarının olmadığı durumlarda miyokard hasarı için yüksek spesifisiteye sahiptir. Sitolde bulunan CK-MB mitokondride yüksek enerjili fosfatın transferinde görev almaktadır. Miyokard hasarı sırasında 12-24 saatte kandaki en yüksek değerine ulaşan CK-MB yaklaşık 2-3 gün içinde normal değerlerine dönmektedir

2.6.4 Kardiyak Fibrozis

Kardiyak fibrozis, ekstrasellüler matriksin normalden fazla üretilip kardiyak interstisyumda depolanmasıdır ve hem sistolik hem de diastolik fonksiyon bozukluğu sebebidir (65, 66). Fibrozis, *remodelling* denilen yeniden yapılanma sürecinin bir parçasıdır ve kalpte sayıca en çok bulunan hücrelerden biri olan kardiyak mezenkimal hücreler, yani fibroblastlar tarafından yönetilmektedir (66, 67). Normal sağlıklı bir kalpte fibroblastlar aslında bağ doku yapımında görevli olan temel hücrelerdir (65-67).

Fibroblastların kardiyak yapıdaki etkilerini şu şekilde özetleyebiliriz (66):

1. Yeniden yapılanma sürecindeki adaptasyon mekanizmasının bir parçası olan fibrozis, artmış doku rijiditesi ve bunlara bağlı histoanatominin değişmesiyle ortaya çıkan kalp yetmezliği tablosu (66)
2. Ekstrasellüler matrikste kollajen depolanmasının artmasıyla oluşan skar dokusu ve biyofiziksel sinyal mekanizmasında değişiklikler oluşması ile ortaya çıkan ileti sistemi hasarı (66)
3. Biyokimyasal değişikliklere bağlı artmış inflamasyon, adaptasyon için gelişen hipertrofi ve eş zamanlı gerçekleşen apoptozis ile kas kaybı (66)
4. Fibroblast-miyosit farklılaşması (66)

Sağlıklı bir kalbin 30%'unu kardiyomiyositler, kalan 70%'i ise non-miyositer hücreler oluşturmaktadır ve bunların çoğunluğu kardiyak fibroblastlardır (67). Kendilerinin elektriksel iletkenlikleri yoktur ancak miyositlerle aralarında bulunan *gap junction* ve *koneksinler* aracılığıyla miyosit kontraksiyonunun senkronizasyonunda rol aldığı bilinmektedir (67, 68).

Kollajen sentezleyerek kalbin yapısal desteğini sağlayan fibrositlerin normalden fazla aktive olması kalp kasının esnekliğini kaybettirmektedir (67, 68). Diğer yandan fibrozis sonucu ortaya çıkan fokal skar ya da var olan hasarın genişliği sebebiyle oluşan difüz fibrozis kardiyak artimiye sebep olabilmektedir (66, 69). Bunun temel sebebi, kollajenden zengin dokuların ileti sistemine yalıtkan bir yapılarının olmasıdır (66).

Kardiyak fibroblastlarla ilgili özellikle konjenital kalp hastalıkları açısından bilinmesi gereken bir diğer konu da hipoksiye olan yanıtlarıdır. Her ne kadar miyositlere kıyasla duyarlılıkları az olsa da hipoksi varlığında hücre proliferasyonu azalmakta, kollajen sentezi artmaktadır (67, 70, 71). Bununla birlikte hipoksi kardiyak fibrositlerin tumor necrosis faktor alfa ($TNF\alpha$) ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) de dahil olmak üzere sitokin ve büyüme faktörü sekresyonunu tetiklemektedir (67, 72, 73). Dolayısıyla, özellikle siyanotik konjenital kalp hastalıklarındaki etkilerinin asiyanotiklerilere kıyasla daha fazla olması beklenmektedir. Özetle kardiyak fibroblastlar kalbin hem fizyolojik hem de patofizyolojik süreçlerinde rol oynayan önemli bir hücre grubudur.

2.7. KONJENİTAL KALP HASTALIKLARINDA MİTOKONDRİNİN YERİ

Mitokondriyal DNA mutasyonuna bağlı ortaya çıkan mitokondriyal hastalıklar daha çok erişkin hasta grubunda görülürken, nükleer DNA mutasyonuna bağlı oluşan mitokondriyal hastalık prevalansı infant ve ocuk hasta grubunda daha yüksektir (74, 75). Sendroma ait klasik bulgular çoğunlukla olmadığı için çocuklarda nükleer DNA mutasyonuna bağlı oluşan mitokondriyal hastalıkların teşhisini koymak görece zordur (74).

Mitokondriyal hastalıklar multi sistemik olup çoklu organ hasarı yaratabilmektedir. Prevalansının ortalama her 5000 doğumda 1 olduğu bilinmektedir (75). İsveç (76) ve Avusturya'da (77) eş zamanlı çocuklar için yapılan bir epidemiyolojik araştırmada sonuçların şaşırtıcı derecede benzer oldukları görülmüştür ve mitokondriyal hastalık prevalansının toplamda 100.000'de 5 olduğu ve bunların 15%'inin mitokondriyal DNA ilişkili olduğu tespit edilmiştir (36).

Mitokondriyal hastalıklar erken evrelerde kardiyovasküler sistemde semptomatik değildir. İleri evrelerde, mitokondriyal gen defektine bağlı kardiyak yapı bozukluğu oluşmakta ve bu sebeple izole kardiyomiyopati dediğimiz klinik tablo gelişmektedir (75).

Mitokondriyal hastalıkların kardiyak klinik tablosu hipertrofik ve dilate kardiyomiyopati, aritmi, ve kalp yetmezliğidir (75). Kalp kasının kontraksiyonu için sahip olduğu yüksek aerobik metabolik ihtiyaç kalp kasında oksidatif fosforilasyonun merkezi olan mitokondrinin önemini arttırmaktadır. Özetlemek gerekirse mitokondrinin dört önemli hücresel görevi vardır: ATP retimi, reaktif oksijen ürünlerinin regülasyonu, kalsiyum iyonlarının sistol sırasında tamponlanması ve apoptozun mitokondriyal por geçirgenliği ile regülasyonu

(75, 78). Bu dört major özelliğe ek olarak reaktif oksijen ürünlerinin hücresel metabolizmaya olan yan etkilerini önlemek de mitokondrinin görevleri arasında bulunmaktadır (75, 79).

Elektron transport zincirindeki defekt ile karakterize mitokondriyal hastalıklarda ATP üretiminde azalma oluşmaktadır. ATP üretim bozukluğu metabolik, neoplastik, dejeneratif klinik tablolar ortaya çıkarmaktadır. Bu, mitokondriyal hastalıkların özellikle kas, endokrin sistem, kalp ve beyin gibi yüksek enerji ihtiyacı olan dokuları etkilemesine sebep olmaktadır (75).

Mitokondriyal DNA'da herhangi bir mutasyon meydana geldiğinde çeşitli mutant DNA popülasyonları oluşmaktadır. Bu hücre grubu heteroplazmi adı verilen biyolojik duruma sahiptir (75, 80). Heteroplazmik bir hücre bölündüğünde oluşan hücreler mutant mitokondriyal DNA'ya sahiptir. Ancak bu programlı olmayan bir paterndir ve heteroplazmik hücrelerin içerdiği mutant mitokondriyal DNA yüzdeleri birbirlerinden farklıdır (75, 81-83). Yapılan araştırmalarda, mitokondriyal hastalığın klinik şiddetinin heteroplazminin yüzdesi ile belirlendiği gösterilmiştir. Eğer mutant mitokondriyal DNA yüzde olarak fazla ise klinik semptomlar da daha şiddetlidir (75). Mutant mitokondriyal DNA için klinik eşik 50-100% olarak gösterilmiştir (75). Diğer yandan klinik istisnalar da bazı çalışmalarda gösterilmiştir (75, 84, 85). Metabolik aktivitesi yüksek olan dokular mitokondriyal DNA mutasyonunda daha fazla etkilenmektedirler (75, 82, 83, 85). Mitokondriyal DNA mutasyonunun en belirgin klinik tablolarından biri ise mitokondriyal kardiyomiyopatidir (75).

Mitokondriyal hastalıklar *genetik, fonksiyonel ve biyokimyasal* grup olarak sınıflandırılmaktadırlar (75). Mitokondriyal DNA'daki mutasyonun lokasyonu ile *genetik* sınıflama yapılmaktadır. Elektron transport zincirinde

görev alan proteinleri etkileyen gen mutasyonları *fonksiyonel* mitokondriyal hastalık olarak sınıflandırılmaktadır. *Biyokimyasal* grupta en sık Kompleks-I ve Kompleks-IV eksikliği görülmektedir (75, 86).

Mitokondriyal kardiyomiyopati hipertrofi, dilate ve nonkompaksiyon sol ventrikül kliniği ile görülmektedir. Tüm kardiyomiyopatilere kalp yetmezliği, malign aritmi ve ani kardiyak ölüm eşlik edebilir (74, 75, 87, 88). Mevcut klinik yüksek ateş ya da cerrahi gibi fizyolojik stres faktörleri ile kötüleşmektedir. Bu kötüleşmeye "*mitokondriyal kriz*" denilmektedir (75). Mitokondriyal kriz akut ya da subakut çoklu organ yetmezliği ile seyreden, metabolik asidozun major belirteç olduğu bir tablodur. Kardiyojenik şok, atrial ve ventriküler aritmi ve ani kardiyak ölüm mitokondri krizi sırasında görülebilen kardiyak komplikasyonlardır (75).

Mitokondriyal kardiyomiyopatiye nöromusküler semptomlar da eşlik edebilmektedir (Tablo 2.1.). Kardiyak komponenti olan çeşitli sendromlar Tablo 2.2.'de listelenmiştir. Mitokondriyal hastalık tanı kriterleri ise Tablo 2.3.'de özetlenmiştir.

Kas biyopsisi tanı için altın standarttır. Ancak kardiyak biyopsi almak her zaman mümkün değildir. Yapılan bir çalışmada, mitokondriyal kardiyomiyopatisi olan infant ve çocuk hasta grubundan alınan kardiyak biyopsi spesimenlerinde asimetric septal hipertrofi ve endokardiyal fibroelastozis ile seyreden hipertrofik bir morfoloji olduğu görülmüştür (45). Mitokondriyal kardiyomiyopati mikroskopik bulguları ise miyositlerde fusiform büyüme, perinükleer alanda sitoplazmik silinme ve çizgili yapının yerini granüler yapıya bırakmasıdır (75).

Tablo 2.1. Mitokondriyal Disfonksiyon Klinik Semptomları⁴

Sistem	Klinik Semptomlar		
Kardiyovasküler	Kalp yetmezliği Aritmi Ani kardiyak ölüm Apikal balonlaşma sendromu	Kas ve İskelet	Kas güçsüzlüğü (normal kreatin kinaz ve EMG) Kısa boy, kısa boyun Mikrosefali Düşük kulak
Pulmoner	Dispne Ortopne Respiratuvar asidoz Respiratuvar yetmezlik	Cilt ve Yumuşak Doku	Egzema Hipertrikozis Vitiligo Retiküler pigmentasyon
Nörolojik	Ensefalopati Ataksi Hareket bozuklukları Mental retardasyon	Gastrointestinal	Karın ağrısı Bulantı/ kusma Diyare/ Konstipasyon Malabsorbsiyon Pancreatit Bozulmuş KCFT
Renal	Renal yetmezlik Benign renal kist FSGS Proksimal tübülopati Nefritik sendrom	Oftalmik	Eksternal oftalmoparezis Retinitis pigmentosa
Hematolojik	Anemi Lökopeni Trombositopeni Eozinofili	İşitsel	Sensorinöral işitme kaybı
Endokrinolojik	Diabetes mellitus Diabetes insipidus Hipotroidi Hipoparatiroidi ACTH eksikliği Hipogonadizm Amenore Jinekomasti		

⁴75. Meyers DE, Basha HI, Koenig MK. Mitochondrial cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and management. Texas Heart Institute journal. 2013;40(4):385-94.

Tablo 2.2. Kardiyovasküler Semptomları Olan Mitokondriyal Sendromlar⁵

Sendrom	Kardiyovasküler Semptomlar
Barth sendromu (letal infantil kardiyomiyopati)	Dilate kardiyomiyopati ve LV hipertrekülasyon
Kronik progresif eksternal oftalmopleji	Aritmi
Leigh sendromu (subakut nekrotizan ensefalomiyopati)	Kardiyomiyopati ve aritmi
Kearns-Sayre sendromu	Aritmi
Mitokondriyal ensefalopati, laktik asidoz	Dilate kardiyomiyopati ve LV hipertrekülasyon
MERRF Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers	Kardiyomiyopati ve aritmi
Maternal geçiş gösteren diyabet ve sağırılık	LV hipertrekülasyon ve aritmi
Nörojenik kas güçsüzlüğü, ataksi ve Retinitis pigmentosa	Kardiyomiyopati
Maternal geçiş gösteren Leigh sendromu	Kardiyomiyopati

⁵ 75. ibid.

Tablo 2.3. Mitokondriyal Hastalıklar Tanı Kriterleri⁶

	Major Diagnostik Kriterler	Minor Diagnostik Kriterler
Klinik	Mitokondriyal sendrom ya da nörolojik, musküler, kardiyak, renal, endokrin, hematolojik, otojenik, oftalmolojik, dermatolojik sistemlerin 3'ünde tutulum, mtDNA mutasyonu aile öyküsünün olması ya da diğer tanıların ekarte edilmesi	Respiratuvar zincir defektiyle korele semptomların varlığı
Histolojik	>2%iskelet kasından Ragged Red Fibers (RRF) bulunması	30-50 yaş arasında 1%-2% RRF varlığı, 30 yaşın altında RRF varlığı, 16 yaşın altında 2%'den fazla subsarkolemmal mitokondri akümülyasyonu ya da herhangi bir dokuda yaygın elektron mikroskopu ile tespit edilen anomali varlığı
Enzimatik	50 yaşın altında >2% COX-negatif fiber bulunması, 50 yaşın üstünde >5% COX-negatif fiber bulunması, herhangi bir dokunun respiratuvar zincir aktivitesinin 20%'in altında olması, herhangi bir hücre grubunda respiratuvar zincir aktivitesinin 30%'in altında olması ya da iki veya daha fazla dokuda aynı respiratuvar zincir kompleks aktivitesinin 30%'in altında olması	Respiratuvar zincir kompleksi defektinin antikör bazlı gösterilmesi, herhangi bir dokuda respiratuvar zincir aktivitesinin 20-30% olması, herhangi bir hücre grubunda respiratuvar zincir aktivitesinin 30-40% olması ya da iki ve ya daha çok dokuda aynı respiratuvar zincir kompleksi aktivitesinin 30-40% olması
Fonksiyonel	Fibroblast ATP sentez oranının mean değerinin 3 ve ya daha fazla SD altında olması	Fibroblast ATP sentez oranının mean değerinden 2-3 SD altında olması ya da media tabakasında bulunan fibroblastın glukoz galaktoz ile yer değiştirildiğinde büyüme gösterememesi
Moleküler	Patojenite gösteren nükleer DNA (nDNA) ya da mitokondriyal DNA (mtDNA) mutasyonunun tespiti	Olası patojeniteye sahip nDNA ya da mtDNA'nin tespiti
Metabolik	-	Respiratuvar zincir defektini gösteren bir ya da daha fazla metabolik indikatör

⁶75. ibid.

Mitokondriyal mutasyonlar “*Sol Ventrikül Hipertrabekülasyonu*” olarak da bilinen LV noncompaction için spesifik etiyolojilerden biridir. Etiyolojisi belirlenemeyen ve multi sistemik semptomları olan akut kalp yetmezliğinde mutlaka şüphelenilip araştırılmalıdır. Sol ventrikül hipertrabekülasyonu sol ventrikül kavitesinden subendokardiyal seviyeye kadar uzanım gösteren belirgin sol ventrikül trabekülasyonu ile karakteristiktir (89-91). Bu klinik tablo izole olabilir ya da nöromusküler semptomlarla birlikte görülebilmektedir.

Konjenital kalp hastalığı ile takip edilen pediatrik hasta grubunda pediatrik kardiyologlar büyük öneme sahiptir. Özellikle etiyolojisi belirlenemeyen akut kalp yetmezliğinde tüm hastalarda mitokondriyal kardiyomiyopati düşünülmeli, hipertrofi, ileti sistemi anomalileri, ve dilate kardiyomiyopati mutlaka değerlendirilmelidir. Mitokondriyal hastalıklara nöromusküler semptomlar da eşlik edebileceği için pediatrik nörologlarla iletişim halinde olmak önemlidir. Örneğin, Kearns-Sayre sendromu senkop ile seyreden atrioventriküler ileti sistemi defekti ile karakterizedir. MELAS'ta (*Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*) ise hastalar 3 yaşına kadar normal büyüme ve gelişme göstermektedir. 3 yaşından sonra kardiyak hipertrofi, patolojik kısa boyun eşlik ettiği dilate kardiyomiyopati, hemiparezi, hemianopsi, ve körlük ortaya çıkmaktadır (92).

Özellikle pediatrik hasta grubunda bir hasta mitokondriyal hastalık tanısı aldıysa birinci derece yakınları da mutlaka mitokondriyal defekt açısından değerlendirilmelidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ETİK KURUL ONAMI

“Açık Kalp Ameliyatı Yapılan Konjenital Kalp Hastalığı Olan Çocuk Hastalarda Miyokardiyal Mitokondri Fonksiyonlarının Histopatolojik ve Enzimatik Değişikliklerle Olan İlişkisi” başlıklı prospektif araştırma projesi ve Uzmanlık Tezi, T.C. Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve 27 Eylül 2017 tarih ve GO 17/651 karar numarası ile etik açıdan uygun bulunarak araştırma için onay almıştır.

3.2. HASTA SEÇİMİ

T.C. Hacettepe Üniversitesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra, 10.11.2017 tarihinden itibaren Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından açık kalp ameliyatı kararı ile İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Çocuk Kalp Cerrahisi Servisi'ne yatırılan yaşları 1 gün ile 18 yıl arasında değişen, siyanotik konjenital kalp hastalığı olan 5, asiyantotik konjenital kalp hastalığı olan 5 hasta çalışma kriterlerine uygun bulunarak araştırmaya dahil edilmiştir. Etik Kurul standartları doğrultusunda Aile Bireyleri ve Çocuk Onam Formları hazırlanarak çalışmaya dahil olmayı kabul eden hastalardan yazılı izinler alınmıştır. Çocuk Kalp Cerrahisi-Kardiyoloji Konsey'inde operabilite açısından inoperable kabul edilen, Down sendromu olan ve Ekstrakorporeal Membran Oksijenatörü (ECMO) ya da Sol Ventrikül Asist Device (LVAD) takılmış olan hastalar çalışma dışında bırakılmıştır.

3.3. HASTA GRUPLARI

Ameliyat planıyla yatırılmış konjenital kalp hastalığı olan toplam 10 hasta Siyanotik ve Asiyanotik hasta grubu olarak iki ayrı grupta incelenmiştir (Şekil 3.1.) .

Siyanotik hasta grubunda 5 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. 1 hasta Fallot Tetralojisi (TOF), 1 hasta TOF+ atrial septal defekt (ASD), 1 hasta çift çıkımlı sağ ventrikül (DORV)+ dilate kardiyomiyopati (DCMP), 1 hasta DORV+ atriyoventriküler septal defekt (AVCD), 1 hasta büyük arter transpozisyonu (TGA) tanısı ile ameliyata alınmıştır (Şekil 3.2.). Hastaların hepsine cerrahi tüm düzeltme uygulanmıştır.

Asiyanotik hasta grubunda incelenmiş olan 1 hasta atrial septal defekt +ventriküler septal defekt (VSD), 2 hasta ventriküler septal defekt, 1 hasta atriyoventriküler septal defekt, 1 hasta ise mitral darlık (MS) ve mitral yetmezlik (MR) tanısı ile ameliyat edilmiştir (Şekil 3.2.). Hastaların dördüne cerrahi tüm düzeltme, bir hastaya ise kapak tamiri yapılmıştır.

Siyanotik ve Asiyanotik gruptaki tüm hastalardan alınan kardiyak biyopsi materyalleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından mitokondriyal fonksiyon açısından; Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı tarafından ise miyosit hasarı ve histopatolojik açıdan incelenmiştir.

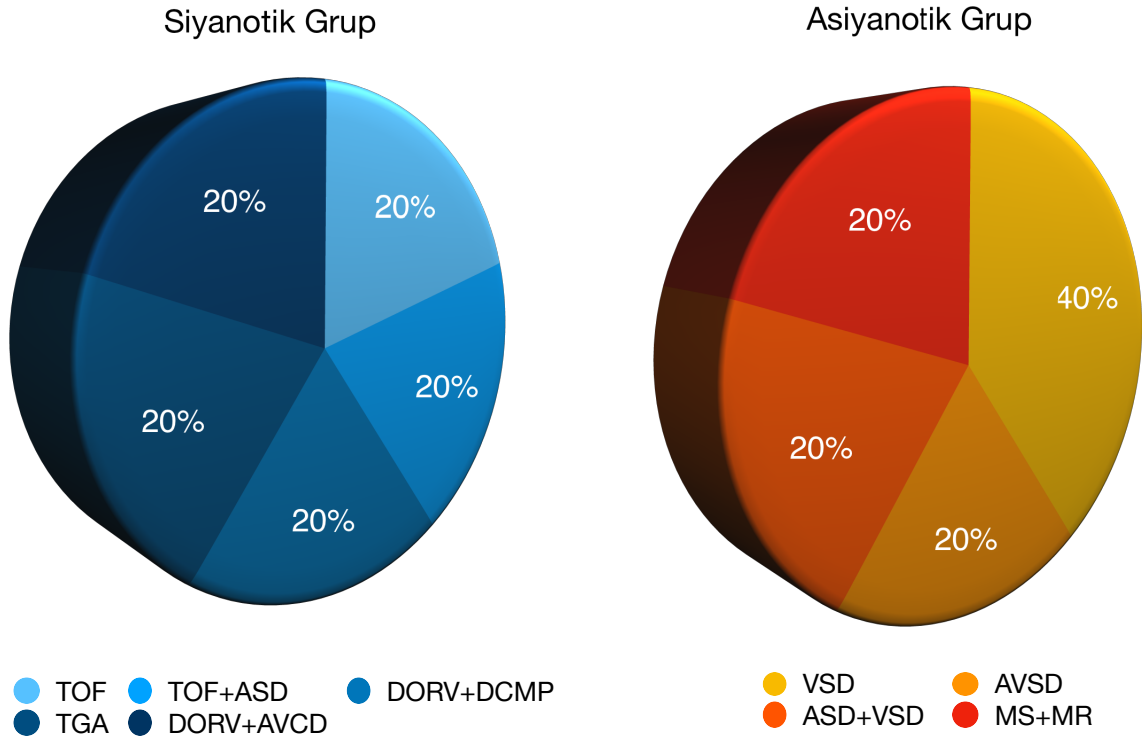
Hastaların hepsinden preoperatif hazırlıkları sırasında ve postoperatif ilk 1 saat içinde kardiyak enzim görülmüştür. Kardiyak enzim olarak Troponin-I, Miyogloblin ve CK-MB seviyelerine bakılmıştır.

Hastaların preoperatif ve postoperatif dönem klinik takipleri ve kardiyak enzim takipleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Asiyantok Grup (5)	#1	#2	#3	#4	#5
Hasta Yaşı	6 YIL 6 AY	12 YIL 8 AY	5 YIL	3.5 AY	5 YIL 9AY
Cinsiyet	E	E	E	K	K

Siyantok Grup (5)	#1	#2	#3	#4	#5
Hasta Yaşı	17 YIL 1 AY	9 AY	4 YIL 4 AY	7 AY	4 YIL 4 AY
Cinsiyet	E	E	K	E	E

Şekil 3.1. Araştırmaya Dahil Edilen Hasta Grupları.



Şekil 3.2. Araştırmaya Dahil Edilen Hastaların Tanıları.

3.4. CERRAHİ PROSEDÜR VE BİYOPSİ MATERYALLERİNİN ALINMASI

Preoperatif hazırlıkları tamamlanan hastalar genel anestezi altında ameliyat edilmişlerdir.

Tüm hastalar median sternotomi ile açılmıştır. Kardiyopulmoner baypasa geçileceği için 3 mg/kg sistemik heparin uygulanmış ve ameliyat süresince ACT (*activated coagulation time*) düzeyi 450 ve üzeri tutulmuştur. Cerrahi prosedüre uygun olacak şekilde standart aortokaval kanülasyonun ardından kardiyopulmoner baypasa geçilmiştir. Hastalar optimum derecede soğutulmuş ve aort kross klemp konmuştur. Kardiyopleji verilerek diyastolik arrest sağlanmıştır. Cerrahi tamir gerçekleştirildikten sonra hastalar ısıtılmış, ventilasyon sonrasında intrakardiyak hava çıkışı sağlanmış ve aort klemp kaldırılmıştır. Ardından kardiyopulmoner baypastan çıkılmıştır. Hemodinaminin stabil olduğundan emin olunduktan sonra pacemaker teli ve drenaj tüpleri yerleştirilmiş ve hastalar uygun şekilde kapatılarak Çocuk Kalp Cerrahisi Yoğunbakım Servisi'ne transfer edilmiştir.

Kardiyak biyopsi materyalleri kardiyopulmoner baypas öncesinde venöz kanülün yerleştirildiği atrial kanülasyon yerinden 2-3mm boyutlarında rezeke edilerek alınmıştır. Kardiyopulmoner baypastan çıkıldıktan sonra alınan yaklaşık 2-3mm boyutlarındaki biyopsi materyalleri de sağ atrium appendiksinden alınmıştır.

Alınan biyopsi örnekleri hem erişkin hem çocuk olmak üzere açık kalp ameliyatlarının tümünde rutin olarak venöz kanülasyon için rezeke ettiğimiz dokulardan elde edilmiştir. Dolayısıyla çalışmamız için özel olarak ayrı bir kalp doku örneği hastalardan alınmamıştır.

Siyanotik ve asiyanotik hasta grubunun hepsinden alınan doku örnekleri miyosit hasarı ve histopatolojik açıdan incelenmiştir. Araştırmamızda siyanotik gruptan 5 asiyanotik gruptan 5 olmak üzere araştırma kriterlerine uygun toplam 10 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Toplam 10 hasta ile araştırma örneklemini yeterli görmemizin sebebi araştırmanın “var-yok” değerlendirilmesi şeklinde yapılması, incelenen dokunun nadir çalışılan doku kapsamında olması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde mitokondriyal fonksiyon açısından kardiyak dokunun ilk defa incelenmiş olmasıdır. Ayrıca her iki gruptan 5’er hastanın hepsinde “var-yok” değerlendirmesi ile anlamlı sonuç bulmuş olmamız ve bu sebeple araştırmanın geçerliliğini korumuş olması da göz önüne alınmış ve miyokardiyal mitokondri fonksiyonu ve histopatolojik değişiklik araştırmasınının 11 Aralık 2018 tarihli GO 17/651-01 karar numaralı Etik Kurul onayı alınarak toplam 10 hasta ile tamamlanmasına karar verilmiştir.

Kardiyopulmoner baypas başlamadan alınan kardiyak biyopsi örnekleri longitudinal iki ayrı parça haline getirilerek histopatolojik inceleme için parçanın biri 10%’luk formaldehit içinde patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Mitokondriyal fonksiyonlar açısından incelenecek olan diğer parça ise alüminyum kutulara sıvı nitrojenin buhar fazında dondurulacak şekilde yerleştirilmiş ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’na gönderilmiştir. Cerrahi düzeltme tamamlanıp kardiyopulmoner baypastan çıktıktan sonra alınan miyokard biyopsi örneği ise başka bir 10%’luk formaldehit solüsyonu içinde Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı’na gönderilmiştir.

Kardiyak biyopsi aldığımız yerlerde kanama olmadığı ve morfolojik olarak atrial fonksiyonun bozulmadığı kontrol edildikten sonra standart cerrahi prosedür devam etmiş ve ameliyat uygun şekilde tamamlanmıştır.

3.5. POSTOPERATİF İZLEM

Ameliyatı tamamlanan hastalar postoperatif dönemde Çocuk Kalp Cerrahisi Yoğunbakım Servisi'nde takip edilmiştir. Çalışmamızda ameliyat sonrası ilk bir saatte rutin alınan tam kan sayımı, arteriyel kan gazı, karaciğer ve renal fonksiyon testlerine ek olarak kardiyak enzim görülmüştür. Kardiyak enzim olarak Troponin-I, Miyogloblin ve CK-MB seviyeleri olarak belirlenmiştir. Kardiyak enzim için alınan kan örnekleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Merkez Laboratuvarı tarafından, kantitatif analizlerde iç kalite kontrol sonuçları Wesgart kurallarına uygun olacak şekilde değerlendirilmiştir. Troponin-I seviyesi *hs Troponin-I testi* ve ona uygun referans aralığı ve birimi kullanılarak sonuçlandırılmıştır (Tablo 3.1). Kardiyak enzim değerlerinin mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve histopatolojik değişiklik ile istatistiksel olarak ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. Hastaların inotropik ajan ihtiyacının olup olmadığı, başlanan inotropik desteğin süresi kaydedilip ve her iki grup karşılaştırılarak incelenmiştir. Ek olarak, gerçekleştirilen ameliyatın kardiyopulmoner baypas süresi, aort klemp süresi, hastaların yoğunbakımda kalış süreleri ve toplam hospitalizasyon süreleri kaydedilmiştir.

Tablo 3.1. Kardiyak Panel Referans Aralığı ve Birimi

Kardiyak Panel	Birim	Referans Değerler
Troponin-I	nanogram/Litre	14-42,9
CK-MB	mikrogram/Litre	0,6-6,3
Miyogloblin	mikrogram/Litre	17,4-105,7

3.6. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Formaldehit ile fikse, parafine gömülü dokulardan 4 µm kalınlığında kesitler hazırlanmıştır. Rutin ışık mikroskopik inceleme için bir kesit, fibrozisi değerlendirmeye yönelik Masson trikrom ve Gomori trikrom boyalar için de birer kesit hazırlanmıştır. HE kesitlerde miyositlerdeki hasar ya da hasara karşı adaptif (reaktif) yanıt miyosit nükleuslarında irileşme, hiperkromazi ve nükleer kontur düzensizliği ile karakterize sitolojik atipi ile değerlendirilmiştir. Daha geç inflamatuvar yanıt ve miyosit kayıpları ise fibrozisin varlığı ve yaygınlığı ile irdelenmiştir. Fibrozisin varlığı ve yaygınlığı Masson ve Gomori trikrom boyları ile değerlendirilmiştir.

Sitolojik atipi nükleer büyüklük, nükleer kontur düzensizliği ve kromatin rengi parametreleri ile şu şekilde skorlanmıştır: 1, belirgin atipi yok; 2, hafif atipi; 3, orta şiddette atipi; 4, şiddetli atipi.

Benzer şekilde, fibrozis de yaygınlığı ve şiddetine göre şu şekilde skorlanmıştır: 1, belirgin fibrozis yok; 2, hafif fibrozis; 3, orta şiddette fibrozis; 4, şiddetli fibrozis. Fibrotik değişikliklerin ve nükleer atipinin aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve kardiyak enzim artış miktarıyla bir ilişkisinin olup olmadığına bakılmıştır.

3.7. DOKU KESİTLERİNDE İMMUNFLORESAN BOYAMA

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda siyanotik ve asiyanotik konjenital kalp hastalığı olan bireylerden cerrahi tamir sırasında almış olduğumuz kalp kası biyopsi dokularından lam üzerine alınan 8 µm'lik kesitler kullanılmıştır.

İmmünfloresan boyama sonrası preparatlar, Zeiss Axioplan 2 floresan mikroskobunda görüntülenmiş olup boyama sonuçları siyanotik ve asiyanotik hastalara ait doku kesitlerinde karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

- Kesitler 30 dk oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, dokuların etrafı Pappen ile işaretlenmiştir.
- Dokular 10 dk %4'lük PFA çözeltisinde bekletilerek fiksasyon yapılmıştır.
- Fiksasyon sonrası dokular 2 kez 10 dk 1x PBS (*Phosphate buffered saline*) ile yıkanarak PFA'nın uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Dokular 15 dk oda sıcaklığında, 1xPBS içerisinde hazırlanmış %0,2 Triton X-100 permeabilizasyon çözeltisinde bekletilmiştir.
- 3 kez 5 dk 1xPBS ile yıkama yapılarak permeabilizasyon çözeltisi uzaklaştırılmıştır.
- Preparatlar %0,1 Tween20 içinde hazırlanmış %10 BSA (*Bovine serum albumin*) (0,1 g/ml) ve %10 keçi serumundan oluşan bloklama çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Primer antikor sulandırım çözeltisi (%0,1 Tween20 içinde hazırlanmış %10 keçi serumu) içerisinde uygun oranda sulandırılmıştır ve gece boyunca +4°C'de preparatlar üzerinde bekletilmiştir.
- 3 kez 10 dk 1x PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Sekonder antikor, sulandırım çözeltisi (%0,1 Tween20 içinde hazırlanmış %10 keçi serumu) içerisinde uygun oranda sulandırılıp 1 saat süre ile oda sıcaklığında kesitler üzerinde bekletilmiştir.
- 3 kez 10 dk 1xPBS ile yıkama yapılmıştır.
- Kesitlerin üzerine DAPI (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole*) içeren Prolong Gold Antifade çözeltisi damlatılarak lamel kapatılmıştır ve ışık görmeyecek şekilde bir gece oda sıcaklığında kurutulmuştur.

- Preparatlar floresan ataçmanlı Zeiss Axioplan 2 mikroskobunda uygun filtreler kullanılarak aynı floresan yoğunlukta görüntülenmiştir.

3.8. DOKU KESİTLERİNDE COX/SDH İKİLİ BOYAMA

- Kalp kası biyopsi dokularından lam üzerine alınan 8 µm'lik kesitler oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek kurutulmuştur.
- Lam üzerinde etrafı Pappen ile işaretlenen doku kesitleri, üzerini kapatacak miktarda COX boyası ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 3 kez 10 dk 1xPBS ile yıkama yapılmıştır.
- Hazırlanan SDH boyası 1 saat süre ile oda sıcaklığında kesitler üzerinde bekletilmiştir.
- 3 kez 10 dk 1xPBS ile yıkama yapılmıştır.
- Kesitlerin üzerine gliserin damlatılarak lamel kapatılmıştır ve aydınlık alan mikroskobunda (Zeiss Axioplan 2) görüntülenmiştir

3.9. DOKU ÖRNEKLERİNDEKİ ATP MİKTARININ ANALİZİ

Konjenital kalp hastalığı olan bireylerden cerrahi tamir sırasında alınmış olan kalp kası biyopsi dokularında ATP miktar analizi yapılarak, elde edilen sonuçlar siyanotik ve asiyanotik hastalar arasında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

- -80°C'de saklanan doku örnekleri sıvı azot yardımıyla porselen havanda ezilerek toz haline getirilmiştir.
- Toz halindeki dokular 500 µl soğuk hücre lizis tamponu içeren eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Hazırlanan örneğin 400 µl'lik kısmı protein izolasyonu ve miktar tayini için -20°C'de saklanmıştır. Geriye kalan 100 µl'lik örneklerin üzerine eşit miktarda soğuk %1,5'lük TCA eklenmiştir.

- Vortekslenerek homojenize edilmiş olan örnekler, +4°C'de ve 10.000g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında süpernatant yeni bir tüpe aktarılıp üzerine 1:100 oranında Tris-Asetat Tamponu eklenmiştir.
- Hazırlanan örnekler, 96 kuyucuklu beyaz mikrokuyucuklu plakalara 10 µl eklenmiştir (her örnekten üçlü tekrar olacak şekilde) ve üzerlerine 90 µl sulandırılmış lusiferin-lusiferaz çözeltisi ilave edilmiştir.
- Hazırlanan örneklerdeki ATP miktarı bekletilmeden luminometrik olarak SpectraMax-i3x mikroparka okuyucu (Molecular Devices) yardımı ile okunmuştur. Örneklerdeki ATP miktarı kit içerisinde bulunan ve ATP miktarı bilinen standartlar yardımıyla GraphPad Prism 5 yazılımı (<https://www.graphpad.com/scientific-software/software/prism>) yardımıyla çizilen standart eğri ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir.
- Örneklerdeki ATP miktarı doku içerisinde bulunan total protein miktarına göre normalize edilmiştir.

3.10. DOKU ÖRNEKLERİNDE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

20°C'de lizis tamponu içerisinde saklanan örnekler buz üzerine alınıp sonikatör cihazı ile %50 amplitütte, 20 sn'lik sinyaller 9 defa verilerek parçalanmıştır. Oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir ve süpernatanda bulunan total protein konsantrasyonları BCA Protein Assay Kit (Pierce) kullanılarak ölçülmüştür.

- %1 SDS kullanılarak kör çözelti hazırlanmıştır.
- 2 mg/ml derişimindeki albümin standartları %1 SDS ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır.

BCA protein assay için standart örneklerin sulandırım oranları:

	Kor Çözelti	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1,2 mg/ml
BSA (2 mg/ml)	-	2,5 mikrolitre	5 mikrolitre	10 mikrolitre	20 mikrolitre	30 mikrolitre
1% SDS	50 mikrolitre	47,5 mikrolitre	45 mikrolitre	40 mikrolitre	30 mikrolitre	20 mikrolitre

- İzole edilen protein örnekleri %1 SDS ile 10 kat seyreltilmiştir.
- 1:50 oranında B ve A çözeltileri kullanılarak çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.
- Standart çözeltiler ve seyreltilen protein örnekleri üzerine 1'er ml çalışma çözeltisi eklenmiştir.
- 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- Standart çözeltilerin NanoDrop ND-1000 cihazında 562nm dalga boyunda verdikleri absorbands değerleri ile standart eğri çizilmiştir.
- Protein örneklerinin absorbandsları üçer kez .l.ülerek standart eğri yardımı ile miktarları tayin edilmiştir.
- Elde edilen değerler sulandırma faktörü olan 10 ile çarpılarak proteinlerin asıl konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.

3.11. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS for Windows Version 21 programı ile yapılmıştır. Parametrik bağımsız gruplarda t-testi, nonparametrik gruplar için ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Sayısal değişkenler t-testi için ortalama \pm standart sapma, Mann-Whitney U testi için median (min-max) ile ifade edilmiştir. Normallik varsayımı ise Shapiro-Wilk testi ile kontrol edilmiştir. Varsayılanların homojenlik kontrolü için Levene testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerde oranlar ise Fisher kesin testi ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonucu p değerinin 0.05'in altında olduğu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Mitokondriyal araştırma için ise İmmünfloresan boyama sonrası preparatlar, Zeiss Axioplan 2 floresan mikroskobunda görüntülenmiştir ve boyama sonuçları siyanotik ve asiyanotik hastalara ait doku kesitlerinde karşılaştırmalı olarak aynı pozlama süresinde analiz edilmiştir. Her iki farklı hasta grubundaki ATP miktarları, dokulardan izole edilen total protein miktarına göre normalize edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. HASTA GRUPLARI

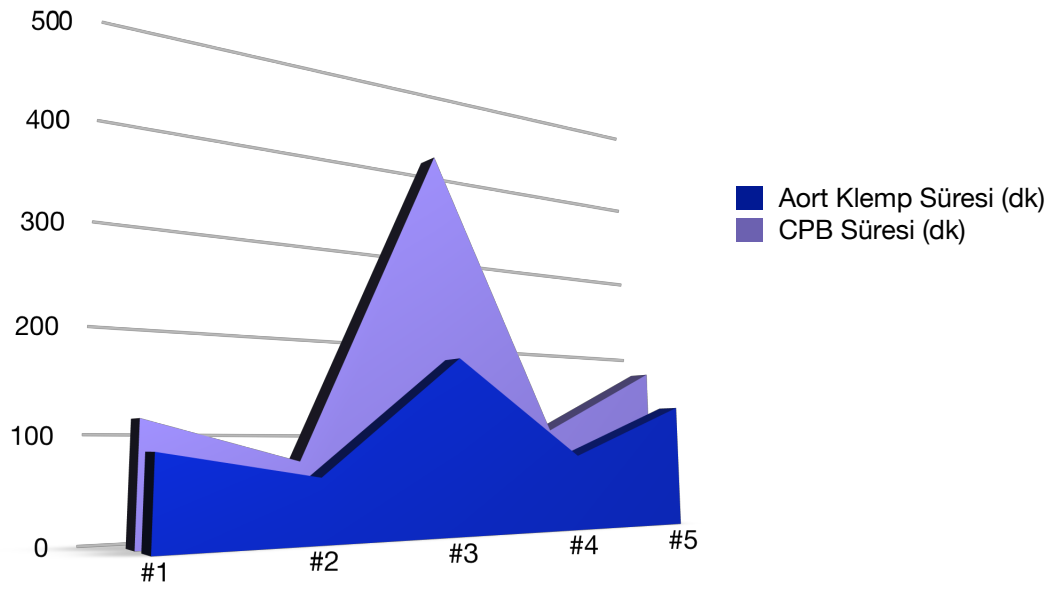
Hasta grupları Siyanotik ve Asiyantotik olarak iki temel başlık altında değerlendirilmiştir. Siyanotik grupta 5, Asiyantotik grupta 5 olmak üzere kriterlere uygun toplam 10 hasta çalışmaya dahil edilmiştir .

Tüm hastaların kardiyopulmoner baypas ve klemp süreleri kaydedilmiştir. Aynı zamanda inotropik ajan ihtiyaçlarının olup olmadığına bakılmış ve yoğunbakımda kalış süreleri ile hospitalizasyon süreleri kaydedilmiştir.

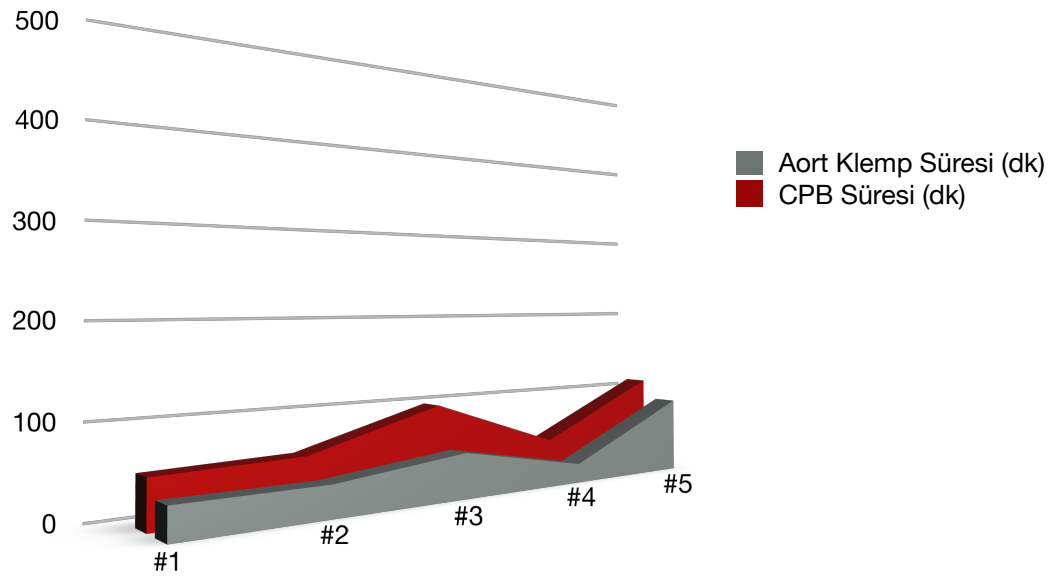
Siyanotik ve Asiyantotik grupta bulunan tüm hastalardan preoperatif ve postoperatif kardiyak enzim görülmüş miyosit hasarına bakılarak histopatolojik inceleme yapılmıştır. Her iki grup miyokardiyal mitokondri fonksiyonu açısından değerlendirilmiş ve sonuçların histopatolojik ve enzimatik ilişkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

4.2. HASTALARIN İNTRAOPERATİF DEĞERLERİ VE POSTOPERATİF TAKİBİ

Çalışmaya dahil edilen siyanotik hasta grubunun ameliyatlarında kardiyopulmoner baypas (CPB) süreleri 75 dakika ile 401 dakika arasında değişirken mean değeri 174.6 dakika, median değeri ise 114 dakikadır. Asiyantotik grupta kardiyopulmoner baypas süreleri 45 dakika ile 111 dakika aralığındadır ve mean değer 73 dakika, median değeri ise 57 dakika olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). Siyanotik grup aort klemp süresi en kısa 61 dakika en uzun 178 dakika sürmüştür. Mean değer 107.40 dakika iken median değeri 85 olarak hesaplanmıştır. Asiyantotik grupta en kısa klemp süresi 22 dakika, en uzun klemp süresi ise 88 dakikadır. Asiyantotik hasta grubu klemp süresi mean değeri 46.2 dakika iken median değer 35 dakikadır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2.).

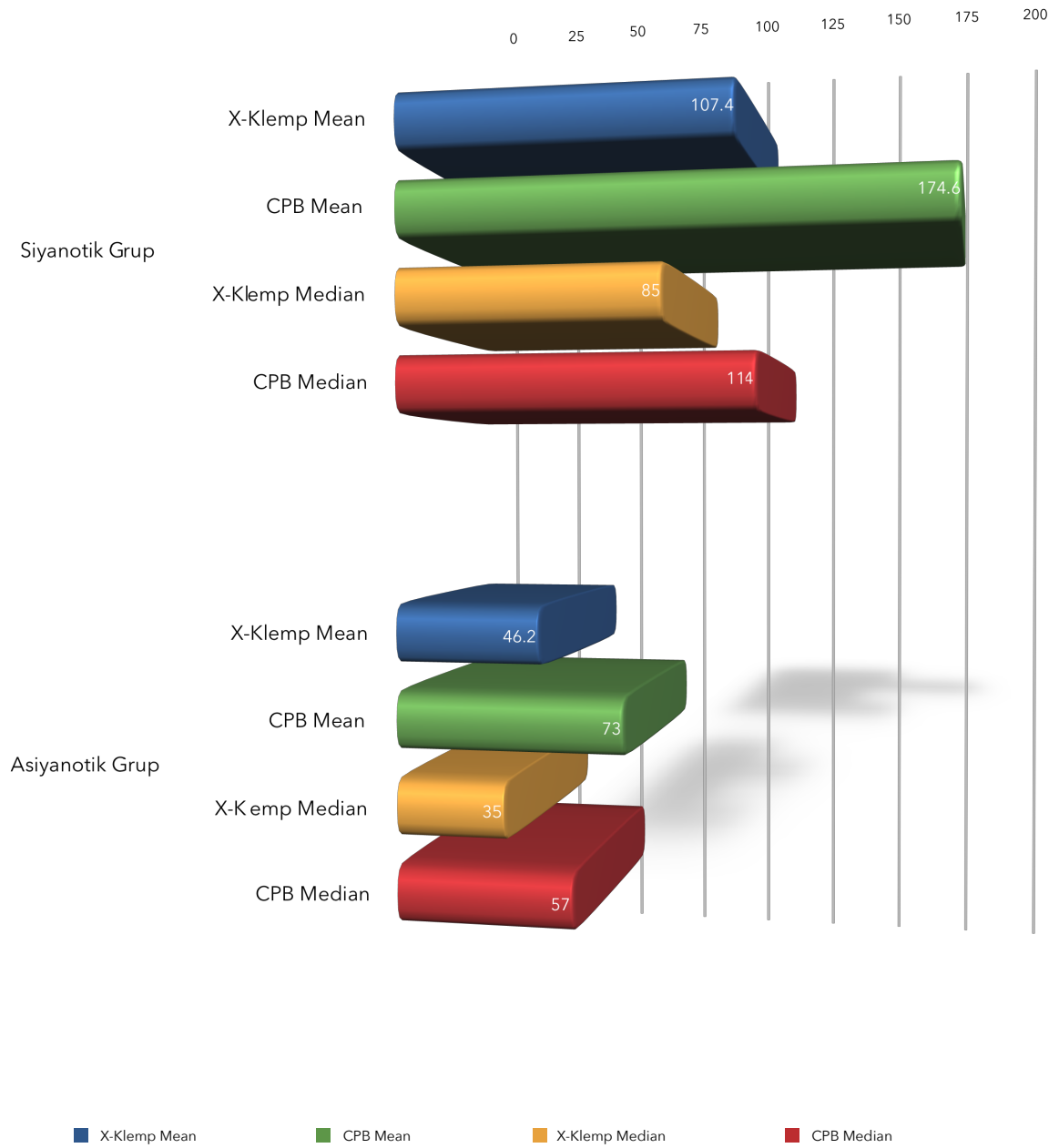


Siyanotik Grup



Asiyanotik Grup

Şekil 4.1. Siyanotik ve Asiyanotik Grupların Aort Klemp ve Kardiyopulmoner Baypas Süreleri.



Şekil 4.2. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Aort Klemp ve Kardiyopulmoner Baypas Sürelerinin Mean ve Median Değerleri.

Elde edilen sonuçlara göre siyanotik hasta grubunda kardiyopulmoner baypas süresi ve klemp süresi asiyanotik gruba göre fazla bulunmuştur. Bu durumu siyanotik konjenital kalp hastalıkları düzeltme ameliyatlarının asiyanotik gruba göre genel olarak daha kompleks olması, dolayısıyla daha uzun sürmesiyle açıklamaktayız. Ancak bunun için tam olarak istatistiksel anlamlı demek mümkün değildir. Bulunan değerlerin sınırdan çıkması ise hasta sayısının azlığına bağlanmıştır ($p= 0.056$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Aort Klemp ve CPB Sürelerinin Mann-Whitney U Testi ile Analizi

	Siyanotik Grup (Median (min-max))	Asiyanotik Grup (Median (min-max))	p
CPB (dk)	114.00 (75.0- 401.0)	57 (45.0- 111.0)	0.056
X-Klemp (dk)	85 (61.0- 178.0)	35.00 (22.0- 88.0)	0.056

İnotropik ajan ihtiyacına bakıldığında ise siyanotik hastaların 4'ünde postoperatif inotropik ajan desteği bulunmaktadır. Tercih edilen inotropik ajanın Dopamin olduğu görülmüştür. Siyanotik grup Dopamin desteği süresi ise 48 saat ile 9 gün arasında değişkenlik göstermektedir. Asiyantotik grupta ise Dopamin'in yalnızca 1 hastada 48 saat süreyle kullanılmış olduğu görülmüştür. Genel olarak bakıldığında siyanotik hasta grubunun inotropik ajan ihtiyacının asiyantotik gruba göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Fisher Exact Test ile yapılan analizde ise inotropik ajan kullanımının Siyanotik grupta daha çok hastada kullanılıyor olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Siyanotik ve Asiyantotik Grup İnotropik Ajan Kullanımının Fisher's Exact Testi ile Analizi

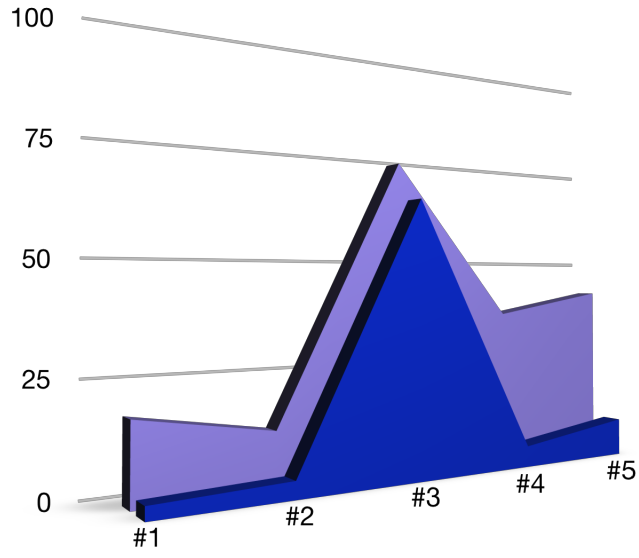
	İnotropik ajan kullanılan hasta sayısı	İnotropik ajan kullanılmayan hasta sayısı	Fisher's Exact Test
Siyanotik Grup (n=5)	4	1	0.206
Asiyantotik Grup (n=5)	1	4	

Aynı şekilde postoperatif yoğunbakım ve hospitalizasyon süreleri her iki grup için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Siyanotik grup yoğunbakım süresi 3 gün ile 64 gün arasında değişmektedir. Hospitalizasyon ise en kısa 13 gün en uzun 73 gündür. Asiyantotik gruptaki 5 hastaya bakıldığında ise yoğunbakım kalış süreleri hepsinin 2 gündür. Hospitalizasyon süreleri ise 9 gün ile 19 gün arasında değişmektedir (Şekil 4.3.).

Siyanotik grup yoğunbakım kalış süresi mean değeri 17 gün, median ise 5 gün olarak hesaplanmıştır. Hospitalizasyon mean değeri ise 36.6 gün, median ise 37 gündür. Asiyantotik grup yoğunbakım kalış süresi mean değeri 2 gün, median değeri ise yine 2 gündür. Hospitalizasyon mean değerinin 13.4 gün, median değerinin 12 olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.4.). Yoğunbakım takip süreleri siyanotik grupta diğer gruba kıyasla daha uzun süre olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Siyanotik ve Asiyantotik Grup Yoğunbakım Takip ve Hospitalizasyon Sürelerinin Mann-Whitney U Testi ile Analizi

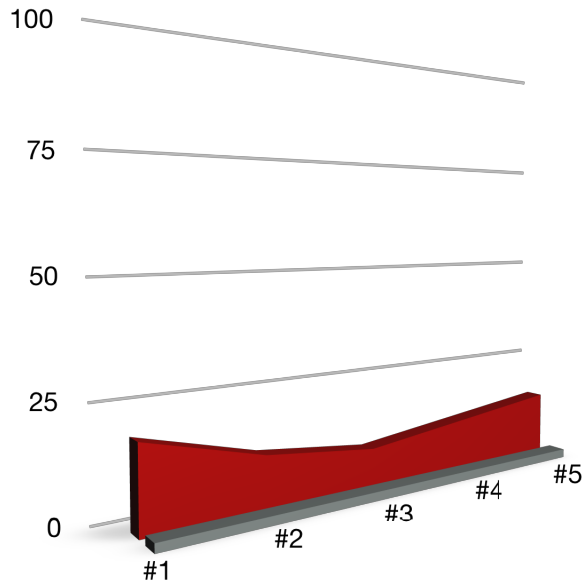
	Siyanotik Grup (Median (min-max))	Asiyantotik Grup (-) (Median (min-max))	p
Yoğunbakım Takip (gün)	5 (3- 64)	2 (2- 2)	0.008
Hospitalizasyon (gün)	37 (13- 73)	12 (9- 19)	0.056



Siyanotik Grup

■ Siyanotik Grup Yoğunbakım Süresi (gün)

■ Siyanotik Grup Hospitalizasyon Süresi (gün)

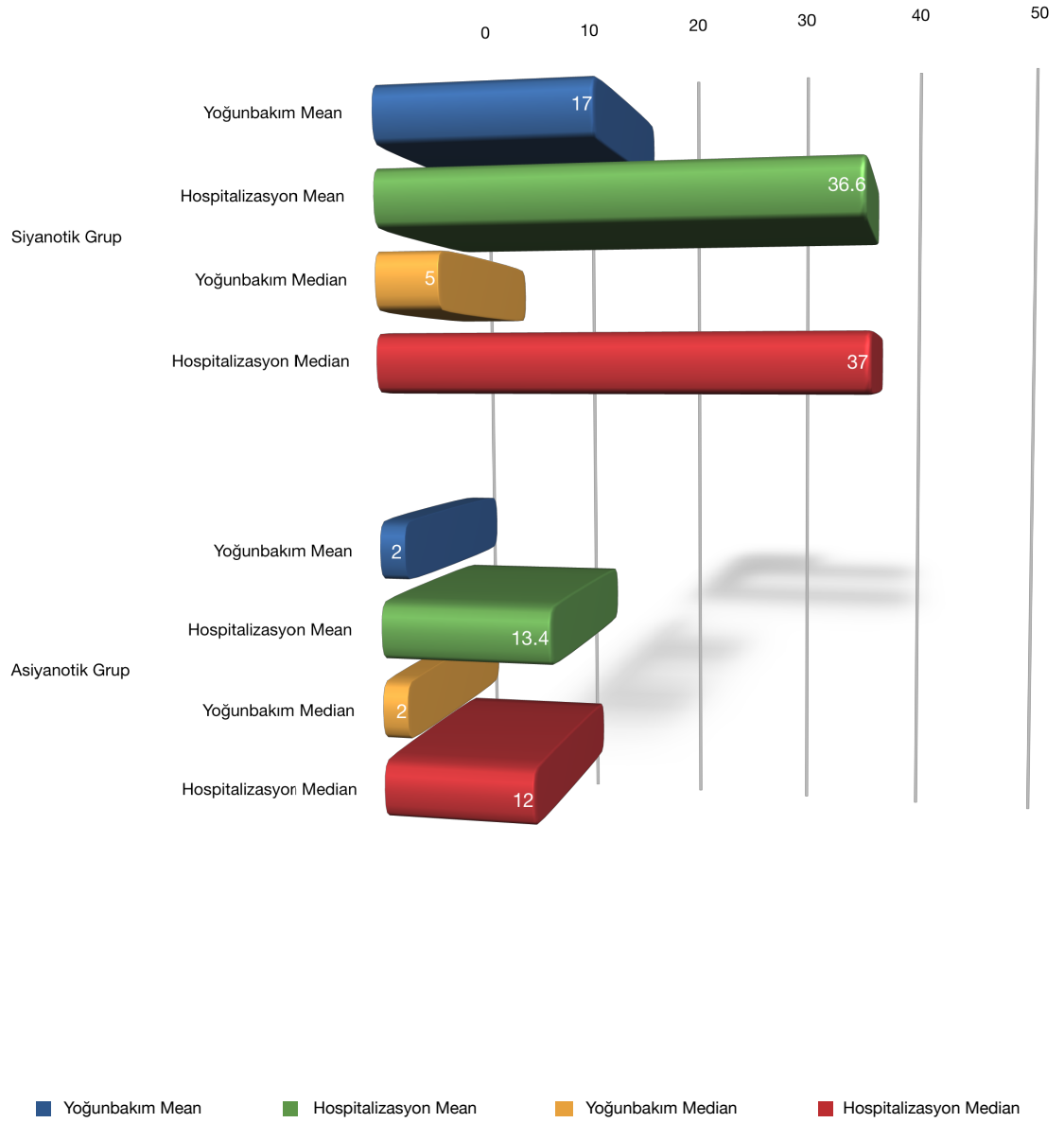


Asiyanotik Grup

■ Asiyanotik Grup Yoğunbakım Süresi (gün)

■ Asiyanotik Grup Hospitalizasyon Süresi (gün)

Şekil 4.3. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Yoğunbakım Takip ve Hospitalizasyon Süreleri.



Şekil 4.4. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Yoğunbakım Takip ve Hospitalizasyon Süreleri Mean ve Median Değerleri

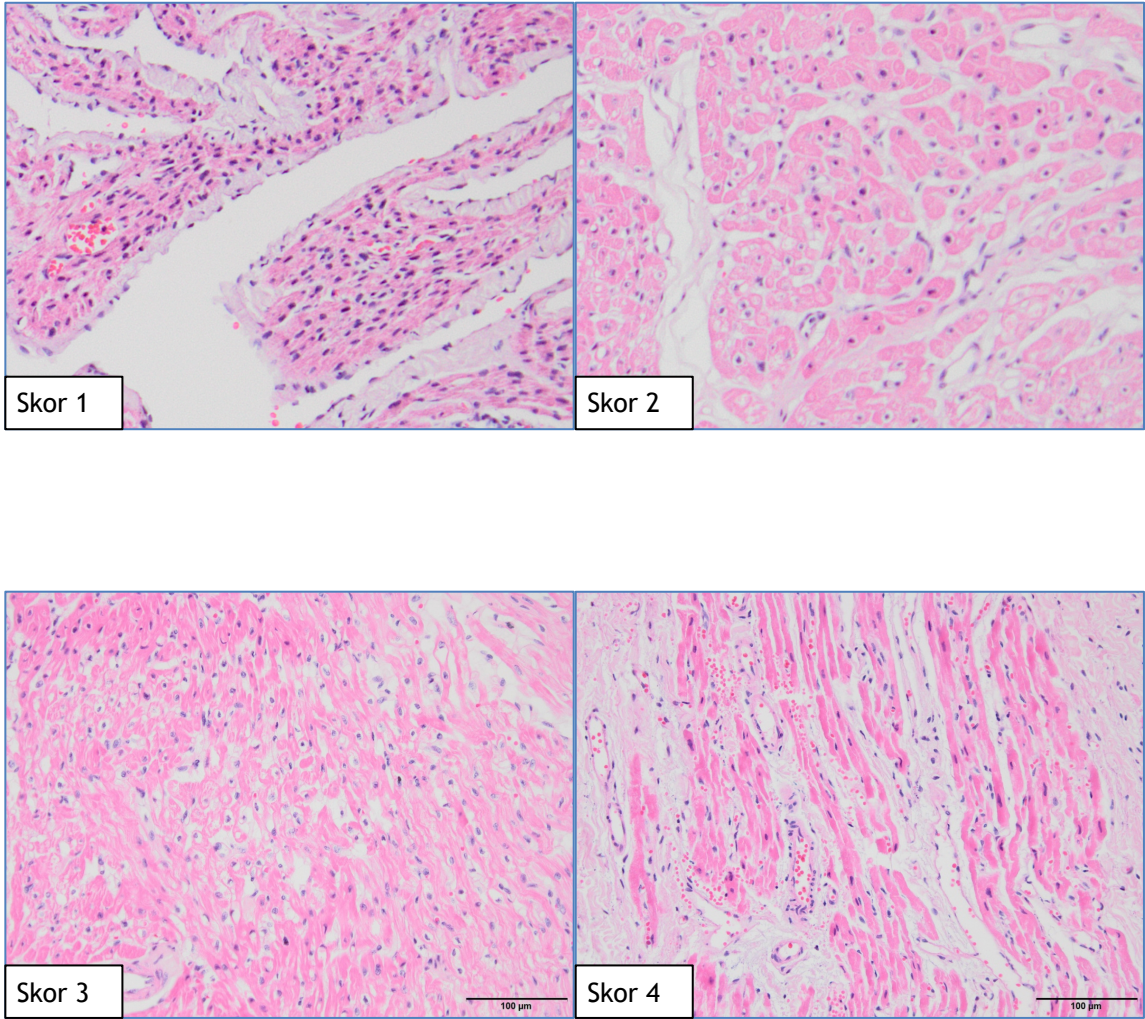
4.3. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Intraoperatif kardiyopulmoner baypas öncesi ve kardiyopulmoner baypas sonrası alınan kardiyak biyopsi örnekleri histopatolojik değerlendirme için nükleer atipi ve fibrozis açısından incelenmiştir. Nükleer atipi ve fibrozisin değerlendirmesi ve hasarın derecelendirmesi her iki parametre için skor 1 (normal), skor 2 (hafif), skor 3 (orta) ve skor 4 (şiddetli) olarak ayrı ayrı skorlanmıştır. Tüm derecedeki hasar görüntüleri standardize şekilde alınmıştır (Şekil 4.5a ve Şekil 4.5b). Fibrotik değişikliklerin ve nükleer atipinin aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve kardiyak enzim artış miktarıyla bir ilişkisinin olup olmadığına bakılmıştır.

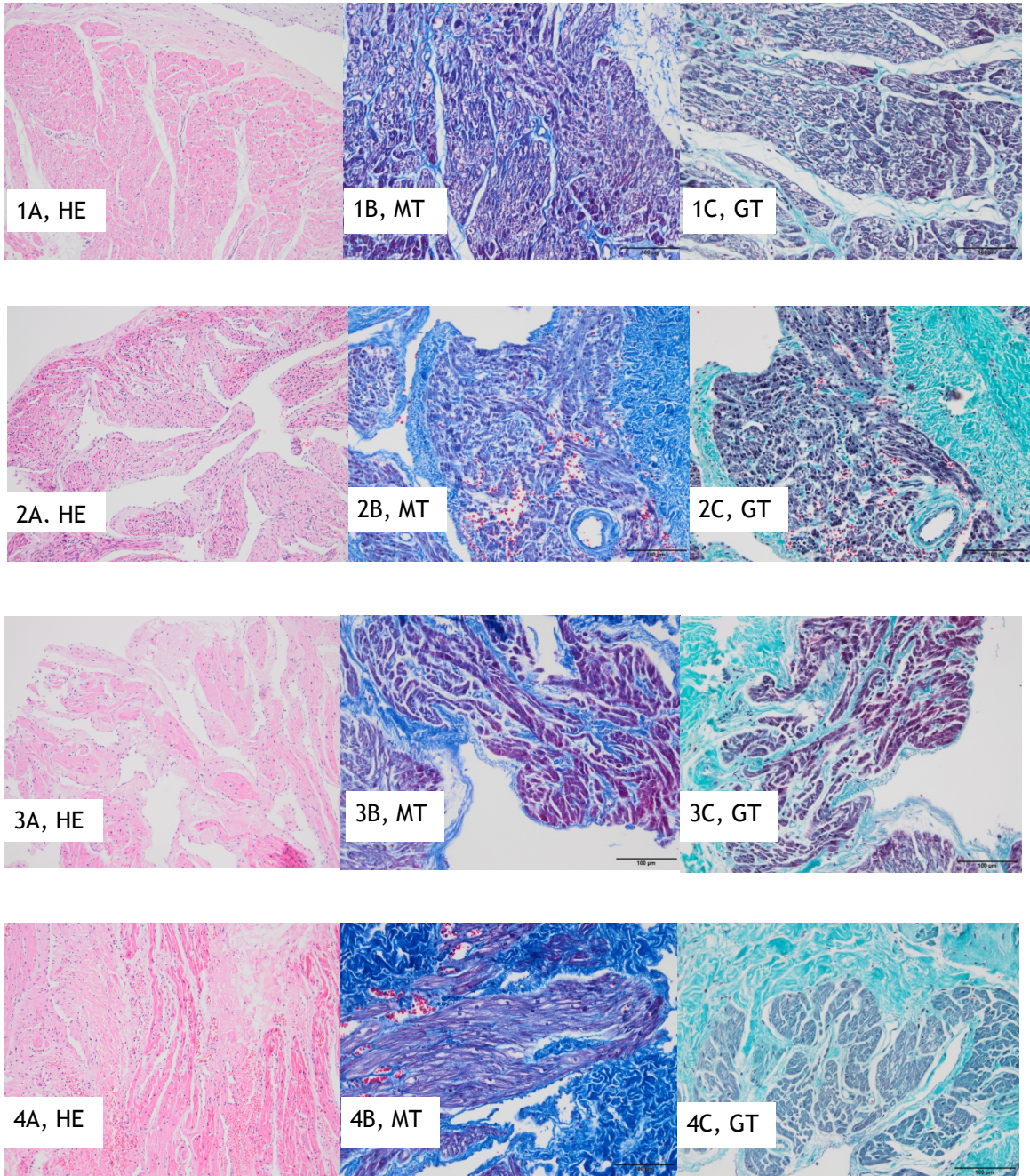
HE kesitlerde miyositlerdeki hasar ya da hasara karşı adaptif (reaktif) yanıt miyosit nükleuslarında irileşme, hiperkromazi ve nukleer kontur düzensizliği ile karakterize sitolojik atipi ile değerlendirilmiştir. Daha geç inflamatuvar yanıt ve miyosit kayıpları ise fibrozisin varlığı ve yaygınlığı ile irdelenmiştir.

Siyanotik hasta grubunda preoperatif nükleer atipi bir hastada skor 4, iki hastada skor 3, iki hastada ise skor 1 olarak derecelendirilmiştir. Postoperatif nükleer atipi derecesi ise yalnızca bir hastada değişiklik göstermiş ve preoperatif skor 1 olan hasarın postoperatif skor 2 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

Asiyanotik grupta ise preoperatif nükleer atipi bir hastada skor 4, iki hastada skor 3 ve iki hastada skor 2'dir. Postoperatif nükleer atipi derecelendirmesi ise asiyanotik hasta grubu için tüm hastalarda preoperatif değerle aynı bulunmuştur (Şekil 4.6).



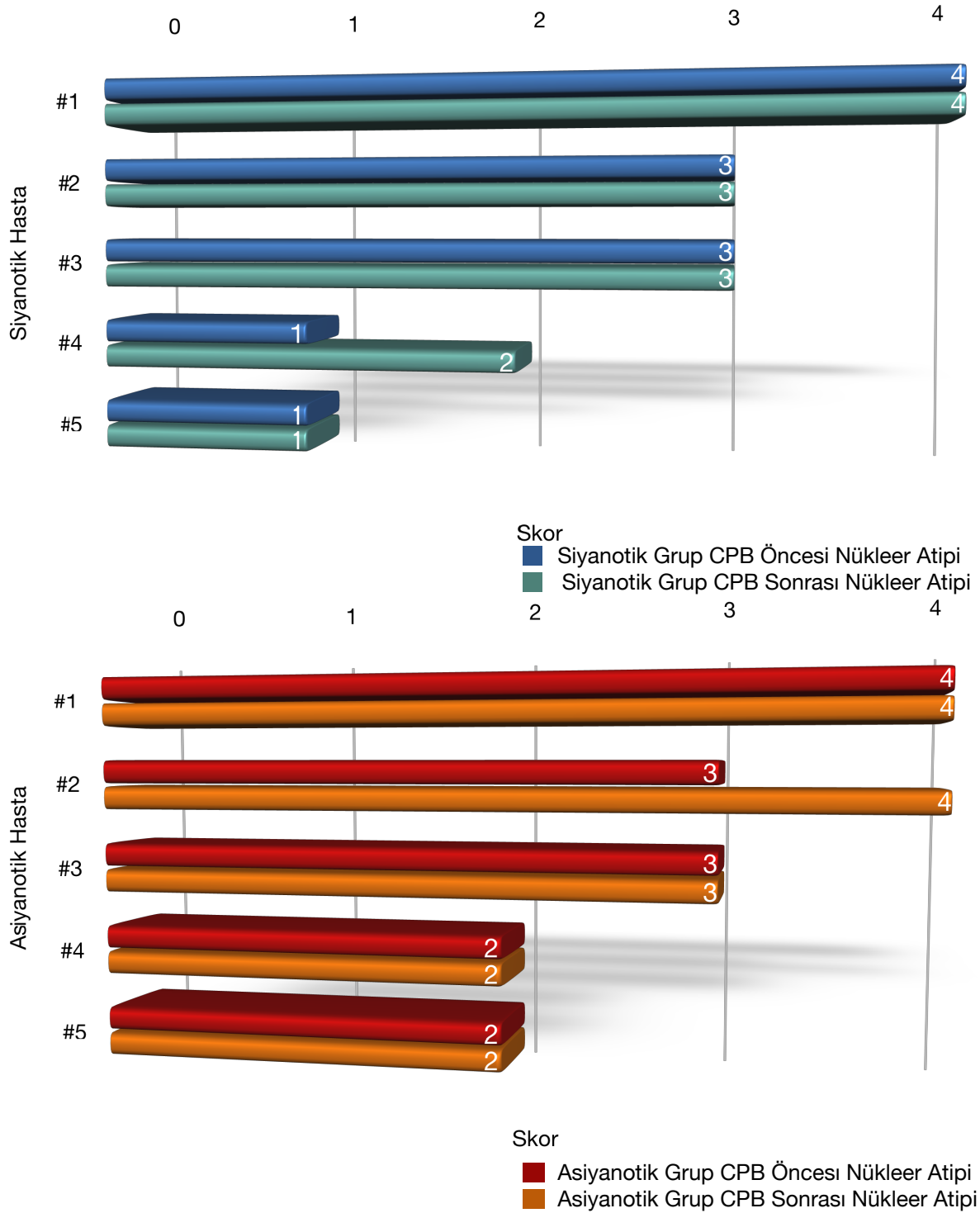
Şekil 4.5a. Miyosit Atipisinin Histolojik Değerlendirmesi ve Skorlaması: Küçük, koyu, yuvarlak-oval nükleusa sahip normal miyositler (A). Nükleer irileşme ve perinükleer halo sergileyen az sayıda miyosit (B). Miyositlerde daha belirgin ve yaygın perinükleer halo, nükleer irileşme ve kontur düzensizliği (C). Miyositlerde yaygın nükleus kaybı ve sitoplazmik iskelet varlığı. Bazı miyositler tamamen ortadan kalkmış ve miyosit dizisi kesintiye uğruyor (D).



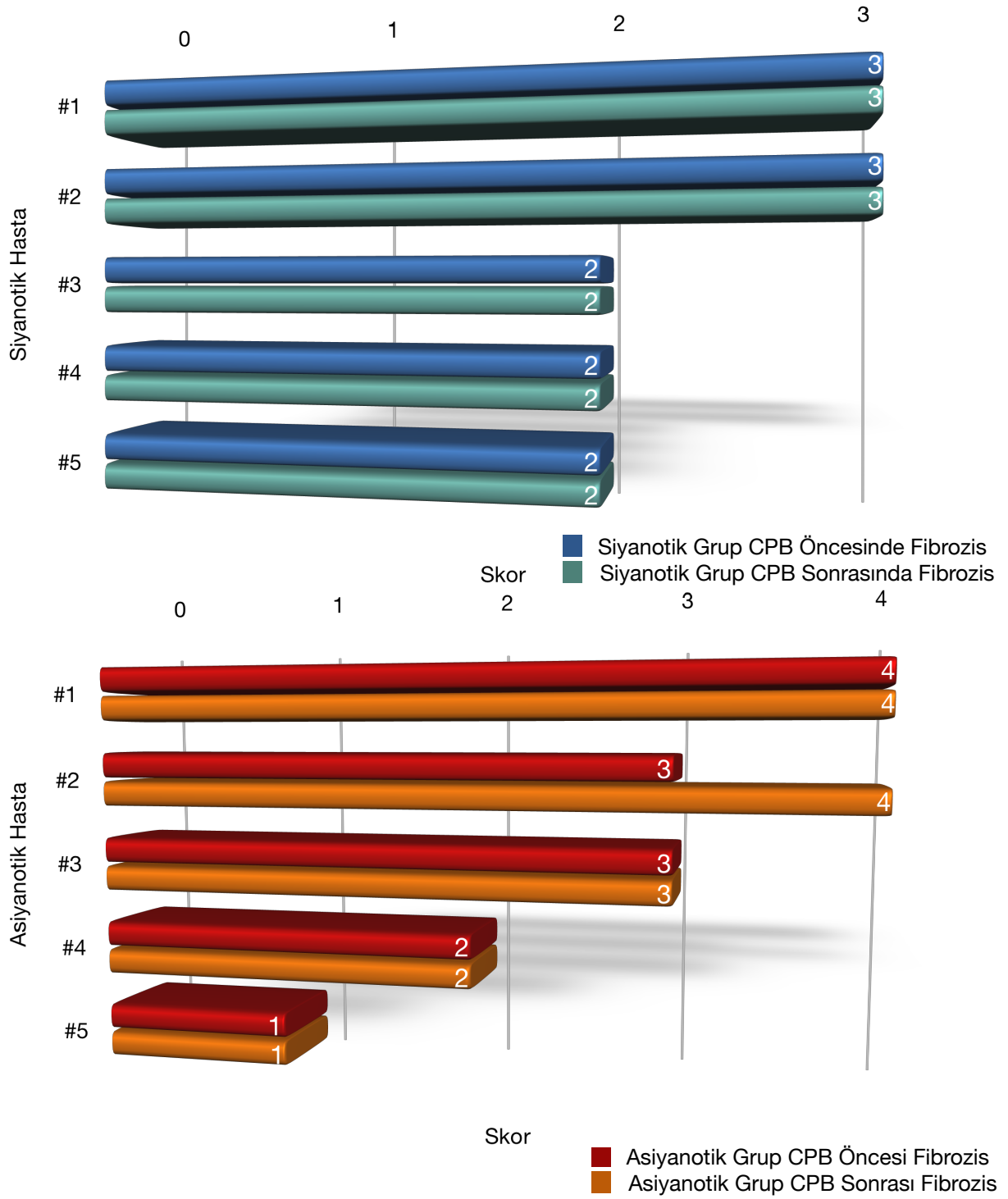
Şekil 4.5b. Miyokardiyal Fibrozisin Histolojik Değerlendirmesi ve Skorlaması: Normal bir miyokarda miyosit dizileri arasında çok ince fibroz fibriller (1A-C). İnterstisyel fibroz lifler ve hafif ve orta dereceli daha kalın ve belirgin (2A-2C ve 3A-3C). Miyosit hasarı sonrası ortadan kalkan dejenere miyositlerin ve yerini alan belirgin fibrozis (4A-C).

Fibrozise bakıldığında ise siyanotik grupta iki hastada preoperatif skor 3 fibrozis, üç hastada ise skor 2 fibrosis görülmüştür. Aynı grupta postoperatif fibrozis derecelerinin değişkenlik göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Asiyantotik grup preoperatif fibrozis incelemesinde bir hastada skor 4, iki hastada skor 3, bir hastada skor 2, bir hastada ise skor 1 fibrozis tespit edilmişken postoperatif incelemede, beş hastanın yalnızca birinde fibrozis derecesinin değiştiği görülmüştür (Şekil 4.7).

Hem siyanotik hem asiyantotik grupta tüm biyopsi örneklerinin normal doku ve normal nükleer skor 4 (şiddetli) ve skor 4 nükleer atipiyeye kadar değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Buna ek olarak kardiyopulmoner baypas sonrası alınan örneklerin değerlendirme skorlarının, öncesinde alınan örneklerle göre değişmediği tespit edilmiştir. Bu durum kardiyopulmoner baypas süresinin fibrotik değişiklik yaratmaya ya da varsa bile en azından ışık mikroskop düzeyinde gözlemlemeye yetmeyecek kadar kısa sürmesi ile açıklanmaktadır. İstatistiksel analiz CPB sonrası skorlar dikkate alınarak yapılmıştır. Kohort'un ve her bir skordaki olgu sayısının nispeten az olması nedeniyle nükleer atipi ve fibrozis dereceleri skor 3 ve skor 4 olgular için "pozitif (var)", skor 1 ve skor 2 olgular için "negatif (yok)" şeklinde tekrar skorlanmış ve istatistiksel olarak değerlendirildiğinde siyanotik ve asiyantotik grup arasında Fisher Exact Test'te yine anlamlı farklılık bulunamamıştır. (Tablo 4.4).



Şekil 4.6. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Nükleer Atipi Değerlendirmesi.



Şekil 4.7. Siyanotik ve Asiyanotik Grup Fibrozis Değerlendirmesi.

Tablo 4.4. Siyanotik ve Asiyantotik Grupların Nükleer Atipi ve Fibrozis ile İlişkisinin Fisher Exact Testi ile Analizi.

	Nükleer Atipi (+) Hasta Sayısı	Nuclear Atipi (-) Hasta Sayısı	Fisher's Exact Test
Siyanotik Grup	3	2	1.000
Asiyantotik Grup	3	2	

	Fibrozis (+) Hasta Sayısı	Fibrozis (-) Hasta Sayısı	Fisher's Exact Test
Siyanotik Grup	2	3	1.000
Asiyantotik Grup	3	2	

4.4. MİTOKONDRIYAL FONKSİYONLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Siyanotik ve asiyanotik konjenital kalp hastalığı olan bireylerden intraoperatif kardiyopulmoner baypas öncesinde alınmış olan kalp kası biyopsi dokularında; mitokondri morfolojisi ve ağ yapısındaki olası hasar incelenmiştir. Bu amaçla alınan doku kesitlerinde, mitokondri belirteci olan ve organel dış membranında yerleşik Tom20 translokazını tanıyan antikora immünfloresan boyama yapılmıştır. Asiyanotik grupta incelenen beş doku örneğinde ait incelenen kesitlerde; mitokondri ağ yapısının (uzun, tübüler yapı) ve hücre içi yoğunluğunun korunduğu saptanmıştır. Aynı pozlama süresinde incelenen siyanotik gruptaki tüm doku örneklerinde ise, mitokondri ağında bozulmalar olduğu ve asiyanotik gruba kıyasla özellikle hücrelerdeki mitokondri yoğunluğunun ciddi oranda azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.8).

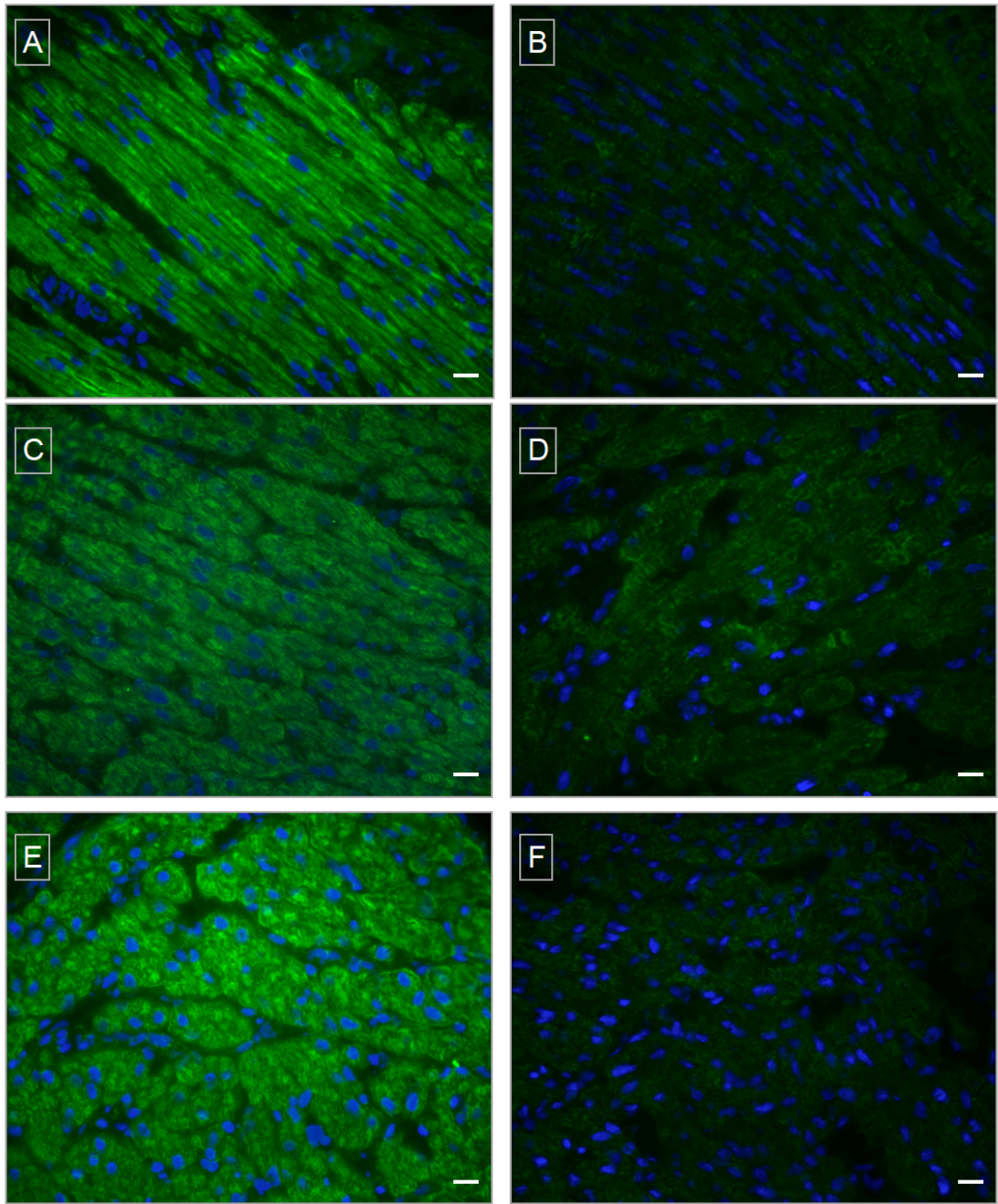
Bir sonraki aşamada; siyanotik ve asiyanotik gruba ait doku kesitlerinde COX/SDH ikili boyaması gerçekleştirilmiştir. Bu boyama, doku kesitlerinde dolaylı olarak mitokondriyal işlev analizi yapmaya yarayan bir histokimyasal boyama tekniğidir. Mitokondriyal kompleks IV olarak bilinen COX'un belirli katalitik alt üniteleri mitokondriyal genom (mtDNA) tarafından kodlanmakla beraber, kompleks II olarak bilinen Süksinat dehidrogenaz (SDH) tüm alt üniteleri nükleer genom (nDNA) tarafından kodlanmaktadır. Dolayısıyla SDH boyaması mtDNA'dan bağımsız olarak gerçekleşirken, Sitokrom C Oksidaz (COX) boyaması eksikliği çoğunlukla mtDNA bütünlüğündeki bozulmanın göstergesi olarak ifade edilmektedir. Hücresel solunum işlevi/COX aktivitesi bozuk olan hücreler ikili boyama sonucunda mavi renkte gözükürken (SDH aktivitesine bağlı olarak NBT'nin indirgenmesi sonucu oluşan formazan son ürün), normal mitokondri/COX işlevine sahip hücreler kahverengi (mitokondri kristasına ve hücreye yerleşen DAB ürünü) olarak gözükmektedir (93-95).

Yaptığımız histokimyasal boyamalar sonucunda; COX/SDH'nin her iki gruba ait örneklerde de benzer şekilde koyu kahverengi boyama verdiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.9). Bu sonuç bize; gerek siyanotik gerekse asiyanotik gruptaki örneklerde COX aktivitesinin korunduğunu göstermektedir. Bu boyama metodu mitokondri işlevinde yönelik bir ön bulgu ortaya çıkarmasının yanısıra, boymanın çıkmaması mitokondri işlevinin bozuk olduğunu tam olarak göstermemektedir.

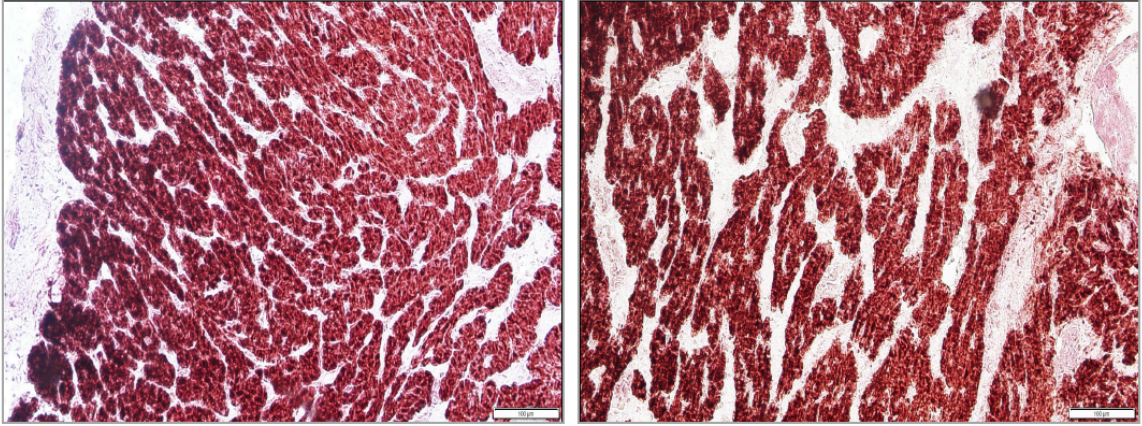
Klinik olarak etkilenmiş dokulardaki mitokondri hasarını anlayabilmek için günümüzde standart bir teknik olarak COX/SDH ikili histokimyasal boyaması ile sırasıyla kompleks IV ve II aktivitelerine bakılmaktadır (95). Bu boyama tekniği, çok farklı mitokondriyal hastalık gruplarında organel hasarını kolaylıkla tespit edebilse de oksidatif fosforilasyon yolağının her aşamasındaki hataları tespit edememektedir. Mitokondri hasarının başlangıç aşamasındaki ya da farklı bir solunum kompleksinin hasarlı olduğu dokularda pozitif boyama verebilmektedir (96-98). Bu nedenle, tez çalışmasındaki hastalık gruplarında morfolojik olarak gösterilen mitokondri hasarını işlevsel olarak analiz etmeye yönelik daha detaylı ve kantitatif teknolojilere ihtiyaç vardır.

Mitokondri işlevini kantitatif olarak analiz etmek amacıyla, siyanotik ve asiyanotik gruba ait doku örneklerindeki ATP miktarı kit yardımıyla ölçülmüştür. Bu analiz, ATP'nin lüsiferin-lüsiferaz enzimi ile reaksiyona girmesi sonucu açığa çıkan biyoluminesansın lüminometre ile ölçülmesi esasına dayanır.

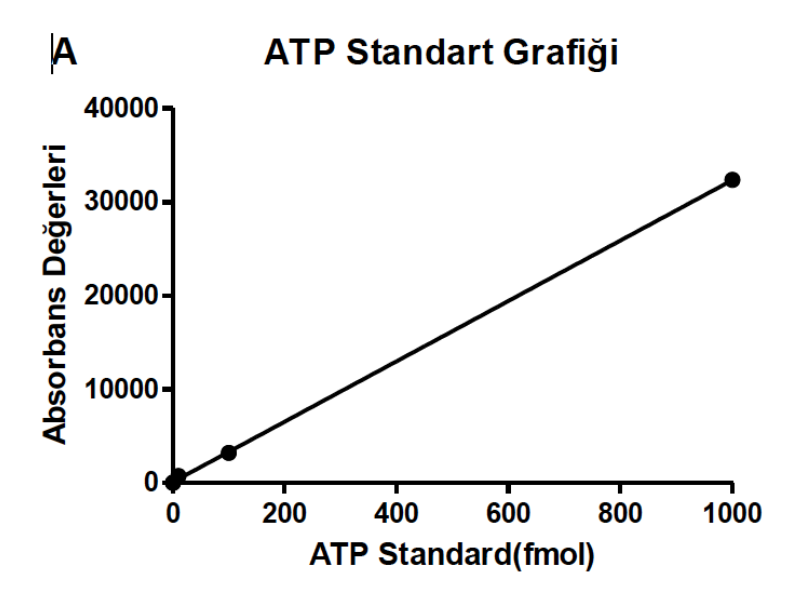
Çalışmamız kapsamındaki iki farklı gruba ait örneklerdeki ATP miktarı kit içerisinde bulunan ve ATP miktarı bilinen standartlar yardımıyla çizilen standart eğri ile karşılaştırmalı olarak belirlendi ve total protein miktarına göre normalize edilmiştir (Şekil 4.10). GraphPad Prism 5 yazılımı ile yapılan analizlerde, siyanotik gruba ait hasta örneklerindeki ATP miktarının, asiyanotik gruba ait örneklerle kıyasla anlamlı şekilde azalmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11.). İmmünfloresan boyamalarla benzer verilere ulaşılmış ve siyanotik gruba ait hasta örneklerinde asiyanotik gruba kıyasla, mitokondri hasarının artmış olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.8. Siyanotik [(B), (D), (F)] ve Asiyantotik [(A), (C), (E)] konjenital kalp hastalığı olan bireylere ait kalp kası biyopsi örneklerinden alınan boyuna (A-D) ve enine (E ve F) kesitlerde mitokondri morfolojisinin floresan mikroskobu görüntüleri (A ve D) Yeşil/FITC: Tom20/mitokondri; Mavi: DAPI (Ölçek: 10µm, Mikroskop: Zeiss Axioplan 2, fotoğraflar tüm örneklerde aynı pozlama süresinde çekilmiştir).



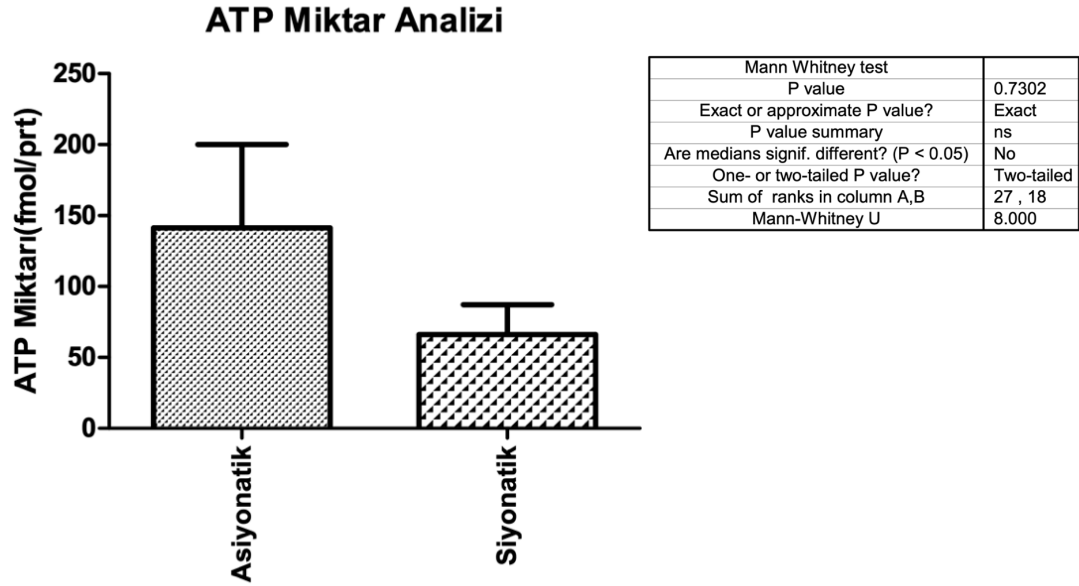
Şekil 4.9. Siyanotik [(sağ)] ve Asyanotik [(sol)] konjenital kalp hastalığı olan bireylere ait kalp kası biyopsi örneklerinden enine kesitlerde COX/SDH ikili boyama görüntüleri (Ölçek: 100µm, Mikroskop: Zeiss Axioplan 2).



B

Goodness of Fit	
r^2	0,9998
Sy.x	203,8
Is slope significantly non-zero?	
F	19350
DFn, DFd	1.000, 3.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant

Şekil 4.10. Siyanotik ve Asiyantotik Konjenital Kalp Hastalığı Olan Bireylere Ait Kalp Kası Biyopsi Örneklerinde ATP Miktarının Analizi; (a) ATP miktarı bilinen standartlar yardımıyla çizilen standart eğri, (b) Regresyon analiz sonuçları



	Absorbans değeri	ATP miktarı (mol)	Protein Konsantrasyonu (mg/ml)	Protein miktarına göre normalize edilmiş ATP miktarı (mol)
Asiyonotik	34698,330	1064,443	4,041	265,69661
	39189,670	1202,846	3,978	304,946958
	3918,000	115,926	1,596	74,149812
	4975,333	148,5084	3,012	50,1858898
	1034,667	27,0741	1,392	20,7272989
Siyanotik	2629,667	76,22511	1,22	64,2269016
	2188,333	62,62512	3,04	21,2694211
	7390,333	222,9283	3,81	59,3477165
	7414,333	223,6699	3,848	58,1257536
	16955,670	517,6905	4,222	123,874112

Şekil 4.11. Siyanotik ve Asiyonotik Konjenital Kalp Hastalığı Olan Bireylere Ait Kalp Kası Biyopsi Örneklerinde ATP Miktarlarının Karşılaştırılması ve Hastalardaki Total Protein Miktarlarına Gore Normalize Edilmiş ATP Miktarları.

4.5. MİTOKONDRIYAL DİSFONKSİYONUN FİBROZİS İLE İLİŞKİSİ

Araştırmamızda mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun miyositer fibrotik değişikliğe yol açıp açmadığına bakılmıştır. Mitokondriyal disfonksiyon ile fibrozis ilişkisi Fisher's Exact Test ile incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Mitokondriyal disfonksiyon görülen 5 hastanın ikisinde skor 3 fibrozis, üçünde ise skor 2 fibrozis saptanmıştır. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olmayan hastalarda ise 2 hastada şiddetli derece, bir hastada orta, bir hastada da hafif fibrozis saptanmıştır. Yine kardiyopulmoner baypastan çıktıktan sonra aldığımız doku örneklerinde fibrozis skorlarında herhangi bir artış görülmemiştir. Tüm hastalarda kardiyopulmoner baypas sonrası fibrozis derecesinin kardiyopulmoner baypas öncesi değerlerle aynı olduğu görülmüştür.

CPB öncesi ve sonrası fibrozis hasar derecesinin aynı olması sebebiyle istatistiksel analiz CPB sonrası değerler ile yapılmıştır. Skor 3 ve skor 4 fibrozis fibrozis "pozitif (var)"; skor 1 ve skor 2 fibrozis ise fibrozis "negatif (yok)" olarak kabul edilerek tekrar skorlanmıştır.

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olan hastalardan alınan biyopside hem hafif hem orta fibrozis görülmüş olması iki parametre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını göstermektedir (Tablo 4.5).

Bu durum kardiyopulmoner baypas süresinin fibrotik değişiklik yaratmaya ya da varsa bile en azından ışık mikroskop düzeyinde gözlemlemeye yetmeyecek kadar kısa sürmesi ile açıklanmaktadır. Ayrıca mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olmayan diğer 5 asiyanotik hastada da orta ve ileri fibrozis görülmüş olması bu düşüncemizi desteklemektedir. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun ise özellikle oksidatif fosforilasyondaki etkisi düşünüldüğünde belirgin sonuçlarının daha çok akut süreçlerde olmasını beklemekteyiz.

Tablo 4.5. Mitokondriyal Fonksiyonların Fibrozis ile İlişkisinin Fisher Exact Testi ile Analizi.

	Fibrozis (+) Hasta Sayısı	Fibrozis (-) Hasta Sayısı	Fisher's Exact Test
Mitokondriyal Disfonksiyon (+)	2	3	1.000
Mitokondriyal Disfonksiyon (-)	3	2	

4.6. MİTOKONDRIYAL DİSFONKSİYONUN NÜKLEER ATİPİ İLE İLİŞKİSİ

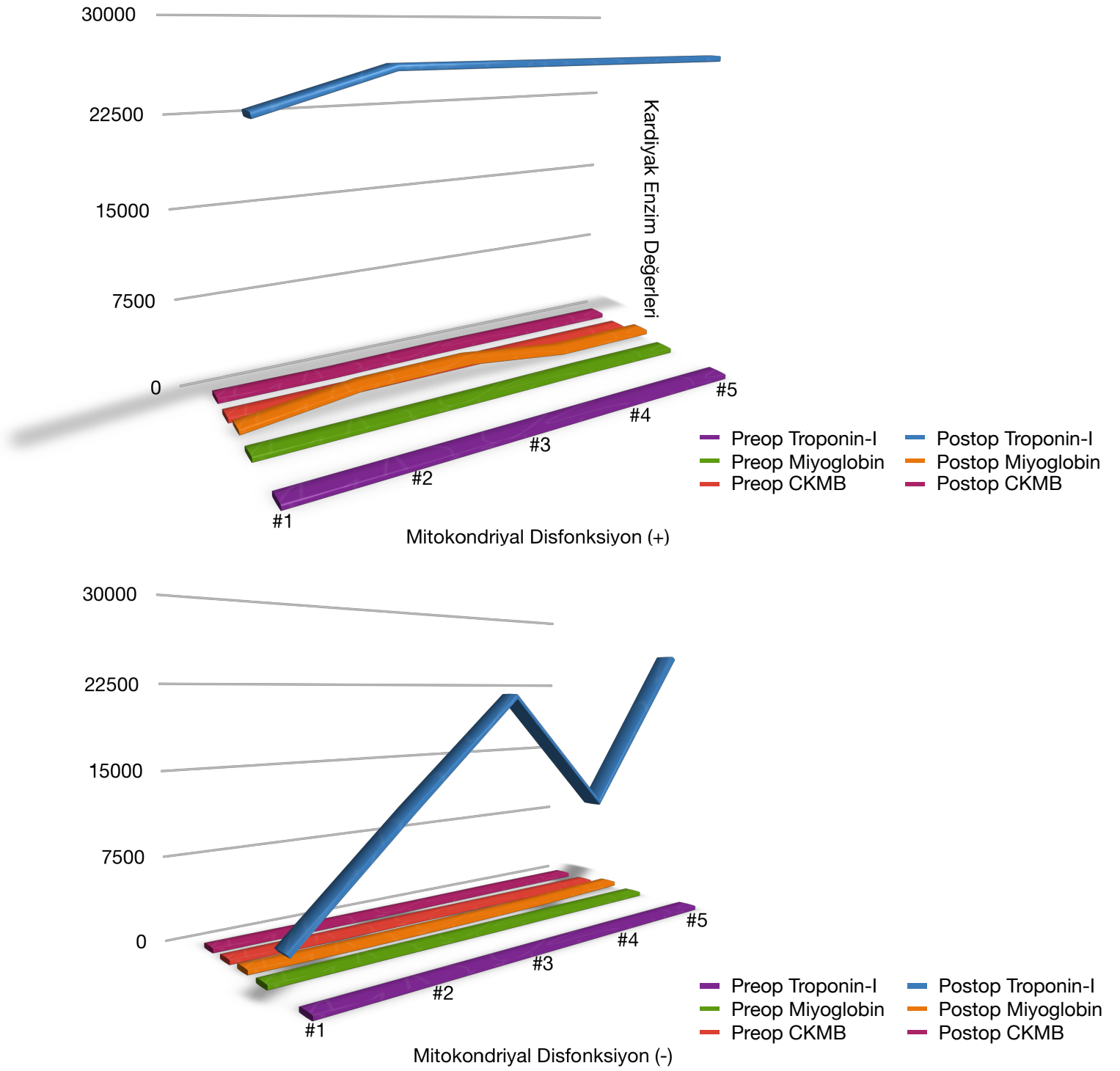
Her iki gruptaki toplam 10 hastanın hepsinde kardiyopulmoner baypas öncesi ve sonrası alınan dokuda nükleer atipi değerlendirildiğinde hem siyanotik hem de asiyanotik grupta normal nükleer yapılanması olan hastalar olduğu gibi şiddetli nükleer atipi gösteren hastaların da olduğu görülmüştür (Tablo 4.4.). Asiyanotik hasta grubunda da ileri derece nükleer atipi olabileceği saptanmış olması bu durumun mitokondriyal fonksiyondan bağımsız bir bulgu olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile nükleer atipi arasında yapılan Fisher's Exact Test değerlendirmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Tablo 4.6). Araştırmamızda mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun nükleer atipiyeye yol açıp açmadığına bakılmıştır. Ancak bunu genel bir prensip olarak söyleyebilmek için daha fazla sayıda hasta incelenmelidir.

Tablo 4.6. Mitokondriyal Fonksiyonların Nükleer Atipi ile İlişkisinin Fisher Exact Testi ile Analizi.

	Nükleer Atipi (+) Hasta Sayısı	Nuclear Atipi (-) Hasta Sayısı	Fisher's Exact Test
Mitokondriyal Disfonksiyon (+)	3	2	1.000
Mitokondriyal Disfonksiyon (-)	3	2	

4.7. MİTOKONDRIYAL DİSFONKSİYONUN POSTOPERATİF KARDİYAK ENZİM DEĞERLERİNİN ARTIŞI İLE İLİŞKİSİ

Açık kalp ameliyatı sonrası postoperatif dönemde tüm hastalarda kardiyak enzim değerlerinde artış beklenmektedir. Kardiyak enzim seviyelerinde postoperatif dönemde görülen bu yükseliş uzun CPB süresi ile ilişkilendirilebilir. Ancak ameliyat sırasında miyokardı korumak için kardiyopleji verilmektedir. Bu sebeple siyanotik ve asiyanotik hasta grubunda postoperatif kardiyak enzim seviyelerindeki anlamlı farklılığın bir başka parametreye bağlı olup olmayacağına bakılmıştır ve çalışmamızda bu artış miktarının siyanotik hasta grubunda görülen miyokardiyal mitokondri fonksiyon bozukluğu ile ilişkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olan ve olmayan tüm hastalarda preoperatif ve postoperatif 1. saat içinde görülen Troponin-I, Miyogloblin ve CKMB değerleri kaydedilmiştir (Şekil 4.12). İstatistiksel analizde ise açık kalp ameliyatı sonrası Troponin-I, Miyogloblin, CKMB değerleri ile preoperatif değerlerin farkı hesaplanmıştır. Postoperatif kardiyak enzim artışı ile mitokondriyal fonksiyon bozukluğu arasında yapılan Mann-Whitney U testinde istatistiksel anlamlı ilişki bulunmuştur (Tablo 4.7.). Bu artış miktarının, siyanotik hasta grubunda miyokardın ameliyat süresince kardiyopleji verilerek korunması sebebiyle uzun klemp ve CPB süresinin yanında mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile daha çok ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Miyokardiyal mitokondri fonksiyonunun bozuk olması, dolayısıyla üretilen ATP miktarının az olması ve miyokardın oksidatif strese yanıtının bozulmuş olması da postoperatif kardiyak enzim seviyesinin yüksekliğini destekleyen sebeplerdir.



Şekil 4.12. Mitokondri Fonksiyon Bozukluğu Olan ve Olmayan Hastalarda Preoperatif ve Postoperatif Kardiyak Enzim Değerleri.

Tablo 4.7. Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğunun Postoperatif Dönemde Kardiyak Enzim Değerlerindeki Artışı ile İlişisinin Mann-Whitney U Testi ile Analizi.

Postoperatif ve Preoperatif Kardiyak Enzim Değerleri Farkı	Mitokondriyal Disfonksiyon (+) (Median (min-max))	Mitokondriyal Disfonksiyon (-) (Median (min-max))	p
Troponin-I	26549.80 (23983.20- 26552.50)	12520.10 (3304.0- 25148.60)	0.016
Miyoglobin	695.50 (515.30- 1759.80)	148.40 (24.40- 455.60)	0.008
CKMB	293.80 (161.20- 298.50)	68.00 (49.00- 192.80)	0.016

5. TARTIŞMA

Yaptığımız bu araştırmada konjenital kalp hastalığı olan çocuk hasta araştırma gruplarımız siyanotik ve asiyanotik hastalar olmak üzere iki grup olacak şekilde belirlenmiştir. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Bölüm 33'te operasyon planıyla yatırılıp takip edilen ve açık kalp ameliyatı kararı olan siyanotik konjenital kalp hastalığı tanılı 5; asiyanotik konjenital kalp hastalığı tanılı 5 pediyatrik hasta araştırma kriterlerine uygun bulunarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Yaptığımız çalışmamızda çıkış noktamız Emami ve arkadaşlarının uyguladığı mitokondri transplantasyonunun (8), konjenital kalp hastalığı olan çocuk hastalarda spesifik bir grup için rutin olarak uygulanıp uygulanmayacağını araştırmaktır ve çocuk miyokardına translasyonel bakış açısı sağlamaktır. (<https://nyti.ms/2NE56QD>).

Tüm hastalardan histopatolojik değerlendirme ve mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon kaybının araştırılması için ameliyat sırasında atrial kanülasyon yerinden yaklaşık 2-3 mm boyutlarında kardiyopulmoner baypasa girmeden biyopsi alınmıştır. Doku analizi için erişkin ve çocuk tüm açık kalp ameliyatlarında venöz kanülasyon için rutin rezeke ettiğimiz atrial doku kullanılmıştır. Yaptığımız çalışma için çocuk hastalarımızın kalplerinden çalışmaya özel ayrı bir doku alınmamıştır. Kardiyopulmoner baypastan bağımsız olarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun kardiyak dokuda histopatolojik değişikliğe yol açıp açmadığını görmek için kardiyopulmoner baypastan çıktıktan sonra sağ atriumdan yine yaklaşık 2-3mm boyutlarında kardiyak biyopsi alınmıştır. Ayrıca tüm hastalarda preoperatif hazırlıkları sırasında ve postoperatif 1. saat içinde kardiyak enzim görülmüştür.

Kardiyopulmoner baypas sonrasında mitokondri fonksiyonuna bakılmamıştır. Çünkü çalışmamızdaki esas amaç altta yatan, var olan miyokardiyal mitokondri morfoloji ve fonksiyon bozukluğunun olup olmadığını görmektir. Kardiyopulmoner baypas sonrası alınan dokuda mitokondri fonksiyonu incelemesi ise CPB'in mitokondriyal fonksiyon bozukluğu yaratıp yaratmadığı sorusunun cevabıdır ve araştırmamızdan tamamen bağımsız bir konudur. Ancak daha sonra yapılacak olan bilimsel araştırmalarda CPB'in mitokondri fonksiyonu üzerine etkisi araştırmak, çalışmayı zenginleştirecek bir alternatiftir.

Kardiyak biyopsi örnekleri histopatolojik ve mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon açısından ayrı ayrı incelenmiştir. Kardiyak enzimlerin preoperatif değer ile postoperatif değerler arasındaki artış miktarı ise mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile ilişkisi açısından karşılaştırılmıştır. del Nido ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mitokondrinin reperfüzyon hasarına yanıtındaki rolünün önemi araştırılmıştır. Bizim çalışmamızda da mitokondri fonksiyon bozukluğu olan miyositte reperfüzyon hasarından bağımsız olarak miyositer hasarın tetiklenip tetiklenmediğine bakılmış ve bunun kardiyak enzimlerle ilişkilendirilip ilişkilendirilemeyeceği araştırılmıştır. Literatürde çocuk kalbinde mitokondriyal fonksiyon ile kardiyak enzim ilişkisini inceleyen başka bir çalışma bulunamamıştır.

Mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon bozukluğu, nükleer atipi, fibrozis ve postoperatif kardiyak enzim artış miktarı olmak üzere dört ayrı parametreye bakılmış ve ayrı ayrı birbirinden bağımsız şekilde siyanotik ve asiyanotik grup için değerlendirilmiştir. Buna ilaveten mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon bozukluğunun fibrozis, nükleer atipi ve enzimatik ilişkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmamızda siyanotik gruptaki tüm hastalarda mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon bozukluğunun olduğu görülmüştür. Asiyantotik grupta incelediğimiz hastalarda ise mitokondriyal fonksiyon bozukluğu hiç birinde saptanmamıştır. Siyanotik konjenital kalp hastalıkları ile mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon bozukluğu hasta sayısının azlığına rağmen tüm hastalarda tespit edilmiştir. Literatürde Meyer ve arkadaşlarının yaptığı gibi mitokondriyal kardiyomiyopati araştırması yapılan yayınlar bulunmaktadır. Ancak miyokardiyal mitokondri morfoloji ve fonksiyonlarının konjenital kalp hastalıklarında siyanotik ve asiyantotik grup için ayrı ayrı incelendiği bir başka çalışma bulunamamıştır.

Asiyantotik grupta hiçbir hastada mitokondri morfoloji ve fonksiyon bozukluğu görülmemiş olması da çalışmamızın sonucunu güçlendirmektedir. Fakat konjenital kalp hastalıklarında miyokardiyal mitokondri fonksiyon bozukluğunu siyanotik hasta grubunda genelleyebilmek için araştırma örnekleminin daha geniş olduğu çalışmalara ihtiyaç vardır.

Gourdie ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada miyokardda fibroblastın ve fibrozisin önemi belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise buna ek olarak miyokard homeostazını sağlamada fibrozis ile mitokondriyal fonksiyonların ilişkisi araştırılmıştır. Yine tüm hastalarda sitolojik atipi nükleer büyüklük, nükleer kontur düzensizliği ve kromatin rengi parametreleri ile şu şekilde skorlanmıştır: skor 1, belirgin atipi yok; skor 2, hafif atipi; skor 3, orta şiddette atipi; skor 4, şiddetli atipi. Benzer şekilde, fibrozis de yaygınlığı ve şiddetine göre: skor 1, belirgin fibrozis yok; skor 2, hafif fibrozis; skor 3, orta şiddette fibrozis; skor 4, şiddetli fibrozis olacak şekilde skorlanmıştır.

Hem siyanotik hem asiyanotik grupta tüm biyopsi örneklerinin normal doku ve normal nükleer yapıdan ciddi fibrozis ve skor 4 nükleer atipiye kadar değişkenlik gösterdiği görülmüştür.

Ayrıca kardiyopulmoner baypas sonrası alınan örneklerin fibrozis skorlarının öncesinde alınan örneklere göre değişmediği tespit edilmiştir. Bu durum kardiyopulmoner baypas süresinin fibrotik değişiklik yaratmaya ya da varsa bile en azından ışık mikroskop düzeyinde gözlemlemeye yetmeyecek kadar kısa sürmesi ile açıklanmaktadır.

Fakat çalışmamızda fibrozis ile mitokondri fonksiyon bozukluğu ilişkisini incelemiş olmamızın sebebi mitokondri fonksiyon bozukluğunun miyositer hasarı tetikleme ihtimalini değerlendirmektir. Literatüre bakıldığında ise mitokondri fonksiyonlarının çocuk kalbinde siyanotik ve asiyanotik grup olarak ayrı ayrı incelendiği ve miyokardiyal mitokondri fonksiyonlarının açık kalp ameliyatı sonrası miyositer hasar yaratıp yaratmadığını araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Son incelediğimiz parametre ise Troponin-I, Miyogloblin ve CK-MB artış miktarıdır. Hastalardan hem preoperatif hazırlıklar sırasında hem de postoperatif 1. saat içinde Troponin-I, Miyogloblin ve CK-MB değeri görülmüş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Kardiyak enzimler kalpteki hasarı gösteren belirteçlerdir. Açık kalp ameliyatı sonrası kardiyak enzim miktarında artış görülmesi beklenmektedir. Bunun yanında uzun klemp ve CPB süresinin yaratacağı miyositer hasarı en aza indirmek ve miyokardı korumak için tüm açık kalp ameliyatlarında kardiyopleji solüsyonu kullanılmaktadır. Postoperatif dönemde siyanotik grupta görülen artış miktarı asiyanotik gruba kıyasla daha yüksektir. İstatistiksel analizde ise postoperatif Troponin-I, Miyogloblin ve CK-MB artış miktarı ile siyanotik kalp hastalıkları arasında anlamlı ilişki olduğu

görülmüştür. Tüm siyanotik hastalarda mitokondriyal disfonksiyon pozitif olması sebebiyle mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile Troponin-I, Miyogloblin ve CK-MB artış miktarı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.7.). Kardiyak enzimlerden özellikle Miyogloblin'in oksijen taşıyan bir protein olduğu düşünüldüğünde özellikle mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon bozukluğu olduğunda, normal fonksiyonu olan bir kalp kası hücresine göre kan değerinin görece fazla etkilenmiş olması gerektiğini düşünmekteyiz. Ancak bunu genelledebilmek için daha fazla sayıda hastanın olduğu ve teknik olarak daha spesifik ayrıntılı incelemelerin yapılabildiği çalışmalar gerekmektedir.

Mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon bozukluğu olan hastalardan alınan biyopside hem hafif hem orta fibrozis görülmüş olması aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını göstermektedir. Ayrıca mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olmayan diğer 5 hastada da orta ve şiddetli fibrozis görülmüş olması bu düşüncemizi destekleyen diğer bir sonuçtur. Bu durumu ise fibrozisin kronik bir süreç sonucunda meydana gelmesiyle açıklamaktayız. Herhangi bir fibrotik değişiklik başladı ise bu ışık mikroskopunda gözlemleye yetmeyecek düzeyde olabilmektedir. Bu sebeple daha ayrıntılı incelemelere ihtiyaç vardır.

Bu dört ana parametreye ek olarak her iki hasta grubunda CPB süresi ve aort klemp süresi, inotropik ajan kullanım ihtiyacı, yoğunbakım takip süresi ve hospitalizasyon süresi kaydedilmiş ve istatistiksel olarak ilişki olup olmadığına bakılmıştır. Tüm değerler siyanotik hasta grubunda asiyanotik hasta grubuna göre daha uzun çıkmıştır.

Ancak yalnızca yoğunbakım takip süresi ile siyanotik grup arasında istatistiksel anlamlı sonuç bulunmuştur. Diğer parametrelerin analizi ise sınırdaki değer vermiştir. Dolayısıyla diğer CPB, aort klemp süresi, inotropik ajan ihtiyacı ve hospitalizasyon süresinin siyanotik grup ile anlamlı ilişkisi olmamasının hasta sayısının azlığına bağlı olduğunu ve aynı çalışmanın daha geniş bir hasta grubunda yapıldığı takdirde anlamlı sonuç bulunacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Konjenital kalp hastalıkları siyanotik ve asiyanotik olarak iki gruba ayrılmaktadır. Siyanotik grubun asiyanotik kalp hastalıklarından farkı hipoksi varlığıdır. Hem siyanotik hem asiyanotik tüm konjenital kalp hastalıkları açık kalp ameliyatı sırasında kardiyopulmoner baypas ile tamir edilmektedir. İnsan kalp ve dolaşımının kapalı bir devre olduğu düşünülduğünde yapılan her cerrahi işlem kalp dokusu için bir travmadır. Bu sebeple insan vücudunda var olan savunma mekanizması inflamatuar süreç olarak harekete geçmektedir. Açık kalp ameliyatında kardiyopulmoner baypasın varlığı da bu savunma mekanizmasının aktivasyonunu artırmaktadır.

Kapalı devre olan dolaşım sisteminin dışarı açılması ile harekete geçen inflamatuar süreçler uzun vadede fibrozis ile sonuçlanmaktadır. Ancak kardiyopulmoner baypasın varlığı çocuk kalp dokusundaki fibrozis ve sitolojik atipi derecesini artırmamaktadır. Bu durum kardiyopulmoner baypas süresinin fibrotik değişiklik yaratmaya ya da varsa bile en azından ışık mikroskop düzeyinde gözlemlemeye yetmeyecek kadar kısa sürmesi ile açıklanmaktadır. Hipoksi, fibrozis için tetikleyici bir faktördür. Ancak çalışmamızda hipoksik olan siyanotik hasta grubunda fibrozis derecesinin asiyanotik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı farkı bulunamamıştır. Çalışmamızda fibrozis ile mitokondri fonksiyon bozukluğu ilişkisini incelemiş olmamızın sebebi mitokondri fonksiyon bozukluğunun miyositer hasarı tetikleme ihtimalini değerlendirmektir. Fibrotik hasarın siyanotik hasta grubunda daha ileri derecede olduğunu söyleyebilmek için daha çok sayıda hastanın çalışmaya dahil edildiği, teknik açıdan daha ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Mitokondri ise hayatın devamlılığı için gereken en temel organellerden biridir. Enerji üretim merkezi olması sebebiyle çalışma yükü fazla olan kalp gibi dokularda önemi daha da artmaktadır. Ancak çalışabilmesi için oksijene ihtiyaç vardır. Oksijenin olmadığı ortamda mitokondrinin tam anlamıyla fonksiyonel olması mümkün değildir.

Çalışmamızda siyanotik hasta grubunun hepsinde mitokondriyal disfonksiyonun var olduğu görülmüştür. Ayrıca siyanotik hasta grubundaki hipoksi varlığının mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun sebebi olduğu ya da var olan fonksiyon bozukluğunun şiddetini daha da artırabileceği düşünülebilir. Fakat bu grupta hipoksinin, mitokondriyal disfonksiyon şiddetini artırıp artırmadığını görmek için daha geniş hasta grubunda çalışma yapılmalıdır.

Mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon bozukluğunda genetik mutasyonların yeri bulunmaktadır. Konjenital kalp hastalıklarında mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon bozukluğu varlığının, var olan defekti siyanotik kalp hastalığı olarak sonuçlandırıp sonuçlandırmadığını görmek için ise fetal kalp dokusu ile embriyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Klinik olarak etkilenmiş dokulardaki mitokondri hasarını anlayabilmek için günümüzde standart bir teknik olarak COX/SDH ikili histokimyasal boyaması ile sırasıyla kompleks IV ve II aktivitelerine bakılmaktadır (95). Bu boyama tekniği, çok farklı mitokondriyal hastalık gruplarında organel hasarını kolaylıkla tespit edebilse de, oksidatif fosforilasyon yolağının her aşamasındaki hataları tespit edememektedir. Mitokondri hasarının başlangıç aşamasındaki ya da farklı bir solunum kompleksinin hasarlı olduğu dokularda pozitif boyama verebilmektedir (96-98). Bu nedenle, tez çalışmasındaki hastalık gruplarında

morfolojik olarak gösterilen mitokondri hasarını işlevsel olarak analiz etmeye yönelik daha detaylı ve kantitatif teknolojilere ihtiyaç vardır.

Kardiyak belirteçler ise kalp fonksiyonunu değerlendirmede kullanılan önemli bir yöntemdir. Her cerrahi müdahalenin bir travma olduğu varsayıldığında postoperatif dönemde kardiyak belirteç değerlerinde yükselme görülmesi beklenmektedir. Ancak çalışmamızda postoperatif Troponin-I, Miyogloblin ve CK-MB degerlerinin preoperatif değerlere göre artış miktarı mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olan siyanotik hasta grubunda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olmayan asiyanotik gruba göre daha yüksek çıkmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Özellikle miyogloblinin çizgili kas ve kalp kasında oksijen molekülünü taşımakla görevli 17. kDa monomerik bir protein molekül olduğu düşünüldüğünde mitokondri fonksiyon bozukluğu olan hastalarda daha yüksek değerde çıkması anlamlıdır (63). Ancak bunu tüm siyanotik hasta grubuna genelleymek için yine daha fazla hastada çalışma yapılması gerekmektedir. Ayrıca daha doğru değerlendirme yapabilmek için tüm kardiyak enzim referans aralıklarının çocuk hastalara göre ayrıca titrasyonu gerekmektedir.

Kaydettiğimiz kardiyopulmoner baypas süresi, aort klemp süresinin siyanotik hasta grubunda daha uzun olduğu görülmüştür. Bu durumu ise siyanotik konjenital kalp hastalıklarının kompleks olması sebebiyle cerrahi tamirinin daha uzun sürmesine bağlamaktayız. Fakat uzun klemp ve CPB süresinin miyositer hasara sebep olmaması için tüm açık kalp ameliyatlarında miyokardi korumak amacıyla kardiyopleji solüsyonu kullanılmaktadır. Çalışmamızda istatistiksel anlamlı ilişki bulamamış olmayı p değerinin sınırdaki çıkmış olması sebebiyle hasta sayısının azlığına bağlı olduğuna bağlamaktayız.

Son olarak, yoğunbakımda takip ve hospitalizasyon süresinin siyanotik grupta daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum yine siyanotik konjenital kalp hastalıklarının kompleks hastalıklar olmasına bağlanmaktadır. Yoğunbakım takip süresi ise siyanotik hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Siyanotik gruptaki tüm hastalarımızda mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon bozukluğu tespit etmiş olmamız sebebi ile bu istatistiksel anlamlı ilişkiyi mitokondri fonksiyon bozukluğu ile ilişkilendirmek mümkündür.

Ayrıca, inotropik ajan kullanım ihtiyacının siyanotik hasta grubunda hem daha fazla hastada olduğu ve inotropik destek kullanım süresinin daha uzun olduğu görülmüştür.

Mitokondriyal morfoloji ve fonksiyon bozukluğunun varlığı, kardiyak fonksiyonu etkileyeceği için inotropik ajan ihtiyacını da arttırabilmektedir. Hem mitokondriyal disfonksiyona bağlı yeterli enerjinin üretileniyor olması hem de hipoksinin bu durumu daha da arttırması siyanotik hasta grubunun kardiyak rezervinin postoperatif dönemde yeterince etkin olmamasına yol açmakta ve uzun süreli inotropik ajan ihtiyacı olmasına ve uzamış yoğunbakım ve hospitalizasyon süresine sebep olmaktadır.

SONUÇ

Projemiz için incelediğimiz dokunun kalp dokusu olması, nadir çalışılan doku kapsamında olması ve çocuk hasta grubuna ait olması sebebiyle toplam 10 hasta ile araştırmamız sonlandırılmıştır. Ancak çalışmamızın “var-yok” araştırması olması ve ilk defa yapılıyor olması sebebiyle örneklem büyüklüğü 11 Aralık 2018 tarihli Etik Kurul onayı alınarak yeterli görülmüştür.

Siyanotik konjenital kalp hastalığı olan grupta bulduğumuz miyokardiyal mitokondri morfoloji ve fonksiyon bozukluğu mitokondriyal transplantasyon gibi inovatif (7, 8) çalışmaların rutin olarak kullanılabileceğı bir hasta grubu yaratmaktadır. Transplante edilecek olan mitokondri aynı mitokondriyal DNA'ya sahip olacağı için bu bir dezavantajdır. Fakat her bir mitokondrinin hasar yüzdesi birbirinden farklıdır ve mitokondriyal enerji üretim kapasitesi değışkenlik göstermektedir. Bu sebeple, lokal mitokondri miktarının artırılmış olması akut dönemde üretilen ATP miktarını artırmakta ve dolaylı şekilde kalbin sistolik fonksiyonunu artırmaktadır. Bu, özellikle siyanotik konjenital kalp hastalığı olan tüm kalp hastası çocuklar için kardiyak rezervin artırılmasıyla mortalite ve komplikasyon yüzdesini düşürebilecek alternatif bir cerrahi yaklaşım olarak geliştirilebilir.

Mitokondriyal fonksiyonların postoperatif dönemde değıerlendirilmesi için ise postoperatif kardiyak enzim değıerlerinin özellikle çocuk hasta grubu referans aralığıyla titre edilip değıerlendirildiğinde biyomarker olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda yürüttüğümüz "Açık Kalp Ameliyatı Yapılan Konjenital Kalp Hastalığı Olan Çocuk Hastalarda Miyokardiyal Mitokondri Fonksiyonlarının Histopatolojik ve Enzimatik Değişikliklerle Olan İlişkisi" başlıklı prospektif araştırmamız Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde çocuk kalbinde mitokondriyal morfoloji ve fonksiyonların miyositer hasarının ve enzimatik sonuçlarının incelendiği ilk ve tek çalışmadır.

7. KAYNAKLAR

1. Meletis J, Konstantopoulos K. The Beliefs, Myths, and Reality Surrounding the Word Hema (Blood) from Homer to the Present. *Anemia*. vol 2010; article ID 857657; 6 pages; 2010.
2. C. AW. Discovery of the cardiovascular system: from Galen to William Harvey. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(s1):118-29.
3. Castaneda A. Congenital Heart Disease: A Surgical-historical Perspective. *Ann Thorac Surg*. 2005;79(6):S2217-20.
4. Wells F. The Heart of Leonardo: Foreword by HRH Prince Charles, The Prince of Wales: Springer London; 2014.
5. Aris A. Francisco Romero, the First Heart Surgeon. *Ann Thorac Surg*. 1997;64(3):870-1.
6. Gross RE, Hubbard JP. Landmark article Feb 25, 1939: Surgical ligation of a patent ductus arteriosus. Report of first successful case. By Robert E. Gross and John P. Hubbard. *JAMA*. 1984;251(9):1201-2.
7. Emani SM, Piekarski BL, Harrild D, Del Nido PJ, McCully JD. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovas Surg*. 2017;154(1):286-9.
8. Emani SM, McCully JD. Mitochondrial transplantation: applications for pediatric patients with congenital heart disease. *Transl Pediatr*. 2018;7(2):169-75.
9. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell*, Sixth Edition. New York; Taylor and Francis Group; 2015:1-1342.

10. Hall JE. Pocket Companion to Guyton & Hall Textbook of Medical Physiology E-Book: Thirteenthth edition; Philadelphia;Elsevier Health Sciences; 2016. Chapter 2:The Cell and Its Functions;p.11-19.
11. Zarsky V. Jan Evangelista Purkyne/Purkinje (1787-1869) and the establishment of cellular physiology--Wroclaw/Breslau as a central European cradle for a new science. *Protoplasma*. 2012;249(4):1173-9.
12. Mazurak M, Kusa J. Jan Evangelista Purkinje: A Passion for Discovery. *Tex Heart Inst J*. 2018;45(1):23-6.
13. Nicolson GL. The Fluid–Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after mire than 40years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2014;1838(6):1451-66.
14. Shepherd VA. The Cytomatrix as a Cooperative System of Macromolecular and Water Networks. *Current Topics in Developmental Biology*. 75: Academic Press; 2006. p. 171-223.
15. Hardin J, Bertoni G, Kleinsmith LJ. *Becker's World of the Cell*: Eighth edition; Boston;Benjamin Cummings Boston; 2012.
16. Karp G. Cell and molecular biology: concepts and experiments :Fifth edition;Chicester;John Wiley & Sons; 2009.
17. Manion M. McGraw-Hill encyclopedia of science and technology. Eleventh edition; New York; McGraw-Hill; 2012.
18. Mindell JA. Lysosomal acidification mechanisms. *Annual review of physiology*. 2012;74:69-86.
19. Lüllmann-Rauch R. History and morphology of the lysosome. *Lysosomes*: New York;Springer; 2005. p.1-16.
20. Xu H, Ren D. Lysosomal physiology. *Annual review of physiology*. 2015;77:57-80.

21. Brum G, McKane L. *Biology: exploring life*. Second edition; New York; 1994.
22. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol.* 1981;91(3):227s-55s.
23. Margulis L. Symbiosis and evolution. *Scientific American.* 1971;225(2):48-61.
24. Harold F. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriological Reviews.* 1972;36(2):172.
25. Martin WF, Garg S, Zimorski V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Phil Trans R Soc B.* 2015;370(1678):20140330.
26. Lodish HF, . *Molecular cell biology*; Seventh edition; New York; Macmillan; 2013.
27. Wiemerslage L, Lee D. Quantification of mitochondrial morphology in neurites of dopaminergic neurons using multiple parameters. *Journal of neuroscience methods.* 2016;262:56-65.
28. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology.* 2006;16(14):R551-R60.
29. Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, et al. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nature biotechnology.* 2003;21(3):281.
30. Rappaport L, Oliviero P, Samuel J. Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function. *Bioenergetics of the Cell: Quantitative Aspects: Developments in Molecular and Cellular Biochemistry*, vol 25. Boston; Springer; 1998. p. 101-5.
31. Tang HL, Lung HL, Wu KC, Le A-HP, Tang HM, Fung MC. Vimentin supports mitochondrial morphology and organization. *Biochemical journal.* 2008;410(1):141-6.

32. Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level: Fourth edition; New York; Wiley; 2013.
33. Rich P. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society Transactions*. 2003;31(6):1095-1105.
34. Nath S, Villadsen J. Oxidative phosphorylation revisited. *Biotechnology and bioengineering*. 2015;112(3):429-37.
35. Anderson TJC, Komuniecki R, Komuniecki PR, Jaenike J. Are mitochondria inherited paternally in *Ascaris*? *International Journal for Parasitology*. 1995;25(8):1001-4.
36. DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Annals of medicine*. 2005;37(3):222-32.
37. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders—past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2004;1659(2-3):115-20.
38. Blau N, Duran M, Gibson KM, Dionisi-Vici C, Blaskovics ME. *Physician's guide to the diagnosis, treatment, and follow-up of inherited metabolic diseases*: Springer; 2014.
39. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*; 2004;350(7):664-71.
40. Yapfite-Lee J, Weintraub R, Jansen K, Chow CW, Thorburn DR, Boneh A. Cardiac Manifestations in Oxidative Phosphorylation Disorders of Childhood. *J Peds*.2007;150(4):407-11.
41. Callaway E. Three-person embryos may fail to vanquish mutant mitochondria. *Nature News*. 2016;533(7604):445.

42. Callaway E. World hails embryo vote: UK move to allow pioneering fertility technique could spur other countries to relax rules too. *Nature*. 2015;518(7538):145-7.
43. Cargnoni A, Ceconi C, Stavroula G, Ferrari R. Heart rate reduction by pharmacological If current inhibition. *Advances in cardiology*. 2006;43:31-44.
44. Lemieux H, Hoppel CL. Mitochondria in the human heart. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2009;41(2):99-106.
45. Taylor GP. Neonatal mitochondrial cardiomyopathy. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*. 2004;7(6):620-4.
46. Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR, et al. Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nature reviews Cardiology*. 2017;14(4):238-50.
47. Thomas RL, Gustafsson AB. Mitochondrial autophagy--an essential quality control mechanism for myocardial homeostasis. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*. 2013;77(10):2449-54.
48. Dhingra R, Kirshenbaum LA. Regulation of mitochondrial dynamics and cell fate. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*. 2014;78(4):803-10.
49. Shirihai OS, Song M, Dorn GW, 2nd. How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. *Circulation research*. 2015;116(11):1835-49.
50. Gottlieb RA, Bernstein D. Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming. *Cell calcium*. 2016;60(2):88-101.
51. Lesnefsky EJ, Chen Q, Hoppel CL. Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circulation research*. 2016;118(10):1593-611.

52. Suliman HB, Piantadosi CA. Mitochondrial Quality Control as a Therapeutic Target. *Pharmacological reviews*. 2016;68(1):20-48.
53. Törnroth-Horsefield S, Neutze R. Opening and closing the metabolite gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;pnas. 0810654106.
54. Aubert G, Vega RB, Kelly DP. Perturbations in the gene regulatory pathways controlling mitochondrial energy production in the failing heart. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(4):840-7.
55. Lemieux H, Semsroth S, Antretter H, Hofer D, Gnaiger E. Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2011;43(12):1729-38.
56. Acin-Perez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernandez-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Perez-Martos A, Bruno C, et al. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Molecular cell*. 2004;13(6):805-15.
57. Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular cell*. 2008;32(4):529-39.
58. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acin-Perez R, Latorre-Pellicer A, Colas C, Balsa E, et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science (New York, NY)*. 2013;340(6140):1567-70.
59. Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G, Genova ML. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of

reactive oxygen species from complex I. Antioxidants & redox signaling.

2013;19(13):1469-80.

60. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Reckelhoff JF. Excitable Tissue: Muscle. Ganong's Medical Physiology Examination. Twentyfifth edition; New York, NY: McGraw-Hill Education; 2015.

61. Sellke F, Nido PJ, Swanson SJ. Sabiston and Spencer Surgery of the Chest E-Book: Ninth Edition; Philadelphia; Elsevier Health Sciences; 2016.

62. Bartos DC, Grandi E, Ripplinger CMJCP. Ion channels in the heart. 2011;5(3):1423-64.

63. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book: Sixth edition; St. Louis, Missouri; Elsevier Health Sciences; 2012.

64. Kanga C, Krishnamurthy S, Shiva S. Myoglobin and mitochondria: A relationship bound by oxygen and nitric oxide. Nitric Oxide. 2012;26(4):251-8.

65. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. Cellular and Molecular Life Sciences. 2014;71(4):549-74.

66. Gourdie RG, Dimmeler S, Kohl P. Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease. Nature Reviews Drug Discovery. 2016;15:620.

67. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. Pharmacology & Therapeutics. 2009;123(2):255-78.

68. Goshima K, Tonomura Y. Synchronized beating of embryonic mouse myocardial cells mediated by FL cells in monolayer culture. Experimental Cell Research. 1969;56(2):387-92.

69. Vasquez C, Morley GE. The Origin and Arrhythmogenic Potential of Fibroblasts in Cardiac Disease. J Cardiovasc Transl Res. 2012;5(6):760-7.

70. Griffin M, Lee H-W, Zhao L, Eghblai-Webb M. Gender-related differences in proliferative response of cardiac fibroblasts to hypoxia. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2000;215(1):21-30.
71. Zhao X, Eghbali-Webb M. Gender-related differences in basal and hypoxia-induced activation of signal transduction pathways controlling cell cycle progression and apoptosis, in cardiac fibroblasts. *Endocrine*. 2002;18(2):137-45.
72. Clancy RM, Zheng P, O'Mahony M, Izmirly P, Zavadil J, Gardner L, et al. Role of hypoxia and cAMP in the transdifferentiation of human fetal cardiac fibroblasts: Implications for progression to scarring in autoimmune-associated congenital heart block. *Arthritis & Rheumatism*. 2007;56(12):4120-31.
73. Shivakumar K, Sollott SJ, Sangeetha M, Sapna S, Ziman B, Wang S, et al. Paracrine effects of hypoxic fibroblast-derived factors on the MPT-ROS threshold and viability of adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2008;294(6):H2653-H8.
74. Koenig MK. Presentation and Diagnosis of Mitochondrial Disorders in Children. *Pediatr Neurol*. 2008;38(5):305-13.
75. Meyers DE, Basha HI, Koenig MK. Mitochondrial cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and management. *Tex Heart Inst J*. 2013;40(4):385-94.
76. Darin N, Oldfors A, Moslemi AR, Holme E, Tulinius M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Ann Neurol*. 2001;49(3):377-83.

77. Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain*. 2003;126(8):1905-12.
78. Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010;5(1):297-348
79. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*. 2013;13(2):71-82.
80. Wallace DC. Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annual Review of Biochemistry*. 2007;76(1):781-821.
81. Wai T, Teoli D, Shoubridge EA. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature Genetics*. 2008;40:1484.
82. Mitochondrial diseases and the heart: an overview of molecular basis, diagnosis, treatment and clinical course. *Future Cardiology*. 2012;8(1):71-88.
83. Freyer C, Cree LM, Mourier A, Stewart JB, Koolmeister C, Milenkovic D, et al. Variation in germline mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission. *Nature Genetics*. 2012;44:1282.
84. Chang-Hung H, Haeyoung K, Cherng-Lih P, Ren-Kui B, Pu D, C. WL-J. Hearing Loss in Mitochondrial Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1042(1):36-47.
85. Sacconi S, Salviati L, Nishigaki Y, Walker WF, Hernandez-Rosa E, Trevisson E, et al. A functionally dominant mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet*; 2008;17(12):1814-20.

86. DiMauro S, Hirano M. Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromuscular Disorders*. 2005;15(4):276-86.
87. Holmgren D, Wåhlander H, Eriksson BO, Oldfors A, Holme E, Tulinius M. Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease Clinical course and cardiological findings. *Eur Heart J*; 2003;24(3):280-8.
88. Debray F-G, Lambert M, Chevalier I, Robitaille Y, Decarie J-C, Shoubridge EA, et al. Long-term Outcome and Clinical Spectrum of 73 Pediatric Patients With Mitochondrial Diseases. *Pediatrics*. 2007;119(4):722-33.
89. Jenni R, Oechslin E, Schneider J, Jost CA, Kaufmann PA. Echocardiographic and pathoanatomical characteristics of isolated left ventricular non-compaction: a step towards classification as a distinct cardiomyopathy. *Heart*. 2001;86(6):666-71.
90. Stöllberger C, Finsterer J, Blazek G. Left ventricular hypertrabeculation/noncompaction and association with additional cardiac abnormalities and neuromuscular disorders. *Am J of Cardiol*. 2002;90(8): 899-902.
91. Jenni R, Oechslin EN, van der Loo B. Isolated ventricular non-compaction of the myocardium in adults. *Heart*. 2007;93(1):11-5.
92. Anan R, Nakagawa M, Miyata M, Higuchi I, Nakao S, Suehara M, et al. Cardiac Involvement in Mitochondrial Diseases. A Study on 17 Patients With Documented Mitochondrial DNA Defects. 1995;91(4):955-61.
93. Seligman AM, Karnovsky MJ, Wasserkrug HL, Hanker JSJTJocb. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J Cell Biol*; 1968;38(1):1-14

94. Blanco C, Sieck G, Edgerton VJTHj. Quantitative histochemical determination of succinic dehydrogenase activity in skeletal muscle fibres. *Histochem J*;1988;20(4):230-43.
95. Old SL, Johnson MAJTHj. Methods of microphotometric assay of succinate dehydrogenase and cytochrome c oxidase activities for use on human skeletal muscle. *Histochem J*;1989;21(9-10):545-55.
96. Choudhury KR, Yagle KJ, Swanson PE, Krohn KA, Rajendran JGJJoH, Cytochemistry. A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images. *Journal of Histochemistry*; 2010;58(2):95-107.
97. Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, et al. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagnostic Pathology*; 2012;7(1):42.
98. Rocha MC, Grady JP, Grünewald A, Vincent A, Dobson PF, Taylor RW, et al. A novel immunofluorescent assay to investigate oxidative phosphorylation deficiency in mitochondrial myopathy: understanding mechanisms and improving diagnosis. *Scientific Reports*; 2015;5:15037.



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -1314

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 27 EYLÜL 2017 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2017/21
Proje No : GO 17/651 (Değerlendirme Tarihi: 26.07.2017)
Karar No : GO 17/651- 31

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Metin DEMİRCİN' in sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Sevgen Çelik ÖNDER, Doç. Dr. Burcu HAYTA, Doç. Dr. Banu Balcı PEYNİRCİOĞLU ile birlikte çalışacakları ve Arş. Gör. Dr. Zeynep UÇAR' ın uzmanlık tezi olan, GO 17/651 kayıt numaralı, "**Açık Kalp Ameliyatı Yapılan Siyanotik ve Asiyantik Konjenital Kalp Hastalığı Olan Çocuk Hastalarda Kardiyopulmoner Bypass Sonrasında Miyokarda Görülen Histopatolojik ve Enzimatik Değişiklikler ve Bu Değişikliklerin Mitokondriyal Fonksiyonlar İle İlişkisi**" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan) | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye) | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARI (Üye) | İZİNLİ |
| 4. Prof. Dr. Neccet SAĞLAM (Üye) | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye) | İZİNLİ |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye) | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye) | 14. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye) |
| İZİNLİ | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye) | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye) |
| İZİNLİ | İZİNLİ |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye) | 17. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN (Üye) |
| | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye) |



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-2185

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 11 ARALIK 2018 SALI
Toplantı No : 2018/29
Proje No : GO 17/651(Onay Tarihi: 27.09.2017)
Karar No : GO 17/651-01

Kurulumuzun 27.09.2017 tarihli toplantısında GO 17/651 kayıt numarası ile onaylanmış olan Üniversitemiz Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Metin DEMİRCİN' in sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Sevgen Çelik ÖNDER, Doç. Dr. Burcu HAYTA, Doç. Dr. Banu Balcı PEYNİRCİOĞLU ile birlikte çalışacakları ve Arş. Gör. Dr. Zeynep UÇAR' ın uzmanlık tezi olan, GO 17/651 kayıt numaralı, “*Açık Kalp Ameliyatı Yapılan Siyanotik ve Asiyantotik Konjenital Kalp Hastalığı Olan Çocuk Hastalarda Kardiyopulmoner Bypass Sonrasında Miyokardda Görülen Histopatolojik ve Enzimatik Değişiklikler ve Bu Değişikliklerin Mitokondriyal Fonksiyonlar İle İlişkisi*” başlıklı proje başlıklı proje için vermiş olduğunuz 28.11.2018 tarihli dilekçeniz Kurulumuzun 11.12.2018 tarihli toplantısında görüşülmüş, başlık değişikliği ve histopatolojik değerlendirmeye alınacak hasta örneklem sayısının azaltılması **uygun bulunmuştur**. Çalışmanın başlığı “*Açık Kalp Ameliyatı Yapılan Konjenital Kalp Hastalığı Olan Çocuk Hastalarda Miyokardiyal Mitokondri Fonksiyonlarının Histopatolojik ve Enzimatik Değişikliklerle Olan İlişkisi*” olarak değiştirilmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

- | | | | |
|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|-------|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU | (Başkan) | 10 Doç. Dr. Gözde GİRGİN | (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU | (Üye) | 11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR | (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA | (Üye) | 12. Doç. Dr. Can Ebru KURT | (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM | (Üye) | 13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL | (Üye) |
| İZİNLİ | | İZİNLİ | |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU | (Üye) | 14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ | (Üye) |
| İZİNLİ | | | |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL | (Üye) | 15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR | (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN | (Üye) | 16. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN | (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL | (Üye) | 17. Av. Meltem ONURLU | (Üye) |
| 9. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU | (Üye) | | |

