Türk Farmakoloji Derneği
XXV. Eğitim Sempozyumu

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı işbirliğiyle

SİSTEMİK HASTALIKLARIN DENEYSEL MODELLERİ

17 Nisan 2025
Margi Hotel, EDİRNE

Türk Farmakoloji Derneği Yönetim Kurulu

Prof. Dr. Alper B. İSKİT
Prof. Dr. Bilgen BAŞGUT
Doç. Dr. Gökçen TELLİ
Doç. Dr. Gökçe Sevim ÖZTÜRK FİNCAN
Prof. Dr. Alper OKYAR
Prof. Dr. Bilgin KAYGISIZ
Doç. Dr. R. Nalan TİFTİK

PROGRAM		
09.15-09.45	**Açılış**	
09.45-10.30	Deneysel Hipertansiyon Modelleri	**Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
10.30-10.45	**Soru/Katkı**	
10.45-11.00	**Kahve Arası**	
11.00-11.45	Oksijen Hasarının Deneysel Modelleri	**Prof. Dr. Mehmet CANSEV** Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
11.45-12.00	**Soru/Katkı**	
12.00-13.30	**Öğle Yemeği**	
13.30-14.15	Kardiyak Hücrelerde Deneysel Modeller	**Prof. Dr. H. Burak KANDİLCİ** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı
14.15-14.30	**Soru/Katkı**	
14.30-14.45	**Kahve Arası**	
14.45-15.30	*In vitro* Hipoksi Deneylerinde Pratik Yaklaşımlar	**Prof. Dr. Emel BALOĞLU** İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
15.30-15.45	**Soru/Katkı**	
15.45-16.30	Deney Hayvanında Biyolojik Ritim Araştırmaları: “Sancar lab” ile olan son bulgularımız	**Prof. Dr. Alper OKYAR** İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
16.30-16.45	**Soru/Katkı**	
16.45-17.00	**Kapanış**	

İÇİNDEKİLER

Program

Deneysel Hipertansiyon Modelleri

Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ.....1

Oksijen Hasarının Deneysel Modelleri

Prof. Dr. Mehmet CANSEV.....7

Kardiyak Hücrelerde Deneysel Modeller

Prof. Dr. H. Burak KANDİLCİ..... 17

In Vitro Hipoksi Deneylerinde Pratik Yaklaşımlar

Prof. Dr. Emel BALOĞLU.....26

Deney Hayvaninda Biyolojik Ritim Araştirmalari:

“Sancar Lab” İle Olan Son Bulgularimiz

Prof. Dr. Alper OKYAR..... 31

Gezi Rehberi:

İkinci Bayezid Külliyesi, Sağlık Müzesi ve Lozan Anıtı-EDİRNE 37

Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ

Doç. Dr. Ruhan TOPUZ

DENEYSEL HİPERTANSİYON MODELLERİ

Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Kardiyovasküler hastalıklar yeryüzündeki ölüm nedenlerinin yaklaşık %50'sini oluşturmakta ve en ön sırada yer almaktadır. Hipertansiyon en yaygın kronik hastalık olmasının yanında, en sık görülen kardiyovasküler hastalıktır ve diğer kardiyovasküler hastalıklar için de en önemli risk faktörüdür.

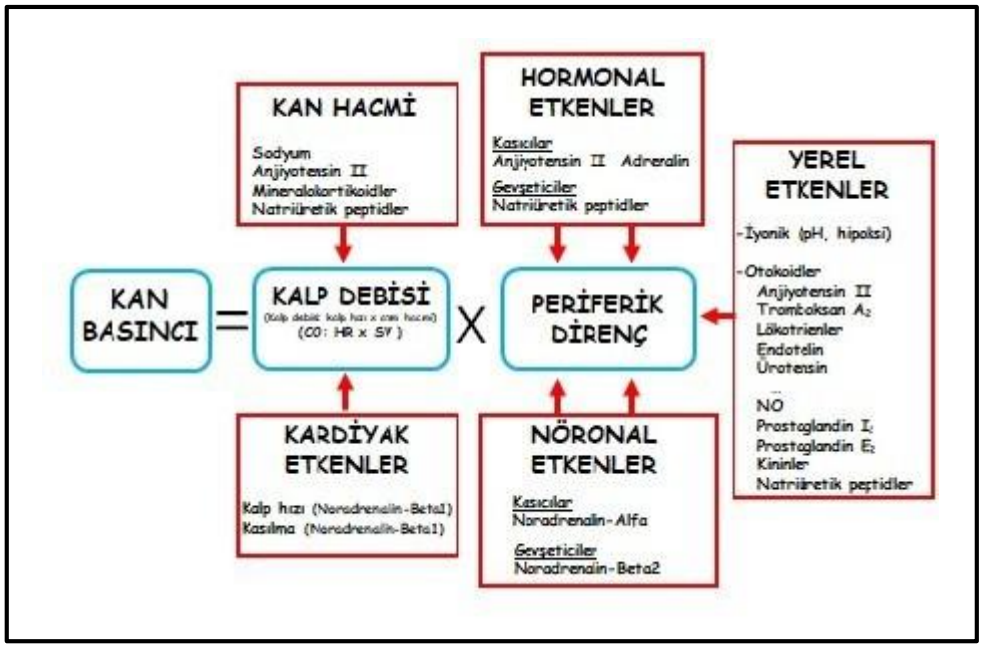
Hipertansiyon günümüzde ardışık ölçümlerde kan basıncının yüksek bulunması olarak tanımlanmaktadır. Ancak bu "yüksek basınç düzeyi", Avrupa Birliği ülkelerinde sistolik 140 diyastolik 90 mmHg'nın üstü kabul edilirken, Amerika Birleşik Devletleri'nde sistolik 130 diyastolik 80 mmHg'nın üstü, hipertansif sayılmaktadır.

Toplumda yaşla sıklığı artan hipertansiyonun farklı yaş gruplarında sıklığı değişmektedir. Türkiye'de toplam nüfusun yaklaşık % 20'si, 45-54 yaş aralığının yaklaşık %40'ı ve 55-64 yaşlarının yaklaşık % 50'si hipertansiftir. Dünyada ise bu oranlar benzerdir ve 70 yaş üstünde oran yaklaşık % 75'e çıkmaktadır.

Hipertansiyon nedeni tam olarak bilmediğimiz "primer hipertansiyon" (esansiyel hipertansiyon) ve nedenini bildiğimiz "sekonder hipertansiyon" olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Tüm vakaların yaklaşık % 95'ini oluştururan esansiyel hipertansiyonda hem genetik hem de çevresel etkenler (tuz tüketimi, şişmanlık, stres, …) rol almakla birlikte, epigenetik düzenlemelerin de önemli olduğu ortaya konmuştur. Sekonder hipertansiyondan ise, renal parankima hastalıkları, renovasaküler hastalıklar, endokrin bozukluklar (Feokromositoma, Cushing Sendromu, Hiperaldosteronizm, Hipertiroidizm,…), aşırı alkol, ilaçlar (oral kontraseptif,…), bazı gıdalar (meyan, enerji içecekleri,…) sorumlu tutulmakta ve bu tip hipertansiyon yaklaşık % 5 sıklıkla görülmektedir.

Çoğu kez yıllar içinde asemptomatik seyreden hipertansiyon birçok komplikasyona neden olarak (inme, iskemik kalp hastalıkları, kalp yetersizliği, anevrizma, damar diseksiyonu, böbrek yetersizliği, retina hastalıkları, hamilelikte bebek ve anne ölümü,…); kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır.

Kan basıncını düzenleyen birçok mekanizma ortaya konmuştur (Şekil 1). Hipertansiyonda kardiyovasküler sistemde yapısal ve işlevsel değişiklikler meydana gelmektedir. Damarlardaki bu vasküler patolojileri giderek artan "endotel işlev bozukluğu"nun tetiklediği, damar duvarındaki kronik inflamasyonun neden olduğu düşünülmektedir. Zaman içinde küçük musküler arter ve arteriyollerde media hipertrofisi ve subintimal fibrozis görülürken; orta ve büyük arterlerde aterosklerotik plaklar oluşabilmektedir. Kalpte ise sol ventrikül hipertrofisi karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 1.

Hastalığın etyopatogenezi günümüzde tam olarak aydınlatılamadığı ve buna yönelik ilaçlar geliştirilemediği için; esansiyel (primer) hipertansiyon tedavisinde temel olarak kan basıncını düşürmeye yönelik semptomatik vazodilatör ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak kullanılan ilaçlarla kan basıncı çoğu hastada istenilen düzeyde sürdürülememektedir (vakaların yaklaşık %10-15'i tedaviye dirençli hipertansiyondur). Daha da ötesi, etyopatogenez tam olarak bilinmediği ve ortadan kaldırılamadığı için, tedavi yaşam boyu sürmektedir. Oysaki patolojiyi ortadan kaldırmak için, etyopatogenezin ortaya konması ve bunu düzeltmeye yönelik ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir.

Antihipertansif ilaçlar, preklinik araştırmalarda hipertansiyon geliştirilmiş hayvan modellerinde denenerek geliştirilmektedir. Bu nedenle, günümüzde deney hayvanlarında hipertansiyon modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hipertansiyon modeli olarak kullanılmak üzere, birçok hayvan modeli geliştirilmiştir. Bu konuda ilk çalışma 1934 yılında Goldblatt tarafından köpekte yapılmıştır. Daha sonra domuz, koyun, kedi, tavşan, sıçanda da deneysel hipertansiyon modelleri oluşturulmuştur.

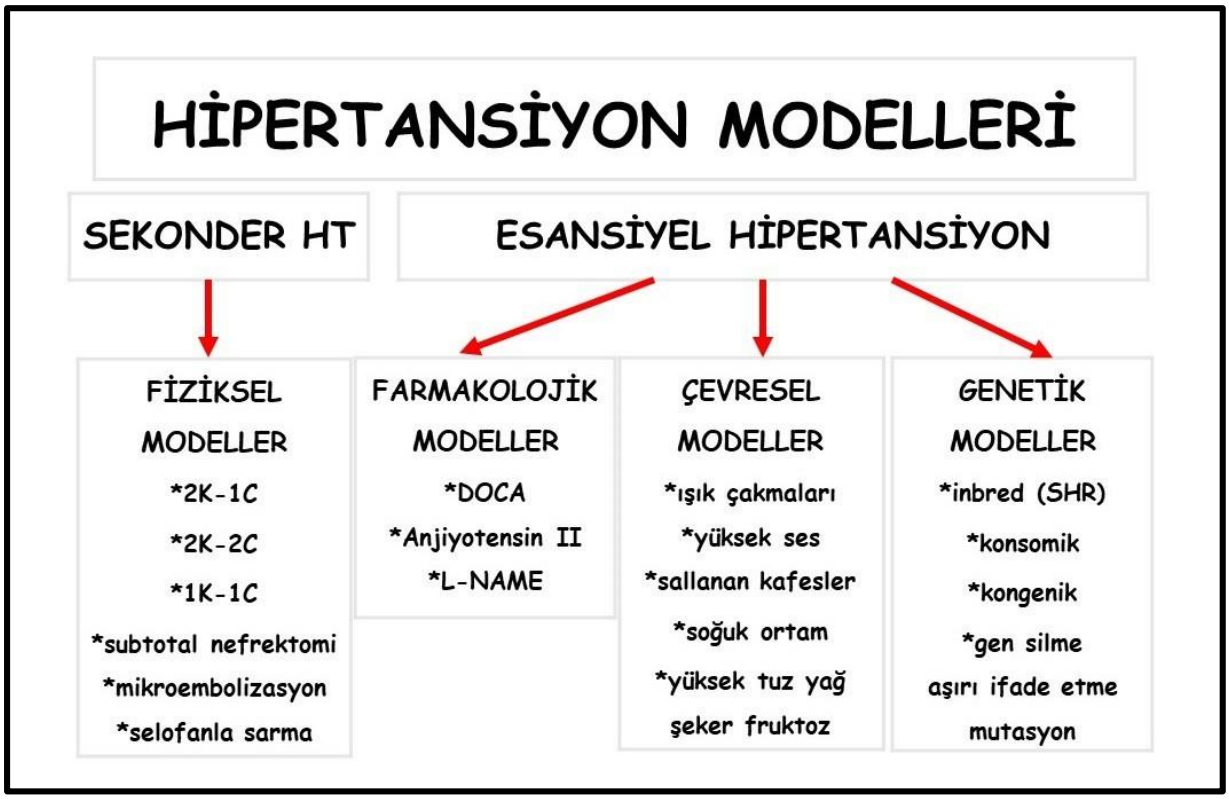
Aslında büyük hayvanlar, küçük hayvanlara göre insanlara daha yakın anatomik, fizyolojik ve hemodinamik özelliklere sahiptir. Bu nedenle kardiyovasküler işlevlerin incelenmesi için daha uygundur. Ancak, çiftlik hayvanlarının bakımı/üretimi/kullanımı zordur ve maliyeti yüksektir. Evcil hayvanlar aynı sorunlara sahip olmalarının yanında, kurulan duygusal yakınlık da deneysel araştırmalarda kullanımlarını engellemektedir.

Günümüzde farklı türler arasında, hipertansiyon modelleri en çok tercih edilen ve en sık kullanılan sıçan hipertansiyon modelleridir. Hipertansiyon modellerinde sıçanların kullanılmasının birçok nedeni bulunmaktadır. Başta sıçan genomu tamamen haritalanmıştır ve insanla %99 dizi homolojisi göstermektedir. Ek olarak, sıçanlarda ve insanlarda hipertansiyon gelişimi sırasında; arteriyel basıncın yükselmesi, çevresel sıkıntıların kan basıncına etkisi, hemodinamik parametreler, kalp ve damar işlevlerini düzenleyen mekanizmalar, kardiyovasküler sistemin otonom nöronal düzenlemesi, renovasküler işlevler, "renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi" (RAAS) ve Nitrik oksit (NO) metabolizması; çok fazla benzerlikler göstermektedir. Ayrıca sıçanlar maliyetlerinin düşük olması, yaygın/kolay bulunmaları ve bakımı/üretim/kullanım kolaylıkları yönünden avantajlıdır.

Öte yandan hipertansiyon modellerinin sınırlılıkları da tanımlanmıştır. Hayvanlar aynı genotipe sahip olsalar bile, hipertansiyona çok sayıda genin katkıda bulunması ve

çevresel etkenlerin epigenetik düzenlemelerle fenotipi değiştirmeleri nedeniyle; tüm hayvanlarda aynı fenotip ortaya çıkmayabilmektedir. Ayrıca gen mutasyonları ve silinmeleriyle oluşan hipertansiyon fenotipinin, insandaki fenotiple aynı olmaması da başka bir sınırlılıktır.

Hipertansiyon modelleri primer ve sekonder hipertansiyonu taklit eden, fiziksel, farmakolojik, çevresel ya da genetik modeller olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2

Sekonder hipertansiyonda genel olarak **fiziksel** modeller kullanılmaktadır. Bu tür hipertansiyon çoğunlukla renal arter darlığı sonucu ortaya çıktığı için, duruma benzer olarak, deney hayvanlarının renal arterleri sıkıştırılarak oluşturulmaktadır. RAAS aktivasyonu sonucu kan renin düzeylerinin yükseldiği bu modelde, anjiyotensin-II oluşumuna bağlı vasküler kasılma, su-tuz tutulumu, sempatik tonus artışı ile kan basıncı yükselmektedir. Bu amaçla renovasküler hipertansiyonu taklit eden “2 böbrek-1 sıkıştırma (clip)” (2K-1C), “2 böbrek-2 sıkıştırma (clip)” (2K-2C), “1 böbrek-1 sıkıştırma (clip)” (1K-1C) modelleri geliştirilmiştir. 2K-1C modelinde hayvanların iki böreğinden birinin arteri sıkıştırılırken, 2K-2C modelinde her iki renal arter de daraltılmaktadır. 1K-1C modelinde ise, bir böbrek nefrektomiyle alınıp, diğer böbreğin arteri sıkıştırılmaktadır. Sekonder hipertansiyon modellerinde: subtotal nefrektomi yapılması, renal mikroembolizasyon ile iskemi ve nefrosklerozis geliştirilmesi ve böbreği selofan ile sararak böbrek etrafında fibrozis oluşturulması teknikleri de kullanılabilmektedir.

Esansiyel hipertansiyonda: **farmakolojik** modellerde “deoksikortikosteron asetat (DOCA), anjiyotensin-II, N-nitro-L-arginin-metil ester (L-NAME) kullanılırken; **çevresel** modellerde yanıp-sönen ışıklar, yüksek ses, sallanan kafesler, soğuk ortam gibi etkenler uygulanmaktadır. **Genetik** modellerde ise, inbred, konsomik, kongenik ve geni silinmiş hayvanlar söz konusudur.

Mineralokortikoidler veya DOCA gibi sentetik türevleri, hipertansiyon oluşturmak için kullanılmaktadır. Aynı zamanda içme suyuna sodyum klorürün de katılmasıyla; doza ve süreye bağlı olarak, birkaç hafta içinde hayvanlarda hipertansiyon gelişebilmektedir. Başlangıçta tek taraflı nefrektomi yapılarak oluşturulmuş bu model, daha sonra nefrektomi yapılmadan da uygulanmaya başlamıştır. DOCA-tuz modelinde mineralokortikoid etkiye bağlı olarak, düşük kan renin ve anjiyotensin-II düzeyi olan bir hipertansiyon ortaya çıkmaktadır. Bu haliyle düşük kan renin düzeyli esansiyel hipertansiyon modeli olarak kullanılmaktadır. Hipertansiyon gelişiminden kan ve hücre dışı sıvı volümü artışının yanında; vasküler-kardiyak hipertrofi, nörojenik sempatik aktivasyon ve sistemik inflamasyon sorumlu tutulmaktadır.

Hipertansiyon modelleri başta anjiyotensin-II olmak üzere, RAAS bileşenleri verilerek de oluşturulabilir. Anjiyotensin-II uygulaması, RAAS'ın hiperaktivasyonuna benzer etki göstererek hipertansiyon oluşturmaktadır. Ancak etkililiği ve maliyeti açısından kullanımı sınırlıdır.

Kandaki birçok kimyasal ve fiziksel etkenin damar endotelini uyarması sonucu aktive olan nitrik oksit sentaz (NOS), güçlü bir vazodilatör madde olan NO üretimini sağlamaktadır. NO tüm damar yataklarında hem dinlenim hem de uyarıyla salıverilmektedir. Bir L-arginin analoğu olan L□NAME NOS'un seçici olmayan inhibitörüdür. L-NAME uygulamalarıyla endotelde bulunan eNOS inhibisyonu sonucu, NO eksikliği olan bir hipertansiyon modeli gelişmektedir. L-NAME düşük dozlarda, renal vazokonstriksiyon ve azalmış glomerüler filtrasyon nedeniyle hacim bağımlı bir kan basıncı artışına neden olurken; yüksek dozlarda, sistemik vazokonstriksiyona bağlı olarak hipertansiyona yol açmaktadır.

Çevresel modelde ayrı veya eş zamanlı olarak yanıp sönen ışıklar, yüksek sesler, sallanan kafesler, aşırı soğuk ortam (5˚C) veya diyette uzun süreli yüksek tuz, yağ, şeker ya da fruktoza maruz kalma gibi çevresel etkenler, hipertansiyon oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu yüksek düzeyde sıkıntı oluşturan etkenlerin kronik uygulanması, hipertansiyon gelişmesine neden olmaktadır. Bu modellerde kronik olarak sempatik sinir sistemi, kortiko-adrenal sıkıntı cevabı ve RAAS aktivasyonu, hipertansiyondan sorumlu etyopatogenez olarak düşünülmektedir.

Esansiyel hipertansiyonda genetik faktörlerin yaklaşık % 50 rol aldığı tahmin edilmektedir. Hipertansif sıçanların en az 20 nesil kardeş çiftleşmesiyle üretilen genetik benzerlik gösteren hipertansif hayvanlar "inbred" suşları oluşturmaktadır. Japonya'da üretilen "kendiliğinden (spontan) hipertansif sıçanlar" ve "inme-eğilimli kendiliğinden hipertansif sıçanlar", normal renin düzeyi ve sodyumdan bağımsız olmaları nedeniyle, esansiyel hipertansiyona benzer bir durum göstermektedir. "Yeni Zelanda", "Liyon", "Milono" ve "Schlager" hipertansif sıçan suşları da, "kendiliğinden hipertansif" suşlara benzer özellikler gösteren, genetik modellerdir. "Dahl tuz duyarlı" ve "Sabra" sıçan suşları ise, yüksek tuzlu diyete (%8 NaCl) maruz bırakıldığında hipertansif olmaktadır. "Fawn- hooded" hipertansif sıçanlarda kendiliğinden glomerüler skleroz ve hipertansiyon gelişmektedir ve bu nedenle böbrek parankima hastalıklarındaki hipertansiyon modeli olarak kullanılmaktadır. Beslenmeye bağlı şişmanlığın hipertansiyon gelişimi üzerine etkileri; "Sprague-Dawley", "obez Zucker", Wistar yağlı sıçanlar üzerinde araştırılmaktadır. Esansiyel hipertansiyon modeli olarak "transgenik", "konsomik", "kongenik" ve

“subkongenik” suşlar da kullanılabilmektedir. Bazı genlerin silinmesi, aşırı ifade edilmesi ya da mutasyonu ile hipertansiyon modelleri oluşturulabilmektedir.

Öte yandan, hipertansiyonla ilgili bazı genler ortaya konmasına rağmen, hipertansiyonda hiç bir major gen ilişkisi bulunamamıştır. Bu noktada bir genetik yatkınlıktan söz edilmektedir. Çevresel etkenlerin (düşük doğum ağırlığı, büyük plasenta, fazla tuz tüketimi, zihinsel sıkıntı, şişmanlık,…) epigenetik düzenlemelere yol açarak, genetik yatkınlığı olanlarda hipertansiyona neden olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aleksandrowicz M, Kuczeriszka M, Dobrowolski L, Kassan M. Editorial: Animal models of hypertension. Front Physiol. 2025; 16:1542502.

Bal NB, Han S, Usanmaz SE, Kiremitci S, Sadi G, Uludag MO, Demirel-Yilmaz E. Activation of Liver X Receptors by GW3965 attenuated DOCA-salt hypertension-induced cardiac functional and structural changes. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2019; 74(2):105-117.

Bal NB, Han S, Usanmaz SE, Kiremitci S, Sadi G, Uludag MO, Demirel-Yilmaz E. Hypertension-induced cardiac impairment is reversed by the inhibition of endoplasmic reticulum stress. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2019; 71(12):1809-1821.

Bal NB, Uludag MO, Demirel-Yılmaz E. Kardiyovasküler sistemde karaciğer X reseptörleri. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2019; 39(4):430-443.

Bal NB, Han S, Kiremitci S, Uludag MO, Demirel-Yilmaz E. Reversal of deleterious effect of hypertension on the liver by inhibition of endoplasmic reticulum stress. Molecular Biology Reports. 2020; 47:2243-2252.

Bal NB, Han S, Uludag MO, Demirel-Yılmaz E. The effect of DOCA-salt model without nephrectomy on blood pressure, heart and kidney functions, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2022; 79(3):485-496.

Bal NB, Bostanci A, Sadi G, Dönmez MO, Uludag MO, Demirel-Yilmaz E. Resveratrol and regular exercise may attenuate hypertension-induced cardiac dysfunction through modulation of cellular stress responses. Life Science 2022; 296:120424.

Bal NB, Demirel-Yılmaz E. Resveratrol and regular exercise can restore hepatic alterations induced by hypertension. Journal of Research in Pharmacy 2024; 28(1): 29- 39.

Bhat M, Zaid M, Singh S, Gill K, Tantray J, Sharma RK, Singh M, Mishra A, Singh RP, Sahu SK, Garg A, Sharma AK. A current review on animal models of anti- hypertensive drugs screening. Health Sciences Review 2023; 6:1-13.

Han S, Uludag MO, Usanmaz SE, Ayaloglu-Butun F, Akcali KC, Demirel-Yilmaz E. Resveratrol affects histone 3 lysine 27 methylation of vessels and blood biomarkers in DOCA salt-induced hypertension. Molecular Biological Reports. 2015; 42(1):35-42.

Han S, Bal NB, Sadi G, Usanmaz SE, Uludag MO, Demirel-Yilmaz E. The effects of LXR agonist GW3965 on vascular reactivity and inflammation in hypertensive rat aorta. Life Science. 2018; 213:287-293.

Han S, Bal NB, Sadi G, Usanmaz SE, Tuglu MM, Uludag MO, Demirel-Yilmaz E. Inhibition of endoplasmic reticulum stress protected DOCA-salt hypertension-induced vascular dysfunction. Vascular Pharmacology. 2019; 113:38-46.

Han S, Uludag MO, Demirel-Yılmaz E. Deneysel Hipertansiyon Modelinde Farklı DOCA- tuz Uygulama Sürelerinin Kan Basıncı ve Damar Cevapları Üzerine Etkisi. Dicle Tıp

Dergisi. 2019; 46(4):707-713.
Han S, Uludag MO, Demirel-Yılmaz E. Endoplazmik retikulum stresi ve hipertansiyon. Türkiye Klinikleri İç Hastalıkları Dergisi. 2019; 4(3):147-153.
Jama HA, Muralitharan RR, Xu C, O'Donnell JA, Bertagnolli M, Broughton BRS, Head GA, Marques FZ. Rodent models of hypertension. Br J Pharmacol. 2022; 79(5):918-937.
Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE; AHA Council on High Blood Pressure Research, Professional and Public Education Subcommittee. Recommendations for blood pressure measurement in animals: summary of an AHA scientific statement from the Council on High Blood Pressure Research, Professional and Public Education Subcommittee. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25(3):478-9.
Leong XF, Ng CY, Jaarin K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. Biomed Res Int. 2015; 2015:528757.
Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL,
Lin HY, Lee YT, Chan YW, Tse G. Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans. Biomed Rep. 2016; 5(6):653-659.
Lin HY, Lee YT, Chan YW, Tse G. Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans. Biomed Rep. 2016; 5(6):653-659.
Mullins JJ, Osborn J, Eirin A, Reckelhoff JF, Iadecola C, Coffman TM. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. Hypertension. 2019; 73(6):e87-e120.
Padmanabhan S, Joe B., Towards Precision Medicine for Hypertension: A Review of Genomic, Epigenomic, and Microbiomic Effects on Blood Pressure in Experimental Rat Models and Humans. Physiol Rev. 2017; 97(4):1469-1528.
Tabara Y, Kohara K and Miki T; Millennium Genome Project for Hypertension: Hunting for genes for hypertension: The millennium genome project for hypertension. Hypertens Res 2012; 35: 567573.
Wang Q, Domenighetti AA, Schäfer SC, Weber J, Simon A, Maillard MP, Pedrazzini T, Chen J, Lehr HA, Burnier M. Impact of salt on cardiac differential gene expression and coronary lesion in normotensive mineralocorticoid-treated mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2012; 302(9):R1025-33

OKSİJEN HASARININ DENEYSEL MODELLERİ

Prof. Dr. Mehmet CANSEV
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

GİRİŞ

Oksijen hasarı aşırı oksijen maruziyeti ile meydana gelir ve hücre ve doku hasarına neden olur. Oksijen toksisitesine Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) aracılık eder. Yüksek oksijen konsantrasyonları bütün doku ve organlara zarar verebildiği gibi en belirgin hasar akciğer, sinir sistemi ve gözde meydana gelir. Oksijen hasarının deneysel modelleri mekanizmanın anlaşılıp tedavilerin keşfedilmesine yardımcı olabilmektedir

Soluduğumuz hava %78.08 Azot (N_2), %20.91 Oksijen (O_2), %0.93 Argon (A), %0.04 Karbondioksit (CO_2) ve %0.04 su, toz ve diğer gazlardan oluşur. Deniz seviyesinde parsiyel oksijen basıncı PO_2=0.21 atm'dir. 1 atm basınç 760 mmHg'ya tekabül ettiği için 0.21 atm basınç 160 mmHg'dır. Oksijen vücuda girdikten sonra soluduğumuz havadaki O_2 basıncı doku ve organlara ulaştıkça azalır. Solunan havadaki PO_2 0.21 atm = 160 mmHg iken; alveolar havadaki PO_2 ~ 100 mmHg, arteryel kandaki PO_2~90 mmHg, beyindeki PO_2 ~30-35 mmHg, karaciğerdeki PO_2~40 mmHg ve böbrekteki PO_2 ~ 50-55 mmHg'dır.

Normal atmosferik basınçta (1 atm) yüksek konsantrasyonda oksijen (FiO_2>0.6) uzun süre (>24 saat) ile uygulandığında akciğerlere toksiktir. Bu tür maruziyete Düşük Basınçlı Oksijen Zehirlenmesi, Pulmoner Toksisite veya "Lorraine Smith Etkisi" denir. Solunum yollarında konjesyon, pulmoner ödem ve atelektazi ortaya çıkar. Nefes darlığı, göğüste yanma ve ağrılı solunum görülür. Bu hasarın sadece akciğerde görülüp diğer organlarda görülmemesinin sebebi, akciğerin direkt olarak yüksek konsantrasyonda oksijene maruz kalması fakat hemoglobin-oksijen tamponlama sistemi sayesinde diğer organlara oksijenin normal basınçlarında iletilmesidir. Yüksek atmosferik basınçta (1.6-4 atm) ve yüksek konsantrasyonda oksijen (FiO_2>0.6) kısa süreli de uygulansa merkezi sinir sistemine (MSS) toksiktir. Bu tür maruziyete Yüksek Basınçlı Oksijen Zehirlenmesi veya "Paul Bert Etkisi" denir. MSS toksisitesi 30-60 dk içinde nöbet ve koma ile birlikte ölüme götürür. Diğer semptomlar arasında bulantı, kas seğirmesi, baş dönmesi, görme bozuklukları, irritabilite ve dezoryantasyon sayılabilir. MSS toksisitesinin sebebi, belli bir alveolar oksijen basıncı (PAO_2) aşıldıktan sonra hemoglobin-oksijen tamponlama sisteminin yetersiz kalması ve doku oksijen basıncının yüzlerce ya da binlerce mmHg seviyelerine çıkabilmesidir. Bu tür toksisite okyanus dalgıçlarında görülür.

Reaktif Oksijen Türevleri (Reactive Oxygen Species; ROS)

Aerobik solunum, organizmaların son elektron alıcısı olarak oksijenin varlığında elektron taşıma zincirini kullanarak organik bileşiklerden enerji elde etmesini sağlayan metabolik bir süreçtir. Organizmalar aerobik solunumun faydalarından yararlanmak için evrimleştikçe, hücresel aerobik solunumun kaçınılmaz yan ürünleri olan ROS birikimi söz konusu hale gelmiştir. ROS hem makromoleküler hasarın güçlü kaynakları hem de temel sinyal molekülleri olarak hizmet ettiği için bu negatif ve pozitif etkiler arasında bir dengenin kurulması normal hücresel fonksiyonlar için önemlidir.

ROS Üretimine Neden Olan Reaksiyonlar

(1) NADPH Oksidaz enziminin katalizlemesiyle demir ya da bakır gibi bir metalin yükseltgenmesi sırasında moleküler oksijenin süperoksit anyonuna (O_2^-) tek-elektron

indirgenmesi meydana gelir
(2) Süperoksit anyonuna hidrojen atomu transferi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur
(3) Süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit arasındaki Fenton/Haber-Weiss döngüsü reaksiyonları aşırı anstabil ve çok toksik bir metabolit olan hidroksil radikalini (HO•) ortaya çıkarır.

Hücresel Antioksidanlar

Enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılırlar. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz'dır (GPx). Non-enzimatik olanlar ise glutatyon, ürik asit, bilirubin, Vitamin C, Vitamin E ve beta-karoten'dir.
Mitokondride kullanılan oksijenin tahminen %2'sinin ROS'a dönüştüğü düşünülmektedir. Fizyolojik şartlarda bu miktar antioksidan savunma tarafından yok edilebilmektedir. Ancak vücuda giren oksijenin artması ROS'un da artmasına sebep olur. ROS, hücresel antioksidan sisteme üstün gelmeye başladığında oksidatif stres durumuna neden olur. Oksidatif stresin biyolojik yapılar üzerindeki zararlı etkileri: DNA ve/veya RNA hasarı, DNA onarım sistemlerinin bozulması, transkripsiyonun etkilenmesi, lipid peroksidasyonu (bu da doğrudan hücre zarı yapısına zarar verir), amino asitlerin doğrudan oksidasyonu veya enzimlerin oksidatif deaktivasyonu ile protein işlevinin bozulmasıdır.

Akciğerde Oksijen Toksisitesinin Aşamaları

Başlangıç Fazı: Artmış ROS ve azalmış antioksidan savunma nedeniyle akciğerlerde mukus birikimi başlar (Antioksidan savunmanın bertaraf edemeyeceği kadar ROS oluşumu mevcuttur)
İnflamasyon (Eksuda) Fazı: Lökosit kaynaklı inflamatuar mediyatörlerin hasar alanına akın etmesi
Proliferatif Faz: Hücresel hipertrofi, tip II pnömositlerin aşırı salgı yapması ve monosit infiltrasyonu
Fibrotik Faz: Kolajen birikimi ve pulmoner interstisyel boşluğun kalınlaşmasıyla birlikte akciğerin fibrotik hale gelmesi (geri dönüşümsüz ve kalıcı faz)

Oksijen hasarı kimlerde görülebilir

A) Klinikte Yüksek Oksijen Maruziyeti
- Prematüre Yenidoğanlar
- Akut ve kronik durumlarda erişkinler
  - COVID-19
  - Pulmoner fibröz
  - Sepsis
  - Kardiyak arrest
  - CO zehirlenmesi
  - Akut MI

B) Pratik Hayattta Yüksek Oksijen Maruziyeti
- Dalgıçlar ve astronotlar

Prematüre yenidoğanlarda oksijen hasarının sonuçları

- Akciğer'de Bronkopulmoner Displazi (BPD) (= Yenidoğanın Kronik Akciğer Hastalığı)
- Beyin'de Periventriküler Lökomalazi (PVL), İntraventriküler Kanama (IVH), Sensorimotor ve kognitif davranış bozuklukları
- Göz'de Prematür Retinopatisi (Retinopathy of Prematurity = ROP)

- Gastrointestinal Sistem'de Nekrotizan Enterokolit (Necrotizing Enterocolitis = NEC)

BRONKOPULMONER DİSPLAZİ (BPD)

Fetal dönemde ductus arteriosus şantı nedeniyle akciğerler oksijen değişimine aracılık etmemektedir ve içleri amniyon sıvısı ile doludur. Doğumda alınan ilk nefes ile birlikte akciğerler hava ile dolar ve alveol-kapiller arasında gaz değişimi başlar. Normal oda havasının solunması ile dahi fetal dönemde %50-60 düzeyinde olan oksijen satürasyonu doğumun ilk birkaç dakikası içinde %90-95 civarına yükselir. Prematür yenidoğanların akciğerleri sakküler evrede kalmış olup henüz tip II pnömositleri gelişmemiş ve sürfaktan yapımları eksiktir. Bu nedenle akciğerleri doğumda gaz değişimini sağlayamaz ve tamamlayıcı oksijen tedavisine ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla BPD, mekanik ventilasyon ya da tamamlayıcı oksijen tedavisine ihtiyaç duyan prematür yenidoğanlarda en sık görülen solunum sistemi morbiditesidir. BPD inflamasyon, gelişen akciğerlerde hasar, alveoller ve kan damarlarında gelişimin bozulması ile karakterizedir. BPD'nin tedavisi bulunmamaktadır. Antenatal steroidler ve eksojen sürfaktan kullanımı akut solunumsal komplikasyonları azaltmış olsa da bu tedaviler BPD'yi önlememektedir. Günümüzde maalesef BPD insidansında azalma bulunmamaktadır. Gelişen yoğun bakım şartları ve tedavi imkanları ile "eski BPD" olarak adlandırılan hastalık karakteristikleri bir miktar değişmiş ve "yeni BPD" olarak adlandırılmıştır.

Deneysel BPD Modelleri

A) *İn vitro* Modeller

İn vitro modeller genellikle hücre kültürlerinde uygulanmış olup 2 boyutlu hücre kültürleri, *ex vivo* kültürler veya 3 boyutlu ko-kültürler kullanılmıştır. BPD modellemesi için bu kültürlerde yetiştirilen hücreler genellikle 24-96 saat süre ile %50-95 arası O2 konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. Hangi kültürlerde ne tür hücrelerin kullanıldığı Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. *İn vitro* BPD modelleri

***İn Vitro* Modeller**	**Kullanılan Hücre Tipleri**
2 Boyutlu Hücre Kültürleri	İnsan fetal akciğer dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücreleri
	Calu-3 hücreleri
	İnsan primer fetal akciğer fibroblastları
	İnsan akciğer mikrovasküler endotelyal ve alveolar epitelyal hücreleri
	İnsan umblikal ven endotelyal hücreleri (HUVEC)
	Prematür sıçanlardan primer tip II alveolar hücreler
Ex vivo Kültürler	Fare akciğer endoderm eksplantları
	Fare fetal/neonatal akciğer eksplantları
	Fare yavrularından (P4-P7) akciğer dilimleri
	Sıçan embriyonik akciğer eksplantları
3 Boyutlu Ko-kültürler	Primer insan akciğer fibroblast ve epitel hücreleri
	Fare fetal akciğer mezenkim ve epitel hücreleri
	Fare mezenkimal kök hücreleri ve distal akciğer epitel hücreleri
	Sıçan kemik iliği kök hücreleri ve primer fetal akciğer tip II hücreleri

B) *İn vivo* Modeller:

İn vivo modeller için deney hayvanı olarak fare, sıçan, tavşan, koyun ve primatlar kullanılmaktadır. Fare ve sıçanların daha çok tercih edilmelerinin sebepleri arasında hem ekonomik olarak diğer büyük türlere göre uygun olmaları, hem hızlı bir şekilde üretilebilmeleri hem de akciğer olgunlaşmasına ait özellikleridir. Fare ve sıçanların akciğerleri doğum esnasında sakküler evrededir ve henüz tam olarak olgunlaşmamıştır (alveolar evreyi tamamlamamıştır). İnsanlarda ise term doğumda alveolar evre tamamlanmış olsa da, prematür bebekler akciğerleri sakküler evrede iken doğarlar. Dolayısıyla prematür bebeklerde hiperoksinin indüklediği BPD hastalığı yenidoğan fare veya sıçan kullanmak suretiyle iyi bir şekilde modellenebilir.

Neonatal sıçan modellerinde uygulanan oksijen %60 ile %100 arası ve uygulama süresi doğumdan itibaren postnatal 14 güne kadar olarak tercih edilmektedir. Neonatal fare modellerinde benzer konsantrasyonda oksijen doğumdan itibaren postnatal 28 güne kadar verilebilmektedir. Bazı çalışmalarda prenatal lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu da yapılmış olduğu dikkati çekmektedir. Ayrıca farelerde TGF-beta transgenik fare, IL1-beta transgenik fare, TLR-4 knock-out fare, IFN-gama aşırı üreten (overexpressing) fare gibi genetik modifikasyonlar da yapılabilmektedir.

BPD-İlişkili Pulmoner Hipertansiyon (PH) orta ve ileri BPD'li infantların %12 ila %39'unda PH gelişir. Patogenezinde azalmış pulmoner vaskülarizasyon, endotelyal hücre disfonksiyonu ve ekstrasellüler matriksin dejenerasyonu mevcuttur. BPD-İlişkili PH adölesan dönemde de kalıcıdır. İnsanda gözlenen BPD-ilişkili pulmoner hipertansiyon (PH) için sıklıkla neonatal farelerde modelleme yapılır.

BPD'nin *in vivo* modellerinde morfolojik, hücresel, moleküler, fonksiyonel ve genetik düzeyde pek çok parametrenin analiz yapılabilir. BPD'nin kemirgen modellerinde incelenen parametreler Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. BPD'nin kemirgen modellerinde incelenen parametreler

Kategori	**İncelenen Parametreler**	
Akciğer yapısı ve morfolojisi	Alveol sayısı ve boyutu Septasyon Radyal alveoler sayım	Ortalama lineer aralık Akciğer hacmi ve ağırlığı Histolojik skorlama (inflamasyon, fibrozis)
Hücresel ve Moleküler Belirteçler	Hücre proliferasyonu (Ki-67) Apoptoz (kaspaz-3) Oksidatif stres (ROS, SOD, katalaz) İnflamasyon belirteçleri (IL-1β, IL-6, TNF-α)	Fibrozis göstergeleri (TGF-β, kolajen, α-SMA) Anjiyogenez (VEGF, CD31, vWF) Sürfaktan proteinleri (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D)
Fonksiyonel Değerlendirmeler	Akciğer kompliyansı ve direnci Elastans Pulmoner arter ve sağ ventrikül fonksiyonu	Tidal hacim, dakika ventilasyonu Kan gazları (PaO^n, $PaCO^n$, SpO^n)
Genetik ve Epigenetik Analizler	Gen ekspresyonu (RT-PCR, RNA-seq) miRNA profilleri	DNA metilasyonu Histon modifikasyonları

Bizim laboratuvarımızda da BPD'nin neonatal sıçan modelinde CDP-kolin molekülünün

etkinliği değerlendirildi[1]. CDP-kolin, Kennedy yolağı[2] üzerinden membran fosfatidilkolin (PC) sentezinin hız kısıtlayıcı basamağında sentezlenen endojen bir moleküldür. Eksojen olarak uygulandığında antioksidan, antiinflamatuar, antiapoptotik, nöroprotektif, kognitif stimülan, kardiyovasküler ve nöroendokrin etkinlikleri bulunmaktadır[3].

Çalışmamızda[1] yenidoğan sıçanlar doğumdan itibaren 10 gün boyunca %95 oksijene maruz bırakıldılar. Takiben sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı. Bu veriler CDP-kolin tedavisinin histopatolojik skoru iyileştirdiğini, fibrozu azalttığını, alveollerdeki radyal alveolar sayıyı ve lameller gövde proteini ekspresyonunu koruyarak alveolarizasyonu iyileştirdiğini, TUNEL pozitif hücre sayılarını ve aktif kaspaz-3 ekspresyonunu azalttığını, antioksidan aktiviteyi artırdığını ve yenidoğan sıçanların hasarlı akciğer dokularındaki lipid peroksidasyonunu ve iltihabı azalttığını gösterdi. Ek olarak, hem akciğer dokusu hem de bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı fosfolipid içerikleri CDP-kolin tedavisiyle önemli ölçüde artmış bulundu.

Takip eden bir çalışmada da CDP-kolin'in gebe sıçanlara uygulanması halinde doğum sonrası gelişen BPD hasarını azaltıp azaltmadığını araştırdık[4]. Gebeliğin 17-19 günleri arasında gebe sıçanlara tek başına veya betametazon ile birlikte CDP-kolin tedavisi uygulandıktan sonra yenidoğanlara postnatal 11 güne kadar %85-90 oksijen uygulaması yapıldı. Bulgularımıza göre antenatal CDP-kolin tedavisi toplam fosfolipitleri ve PC seviyelerini artırdı, apoptotik Bax proteininin ekspresyonunu azalttı ve yenidoğan sıçanlarda akciğer histolojisini, hiperoksinin alveolarizasyon üzerindeki zararlı etkisine karşı belirgin bir koruma sağlayarak iyileştirdi.

CDP-kolin haricinde laboratuvarımızda sıçan BPD modelinde valproik asit tedavisinin etkinliği de araştırıldı ve yararlı sonuçlara ulaşıldı[5].

HİPEROKSİNİN İNDÜKLEDİĞİ BEYİN HASARI

Beyin, oksijen hasarına duyarlı organlardan biridir zira beyin parankimi yüksek miktarda lipid içerir. Aşırı oksijen maruziyeti ile ortaya çıkan ROS beyinde lipid peroksidasyonuna yol açar. Lipid peroksidasyonu nöronal membranları destabilize ederek akışkanlığını ve fonksiyonunu bozar. Sinaptik etkileşim ve nöronal iletişim zarar görür. Kan-beyin bariyerinin de hasar görmesi ile beyne daha fazla toksik metabolitin girmesi söz konusu olur. Protein oksidasyonu toksik metabolitlerin birikimine neden olur. DNA hasarı da apoptoz gibi hücresel ölüm yolaklarının aktive edilmesine yol açar.

İmmatür Beyinde Hiperoksinin Etkileri

Miyelin ile ilişkili proteinlerin sentezinde azalma görülür. Bu nedenle miyelin üretiminde aksamalar ve takiben nöronlarda yapısal anormallikler ortaya çıkar. Sonuç itibariyle beyaz cevher gelişimi gecikir ve bu da doğum sonrası dönemde davranışsal anormalliklere yol açar. Bu anlamda oligodendrositler hiperoksinin neden olduğu beyaz cevher hasarının primer hedefinde olan hücrelerdir. Postnatal 0 ila 7 günlük sıçanların beyinlerinde oligodendrosit prekürsörleri ve pre-oligodendrositler bulunur. Bu hücrelerin antioksidan sistemleri gelişmemiştir ve oksidasyon hasarına duyarlıdırlar. Dolayısıyla *in vitro* modellerde oligodendrositler ve oligodendrosit prekürsörleri yaygın olarak tercih edilmektedir. Hiperoksinin indüklediği beyin hasarının *in vitro* hücre kültürü modelleri Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. Hiperoksinin indüklediği beyin hasarının *in vitro* hücre kültürü modelleri

Hücre Tipi	**İncelenen Parametre**
Oligodendrosit prekürsör hücre kültürleri	Oligodendrosit prekürsörlerinin apoptozu
	Oligodendrosit prekürsörlerinin maturasyon bozukluğu
	Oligodendrosit dejenerasyonu ve maturasyon bozukluğu
Oligodendrosit prekürsör hücreleri ve mikroglia ko-kültürleri	Oligodendrosit prekürsörlerinin ölümü
Oligodendrosit prekürsör hücreleri, mikroglia ve astrosit ko-kültürleri	Platelet-derived growth factor A (PDGFA) aracılı oligodendrosit prekürsör proliferasyonu ve myelinasyon
Astrosit kültürleri	PDGFA azalması ve hipomyelinasyon

İn vivo modellerde ise deney hayvanı olarak genellikle fare veya sıçan kullanılmıştır. Sıçan kullanımı farelere göre daha fazla çalışmada tercih edilmiştir. En düşük %40, en yüksek %100 ve en sık olarak %80 Oksijen uygulaması yapılmıştır. Yüksek oksijen uygulaması en erken P0, en geç P10 ve en sık olarak P6'da başlatılmıştır. Uygulama süresi olarak en kısa 2 saat, en uzun 14 gün ve en sık da 24-48 saat tercih edilmiştir. İncelenen parametreler: beynin genel hasarı, periventriküler (veya yaygın) beyaz cevher hasarı, spesifik olarak nöron, astrosit ya da oligodendrosit hasarı, fonksiyonel değerlendirme için davranışsal parametreler olarak özetlenebilir.

Tablo 4. Hiperoksinin İndüklediği Beyin Hasarı Modellerinde Fonksiyonel Değerlendirme Testleri

Gelişimsel Motor Testler	**Davranış ve Öğrenme Testleri**
Emekleme	Açık alan
Arka ekstremite açısı	T / Y / Artı labirentleri
Doğrulma	Zorlu yüzme
Negatif geotaksis	Korku şartlaması
Ön/arka ekstremitler ile askıda kalma	Pasif kaçınma
Tutunma	Sosyal etkileşim davranışı
Kavrama refleksi	Morris su labirenti
Uçurumdan kaçınma	Nesne tanıma

Laboratuvarımızda yine fosfolipid sentez yolağındaki öncül maddelerden biri olan üridin ile hiperoksik beyin hasarının deneysel sıçan modelinde çalışmalar yaptık. Çalışmamızda doğumdan itibaren postnatal 5 güne kadar %80 oksijen uygulamak suretiyle hiperoksik beyin hasarı modeli oluşturduğumuz yavru sıçanlarda hem erken dönemde hücresel ve moleküler parametreleri hem de 40 günlük olana kadar geç dönemde davranışsal parametreleri inceledik[6]. Verilerimiz, hiperoksik hasar sırasında beş gün boyunca üridin tedavisinin yavru sıçanlarda erken dönemde apoptotik aktiviteyi azalttığını ve miyelinasyonu artırdığını, periadolesan dönemde ise öğrenme ve hafıza performansını geliştirdiğini gösterdi. Daha sonraki benzer bir çalışmamızda da üridin tedavisinin beyinde

antioksidan etkinlik gösterdiğini bildirdik[7].

PREMATÜR RETİNOPATİSİ (RETINOPATHY OF PREMATURITY; ROP)

ROP, prematür yenidoğanlarda görme bozukluğu ve körlüğün primer nedenidir. İlk olarak 1942 yılında "Retrolental Fibroplazi (RLF)" adıyla tanımlanmıştır[8]. ROP'un en önemli nedeni de prematür dönemde maruz kalınan yüksek oksijendir. ROP, gelişmekte olan retinada fizyolojik retinal vaskülarizasyonda gecikme, intravitreal (ekstraretinal) neovaskülarizasyon ve retinal ayrılma (retina dekolmanı) gibi bozukluklarla karakterizedir. ROP gelişiminin iki fazda gerçekleştiği bildirilmiştir:

Faz I: Hiperoksi nedeniyle retinanın beslenememesi ve anoksik kalması

Faz II: Hiperoksi ortadan kalktıktan sonra gelişen fibrozis ve vasküler proliferasyon

ROP'un klinik evreleri aşağıdaki gibidir:

Evre 1: Demarkasyon çizgisi oluşumu

Evre 2: Vasküler ve avasküler retinayı ayıran kabartı oluşumu

Evre 3: Ekstraretinal fibrovasküler doku oluşumu

Evre 4: Subtotal retinal ayrılma

Evre 5: Total retinal ayrılma

ROP'un Deney Hayvanı Modelleri

İnsandaki ROP hastalığı deney hayvanı modellerinde Oksijenin İndüklediği Retinopati (OIR) olarak adlandırılır. İnsan infantlarda gözün iç katmanlarının (özellikle retinanın) damarlanması ve kan dolaşımı doğumdan önce tamamlandığı halde deney hayvanları ve pek çok diğer türde bu durum doğumdan sonraki dönemde gerçekleşir. Prematür yenidoğanlarda ise retinal damarlanma henüz başlangıç aşamasında olduğundan kemirgenlerde ROP modellemesi, tıpkı BPD'de olduğu gibi, kemirgenin doğum sonrası döneminde yapılabilir.

ROP'un kemirgen modellerinde fare ve sıçanlar iki farklı amaç için kullanılır:

- Fare OIR modeli, oksijen tedavisinin düzenlenmesinde kısıtlı kaynaklara sahip gelişmekte olan ülkelerdeki gözlenen agresif ROP'u taklit etmek üzere dizayn edilir
- Sıçan OIR modeli ise, günümüzün modern koşullarında gözlenen ROP patolojisini daha iyi taklit etmek üzere retinal vasküler gelişimin engellenmesi için en baştan itibaren dalgalanmalı şekilde yüksek oksijen uygulamalarını temel alır.

İki modelin özellikleri ve aralarındaki farklar Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5. Fare OIR ve Sıçan OIR modelinin özellikleri ve aralarındaki farklar

Fare OIR modeli	**Sıçan OIR modeli**
P7'den P12'ye kadar sürekli %75 O_2 maruziyeti yapılır	Doğumun 6. saatinden itibaren P14'e kadar her 24 saatte bir %50 ile %10 oksijen uygulamaları dönüşümlü olarak yapılır
P7'de farelerin iç vasküler pleksusu gelişimini tamamlamış durumdadır, dolayısıyla bu model inkomplet vaskülarizasyonu taklit etmez	Takiben yavru sıçanlar oda havasına alınır
Farelere P7'den itibaren uygulanan yüksek oksijen vazo-obliterasyona neden olur (Faz I)	P0-P14 arasında uygulanan dalgalı yüksek oksijen sıçanlarda hem damar yapılanmalarında kayba yol açar hem de fizyolojik retinal damarlanmayı geciktirir (Faz I)
P12'den itibaren yüksek oksijen uygulaması sonlandırılıp normal oda havasına geçilmesiyle intravitreal neovaskülarizasyon başlar (Faz II). Aynı zamanda retinada yeniden damarlanma görülür	Vasküler ve avasküler retinanın kesiştiği bölgelerde vazoproliferasyon görülür (Faz II)

Lutty ve McLeod adlı araştırmacılar göz damarlanmasının gelişimi bakımından insan ile fare arasında bazı farklılıklar olduğunu bildirmiştir. Buna göre insanda vitröz boşluğun damarlanması hemo-vaskülogenezis (kan ve kan damarlarının hemanjioblast adlı ortak progenitörden gelişmesi) ile olurken farede bu süreç anjiogenez ile gerçekleşmektedir. Ancak bu süreç köpeklerde insanlara benzer şekilde olmaktadır. Araştırmacılar insan ve fare arasında göz damarlanmalarındaki bu gelişimsel farklılıkları öne sürerek insandaki ROP'un köpeklerde daha doğru bir şekilde modellenebileceğini bildirmiştir[9]. Bu nedenle insandaki ROP'un daha iyi modellenebilmesi için köpek modelinin kullanılması daha uygun olabilir.

HİPEROKSİNİN İNDÜKLEDİĞİ NEKROTİZAN ENTEROKOLİT (NEC)

İntestinal lümen oksijenden fakir (PO_2=1 mmHg) bir ortamdır. Oksijen tedavisi ile yüksek oksijene maruz kalan GİS bileşenlerinde çeşitli değişiklikler meydana gelir. Yüksek oksijeni takiben oluşan ROS ve takip eden oksidatif stres ve inflamasyon hiperoksinin indüklediği NEC'in patogenezinin de temelini oluşturmaktadır. Oksijen ortamı değişen barsaklarda intestinal flora ve mikrobiyom da değişir (disbiosis). ROS ve disbiosis, normal bağırsak kök hücre farklılaşmasını düzenleyen Toll-like Receptor 4 (TLR4)'ün ekspresyonunu artırır. Abartılı TLR4 sinyallemesi, apoptoz ve nekroptoz yoluyla bağırsak epitel hücre ölümüne, ayrıca bozulmuş mukozal restorasyona ve azalmış proliferasyona yol açarak bağırsak bariyeri hasarına neden olur. Bariyerlerin hasarı ve disbiosis birlikte endotoksemi ve sepsisi tetikleyebilir. Patognomonik bulgusu pnömatozis intestinalis (barsakta hava) radyolojik olarak görüntülenebilir.

NEC'in Deneysel Hayvan Modelleri

İnsandaki NEC'i taklit etmek için fare, sıçan, domuz ya da diğer bazı hayvanlarda deneysel NEC oluşturulabilir. Ancak bu modellerde BPD, beyin hasarı ve ROP'tan farklı olarak hiperoksi tek başına kullanılmaz. Günümüzde genel kabul gören NEC modellemesinde hiperoksi-hipoksi döngüsü, soğuk maruziyeti, hiperosmolar formül gıdayla beslenme ve tetikleyici olarak enteral yolla patojenik bakteri (Cronobacter sakazakii veya Klebsiella) verilmesi ya da enteral, intravenöz veya intraperitoneal yolla lipopolisakkarit (LPS) uygulaması yapılarak deneysel NEC oluşturulmaktadır. Bunların yanı sıra uzun süreli antibiyotik verilmesi veya Paneth hücre harabiyeti gibi uygulamalar da tek başına ya da üstteki uygulamalara ilave olarak NEC modellerinde tercih edilmektedir. NEC modelinin diğerlerinden bir diğer farkı da anne sütünün koruyucu etkisini ekarte etmek için deneye başlarken yenidoğan deney hayvanları annelerinden ayrılır.

Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada neonatal sıçanlarda NEC oluşturmak için yöntem olarak doğumdan itibaren 3 gün boyunca mama ile besleme, hiperkarbi, hipotermi ve hiperoksi kombinasyonu kullanılmıştır[10].

Mama ile besleme: Yavru köpekler için ticari olarak satılan süt tozu sulandırılarak içerisinde Similac 60/40 bebek maması çözüldü ve bu mama her 3 saatte bir gavaj yoluyla 0.2 mL hacminde yavru sıçanlara içirildi. Gavajın volümü deney boyunca her gün 0.1 mL artırıldı

Hiperkarbi: Yavru sıçanlara her gün 10 dk boyunca karbondioksit inhalasyonu yaptırıldı

Hipotermi: Yavru sıçanlar her gün 5 dk boyunca +4^{o}C soğuğa maruz bırakıldı

Hiperoksi: Yavru sıçanlara her gün 2 defa 5'er dk boyunca %97 oksijen solutuldu

Deneyler tamamlandığında çıktı olarak kilo alımı, klinik hastalık skoru, yaşam süresi, makroskopik barsak skoru, apoptoz, oksidasyon ve inflamasyon parametreleri, barsak fosfolipid düzeyleri incelendi.

Elde edilen veriler, CDP-kolin uygulamasının, neonatal sıçan NEC modelinde klinik hastalık skorunu azalttığını, makroskopik ve histopatolojik bağırsak hasarını iyileştirdiğini, inflamasyonu ve apoptozu azalttığını ve bağırsak dokusu fosfolipid seviyelerini artırdığını gösterdi. CDP-kolin tedavisi ayrıca lipid peroksidasyonunu ve oksidan hasarını azaltırken, antioksidan seviyelerini artırdı. CDP-kolin tedavisinin biyokimyasal, morfolojik ve moleküler biyolojik etkileri, klinik hastalık skorlarının azalması ve daha uzun sağ kalım gibi uzun vadeli sonuçlarla ilişkili bulundu.

KAYNAKLAR

1. Cetinkaya M, Cansev M, Kafa IM, vd. Cytidine 5'-diphosphocholine ameliorates hyperoxic lung injury in a neonatal rat model. *Pediatr Res*. 2013;74(1):26–33. doi:10.1038/pr.2013.68
2. KENNEDY EP, WEISS SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*. 1956;222(1):193–214. doi:10.1016/S0021-9258(19)50785-2
3. Secades JJ, Gareri P. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2022 update. *Rev Neurol*. 2022;75(S05):S1–S89. doi:10.33588/rn.75S05.2022311
4. Koc C, Cakir A, Salman B, vd. Preventive effects of antenatal CDP-choline in a rat

model of neonatal hyperoxia-induced lung injury. *Can J Physiol Pharmacol*. 2023;101(2):65–73. doi:10.1139/cjpp-2022-0321

5. Cetinkaya M, Cansev M, Cekmez F, vd. Protective effects of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, against hyperoxic lung injury in a neonatal rat model. *PLoS One*. 2015;10(5). doi:10.1371/journal.pone.0126028
6. Goren B, Cakir A, Sevinc C, vd. Uridine treatment protects against neonatal brain damage and long-term cognitive deficits caused by hyperoxia. *Brain Res*. 2017;1676:57–68. doi:10.1016/j.brainres.2017.09.010
7. Al, Nevin; Cakir, Aysen; Koc, Cansu; Cansev, Mehmet; Alkan T. Antioxidative effects of uridine in a neonatal rat model of hyperoxic brain injury. *TURKISH J Med Sci*. 2020;50(8):2059–2066. doi:10.3906/sag-2002-14
8. Terry TL. Fibroblastic overgrowth of persistent tunica vasculosa lentis in infants born prematurely. III. Studies in development and regression of hyaloid artery and tunica vasculosa lentis. *Am J Ophthalmol*. 1942;25(12):1409–1423. doi:10.1016/S0002-9394(42)91858-0
9. Lutty GA, McLeod DS. Development of the hyaloid, choroidal and retinal vasculatures in the fetal human eye. *Prog Retin Eye Res*. 2018;62:58–76. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.10.001
10. Cetinkaya M, Cansev M, Cekmez F, vd. CDP-choline reduces severity of intestinal injury in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J Surg Res*. 2013;183(1). doi:10.1016/j.jss.2012.11.032

KARDİYAK HÜCRELERDE DENEYSEL MODELLER

Prof. Dr. H. Burak KANDİLCİ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı

GİRİŞ

Kardiyak kökenli hücrelerde oluşturulan deneysel kalp hastalıkları modelleri genellikle hastalığın mekanizmasını anlamaya yöneliktir. Bu modellerde mekanizmanın anlaşılabilmesi için klinik durumda olmayan hücrede bir genin geçici olarak aşırı ifade edilmesi veya silinmesi gibi yöntemler kullanılabilir. Bu tip bilimsel araştırmaların amacına ulaşması için deneysel ortamda kontrol edilen parametreler klinik durumumdakinin aksine çok daha az sayıdadır. *In vitro* hücre kültüründe hücreler ilgili fizyolojik aktivitesine yardımcı olan belli koşullar altında tutulur veya kontrollü kimyasal, fiziksel ya da biyolojik etkiler ortaya çıkartılır. Elde edilen deneysel sonuçların değeri yeniden üretilebilme şartını gerektirir. Yani deneyler farklı laboratuvarlardaki araştırmacılar tarafından da tekrarlanabilmelidir. Ancak, araştırıcıların birbirlerinin deneylerini tekrar edebilme oranının az olduğu[1] ve preklinik verilerdeki kalitesizliğin aday ilaç moleküllerinin klinik çalışmalarının faz 3 aşamasında durdurulması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, hücre kültürü deney ortamı şartlarındaki değişkenlerin iyi kontrol edilmesi gereklidir. Burada kardiyak hücre iskemi modelinde bu konular ele alınacaktır. Hipoksi; miyokard enfarktüsü (MI), koroner arter hastalığı gibi kalp hastalıklarının ana komponentidir. *In vitro* modellerde iskemiyi taklit etmek için çoğunlukla hipoksi ve reoksijenasyon uygulaması yapılmaktadır. Hipokside kardiyomiyosit hücre içi pH dengesinden sorumlu proteinlerin regülasyonunun ölçüldüğü deneysel metot bu kapsamda anlatılmıştır[2].

Kardiyak hücre hipoksi modellleri

In vitro modeller

Memeli kalbinden taze izole edilen kardiyomiyositler (olgunlaşmış veya neonatal) veya kalp kökenli kültür hücrelerinde (ör: H9C2, HL-1 hücreleri) hipoksi uygulamaları yapılabilir. Böylece kalpteki diğer hücre gruplarının (ör: fibroblast, endotel hücreleri, inflamatuvar/immün hücreler, kan hücreleri gibi) ya da kan dolaşımındaki faktörlerin (ör: hormonlar, nörotransmitterler, sitokinler) etkisi olmadan sadece hipoksinin etkisi gözlenebilir. Ancak burada araştırmanın amacına yönelik olarak bir parantez açmak gereklidir. Eğer klinik şartlar taklit edilmek isteniyorsa iskemik kalbi taklit etmek için hipoksi ile birlikte ya da tek başına perfüzyon/inkübasyon ortamından substrat çıkartılması (glukoz vb.), hiperkalemi, asidosis gibi protokoller de uygulanabilir. Hipoksik adaptasyonda rol oynayan mekanizmalar ortaya çıkartılırken kullanılacak hücre tipi uygulanan hipoksi protokolüne göre seçilir. Taze izole edilen, haraketsiz (spontan atım göstermeyen) erişkin memeli kardiyomiyositleri (sıçan ya da fare) altın standart olmakla birlikte uzun süreli şiddetli hipoksi kültüründe (48-72 saat, %1-2 O_2) canlı kalamadıkları için tercih edilmez. Diğer dezevantajları primer kardiyomiyosit izolasyonun zor olması, transfeksiyon yöntemlerinin kolay uygulabilir olmamasıdır. Dolayısıyla, birçok araştırmacı neonatal kardiyomiyosit ya da hücre serilerine yönelmektedir. Neonatal hücreler ve HL-1 hücreleri

spontan atım özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Neonatal kardiyomiyositler birkaç günlük sıçan/fareden izole edildiğinden, morfolojileri ve transkripsiyonel profilleri erişkin kardiyomiyosit karakterine benzememektedir. Avantajları ise erişkin kardiyomiyositlere göre daha kolay izole edilebilir olmaları, hücre kültüründe günlerce canlı kalabildiklerinden genetik manüpülasyona uygun olmalarıdır. Neonatal hücreler uzun süreli hipoksi (min 24 saat), hücre kültüründe izole primer kardiyomiyositlerin aksine temas halinde bulunduklarından *gap junction*, elektriksel iletkenlik çalışmalarına uygundur. Erişkin primer kardiyomiyositler ve neonatal hücreler kardiyomiyosit izolasyondan sonra kardiyomiyosit izolasyon verimi (saflık ve fenotip) kontrol edilmesi önemlidir.

HL-1 fare kardiyomiyosit hücre serisi erişkin kardiyomiyosit fenotipindedir. Birçok pasajlama sonrası bu karakterini kaybetmemesi, kardiyomiyosite özgü hipoksi ile indüklenebilen genlere sahip olması ve uzun süreli hipoksiye (min 48 saat) dayanıklı olması ile akut ve kronik MI modelleri için uygundur. Elektrofizyolojik özellikleri primer erişkin kardiyomiyositlerine yakındır. Hücre serisi olduğundan etik onay alınması gerekli değildir. En önemli dezevantajı ise hücrelerin spontan atım özelliğini kaybetmemesi için adenozin, retinoik asit, norepinefrin ve özel serum içeren bir besiyerinde kültüre edilmelerinin gerekliliğidir. Bu durum hazır satılan besiyerinin (Claycomb besiyeri) standart kültür besiyerine göre (DMEM v.b.) pahalı olmasını beraberinde getirir.

Ex Vivo modeller

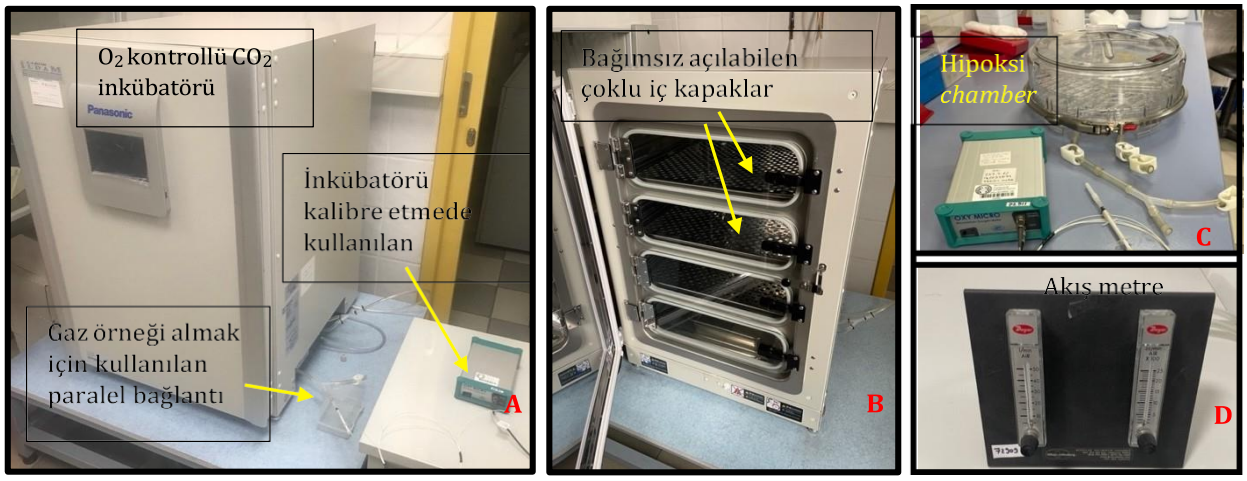
İzole memeli kalp perfüzyonu, *in vivo* şartlardaki normal kan dolaşımdaki faktörler ve diğer organlardan gelen nöroendokrin sinyallerden bağımsız olarak kalbin fonksiyonunu devam ettirdiği ve aynı zamanda bütünlüğünü koruduğu bir deney metodudur. Langendorff metodunda aort kanülasyonu sonrasında retrograd olarak koroner arterler genelde fizyolojik bir solüsyonla (ör: Krebs-Henseleit gibi) oksijenlenerek perfüze edilir. Kalp bu şekilde saatlerce çalışabilir. İzole kalp iskemi protokolünde perfüzyon durdurularak (20-40 dk) iskemi modeli oluşturulur. İzole kalpte anoksi/hipoksi oluşturulmak için ise kalp perfüzyon solüsyonu azotla gazlandırıldıktan (5 %CO_2 ve 95 % N_2) sonra oksijen süpürücü kimyasal ajanlar eklenerek (ör: $Na_2S_2O_4$ gibi) perfüze edilebilir.

Hipoksinin oluşturulması ve hipokside hücre kültürü

Hücre kültüründe hipoksi oluşturmak için planlanan deneylerin miktarına ve araştırma bütçesine göre oksijen kontrollü karbondioksit inkübatörü veya kapalı *chamber* sistemleri tercih edilebilir. Hipoksi oluşturmak için azot gazı kullanılır. İnkübatör sisteminde cihazın içindeki oksijen probunun belirli zaman aralıkları ile kalibre edilmesi gereklidir. Firmaların bu iş için oksijen içeren gaz karışım tüpleri (%5 O_2, %95 N_2 gibi) bulunmaktadır. Ancak standart tüplerinin içindeki gaz karışımlarındaki sapmalar nedeniyle genellikle bu işin diğer bir oksijenmetre kullanarak araştırıcı tarafından yapılması daha uygundur. Özellikle inkübatörlerin genellikle tek nokta kalibrasyonları olduğundan özellikle şiddetli hipoksi oksijen seviyeleri elde etmek için (%1-2 O_2, %5 CO_2, %95 nem, 37°C) inkübatörün

istenilen oksijen konsantrasyonundan kalibre edilmesi gereklidir. İlk olarak inkübatör oksijen kalibrasyonunda kullanılacak oksijenmetre kalibre edilmelidir. Genel olarak oksijenmetrelerin kalibrasyonları havada (%21 O_2, PO_2: ~143 mm Hg Ankara, 890 m) ve sudaki anoksik şartlarda (%0 O_2, 1 mM $Na_2S_2O_4$ + %100 N_2 ile gazlandırma) olmak üzere iki noktadan yapılır. Daha sonra oksijenmetre inkübatörün çıkışına paralel olarak bağlanarak inkübatör içindeki oksijen probunun kalibrasyonu yapılır (Şekil 1A). İnkübatör sistemi çoklu bağımsız açılabilen iç kapaklı olması durumunda hipoksik şartlarda kesinti oluşturmadan hücre grubu ekleme/çıkartılması yapılabilir (Şekil 1B). En önemli dezavantajı ise büyük hacimdeki inkübatörlerin fazla miktarda gaz harcamasıdır.

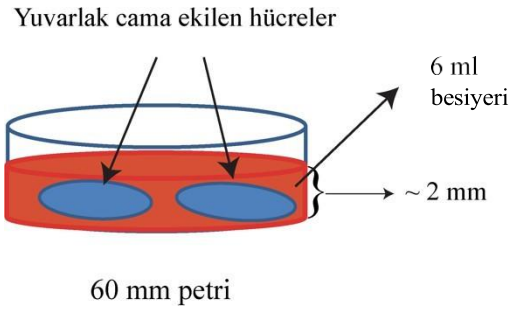
Buna karşın, kapalı *chamber* sistemlerinde (Şekil 1C) hipoksi oluşturmak için sarfedilen gaz miktarı çok daha az olmakla birlikte kapalı kap içinde zamanla oksijen kontaminasyonu olduğundan yeniden gazlandırılması gerekmektedir. Bu durum *chamber* içindeki oksijen konsantrasyonunda dalgalanmalar oluşturur. Ayrıca *chamber* içindeki gaz içeriği her tazelendiğinde yeni gaz ~25°C'deki gaz tüpünden aktarıldığından *chamber* tekrar 37°C'deki inkübatör içine konulduğunda kapalı *chamber*'daki tazelen gaz ısındığından oluşan pozitif basıncın boşaltılması gerekmektedir. İstenilen oksijen konsantrasyonu için gaz akışını ölçen ekstra cihazlara ihtiyaç duyulması kapalı sistemlerin diğer bir dezavantajıdır (Şekil 1D).



Şekil 1. A. Hipoksi oluşturmak için kullanılan oksijen kontrollü karbondioksit inkübatörü (MCO-170M-PE, Panasonic) ve kalibrasyon için kullanılan oksijenmetre (Oxymicro, WPI). **B.** Çoklu bağımsız açılabilen iç kapak sistemi. **C.** Kapalı hipoksi *chamber* **D.** *Chamber* oksijen konsantrasyonunu ayarlamak için kullanılan akışmetre.

Uzun süreli şiddetli kesintisiz hipokside (%1 O_2, 24-48 saat) kardiyomiyosit gibi yüksek metabolizmaya sahip hücrelerde (ör: HL-1) hücre kültürü besiyer pH'sı hücrelerin glikolitik metabolizması sonucu laktik asit üretimine bağlı olarak aside kayma oluşabilir. Bu durum genelde besiyeri çözeltisinde bulunan pH'ya duyarlı fenol kırmızısı boyasından besiyeri renginin sarıya kayması ile gözlemlenebilir. Deneylerde sadece hipoksinin etkisini gözlemlemek, besiyer pH'sının aside kaymasının önüne geçmek için besiyerinin tampon kapasitesi artırılmalıdır. Hücreler daha fazla besiyerinde deneye alınabilir ya da aynı besiyerindeki CO_2/HCO_3^- tampon sitemine uçucu olmayan ilave tampon (HEPES, MES

gibi) eklenerek toplam tampon kapasitesi artırılabilir. Burada dikkat edilecek nokta ilave tampon eklenmesi sırasında besiyerindeki osmolarite değişikliklerinin ölçülmesi, gerekirse kompanse edilmesidir. Örnek olarak, kendi deneylerimizde hipoksi uygulamasından önce HL-1 hücreleri yuvarlak camlarda büyütüldü. Hücreler uygun yoğunluğa (~%60-70) ulaştıktan sonra 6 ml besiyeri içeren 60 mm geniş petri kaplara, 2 yuvarlak cam olacak şekilde aktarıldı. Böylelikle besiyer miktarı %50 artırılırken standart besiyer derinliği (~2 mm) gaz difüzyonunu etkilemeden korundu (Şekil 2).



Şekil 2. Kesintisiz hipoksi deneyleri için hücrelerin 2 yuvarlak cama ekilip yeterli yoğunluğa geldikten sonra 60 mm petride, 6 ml'lik besiyerine aktarılmasının şematik gösterimi

Kardiyomiyositlerde pH Transport Kinetiği ve hücre içi (pH_i) Görüntülenmesi

pH_i Ölçümü ve Kalibrasyonu

Kardiyomiyositlerden pH_i görüntülenmesi için pH duyarlı floresan boyaların asetometil esterleri (SNARF-1, BCECF gibi) kullanılır. Hücre kültüründe kırık camlara ya da doğrudan görüntülemeye uygun kuyulara (Şekil 3) ekilen hücreler seçilen boya ile 30 dk. 2-4 µM konsantrasyonda standart kültür koşullarında inkübe edilir. İzole taze kardiyomiyositler ise 200 µl hücre/2 µM boya olacak şekilde yaklaşık 10 dk'da yüklenebilir. Daha sonra boya yüklenen kırık camdaki hücreler süperfüzyon banyo ortamında floresan görüntüleme sistemine alınır. İzole primer kardiyomiyositler *poly-L-lysine* kullanılarak süperfüzyon banyo ortamının cam yüzeyine yapıştırılabilir. Kırık cama ekilen hücreler ise doğrudan banyo ortamına transfer edilir.

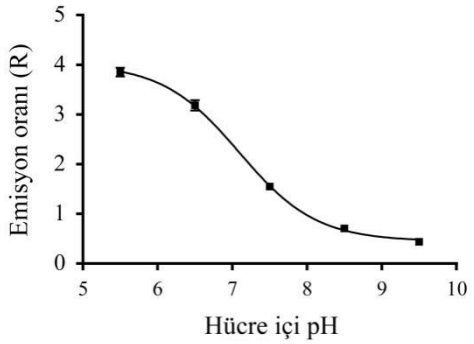
A B

Şekil 3. A. Doğrudan floresan görüntülemeye uygun hücre ekim kuyuları (Ibidi®). **B.** Hücre ekiminde kullanılan kırılmış lamel parçaları.

Hücreler uygun pH boyaları için uygun dalga boyunda uyarıldıktan sonra elde edilen ham emisyon sinyal oranları (R) *in suti* nigerisin (K^+/H^+ iyonoforu, 10 µM) kalibrasyonu ile pH

değerine çevrilir. Her pH değerine karşılık gelen R, dört parametreli logistik denklem eğrisine oturtularak R_{min}, R_{max} ve pK_a değerleri hesaplanır (Şekil 4). Kalibrasyon solüsyonlarında (mM olarak) 140 KCl, 1 $MgCl_2$, 0,5 EGTA, 0,01 nigerisin, 20 Hepes ya da MES kullanılır. Alkali kalibrasyon solüsyonlarında miyozin inhibitörü 2,3 butandion monoksim kullanılır. Kalibrasyon solüsyonlarının pH'sı HCl ya da NaOH ile ayarlanır. Deneylerde kardiyomiyosit süperfüzyonu için Hepes tamponlu tirod solüsyonu (mM olarak) 135 NaCl, 20 Hepes, 11 Glukoz, 4,5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$ hazırlanır. Solüsyon pH'sı 37°C' de NaOH ile 7,4'e ayarlanır. HCO_3^- tamponlu tirod solüsyonu için (mM olarak) 125 NaCl, 22 $NaHCO_3$, 11 Glukoz, 4,5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$ kullanılır. Solüsyon %5 CO_2 %95 O_2 ile gazlandırılır. Amonyum klorür (NH_4Cl, 20 mM) Hepes ve HCO_3^- tamponlu tirod solüsyonları hazırlanırken eşdeğer Na^+ ile yer değiştirilir.

A



B

$$R=R_{min}+(R_{maks}-R_{min})/1+ 10^{-(pK_a-pH_i)}$$

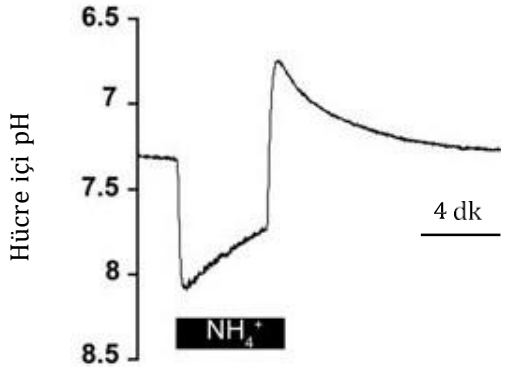
Şekil 4. Kardiyomiyositlerde pH duyarlı SNARF-1 floresan boyasının *in situ* kalibrasyonu. **A.** hücrelerinin nigerisin iyonoforu varlığında beş farklı pH değerinde (5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5) solüsyon ile süperfüzyonu sonucu kaydedilen emisyon oranlarının grafikte gösterimi. **B.** Deney sırasında kaydedilen R değerlerinden pH_i hesaplanmasında kullanılan denklem. R: emisyon oranı, R_{min}: minimum emisyon oranı, R_{maks}: maksimum emisyon oranı, pK_a: SNARF-1 pK_a'sı, pH_i: Hücre içi pH.

Sarkolemmal H^+ Akısının (J_H) Hesaplanması

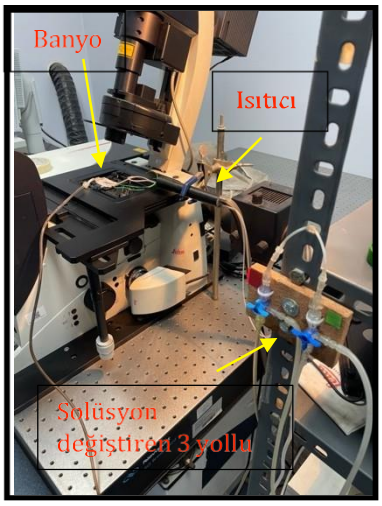
Hücrelere hücrelere asit yüklemek ve asit atan transportörleri aktive etmek amacıyla, hücreler yaklaşık beş dakika amonyum klorür (NH_4Cl, 20 mM) solüsyonu ile süperfüze edilir. Amonyum ön işlemi olarak adlandırılan bu klasik metod çeşitli hücrelere asit yüklemek için kullanılmaktadır (Şekil 5A). Metodun prensibi şöyledir; hücre dışından geçirilen amonyum klorür çözeltide amonyum (NH_4^+) ve klora (Cl^-) ayrışır. Amonyum suda hızla yüksüz olan amonyak (NH_3) ve H^+'e dönüşür. Amonyak hücre membranından geçtiğinde hücre içindeki H^+'nu bağlayarak pH_i'yı alkaliye kaydırır ve hücre içerisinde amonyum oluşur. pH_i'nın alkaliye kayması hücreye asit yüklenmesinden sorumlu

proteinleri aktive ettiğinden hücre içine net asit yüklenir. Daha sonra amonyum klorür solüsyonunun hızla yıkanması ile hücre içindeki amonyum hızla amonyağa dönüşerek konsantrasyon gradientine göre hücre dışına çıkar ve süperfüzyon ile ortamdan uzaklaştırılır. Böylece hücre içine pasif amonyum giriş ve çıkışından sonra net asit yüklenmiş olur. Hücre içerisinde kalan net asit transportörler aracılığıyla hücreden uzaklaştırılır. Amonyum ön-işlemi hızlı solüsyon değişimi gerektirmektedir. Solüsyonlar peristaltik pompa aracılığı ile 2 ml/dk hızında ve sıcaklığı geri beslemeli peltier ısıtıcı sistemi (CL-100, Warner Instruments) ile 37°C'de sabit tutularak floresan mikroskoptaki banyo ortamına gönderilir (Şekil 5).

A



B



Şekil 5. A. SNARF-1 floresan boyası ile pH_i'nın görüntülendiği kardiyomiyositlerde amonyum ön işlemi ile hücrelere asit yüklenmesinin kaydı. **B.** pH_i görüntülemesinin yapıldığı süperfüzyon deney setup'ı.

Kardiyomiyositlerde asit akısı (J_H), hücrelere amonyum ön işlemi ile asit yüklendikten sonra hücrenin asit atan transporterler aracılı asitten kurtulma hızının (dpH_i/dt) toplam hücre içi tamponlama kapasitesi (β_{top}) ile çarpılması ile edilir (Şekil 6A). Denklemdeki β_{top} hücrenin doğal tamponlama (CO_2 dışındaki) kapasitesi (β_i) ve CO_2/HCO_3^- bağımlı tamponlamanın (β_{CO2}) aritmetik toplamından elde edilir (Şekil 6B).

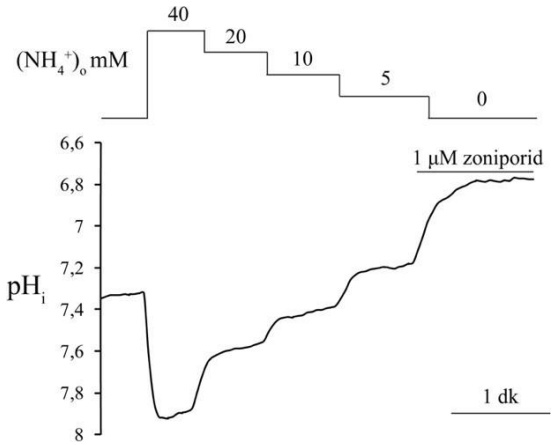
A) $J_H = dpH_i/dt \times \beta_{top}$

B) $\beta_{top} = \beta_i + \beta_{CO2}$

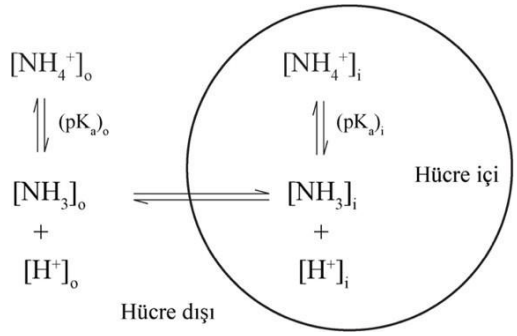
Şekil 6. Hücrelerden asit akısı hesaplanmasında kullanılan denklemler.

β_i hesaplanmasında kademeli amonyum uzaklaştırılması yöntemi kullanılır (Şekil 7A). Bu yöntemde, hücre içi ve dışında amonyum ayrışmasının pK_a'larının eşit olduğu kabul edilir. İkinci olarak, amonyak konsantrasyonun hücre iç ve dışı arasında hızla dengeye geldiği varsayılır. Hücre dışında amonyum uzaklaştırılması ile elde edilen hücre içi asit yükünün hesaplanan hücre içi amonyum konsantrasyonundaki azalmaya eşit olduğu varsayılır (Şekil 7B).

A



B



1) $[NH_3]_o = [NH_3]_i$

2) $(pK_a)_o = (pK_a)_i$

Şekil 7. A. Hepes tamponu içeren çözeltilerden (CO_2/ HCO_3^- içermeyen) βi hesaplanmasında kullanılan deneysel protokol. Başlangıçta 40 mM NH_4Cl ile süperfüzyon ve sonrasında sırası ile kademeli olarak uzaklaştırılması ile indüklenen asit yüklemeleri. βi ortalama değerleri birbirini takip eden yaklaşık 0,4 pH ünitelik dilimlerden hesaplanır. **B.** Amonyum ayrışması sırasındaki reaksiyonlar ve tamponlama hesaplamasında kullanılan varsayımlar. $[H^+]_i$: Hücre içi H^+ konsantrasyonu, $[H^+]_o$: Hücre dışı H^+ konsantrasyonu, $[NH4^+]_i$: Hücre içi amonyum konsantrasyonu, $[NH4^+]_o$: Hücre dışı amonyum konsantrasyonu, (pK_a): Hücre içi/dışı amonyum ayrışma reaksiyonu denge sabiti.

Daha sonra bu varsayımlar altında Henderson-Hasselbalch denklemi kullanılarak bilinmeyen hücre içi amonyum konsantrasyonu, bilinen ve ölçülen parametreler cinsinden ifade edilir (Şekil 8A). Böylece amonyumun hücre içinde birebir ayrışması ile hücre içinde oluşturulan net asidin pH_i'yi değiştirme miktarı olan β_i hesaplanır (Şekil 8B).

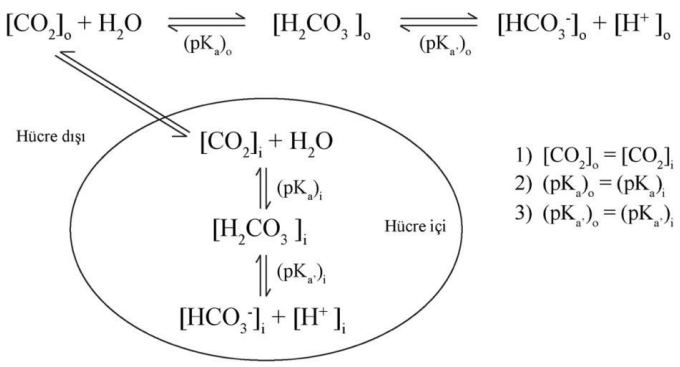
A) $[NH_4^+]_i = [NH_4^+]_o \times 10^{pH_o - pH_i}$

B) $\beta_i = \frac{\Delta[NH_4^+]_i}{\Delta pH_i}$

Şekil 8. β_i hesaplanmasında kullanılan denklemler.

β_{CO2} tamponu ise dışarıya açık ve kısmi CO_2 basıncı (P_{CO2}) %5'de sabit tutulan bir sistemdir. Bu şartlarda *Henry* yasasına (P_{CO2}x CO_2'nin sudaki çözünürlüğü) göre sudaki CO_2 ve dolayısıyla karbonik asit (H_2CO_3) konsantrasyonları sabittir. Her H^+ bir adet HCO_3^- ile reaksiyona girerek ortamdan CO_2 şeklinde uzaklaşır ve nötralize olan H^+ miktarı HCO_3^- miktarındaki azalma kadardır (Şekil 9A). Dolayısıyla β_{CO2}, HCO_3^- miktarındaki azalma ile birim pH'da oluşan değişikliğin diferansiyel çözümüne eşittir. Deneylerde β_{CO2} belirli pH_i ve P_{CO2} için Handerson-Hasselbalch denkleminden hesaplandı (Şekil 9B). Teorik β_{CO2} ve deney verilerinin model ile ifade edilmesi ile kesintisiz şekle dönüştürülen β_i değerlerinin aritmetik toplamından β_{top} elde edilir (Şekil 9C).

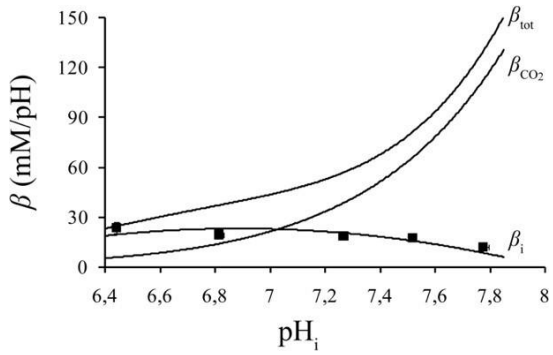
A



B

$$\beta_{CO2} = \frac{d[HCO_3^-]_i}{dpH_i} = 2.303[HCO_3^-]_i = 2.303[HCO_3^-]_o \times 10^{(pHi - pHo)}$$

C



Şekil 9. A. β_{CO2} hesaplanmasında kullanılan denklemler, varsayımlar ve CO_2/ HCO_3^- ayrışma reaksiyonunun gösterimi. Hücre membranın her iki tarafındaki CO_2/ HCO_3^- ayrışmasının pKa'sı, CO_2 çözünürlüğü ve konsantrasyonu eşit kabul edilir. **B.** β_{CO2} hesaplanırken Handerson-Hasselbalch denklemindeki $[HCO_3^-]_i$ bilinen parametreler pH_i, pH_o, $[HCO_3^-]_o$ ile yer değiştirilerek bulunur. **C.** pH_i tamponlarının grafikte gösterimi. pH_i: Hücre içi pH, pH_o: Hücre dışı pH, $[HCO_3^-]_i$: Hücre içi bikarbonat konsantrasyonu, $[HCO_3^-]_o$: Hücre dışı bikarbonat konsantrasyonu, $[H_2CO_3]_i$: Hücre içi karbonik asit konsantrasyonu,$[H_2CO_3]_i$: Hücre dışı karbonik asit konsantrasyonu, $[CO_2]$: CO_2 konsantrasyonu, pK_a: Hücre içi/dışı ayrışma reaksiyonu denge sabiti.

Referanslar

1. Baker M (2016) 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. Nature 533, 452–454
2. Kandilci HB, Richards MA, Fournier M, Şimşek G, Chung YJ, Lakhal-Littleton S, Swietach P (2021) Cardiomyocyte Na+/H+ Exchanger-1 Activity Is Reduced in Hypoxia. Front. Cardiovasc. Med. 7:617038

IN VİTRO HİPOKSİ DENEYLERİNDE PRATİK YAKLAŞIMLAR

Prof. Dr. Emel BALOĞLU
İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

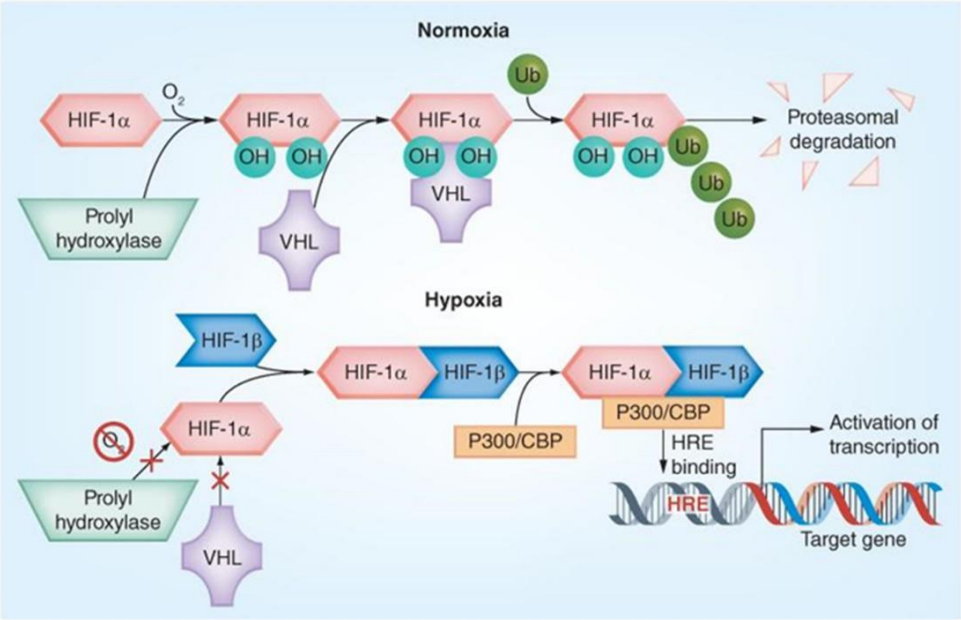
Kardiyovasküler sistem hastalıkları (KVH) tüm dünyada global ölümlerin %31 inden sorumlu olan, kalp, damar, koroner arterler, serebrovasküler hastalıkların da dahil olduğu en sık görülen hastalıklardandır. KVH'na bağlı ölümlerin %85'i kardiyak iskemi ve inme sonucudur (https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en).

İskemi dokulara oksijen ve besin maddelerinin ulaştırılmasının azlığı veya yokluğu ve toksik maddelerin uzaklaştırılmasının azalması ile karakterize perfüzyon yetersizliğidir (Baloglu 2023). İskemi damarların sıklıkla bir trombüs ile tıkanması sonucu gelişebileceği gibi, KVH açısından kalbin iş yükünün arttığı hipertansiyon, hipertrofik kalp hastalıkları, kapak hastalıkları, kalp yetmezliği, pulmoner hipertansiyon ve ani hızlı hücre proliferasyonu ile karakterize durumlarda dokunun oksijen tüketiminin arttığı hastalıklar ile de görülmektedir (Remme 2000). Kısa süren iskemik ataklar tolere edilir iken, uzamış iskemik ataklar Sempatik Sistem ve Renin-Anjiotensin-Aldosteron Sistem (RAAS) aktivitesinin de artması ile kalıcı ve ilerleyici hasar yaratabilmektedir (Leimbach vd. 1986; Graham vd. 2004; Rodriguez-Lara vd. 2018).

İn vivo hipoksi, KVH dışında aynı zamanda çevresel, fizyolojik ve fizyopatolojik durumlarla da ilişkilidir: örneğin yüksek irtifa, embriyogenez süreci, kanser, romatoid artrit, alzheimer hastalığı, enfeksiyon, inflamasyon gibi. Hipoksi (iskemi) ile ilişkili *in vivo* sistemde olan değişiklikleri doku ve hücre seviyesinde anlamak açısından *in vitro* hipoksi çalışmaları yararlı model olarak kabul edilir.

Yukarıdaki durumlardan farklı olarak fizyolojik koşullarda vücutta en az oksijen seviyelerine maruz kalan, fonksiyon ve canlılıklarını çok kanlanan organlara göre daha az oksijenli ortamda (1-20 mmHg) sürdüren ve devam ettiren hematopoetik kök hücreler, kondrositler ve osteoblastlar gibi hücreler için 'hipoksi' normoksiye karşılık gelmektedir (Kovacevic-Filipovic vd. 2007; Ivanovic 2009).

Hipoksik koşullarda hücreler canlılıklarını devam ettirebilmek için bazı adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar hücreden hücreye ve hipoksinin derecesine bağlı olarak hücre içi ATP homeostazisinin ekonomik bir şekilde sürdürülmesi, enerji üretimini optimize etmek için alternatif yollar kullanılması, hücre için daha az verimli olsa da, anaerobik metabolizmaya geçilmesi, çevreyle madde alışverişi, transkripsiyon ve translasyonun azaltılması, oksijenizasyonu sağlamak ve devam ettirebilmek için yeni kan damarları oluşturulmaya çalışılması, stres proteinleri (Hsp) üreterek hücre içi zararlı birikimlerin önlenmesi, hasarlı organel ve proteinler varsa temizlenmesi (otofaji) gibidir. Strese adaptasyon mekanizmalarının devreye girmesinde rol alan en önemli proteinler Hipoksi ile İndüklenebilir Transkripsiyon Faktörleridir (HIF). HIF, tüm ökaryotik türlerde eksprese edilen, canlıların gelişimsel dönemlerine, fizyolojik fonksiyonlarına ve patolojik süreçlere katkısı olan, hücrelerin düşük oksijen düzeylerine uyum sağlayabilmek için ilgili proteinlerin ifadelerini artırıcı genlerin transkripsiyonu kontrol eden kilit proteinlerdir (Semenza 2010; Semenza 2014).



Şekil 1. Normoksi ve hipokside HIF regülasyonu (Burroughs vd. 2013).

HIF, HIF-1α, HIF-2α ve HIF-3α olmak üzere α ve bir β ünitesinden oluşur. Beta alt ünitesinin ekspresyonu hipoksik koşullarda değişmezken, α alt ünitesi hücre içi oksijen düzeylerine duyarlıdır. HIF-α ünitesinin yarılanma ömrü çok kısadır (dakikalar) ve normoksik koşullarda protein düzeyi çok düşüktür (Jewell, Gassmann 2001). HIF-α nın yarılanma ömrünü kontrol eden 4 adet PHD (prolil-4-hidroksilaz domain) enzimleri, moleküler oksijeni kullanarak HIF-α yapısındaki 2 prolil grubunu hidroksile ederek pVHL (von Hippel Lindau tümör supresör) proteinin bağlanmasına izin verir. Bu bağlanma HIF-α nın proteozomlarda degradasyonuna neden olur. Hücre içi oksijen düzeylerinin düşüklüğünde hidroksilasyon reaksiyonu oluşamaz ve HIF-α proteozomlarda degrade olamayacağından hücre içinde stabilize olur, HIF-1β ile dimer yapısı oluşturarak nukleusa transloke olur. HIF-1α ve HIF-2α, promoter bölgelerinde HRE olan genlere bağlanarak gen transkripsiyonunu artırırlar (Burroughs vd.; 2013). HIF-1α ve HIF-2α; VEGF, EPO, Anjiopoetin 1-2, LDK1, PDK, GLUT, PPAR-γ, BNIP3, iNOS, HO-1, PDGF gibi ortak bazı genlerin transkripsiyonunu ve protein sentezini artırsalar da bu etki hücreden hücreye değişiklik gösterebilmektedir (Hon vd. 2002; Kim vd. 2006; Semenza 2014; Yuan vd. 2024). Yine hücreden hücreye ve hipoksinin derecesine ve süresine bağlı olmakla birlikte HIF-1α ekspresyonu hipoksinin erken dönemlerinde (2dk-24saat), HIF-2α ekspresyonu ise daha geç dönemlerde artmaktadır (6-48saat). Jewel ve arkadaşları %0.5 O_2 ve anoksik koşullarda HeLa hücrelerinde 2 dk içinde HIF-1α'nın hücre çekirdeğine transloke olduğunu ve reoksijenizasyon sonrası dakikalar içinde çekirdekten kaybolduğunu, yarılanma ömrünün oksijene çok duyarlı olduğunu göstermişlerdir (Jewell, Gassmann 2001). H9c2 sıçan ventrikül kardiyomiyoblastlarda yaptığımız çalışmalarda %1 O_2 düzeylerinde HIF-1α hücre çekirdeğinde 2.saatten itibaren artarak 24 saat stabil kalırken, HIF-2α düzeyleri hipoksinin 24.saatinde artırmaktadır (Baloglu 2023; Gurler vd. 2023). Çalışmalar HIF aracılı adaptif mekanizmaların farklı zamanlarda devreye girdiğine işaret etmektedir (Jewell, Gassmann 2001).

İn vitro koşullarda hipoksi deneyleri yapmak için özel cihazlara gereksinim vardır. Bunlardan ucuz ve pratik olması nedeniyle en sık kullanılanlardan bir tanesi özel karışım

gazları ile istenilen oksijen düzeylerinde hücre kültürü ve dokularda deney yapılmasına olanak veren plastik kutulardır. Ayrıca oksijen düzeyleri ayarlanabilen hücre kültürü inkübatörleri ve kesintisiz hipoksik ortam sağlayarak, reoksijenizasyon riski olmadan hücrelere kimyasal uygulamasına da elverişli, deney koşullarında O_2 ve CO_2 dalgalanmaları olmadan kısa ve uzun süreli hipoksi deneylerine yapmaya, hücrelerden materyal toplamaya uygun ortam sağlayan hipoksik çalışma kabinleridir.

Hipoksik yanıtın hücreden hücreye değişebildiği göz önünde bulundurularak hücre kültürü çalışmalarında dikkat edilmesi gereken noktaların başında test edilmek istenen modelin ve kullanılacak hücrelerin doğru seçilmesi gerekmektedir. Özellikle ilk kez oluşturulacak hastalık modellerinde farklı derece (%1-5 O_2) ve sürelerde (dk- gün) ön deney yapılması gerekmektedir. Hipoksik etkinin gerçekleşip gerçekleşmediği normoksik hücrelere göre de incelenmelidir. Bu deneylerde sıklıkla HIF-1α, 2α protein ekspresyonu, HRE aktivitesi, hipoksi ile indüklenen gen/protein ekspresyonu (örneğin VEGF, GAPDH, BNIP3) ölçülerek karar verilmektedir. Araştırılmak istenen proteinin aktivitesi veya ekspresyonu de aynı deney koşullarında incelenmelidir.

Akut hipoksi (iskemi) modelleri hücrelerin dakikalar-birkaç saat istenilen düşük oksijen koşullarında bekletilmesi ile oluşturulur. Bu koşullarda besi yerlerinin hipoksik koşullarda en az 3 saat bekletildikten sonra değiştirilmesi daha hızlı yanıtlar elde edilmesini sağlar.

Kronik hipoksi modelleri sıklıkla 24-48 saat hücrelerin hipoksik ortamda bekletilmesi ile oluşturulur. Hücre proliferasyonu ve canlılığı hücre tipine, hipoksinin şiddetine ve süresine bağlı olarak değiştiğinden deneylerde her zaman belirli sayıda hücre/kültür kabı cm^2 olacak şekilde optimize edilerek ekilmesi gerekmektedir. Deney sonlanım süresinde normoksik hücreler kültür kabı yüzeyinin en fazla %80' ni kaplamalıdır. Konfluent hücrelerle çalışmanın normoksik hücrelerde dahi besi yerindeki oksijen düzeylerini azaltarak deneysel artefaktlara yol açabileceği unutulmamalıdır (Allen vd. 2001).

Hipoksi çalışmalarında HIF-α mRNA sında olası değişikliklerden çok HIF-α protein düzeylerini değerlendirmek anlamlıdır. HIF-α protein düzeyinin ölçümü proteinin aktif olduğu kompartman olan hücre çekirdeğinin izolasyonu sonrası SDS-PAGE ve Western Blot ile veya immünfloresan çalışmalar ile gösterilebilir. Çalışmalarda ayrıca HIF-α ile yönlendirilen gen(lerin) ifadesi veya protein düzeylerindeki değişiklikler konfirme edilmelidir.

Bazı kimyasal ajanlar normoksik koşullarda da HIF-α ekspresyonunu indüklerler ve hipoksimimetikler olarak adlandırılırlar. Hipoksik koşullarda gözlenen değişikliklerin HIF-α ile gerçekleştiğini göstermek için normoksik koşullarda kullanılırlar. Bunlar arasında Oksoglutarat analoglarından Dimetiloksaloglisin (DMOG), Fe^{+2} şelatörü Deferoksamin, metallerden Kobalt ($CoCl_2$), elektron taşıma zincirini ayıran Dinitrofenol gibi ajanlar en sık kullanılanladır. Bu ajanların HIF-α izoformları arasında ayırıcılığı bulunmamaktadır. Her zaman düşük oksijen stresinin oluşturduğu yanıtları taklit edemeyebilirler (Munoz- Sanchez, Chanez-Cardenas 2019).

İn vitro hipoksi deneylerinde hücrelerin hipoksiye adaptasyon mekanizmalarını araştırmanın dışında hipoksik ön koşullama deneyleri de sıklıkla yapılmaktadır. Hipoksik ön koşullama çalışmalarında hücre veya dokuda kısa süreli ve geçici stres oluşturarak, daha uzun süreli ve ciddi strese karşı hücrenin toleransını artırarak (direnç kazanılması), geri dönüşümsüz değişiklikleri ve hücresel hasarı azaltmak amaçlanır. Prensip hücrelerin düşük O_2 (%1–5 O_2) seviyelerine belirli bir süre maruz bırakılması ile hayatta kalması ve

stres yanıtları başlatmasını sağlamaktır.

Sıklıkla kullanılan aralıklı ön koşullama deneylerinde hücrelerin daha fazla direnç geliştirmesi ve daha dayanıklı hale gelmesi için 24 saat boyunca hipoksi koşullarına maruz bırakıldıktan sonra normoksi koşullarında bekletilir. Birkaç gün sonra tekrar hipoksi koşullarına getirilir. 3-5 seferlik hipoksi uygulamaları yapılabilir. Kademeli ön koşullama çalışmalarında hücreler başlangıçta hafif hipoksi koşullarında (%5 O_2) bekletilip, zamanla daha düşük O_2 seviyelerine (örneğin önce %3 ve sonra %1 O_2) maruz bırakılır. Bu çalışmalarda uygulama sıklığı ve süresi, hücre tipine ve araştırmanın amacına göre daha kısa (2-12 saat) ya da daha uzun (48-72 saat) hipoksi uygulamaları tercih edilebilir.

Diğer bir model iskemi (hipoksi) reperfüzyon hasarı olup kardiyomiyosit, nöron gibi hücrelerde sıklıkla kullanılır. *İn vitro* iskemi (İ)-reperfüzyon (R) hasarı akut ve kronik olarak oluşturulabilir. Akut İ/R hasar modelinde hücreler birkaç dakikadan- birkaç saat hipoksi maruziyeti sonrası normoksik ortama (birkaç saat) alınır. Kronik İ/R hasar modelinde hücreler birkaç saatten birkaç güne kadar hipokside bekletildikten sonra normoksik ortama (birkaç saat) alınır. *İn vitro* İ/R hasarı modelleri doku dilimlerinde uygulanabilir.

H9c2 kardiyomiyoblastlarda akut ve kronik hipoksi/reoksijenasyona yanıt olarak değişen proteinler ve ilgili sinyal yolaklarının proteomik ve biyoinformatik analizlerle incelediğimiz çalışmamızda akut İ/R modelinde hücreler %0.2 O_2 3 saat bekletildikten sonra 3 saat normoksik ortama alındı. Kronik İ/R modelinde ise hücreler %0.2 O_2 21 saat bekletildikten sonra 3 saat normoksikde bekletildi. Hücrelerden hazırlanan total lizatlarda LC-MS/MS analizleri ile normoksik hücrelere göre ifadeleri değişen proteinler ve ilişkili sinyal ileti yolakları ve reoksijenizasyon duyarlılıkları incelendi. Akut hipoksi ile mitokondri fonksiyonu ve protein homeostazisi ile ilişkili protein düzeylerinde görülen değişiklikler hücrelerin strese acil ve hızlı adaptasyon yanıtları ile ilişkili bulundu. Kronik hipoksi ise hücre yapısı, hücre iskelet protein düzeylerinde, HIF-1α aracılı metabolik yeniden düzenlenmeye yönelik adaptif değişikliklere neden oldu. Gözlenen değişiklikler hücrelerin farklı sürelerde hipoksiye adaptasyon yanıtlarını ortaya çıkardı (Oztug vd. 2024).

KAYNAKLAR

1. Allen, C. B., B. K. Schneider, C. W. White (2001). "Limitations to oxygen diffusion and equilibration in in vitro cell exposure systems in hyperoxia and hypoxia," Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 281(4), L1021-1027.

2. Baloglu, E. (2023). "HIF-2alpha Controls Expression and Intracellular Trafficking of the alpha2-Subunit of Na,K-ATPase in Hypoxic H9c2 Cardiomyocytes," Biomedicines, 11(11).

3. Baloglu, E. (2023). "Hypoxic Stress-Dependent Regulation of Na,K-ATPase in Ischemic Heart Disease," Int J Mol Sci, 24(9).

4. Burroughs, S. K., S. Kaluz, D. Wang, K. Wang, E. G. Van Meir, B. Wang (2013). "Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics," Future Med Chem, 5(5), 553-572.

5. Graham, L. N., P. A. Smith, R. J. Huggett, J. B. Stoker, A. F. Mackintosh, D. A. Mary (2004). "Sympathetic drive in anterior and inferior uncomplicated acute myocardial infarction," Circulation, 109(19), 2285-2289.

6. Gurler, B., G. Gencay, E. Baloglu (2023). "Hypoxia and HIF-1alpha Regulate the Activity

and Expression of Na,K-ATPase Subunits in H9c2 Cardiomyoblasts," Curr Issues Mol Biol, 45(10), 8277-8288.
7. Hon, W. C., M. I. Wilson, K. Harlos, T. D. Claridge, C. J. Schofield, C. W. Pugh, P. H. Maxwell, P. J. Ratcliffe, D. I. Stuart, E. Y. Jones (2002). "Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL," Nature, 417(6892), 975-978.
8. Ivanovic, Z. (2009). "Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm," J Cell Physiol, 219(2), 271-275.
9. Jewell, U. R., M. Gassmann (2001). "Mammalian gene expression in hypoxic conditions," Zoology (Jena), 104(3-4), 192-197.
10. Kim, J. W., I. Tchernyshyov, G. L. Semenza, C. V. Dang (2006). "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia," Cell Metab, 3(3), 177-185.
11. Kovacevic-Filipovic, M., M. Petakov, F. Hermitte, C. Debeissat, A. Krstic, G. Jovcic, D. Bugarski, X. Lafarge, P. Milenkovic, V. Praloran, Z. Ivanovic (2007). "Interleukin-6 (IL-6) and low O(2) concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC)," J Cell Physiol, 212(1), 68-75.
12. Leimbach, W. N., Jr., B. G. Wallin, R. G. Victor, P. E. Aylward, G. Sundlof, A. L. Mark (1986). "Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure," Circulation, 73(5), 913-919.
13. Munoz-Sanchez, J., M. E. Chanez-Cardenas (2019). "The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model," J Appl Toxicol, 39(4), 556-570.
14. Oztug, M., E. Kilinc, Z. A. Oztug Durer, E. Baloglu (2024). "Proteomic investigation of acute and chronic hypoxia/reoxygenation responsive proteins and pathways in H9C2 cardiomyoblasts," Turk J Biol, 48(3), 192-202.
15. Remme, W. J. (2000). "Overview of the relationship between ischemia and congestive heart failure," Clin Cardiol, 23(7 Suppl 4), IV4-8.
16. Rodriguez-Lara, S. Q., L. Garcia-Benavides, A. G. Miranda-Diaz (2018). "The Renin-Angiotensin-Aldosterone System as a Therapeutic Target in Late Injury Caused by Ischemia-Reperfusion," Int J Endocrinol, 2018, 3614303.
17. Semenza, G. L. (2010). "Vascular responses to hypoxia and ischemia," Arterioscler Thromb Vasc Biol, 30(4), 648-652.
18. Semenza, G. L. (2014). "Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease," Annu. Rev. Physiol, 76, 39-56.
19. Yuan, X., W. Ruan, B. Bobrow, P. Carmeliet, H. K. Eltzschig (2024). "Targeting hypoxia-inducible factors: therapeutic opportunities and challenges," Nat Rev Drug Discov, 23(3), 175-200.

DENEY HAYVANINDA BİYOLOJİK RİTİM ARAŞTIRMALARI: "SANCAR LAB" İLE OLAN SON BULGULARIMIZ

Prof. Dr. Alper OKYAR
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Biyolojik ritimler, canlı bir organizmada yaşam boyu tekrarlayan ve canlının dış ortama uyumunu sağlayan fizyolojik olaylardır. Biyolojik ritimleri ve mekanizmalarını inceleyen bilim dalı 'kronobiyoloji'dir. 1729 yılında, Jacques d'Ortous de Marian'ın "Mimoza çiçeği" üzerinde yaptığı çalışmalar biyolojik ritimlerin varlığı konusunda önemli gözlemler içerir. Bu çiçeğin karanlık bir dolapta bırakıldığında dahi yapraklarını sanki gün ışığı varmışçasına, aynı günlük düzende açıp kapadığı; böylece bitkinin sadece ışığa hassasiyeti olmadığı, aynı zamanda bir tür içsel saat taşıdığı anlaşılmıştır. Canlılarda ortaya çıkan, öngörülebilen ve düzenli olarak tekrarlanan içsel kaynaklı değişiklikler, biyolojik ritimler olarak tanımlanmaktadır. Organizmada birçok biyolojik fonksiyon ritim göstermektedir ve bu ritimlerde tek bir döngünün tamamlanması için gerekli olan süre bir saniye veya daha kısa süreli olabildiği gibi, 24 saat, 1 hafta, 1 ay ve hatta bir yıla kadar değişiklik göstermektedir. Yaklaşık 24 saatlik periyotlarla tekrar eden biyolojik ritimler, "sirkadiyen ritimler" veya "günlük ritimler" olarak adlandırılır. Endojen bir biyolojik tempocu tarafından üretilen, yaklaşık 24 saatlik periyotlarla tekrarlayan fizyolojik ve davranışsal döngülerdir. Kısaca, yaklaşık bir gün periyodundaki biyolojik ritimlerdir. Sirkadiyan terimi Latince "**yaklaşık**" anlamına gelen "**circa**" ve "**gün**" anlamına gelen "**dies, diem**" kelimelerinden oluşmaktadır.

Tablo 1: Frekans ritimleri.

Ritim*	**Periyot****
Ultradiyan	$\tau < 20$ saat
Sirkadiyen	20 saat $< \tau <$ 28 saat
İnfradiyan	$\tau >$28 saat
Sirkaseptan	$\tau = 7 \pm 3$ gün
Sirkannual	$\tau = 1$ yıl $\pm$ 3 ay

* Ritim: Kronobiyolojide ritim, biyolojik zaman serilerinin belli dereceye kadar tahmin edilebilen ve sürekli olarak oluşan bileşeni anlamı taşımaktadır.** Periyot: Tek bir döngünün tamamlanması için gerekli olan süredir.

Biyolojik ritim araştırmalarında hayvan kullanımı, araştırmacıların bazı özel konulara dikkat etmesini gerektirir. Hayvanlar, deney öncesinde ve deney süresince ışık-karanlık (light-dark, L:D) döngüsünde bakılır. Fare, sıçan gibi farmakolojik deneylerde kullanılan türler noktürnaldir yani gece aktiftir. Senkronizasyon için 12 saat aydınlık-12 saat karanlık siklusunun kullanılması genel kabul gören bir yaklaşımdır. Bu husus faz kaymasını engeller. Faz kayması, bir salınımın (osilasyon), zaman ekseni boyunca yerinden kaymasıdır (faz gecikmesi veya faz ilerlemesi şeklinde olabilir). Yöntemler kısmında, yapay veya doğal ışık-karanlık döngüsü ve/veya dinlenme-aktivite düzenine ait

zamanlama açıkça belirtilmeli; çevresel ışığın şiddeti gibi detaylar da dahil edilmelidir. Ortam sıcaklığı, bağıl nem, gürültü seviyesi, hayvanların beslenme düzeni ve kullanılan diyet türe uygun olacak şekilde açıklanmalıdır. Ayrıca, periyodik bakım, besin ve su yenileme zamanlamalarının da hayvanların senkronizasyonuna etki edebileceği unutulmamalıdır.

Şekil 1. Kronobiyolojik çalışmalarda kullanılan ve ritim verici (Zeitgeber- ZT) olan ışığa göre programlanmış saat.

Tüm sirkadiyan ritimlerin sahip olduğu temel özelliklerden biri, herhangi bir çevresel ipucu bulunmaması durumunda dahi sürdürülebilir olmalarıdır. Zamansal izolasyon durumunda (sabit sıcaklık ve daimi ışık (LL) veya daimi karanlık (DD) görülen 'free running' ritimlerin periyodu genellikle 24 saatten farklıdır; tam uzunluğu koşullara (örneğin DD veya LL), türe ve hatta bireye bağlıdır. Sirkadiyan ritimler, normal koşullar altında, sürükleme (entrainment) veya senkronizasyon olarak bilinen proseslerle çevresel döngülere uyum sağlama özelliği gösterirler.

Ses sinyalleri ve gürültü, hayvanlar için stres kaynağı olabilir ve belirli biyolojik ritimler üzerinde maskeleme gibi etkiler yaratabilir. Deneylerde alınan toplam kan miktarı daima belirtilmeli ve hayvan sağlığını tehlikeye atmayacak şekilde en aza indirilmelidir. Cerrahi ve ağrılı işlemler, anestezi uygulanmadan yapılmamalıdır; uygun sedasyon, analjezi veya anestezi kullanılarak acı, rahatsızlık ve ağrı önlenmelidir. Ayrıca, yaş, cinsiyet, tür, soy geçmişi/genetik değişiklikler gibi özellikler de belirtilmelidir.

Fiziksel, kimyasal ya da başka türden uygulamaların biyolojik etkilerini araştıran çalışmalarda, bu uygulamaların hangi sirkadiyen zamanda yapıldığına dair gerekçeler sunmalıdır. Zeitgeber (ZT), bir organizmanın biyolojik saat döngüsünü düzenlemesine yardım eden, yani organizmanın biyolojik ritimlerinin, dünyanın 24 saatlik aydınlık/karanlık döngüsüne ve 12 aylık döngülere senkronize olmasını sağlayan çevresel işaretlere (özellikle de ışığa) verilen addır. Zaman verici (time giver veya zeitgeber) veya senkronizatör de denilmektedir. Işık periyodunda deney hayvanlarına beyaz ışık verilirken (100-300 lüks), karanlık periyotta ışıklar kapatılır. Karanlık dönemde deney yapılacak ise loş kırmızı ışığın kullanılması (~7-10 lüks) gerekmektedir. Örnekleme için, 3'ten fazla, ideal olarak her 4 saatte bir örnekleme yapılarak 24 saat boyunca çoklu zaman noktası çalışmaları (örn. n=6) tercih edilmelidir. Bu sayede biyolojik ritimler daha kapsamlı bir

şekilde değerlendirilir. Bu şekilde 24 saatlik ritimler tespit edilebilir ve ritim parametreleri olan ve aşağıda tanımları verilen mesor, amplitüd ve akrofaz hesaplanabilir, pik ve çukur noktalar belirlenebilir.

- Mesor: Ritmin orta doğrusunu tahmin istatistiğidir. Veriye en iyi uygunlaştırılmış kosinüs fonksiyonunun tepe ve çukur değerlerini temsil eden orta değerdir. M değeri, bütün döngü sayılarını kapsayan eşit uzaklıktaki verilerin aritmetik ortalamasına eşittir
- Amplitüd: Genlik olarak da bilinir. Veriye kosinüs eğrisinin en iyi uygunlaştırılması ile elde edilen ritmik değişiklik düzeyinin (tepe ve çukur değerleri) yarı ölçüsü veya sirkadiyan bir dalganın orta değeri ile pik (veya çukur) değeri arasındaki fark olarak tanımlanmaktadır.
- Akrofaz: Kosinüs eğrisinde, tanımlanmış bir referans zaman noktasına göre tepe (doruk) zamanını temsil eden değerdir.
- Pik: Zamanın bir fonksiyonu olarak elde edilen ölçüm dizisindeki en yüksek noktadır.
- Çukur: Zamanın bir fonksiyonu olarak elde edilen ölçüm dizisindeki en alçak noktadır.

SANCAR LAB ile olan Bulgularımız (kısa özet)

Prof. Dr. Aziz Sancar (Kuzey Karolayna Üniversitesi) ile yaptığımız ortak çalışmamızda, bir antineoplastik ajan olan oksaliplatin farmakokinetiği ve toksisitesi üzerine hem uygulama zamanı hem de saat geni *Kriptokrom* (*Cry*) bağımlı değişikliklerin incelenmesi ve olası mekanizmanın aydınlatılması amaçlandı.

Çalışmada kullanılan *Kriptokrom* (*Cry*) 1 ve 2 nakavt fareler Prof. Dr. Sancar tarafından laboratuvarımıza gönderilmiş ve üretimleri tarafımızca yapılmış ve deneyler yerel etik kurul tarafından onaylanmıştır. Kontrol grubu olarak yabanıl tip (wild type, WT) fareler kullanıldı. Fareler, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsünde (LD 12:12) tutuldu. Deneylerin başlamasından 3 gün önce ise tüm fareler sürekli karanlık (DD) koşullarına alındı ve deney süresince bu koşullarda tutuldu. Çalışmamızda 3 gün boyunca sabit karanlıkta tutulan (*Cry*) 1 / 2 geni nakavt olan (*Cry* DKO; Double KO) ve WT farelere tek doz ve yinelen dozda (3 gün, günde tek sefer) oksaliplatin 12 mg/kg dozda, i.p. yoldan CT8 ve CT16 olmak üzere iki sirkadiyan zamanda uygulandı. İlaca bağlı toksisite; mortalite ve kilo kaybı ile değerlendirildi. DD rejiminde ritim verici olmadığından, ZT yerine CT (circadian time) kullanıldı. DD rejiminde nakavt farelerin dinlenme-aktivite ritmi bozulmaktadır.

Kronofarmakokinetik çalışma için, tek ve yinelenen dozda oksaliplatin uygulaması sonrası farelerden 24. saate kadar kan ve karaciğer dokuları toplandı. Farmakokinetik parametreler hesaplanarak uygulama zamanı ve kriptokrom bağımlı değişiklikler değerlendirildi. Oksaliplatin miktar tayini indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS) kullanılarak gerçekleştirildi. Üç gün boyunca 12 mg/kg i.p. oksaliplatinin uygulanmasının ardından, farelerin karaciğerinde ise RNA dizileme çalışması yapıldı. Karaciğer örneklerinden RNA kullanılarak izole edildi ve kaliteli RNA örnekleri RNA dizileme analizi için kütüphane hazırlamak amacıyla kullanıldı. Kütüphanelerin sekanslaması Illumina platformu (Macrogen, Hollanda) ile gerçekleştirildi.

Bulgularımız, *Cry* DKO farelerin oksaliplatine karşı toleranslarının azaldığına ve bu durumun, vücut ağırlığında anlamlı kayıplar ile kendini gösterdiğine işaret etmektedir. Bu azalan tolerans, farklı sirkadiyen saatlerde de gözlemlendi ve bu da sirkadiyen ritmin ilaç

yanıtını düzenlemede önemli rolü olduğunu gösterdi. Ayrıca, *Cry* genlerinin yokluğu, sirkadiyen toksisite profilini bozmuştur. Bu durum, ilaç tolerabilitesi için sağlam bir sirkadiyen saatin gerekliliğini yeniden ortaya koymaktadır.

CT8'de ilaç uygulanan WT fareler, CT16'da uygulama yapılan WT farelere kıyasla anlamlı düzeyde daha fazla kilo kaybı yaşadı. Oksaliplatinin 3 gün boyunca uygulanması ile tek doz uygulamasına benzer bir kilo kaybı profili gözlemlendi. Dozlama zamanına bağlı kilo kaybı farkı, tekrarlayan doz uygulamasıyla daha da belirginleşti. Dikkat çekici bir şekilde, bu sirkadiyen toksisite kalıbı *Cry* DKO farelerde kayboldu. Özellikle, WT farelerde en iyi tolere edilen zaman olan CT16'da yapılan tek ve tekrarlayan doz uygulamaları, *Cry* genlerinden yoksun farelerde WT'lere kıyasla daha fazla kilo kaybına yol açtı.

Tüm deney gruplarında, tek doz sonrası vücut ağırlığı kaybı ile ilaç maruziyeti arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmedi. Ancak, CT16'da yinelenen doz uygulanan *Cry* DKO farelerinde, oksaliplatin plazma ve karaciğerde 24 saat boyunca birikti. Bu grup farelerde en fazla vücut ağırlığı kaybı yaşandı. WT farelerde CT8'de yapılan tekrarlayan doz uygulamaları CT16'ya kıyasla daha fazla kilo kaybına neden oldu ve bu da artan ilaç birikimiyle ilişkiliydi.

RNA dizileme çalışmasında, oksaliplatin detoksifikasyonundan sorumlu glutatyon S-transferaz genlerinin (*Gst*) ekspresyonlarında, WT ve *Cry* DKO farelerde ilaç uygulama zamanına bağlı önemli farklılıklar görülmüştür. Kemoterapiye duyarlılık/direnç ve antikanser ilaç toksisitesi büyük ölçüde vücuttaki detoksifikasyon enzimleri tarafından belirlenir. Bu enzimlerin farklı ekspresyon düzeyleri, çalışmamızdaki deney grupları arasındaki oksaliplatin konsantrasyon farklarında etkili olmuş olabilir. Oksaliplatin, diğer platin türevi ilaçlar gibi, glutatyon S-transferaz (GST) ailesine ait enzimler tarafından detoksifiye edilir. GSTP1 alt sınıfının oksaliplatin detoksifikasyonu ve platin bileşiklerine karşı dirençte doğrudan rol oynadığına dair güçlü kanıtlar mevcuttur. GSTP1'e ek olarak, GSTM1 ve GSTT1 aktivitesi de bu süreçte kısmen rol oynayabilir. Bu enzimlerin gen ekspresyonundaki değişiklikler, hücresel düzeyde platin atılımını etkileyerek, oksaliplatin duyarlılığını değiştirebilir.

Çalışmamızda, üç günlük oksaliplatin uygulaması sonrası yapılan RNA dizileme analizleri, dozlama zamanı ve *Cry*-bağımlı farklılıkların oksaliplatin duyarlılığı ve farmakokinetiğinde etkili olabileceğini gösterdi. Yinelenen doz çalışmasında *Cry* DKO farelerinde detoksifikasyon bozulmuş ve bu durum ilacın maruziyetini artırmıştır. CT16'da tedavi edilen WT farelerde Gstm2, Gstm3 ve Gstm7 gen ekspresyonlarındaki artış, bu gruptaki detoksifikasyon kapasitesinin artmasına ve dolayısıyla ilaç maruziyetinin azalmasına neden olduğunu düşünmekteyiz.

Sancar Lab ile olan çalışmamız, sirkadiyen ritmin oksaliplatinin farmakokinetiği ve toksisitesinin düzenlenmesindeki kritik rolünü ortaya koymuştur. Çalışmamızda oksaliplatinin zaman-bağımlı toksisitesinin *Cry* DKO farelerinde ortadan kalkması dikkat çekicidir. Sirkadiyen ritmin kaybı, ilaç metabolizması/detoksifikasyonunu bozabilir. RNA dizileme analizleri, *Cry*-bağımlı ve dozlama zamanına bağlı mekanizmalarla ilişkili olarak, oksaliplatin duyarlılığı ve farmakokinetiğinde gen ekspresyon değişikliklerinin etkili olabileceğini ortaya koydu. Özellikle Gstm2, Gstm3 ve Gstm7 genlerinin WT farelerde, mutant farelere kıyasla artmış ekspresyonu, daha etkili detoksifikasyona katkı sağlayabilir. Bulgularımız, sirkadiyen saat ile antikanser ilaçlara farmakolojik yanıt arasındaki karmaşık ilişkiyi göstermektedir. Altta yatan mekanizmaların tam olarak aydınlatılması için daha

fazla araştırmaya ihtiyaç duyulsa da, bu çalışma kanser tedavilerinin geliştirilmesi ve optimizasyonunda sirkadiyen ritmin göz önünde bulundurulmasının önemini vurgulamaktadır. Sonuç olarak, ilaç yanıtında sirkadiyen düzenlemenin daha iyi anlaşılması, kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerine ve kanser hastaları için daha iyi sonuçlara kapı aralayabilir.

KAYNAKLAR

1. Cederroth CR et al. Medicine in the fourth dimension. Cell Metab., 2019; 30:238- 250.
2. Halberg F. Chronobiology. Annu Rev Physiol., 1969; 31:675-725.
3. Portaluppi ve ark. Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. Chronobiol Int 2010; 27:1911-1929.
4. Okyar A (2024) Sirkadiyen Ritim ve Kronoterapötik Yaklaşımlar. İçinde: B. Gümüşel, M. Babaoğlu, M. Melli (Ed.) "Kayaalp Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji- Bölüm: XIII-108" Ankara: Pelikan Kitabevi; 1779-1783.
5. Abacıoğlu N. (1999). A general approach to chronobiology and cardiovascular system rhythms. İçinde: N. Abacıoğlu ve H. Zengil (Ed.), "Fundamentals of Chronobiology and Chronotherapy", Ankara: Palme Yayıncılık; 1-14.
6. Lemmer B. Discoveries of rhythms in human biological functions: a historical review. Chronobiol Int, 2009; 26(6): 1019-1068.
7. Lévi, F & Schibler U. Circadian rhythms: Mechanisms and therapeutic implications. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007; 47, 593-628.
8. Aguilar-Roblero ve ark. (2015). Mechanisms of circadian systems in animals and their clinical relevance. Içinde "Mechanisms of Circadian Systems in Animals and Their Clinical Relevance". https://doi.org/10.1007/978-3-319-08945-4
9. Brown S, & Azzi A. (2013). Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. Içinde A. Kramer & M. Merrow (Ed.), Circadian Clocks, Handbook of Experimental Pharmacology (s. 45–66). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0
10. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Merrow M (2003) Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. J Biol Rhythms 18(1):80–90.
11. Sancar A & Van Gelder RN (2021) Clocks, cancer, and chronochemotherapy. Science. https:// doi.org/10.1126/ science.abb0738
12. Öztürk N. (2015). mTOR inhibitörü everolimusun kronotoksisitesinin farelerde incelenmesi. İstanbul Üniv. Sağlık Bili. Ens., Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul
13. Okyar A & Öztürk Civelek ve ark. The role of the circadian timing system on drug metabolism and detoxification: an update. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2024 ;20(6):503-517.
14. Akyel ve ark. The impact of circadian rhythm disruption on oxaliplatin tolerability and pharmacokinetics in Cry1−/−Cry2−/− mice under constant darkness. Arch Toxicol 2025; 99(4):1417-1429.
15. Vitaterna M, Selby C, Todo T ve ark. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(21):12114–12119.
16. Lévi F & Okyar A ve ark. Circadian regulation of drug responses: Toward sex- specific and personalized chronotherapy. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2024; 64:89-114.

Gezi Rehberi:
İkinci Bayezid Külliyesi-Sağlık Müzesi, Lozan Anıtı/EDİRNE

İKİNCİ BAYEZİD KÜLLİYESİ

Edirne merkezdeki Yeniimaret semtinde bulunan II. Bayezid Külliyesi 1484-1488 yılları arasında yapılmış olup, mimarı konusunda fikir birliği bulunmamaktadır; bazı araştırmacılara göre mimar Hayrettin tarafından yapılmıştır. Külliye'nin içinde şu üniteler bulunmaktadır:

1- Darüşşifa (Hastane)
2- Tabhane (Misafir ve Dinlenme Evi)
3- Tıp Medresesi (Temel Bilimler Fakültesi)
4- Camii
5- İmaret (Mutfak, yemekhane, depo, v.s)
6- Köprü (Tunca Nehri üzerinde)
7- Hamam
8- Değirmen ve su deposu
9- Sıbyan Mektebi (İlkokul)
10- Mehterhane (Dönemin musiki konservatuarı)
11- Muvakkithane (Günün saatlerini, takvimi bildiren kuruluş)

Bu ünitelerden günümüze kadar ayakta kalmış olanlar 1'den 6 numaraya kadar yazılmış olanlardır; 7'den 11 numaraya kadar belirtilenler yıkılmışlardır; 9, 10 ve 11 numarada belirtilenler ise külliyenin vakfiyesinde gösterilmemiş olup, bunlar sonradan yapılmışlardır.

SAĞLIK MÜZESİ

Sağlık Müzesi Sultan II. Bayezid Külliyesi Darüşşifası bünyesinde hayata geçirilmiş olup, Trakya Üniversitesi'nin kültürel miras ve korumacılık alanında gerçekleştirdiği en büyük projelerden biridir. 1488 yılında hizmete giren bu külliyenin medresesi, döneminin temel tıp bilimlerinin öğretildiği bir üniversite konumunda olup hastanesinde öğrencilere uygulama yaptırılırdı. Edirne'nin Ruslar tarafından işgal edildiği Osmanlı-Rus Savaşı sonrası başlayan, Balkan Savaşları ile zirveye ulaşan Edirne'nin kötü günleri, külliye gibi birçok yapının da sahipsiz kalmasına yol açmıştır. Cumhuriyet sonrası yaşanan ekonomik sıkıntılar nedeniyle yıkılıp yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalan tarihimizin bu önemli yapılarından biri olan II. Bayezid Külliyesi, 1984 yılında Trakya Üniversitesi'ne devredilmiş ve kapsamlı bir restorasyon sonrası eğitim alanları olarak kullanılmaya başlanmıştır.

1997 yılında müzeye dönüştürülen külliyenin darüşşifa bölümü, dünyanın en prestijli müzecilik ödüllerinden olan Avrupa Konseyi 2004 Yılı Avrupa Müze Ödülü'nü alarak önemli bir tanıtım fırsatı yakalamıştır. Burada, 500 yıl öncesinin bir *"Osmanlı bimarhanesi"* (Bimar: Hasta, Hane: Ev) canlandırılmıştır. Tedavide, dönemin hekimlik bilgilerinin yanı sıra müziğin, su sesinin, güzel kokuların ve meşguliyetin kullanıldığı bu yapı, geçmişi zengin bir görsel anlatımla günümüze taşımaktadır.

Hastanenin Kuruluş Yıllarındaki Kadrosu: Hastane kadrosunda, 1 baştabip, 2 tabip, 2 göz mütehassısı, 2 operatör, 1 eczacı bulunmaktaydı. Diğer personelle birlikte personel sayısı toplam 21'e ulaşmaktaydı. Çeşitli dönemlerde bu personel sayısında değişiklikler olmuştur.

Müze Darüşşifa ve Tıp Medresesi olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır.

Darüşşifa

Birinci Avlu: İlk avlunun bulunduğu birinci bölümde geçmişte poliklinik odaları olarak kullanılan sütunlar yanındaki sıra odalarda, çeşitli sergiler yer almaktadır. Hizmet Odaları olarak kullanılan mutfak, çamaşırhane ve şuruphane gibi odalarda ise, darüşşifanın eski mutfağı canlandırılmıştır. Burada ayrıca eski Edirne fotoğrafları sergisi vardır. Aynı avluda geçmişte eczane ve ilaç depoları olarak kullanılan 2 geniş salonun birinde hekimliğin tarihini anlatan bir sergi bulunmakta, karşısındaki oda ise hem sunum odası hem de Edirne Sarayı çizimlerinin sergilendiği bir oda olarak kullanılmaktadır.

İkinci Avlu: İkinci avluda küçük bir bahçe ve karşılıklı yer alan 4 oda vardır. Bu odalar geçmişte yönetici odaları olarak kullanılmıştır.

Şifahane: Üçüncü bölüm geçmişte hastaların yatırıldığı bölümdür. Burada 4 yazlık, 6 kışlık oda ve bir musiki sahnesi vardır. Ortadaki havuzun şadırvanından su akmaktadır. Geçmişte ruh hastalarının musiki, su sesi ve güzel kokularla tedavi edildiği bu mekân akustiği ile ünlüdür.

Tıp Medresesi
Geçmişte tıp medresesi olarak kullanılan ve dönemin hekimlerinin yetiştirildiği bu bölümde 18 öğrenci odası, bir dershane ve bunların açıldığı bir orta avlu vardır. Bu bölüm bekçi odası, öğrenci odaları, uygulamalı eğitim odası, müderris odası, dershane ve kütüphane olarak kullanılmıştır.

Avrupa Müze Ödülü
Müze 2004 yılında Avrupa Konseyi Avrupa Müze Ödülü'nü kazanmıştır. Bu ödül dünyanın en prestijli müzecilik ödüllerinden biridir. 2005 yılında ise Hırvatistan'ın Dubrovnik kentinde yapılan "Dünya Ödüllü Müzeler Buluşması'nda" en iyi ikinci sunum, 2008 yılında ise Almanya'nın Köln kentinde "En İyi Sunum Ödülü"nü alarak ülkemizin ve kültürümüzün tanıtımına büyük bir katkı daha sağlamıştır. Müze Avrupa Kültür Mirası Birliği tarafından "Mükemmellik Kulübü'ne" kabul edilmiştir.

LOZAN ANITI

Edirne Karaağaç Semtinde bulunan Trakya Üniversitesi Rektörlüğü alanı içerisinde yer almaktadır. Anıtın dikilmesinde Trakya Üniversitesi ve Edirne Valiliği ile diğer kuruluşlar önemli bir çaba sarfetmişlerdir.

Lozan Antlaşması ile Karaağaç'ın tekrar Türk topraklarına kazandırılmasını ve Lozan Antlaşmasında kazanılan diplomatik zaferi temsil etmektedir. Müzenin bulunduğu yerleşke içerisinde Lozan Anıtı dikilmesi Üniversite Senatosu'nun 27.11.1996 tarih ve 7 numaralı kararı ile alınmış ve gerekçe olarak da "Meriç nehrinin Yunanistan tarafındaki Karaağaç bölgesini Savaş Tazminatı olarak Cumhuriyet topraklarına katılmasının" Lozan Barış Antlaşması ile olduğu vurgulanmıştır. Anıtın bitişiğinde ise Lozan Müzesi bulunmaktadır. Lozan Anıtı'nın temeli 29 Mart 1998'de atılmıştır. 19 Temmuz 1998'de dönemin Cumhurbaşkanı Süleyman Demirel tarafından ziyarete açılan Lozan Anıtı üç yüksek sütundan oluşur. Birincisinin yüksekliği 36,45 metredir ve Anadolu'yu sembolize eder. İkincisi 31,95 metredir ve Trakya'yı simgelemektedir. Üçüncüsü ise 17,45 metre uzunluğu ile Karaağaç'ın simgesidir. Beton çember birliği, genç kız figürü estetik, zarafet ve hukuku, kızın elindeki güvercin barış ve demokrasiyi, diğer elindeki belge de Lozan Antlaşmasını sembolize eder.

Anıtın yanında bulunan Lozan Müzesi, günün her saatinde ziyarete açıktır. Lozan Anıtı son yıllarda Edirne'nin en çok ziyaret edilen noktalarından olup, Kurtuluş Savaşımızın bir özeti, gururumuzun ve barışa dönük çağrımızın göstergesidir.

Çetin Hakan KARADAĞ, Ruhan TOPUZ