

NKUBAP.23.GA.18.160 No' lu Proje

**KÜNT GÖĞÜS TRAVMASI SONRASI
GELİŞEN KARDİYAK HASARDA KAFEİK
ASİT FENETİL ESTER (CAPE) 'NİN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yürütücü: Dr. Öğr. Üyesi Nurcan BIÇAKÇI

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Ayşe Handan DÖKMECİ

Öğr. Gör. Dr. İhsan KARABOĞA

Arş. Gör. Zeynep FİDANOL ERBOĞA

ÖNSÖZ

Künt göğüs travması sonucu gelişen kardiyak kontüzyon önemli bir klinik komplikasyon olup spesifik bir tedavisi yoktur. Literatürde kardiyak kontüzyon hasarına karşı tedavi etkinliği incelenen ajan sayısı sınırlıdır.

Bu çalışmada künt göğüs travması sonucu meydana gelen kardiyak hasara karşı önemli bir arı ürünü olan propolisin güçlü biyoaktif maddelerinden Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)' nin tedavi etkinliği incelenmiştir. Çalışmada CAPE' nin künt göğüs travması sonucu gelişen kardiyak kontüzyon hasarını engellediği farklı yöntemlerle ortaya koyulmuştur.

Bu çalışma Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (NKUBAP) tarafından desteklenmiştir (Proje no; NKUBAP.23.GA.18.160).

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER LİSTESİ	4
TABLolar LİSTESİ	5
ÖZET	6
ABSTRACT	7
GENEL BİLGİLER	8
GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
BULGULAR	13
TARTIŞMA VE SONUÇ	18
KAYNAKLAR.....	21

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kalp dokusu histopatolojik inceleme bulguları	13
Şekil 2. Kalp dokusunda TNF- α boyamasına ait görüntüler.....	14
Şekil 3. Kalp dokusu iNOS immünohistokimyasal boyaması	15
Şekil 4. Kalp dokusunda TUNEL boyama bulguları	16

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. CAPE uygulamasının serum CK, CK-MB, LDH ve C-TI seviyelerine etkisi 17

ÖZET

Bu çalışmada künt göğüs travması sonrası meydana gelen kardiyak hasar üzerine Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'nin etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmada 40 adet erişkin erkek wistar albino sıçan 4 gruba ayrıldı; kontrol, kardiyak kontüzyon, kardiyak kontüzyon+CAPE ve CAPE. CAPE (10 µmol/kg) uygulaması kardiyak kontüzyon oluşumunu takiben 7 gün boyunca intraperitoneal olarak gerçekleştirildi. Deney süresinin sonunda, anestezi altında sıçanlardan kalp dokusu ve kan alındı. Kardiyak histopatoloji hematoksilin-eozin (H&E) boyama ile belirlendi. Kardiyomiyositlerde Tümör Nekrozu Faktörü-alfa (TNF-α) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonu indirekt immünohistokimya ile gösterildi. Kardiyak apoptozis TUNEL yöntemi ile gösterildi. Spektrofotometrik yöntem kullanılarak serum Kreatin kinaz (CK), kreatin kinaz-kas / beyin (CK-MB) ve laktat dehidrojenaz (LDH) düzeyleri belirlendi. Serum Kardiyak Troponin I (C-TI) düzeyi ELISA yöntemi ile belirlendi. Kardiyak kontüzyon grubu kardiyomiyositlerinde miyofibril kaybı saptandı. Kardiyak kontüzyon grubunda kontrol grubuna göre artmış apoptoz, iNOS ve TNF-α ekspresyonu gözlemlendi. Ayrıca, kardiyak kontüzyon grubunda artmış CK, CK-MB, LDH ve C-TI düzeyleri saptandı. CAPE uygulaması hem histolojik hem de biyokimyasal bulgularda anlamlı bir azalmaya neden oldu. Çalışmanın sonuçları, künt göğüs travmasından sonrasında gelişen kardiyak kontüzyon hasarında CAPE'nin tedavi edici etkilerini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler; Kafeik asit fenetil ester, kardiyak kontüzyon, TNF-α, CK-MB, apoptozis

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on cardiac damage after blunt chest injury. Forty adult wistar albino male rats were divided into 4 groups; control, cardiac contusion, cardiac contusion + CAPE and CAPE group. CAPE (10 $\mu\text{mol/kg}$) was administered intraperitoneally for 7 days following cardiac contusion formation. At the end of the experiment period, heart tissue and blood were obtained from the rats under anesthesia. Cardiac histopathology was determined by hematoxylin-eosin (H&E) staining. Expression of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in cardiomyocytes were demonstrated by indirect immunohistochemistry. Cardiac apoptosis was demonstrated by the TUNEL method. Serum Creatine kinase (CK), Creatine kinase-muscle/brain (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) levels were determined by spectrophotometric method. Serum Cardiac Troponin I (C-TI) level determined by ELISA method. Myofibril loss was detected in the cardiomyocytes of the cardiac contusion group. Increased apoptosis and TNF- α expression were observed in the cardiac contusion group compared to the control group. Also, increased CK, CK-MB, LDH and C-TI levels were determined in cardiac contusion group. CAPE administration resulted in a significant reduction in both histological and biochemical findings. The results of the study demonstrate the therapeutic effects of CAPE in cardiac contusion damage after blunt chest trauma by different methods.

Key words; Caffeic acid phenethyl ester, cardiac contusion, TNF- α , CK-MB, apoptosis

GENEL BİLGİLER

Travma nedenli ölümler, tüm yaş gruplarındaki ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler sistem hastalıkları ve kanserden sonra üçüncü sırada gelmektedir (Jones 1980). Travmanın temel sebepleri; motorlu taşıt kazaları, düşmeler, ateşli silahlar, kesici ve delici aletler, yangınlardır. Travma sonrası ölümler, temelde motorlu taşıt kazaları (%32), ateşli silah yaralanmaları (% 22) ve düşmelerdir (% 9) (Sirmali ve ark. 2003). Tüm travma olguları içinde baş-boyun ve ekstremiteler travmalarından sonra üçüncü sıklıkta göğüs travmaları görülmektedir (Battistella ve Benfield 2000). Künt travma sonrası oluşan ölümlerin %25'inden göğüs travmaları sorumludur (Jones 1980) .

Kardiyak kontüzyon, künt göğüs travmasının ölümcül olabilen bir komplikasyonudur (Kamdar ve ark. 2011). Özellikle motorlu araç kazaları kardiyak kontüzyon sebepleri arasında en yaygın olanıdır ve travma sonrası teşhis kriterlerine göre aralığı %8 ile %76 arasındadır (El-Chami ve ark. 2008; Patil ve ark. 2013). Künt göğüs travması sonrası kardiyak hasara sebep olan kardiyak kontüzyon, hematomlar, ventriküler rüptürler, ventriküler septal defektler vasküler lezyonlar, tromboz, vazokonstriksiyon ve kapakçık defektleri gibi hasarlara yol açarak hemodinamik akışın bozulmasına ve aritmilere yol açabilir (Kuśmierczyk ve ark. 2013). Kardiyak hasarın teşhisi ve hızlı müdahale çok önemlidir. Klinikte kardiyak kontüzyonun tedavisinde esas olarak destekleyici tedaviler, sıvı lepleşmanı, inotropik ve antiaritmik ilaçlar kullanılmaktadır. Kardiyak kontüzyona karşı spesifik bir ajan henüz geliştirilememiştir (Malangoni ve ark. 1994; Demir ve ark. 2014). Bu sebeple histopatolojik ve moleküler tasarlanmış çalışmalar kardiyak kontüzyon tedavisinde etkin ilaçların geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Literatürde künt göğüs travma modeli sıkça kullanılmaktadır. Bu metot belli bir yükseklikten, belirli ağırlıkta cismin serbest düşme hareketi şeklinde bırakılmasıyla meydana gelen enerjinin göğüs üzerine aktarılması temeline dayanmaktadır. Aktarılan Enerji (E), $E=m.g.h$ formülü ile hesaplanır (m=serbest bırakılan cismin kütlesi (kg), g= yer çekim ivmesi= 9,8, h=yükseklik. Bu çalışmada Raghavendran ve diğ. (2005) 'in bilateral kontüzyon modeli kullanılmıştır.

Literatürde künt göğüs travması kaynaklı kardiyak kontüzyon hasarına karşı etkinliğini incelenen sınırlı sayıda ajan bulunmaktadır. Demir ve ark. (2014) künt göğüs travması uyarımlı kardiyak kontüzyon modelinde quercetin ve metildiprednisolon' un etkinliğini incelemişlerdir. Kombine olarak verilen quercetin ve metildiprednisolon' un kardiyak histopatolojik bulguları azalttığını ortaya koymuşlardır (Demir ve ark. 2014). Quercetin ve metildiprednisolon tedavisi uygulanan gruplarda serum Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve kardiyak troponin I (C-TI) seviyesinin anlamlı derecede azaldığını bildirmişlerdir.

Duran ve ark. (2014) aynı model üzerinde aminoguanidin ve metilprednisolon'un etkilerini incelemişlerdir. Bu ajanların kardiyak kontüzyon hasarında histopatolojik hasarı azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca künt göğüs travmasının C-TI seviyesinde artışa ve kalp dokusunda antiapoptotik etki gösteren Bcl-2'nin ekspresyonunda azalmasına sebep olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada, künt göğüs travmasının sebep olduğu kardiyak kontüzyon hasarına karşı literatürde antioksidan ve antiinflamatuvar rolleri farklı araştırmalarda ortaya konmuş olan CAPE' nin terapotik rolü incelenmiştir. CAPE, işçi bal arılarının ürettiği,

farklı bitkilerden topladıkları biyoaktif bileşenlerden oluşan propolisin bileşiminde bulunur. Yapılan çalışmalarda CAPE'nin antiinflamatuvar, antioksidan, antibakteriyel, antiviral gibi birçok farmakolojik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Ho ve ark. 2014). Ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarına karşı kalp dokusunda CAPE'nin koyucu özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir (İlhan ve ark. 2014).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda küt göğüs travması sonrası gelişen kardiyak kontüzyona karşı CAPE'nin olası tedavi etkinliğinin histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Namık Kemal Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde (NKUDHUAM) gerçekleştirildi. Namık Kemal Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu (NKUHADYEK) onayı alınarak deney protokolüne başlandı (Tarih: 17/10/2017- Karar no: 7). Sıçanlar standart laboratuvar koşullarında (22 ± 2 °C, %60 nem, 12/12 karanlık aydınlık siklusu) içme suyu ve standart pellet yemle beslendi. Çalışmada 40 adet erişkin, 250-300 g vücut ağırlığına sahip erkek sıçan kullanıldı. Çalışma kapsamında 4 farklı deneysel grup oluşturulması planlandı. Deney grupları ve uygulamalar şu şekildedir;

1. Kontrol grubu (n=10); hiçbir uygulama yada tedavi yapılmayan grup.
2. Kardiyak kontüzyon grubu (n=10); Kontüzyon modeli uygulanan ve tedavi verilmeyen grup.
3. Kardiyak kontüzyon + CAPE grubu (n=10); Kontüzyon modeli uygulanan ve 10 $\mu\text{mol/kg}$ dozda CAPE (intraperitoneal) verilen grup.
4. CAPE kontrol grubu (n=10); Kontüzyon oluşturulmadan 10 $\mu\text{mol/kg}$ dozda CAPE (intraperitoneal) verilen grup.

Künt göğüs travması işlemi Kardiyak kontüzyon ve Kardiyak kontüzyon+CAPE gruplarına aşağıda açıklandığı gibi uygulandı. Hayvanlara genel anestezi ve sedasyon uygulandıktan sonra Raghavendran ve ark. (2005)' nin tanımladığı prosedüre göre supin pozisyonda platform üzerinde sabitlenen sıçanların sağ hemitoraksı üzerine düşecek şekilde 50 cm yükseklikten 400 g ağırlıktaki metal silindir serbest düşme hareketi ile bırakıldı. $E=m.g.h$ formülüne göre; E=Enerji (Joule), m=düşen cismin kütlesi (kg), g=yer çekim sabiti (9.8 m/s^2) toplamda 1.96 J'lük enerjinin aktarılması sağlandı.

Kardiyak kontüzyon oluşturulan sonra CAPE tedavisi alacak 3. gruba ve kontüzyon oluşturulmadan CAPE tedavisi alacak olan 4. gruba 7 gün boyunca CAPE 10 $\mu\text{mol/kg}$ dozda intraperitoneal olarak uygulandı (Akıl ve ark. 2016).

Yedinci günün sonunda sıçanlar ketamin-ksilazin (90-10 mg/kg) anestezisi altında orta hattan açılarak kalpten kan alındı ve kalp dokusu elde edildi. Kan serumları elde edilip biyokimyasal analizler için -80°C ' de muhafaza edildi. Kalp dokusu histopatolojik-immünohistokimyasal incelemelerde kullanılmak üzere rutin histolojik takip yöntemleri kullanılarak takip edildi.

Kalp dokusunun fiksasyon işlemi %10' luk nötral formalin içerisinde 48 saat bekletilmesiyle gerçekleştirildi. Fiksasyon işlemi sonrasında dokular bir gece çeşme suyu ile yıkandı. Ardından artan alkol serisi (% 60-70-80-90-96-100) ile dehidrate edildi ve ksilole alındı. Ksilol ile şeffaflandırma işlemi sonrasında sırasıyla eriyik halde bulunan yumuşak parafin ve sert parafine alınarak parafin inklüzyonu sağlandı. Parafin dispenser cihazı (Slee, MPS, Darmstat, Almanya) yardımıyla parafin bloklar edildi. Elde edilen bloklardan yarı motorize mikrotom (Slee, Cut 5062, Mainz, Almanya) ile 5 μm kalınlığında elde edilen seri kesitler Hematoksilin-Eozin (H&E) ve immünohistokimyasal boyamalarda kullanıldı.

Kalp dokusunda meydana gelen histopatolojik değişikliklerin belirlenmesi H&E boyanmış kesitlerde gerçekleştirildi. Ksilol ile deparafinize edilen kesitler azalan alkol serisinden (% 100-96-90-80-70-60) geçirilerek suya indirildi. Çeşme suyu ile 5 dk

yıkandıktan sonra Hematoksilen solüsyonu ile 5 dk boyunca muamele edildi. Boyanın fazlası çeşme suyu altında alındıktan sonra kesitler 5 dk süre boyunca Eozin ile muamele edilip tekrar çeşme suyu ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra dehidrasyon işlemi artan alkol serisi ile yapılarak kesitler ksilol içerisine alındı. Bir saatlik şeffaflandırma işleminin ardından entellan yardımıyla kesitler kapatıldı.

iNOS ve TNF- α immünohistokimyasal boyamasında indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanıldı. Poly-L-Lisin kaplı lamalar üzerine alınan kalp dokusu kesitleri iNOS (136918, Cambridge, MA, USA) ve TNF- α (NBP1-19532, Novus Biologicals, Littleton, CO, ABD) antikoları ile işaretlendi. Kesitler, toluol ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra düşen (%100-90- 96-80- 70) alkol serisinden geçirilerek suya alınan kesitler fosfat buffer solüsyonunda (PBS) 3x5 dakika yıkandı. Antijen geri kazanımı aşaması sitrat buffer içerisine alınan doku kesitlerinin mikrodalga fırında kaynatılması ile gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında soğuma işlemi tamamlandıktan sonra PBS ile 3x5 dakika yıkanarak, endojen peroksidaz aktivesini baskılamak için distile su ile hazırlanan %3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂) çözeltisinde 10 dakika bekletildi. Lamlar 3x5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra özgül olmayan bağlanmaları engellemek için pappen ile havuz oluşturulan kesitler üzerine blok solüsyonu 30 dakika süreyle uygulandı. Blok serumun uzaklaştırılmasının ardından Üretici firma primer antikolar (iNOS; 1/100, TNF- α ;1/100 dilüsyonda) oda ısısında nemli chamber içerisinde uygulandı. Primer antikor uygulaması sonrasında kesitler PBS ile yıkandı. Sonrasında biotinli sekonder antikorla 10 dakika nemli chamber içerisinde inkübe edilerek PBS ile yıkandı. HRP- streptavidin ile nemli chamber içerisinde 10 dakika muamele edilen kesitler PBS ile yıkandı. Tüm immünohistokimyasal işaretlemelede kromojen olarak AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) kullanıldı. PBS ile yıkanan kesitler su bazlı kapatma medyumunu ile kapatılıp ışık mikroskop altında incelenmeye hazır hale getirildi.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla TUNEL boyaması MerckMilipore S7101 ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit kullanılarak yapıldı. Parafin bloklardan lam üzerine alınan 5 μ m' lik kesitler 1 gece 37 °C' lik etüvde tutulduktan sonra toluolde 3x5 dk bekletilerek parafinden iyice arındırılarak azalan alkol serilerinden (%100, %95, %70) 3'er dk geçirilip distile suya indirildi. 5 dk distile suda tutulan kesitlere daha sonra antijen iyileştirme amacıyla 15 dk oda ısısında proteinaz K (20 μ g/ml, Chemicon, 21627) uygulandı. Distile su ile yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivesini baskılamak için metanolde hazırlanan %3' lük H₂O₂' de 5 dk bekletildi. Distile su ve PBS ile çalkalandıktan sonra lam üzerinde kesitlerin etrafı hidrofobik kalem (Zymed, 00-8899) ile çizilerek havuz oluşturuldu ve kesitlere 5 dk oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler 37 °C' de TdT enziminde 1 saat bekletildikten sonra durdurma/yıkama tamponuyla 15 saniye çalkalandı ve oda ısısında 10 dk bekletildi. PBS ile yıkanan kesitlere antidigoksinin konjugatı uygulandı ve oda ısısında 30 dk tutuldu. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk diaminobenzen (DAB) kromojen solüsyon uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 3 dk Mayer's Hematoksilen uygulanarak zıt boyama yapıldı. Toluol içerisinde parlatma aşaması yapıldıktan sonra lamlar kapatma medyumunu yardımıyla lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda değerlendirmeye alındı.

Kan örnekleri 5 dakika boyunca 4000 rpm devirde (Thermo / Heraeus LoboFuge 400 R, Thermo Scientific, Langenselbold, Almanya) santrifüj edildi ve serum örnekleri biyokimyasal analiz için - 80 ° C' de saklandı. Kreatin kinaz (CK), CK-MB ve laktat

dehidrojenaz (LDH) serum seviyeleri, üreticinin talimatlarına göre yarı otomatik biyokimyasal analiz cihazı (Cobas c501, Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana) kullanılarak ölçüldü. Serum C-TI düzeyi, bir kit kullanılarak sandviç ELISA yöntemi ile belirlendi (Rat TNNI3 / Kardiyak Troponin I ELISA Kiti - LS-F37394, LSBio, Seattle, WA).

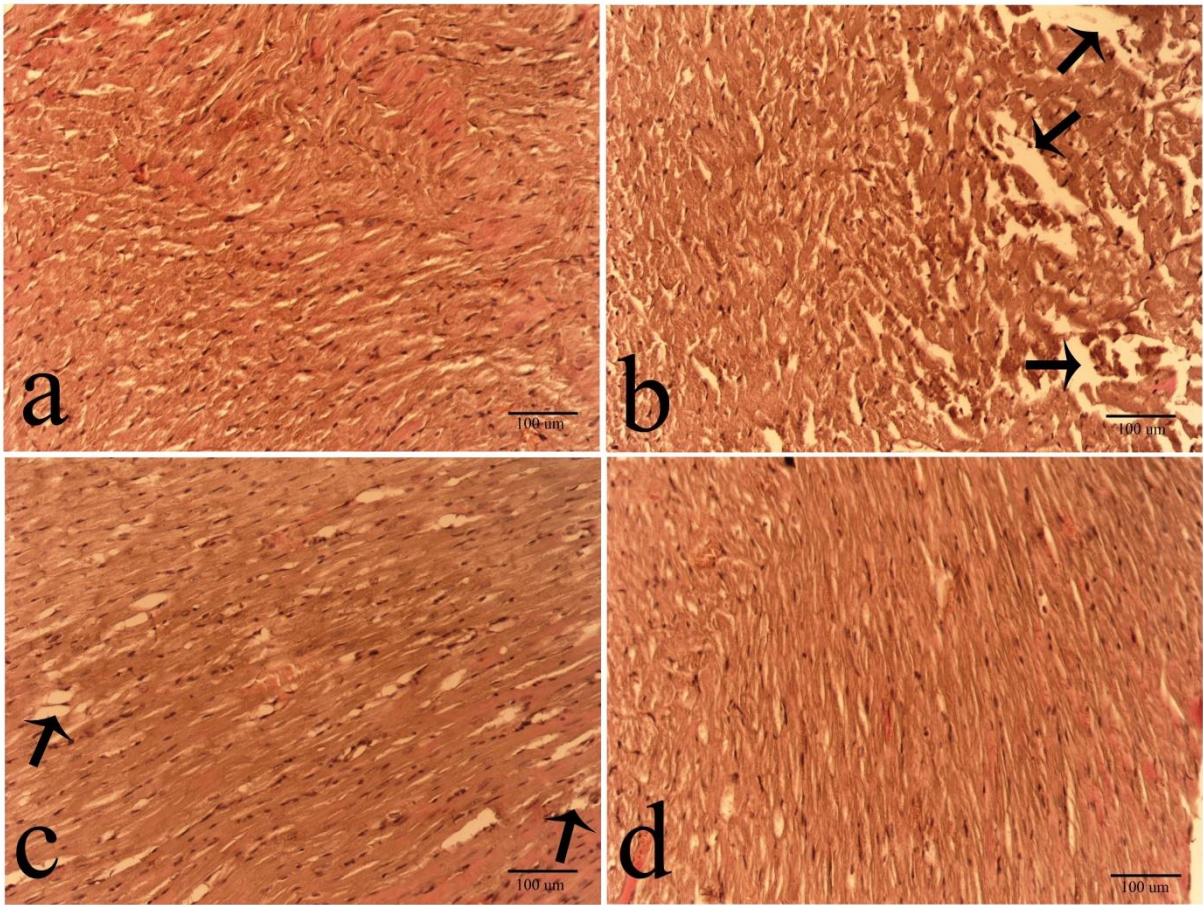
Elde edilen preparatlar Olympus BX40 kamera ataçmanlı mikroskop ve görüntü analiz programıyla (Kameram 2.1. Argenit, İstanbul, Türkiye) değerlendirildi. iNOS ve TNF- α boyanma yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirildi (0; boyanma yok, 1; zayıf, 2; orta ve 3; güçlü). Histopatolojik, immünohistokimyasal ve apoptotik boyamalar NKU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD laboratuvarında; C-TI, CK, CK-MB ve LDH parametrelerinin analizleri Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı ve NKU Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi.

İstatistiksel analiz: Sayısal değerler SPSS programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm veriler ortalama standart sapma değerleri ile ifade edildi. Gruplara ait sayısal parametreler non-parametrik test (Kruskal-Wallis) kullanılarak değerlendirildi. İki yönlü karşılaştırma yapılan gruplarda elde edilen değerlerin anlamlılığı Mann-Whitney U-testi ile ölçüldü. Gruplar arasındaki fark 0.05'ten daha az olduğu durumda anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Histopatolojik bulgular

Kontrol grubu kalp dokusu incelendiğinde kardiomyositlerin normal histolojik görünümüne sahip oldukları izlendi. Kas liflerinin düzenlenmesi sağlıklı doku yapısına uygun olarak gözlemlendi (Şekil 1a). Kardiyak kontüzyon grubunda yer yer nekroz, kas liflerinin düzenli seyrinde bozulmalar ve miyofibriller kayıplar olduğu izlendi (Şekil 1b). Kardiyak kontüzyon+CAPE grubunda ise kardiyak kontüzyon grubuna kıyasla histopatolojik değişikliklerin azalmış olduğu izlendi (Şekil 1c). CAPE grubunun kontrol grubu ile benzer histolojik yapı sergilediği gözlemlendi (Şekil 1d).

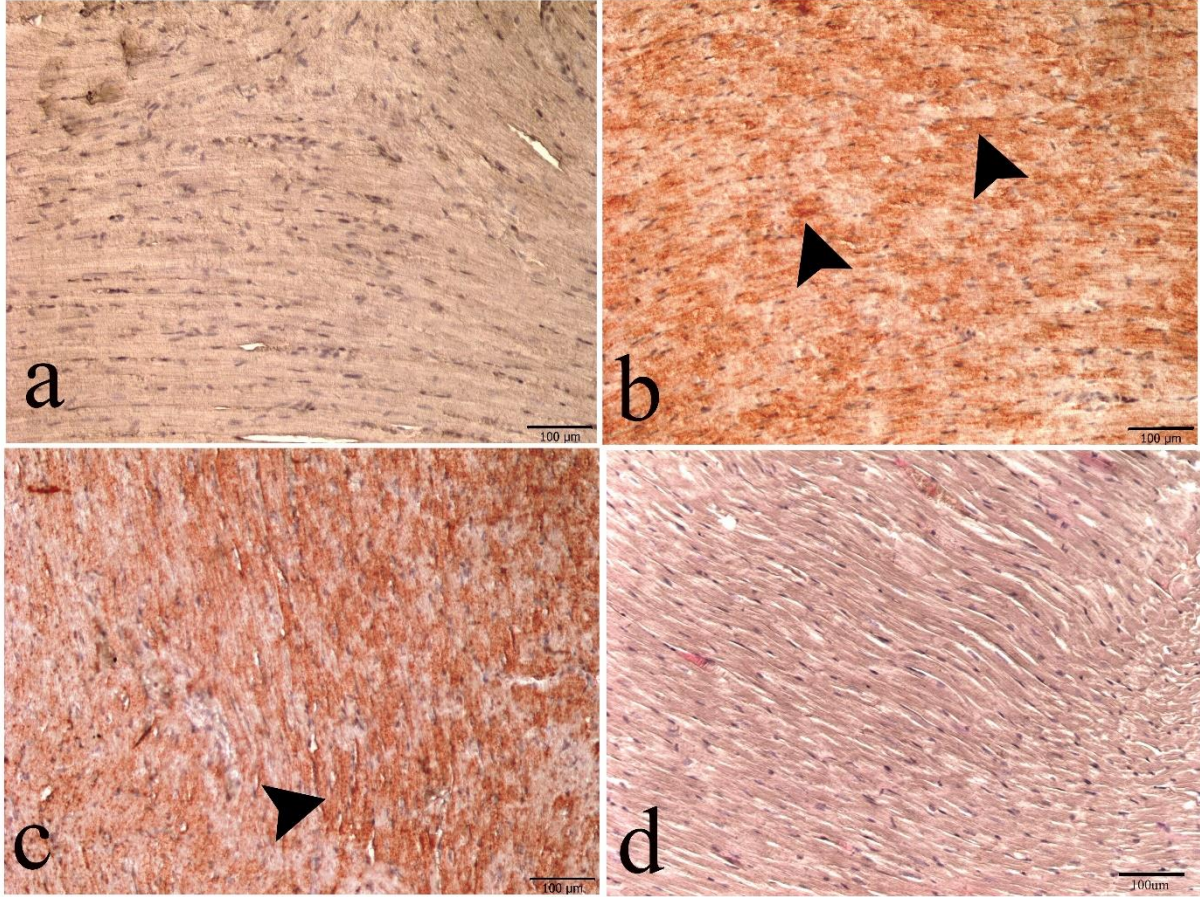


(a; kontrol, b; kardiyak kontüzyon, c; kardiyak kontüzyon+CAPE, d; CAPE, oklar; nekrotik alanlar, bar; 100 µm, H&E boyama)

Şekil 1. Kalp dokusu histopatolojik inceleme bulguları

İmmünohistokimyasal bulgular

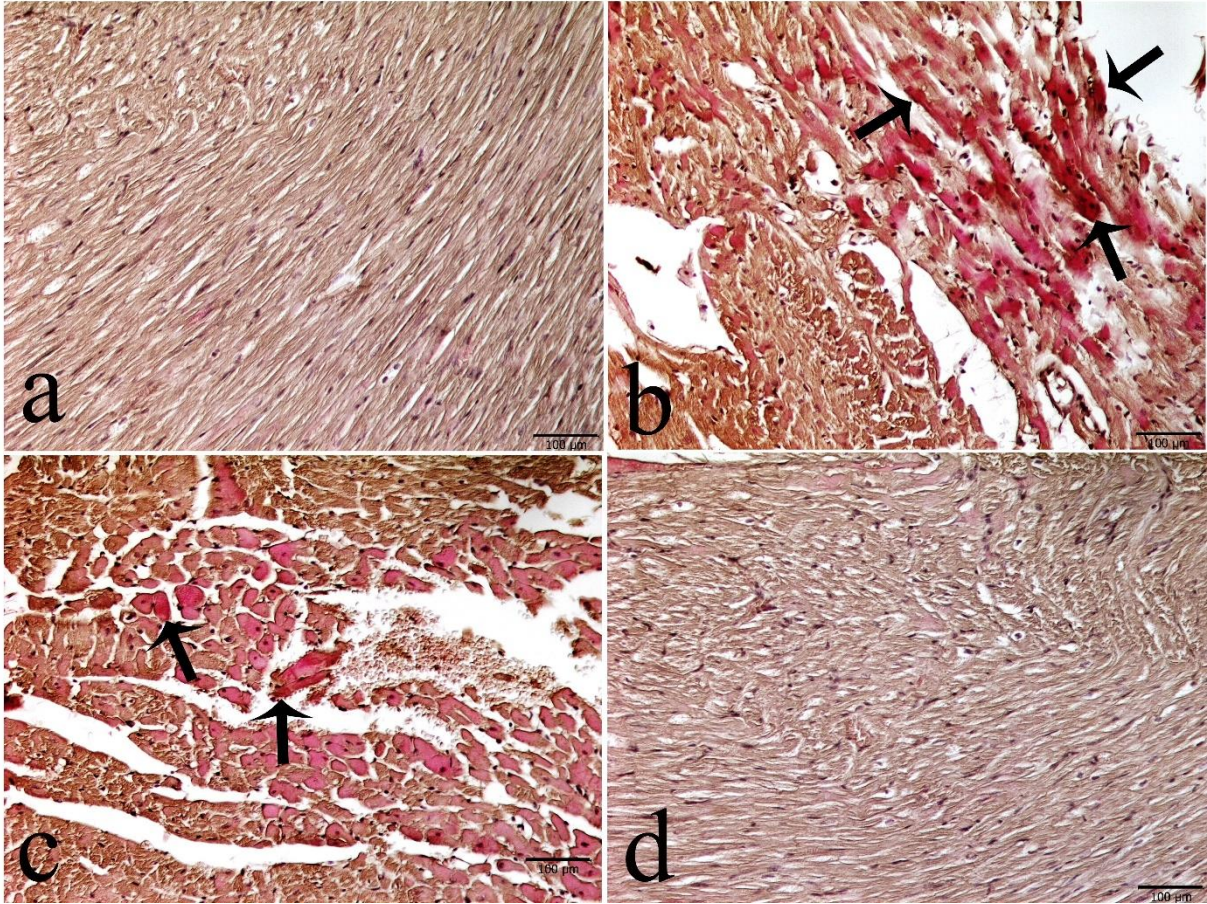
TNF- α immünreaktivitesi bulguları incelendiğinde Kontrol ve CAPE grubunda pozitif boyanma olmadığı görüldü (Şekil 2a-d). Kardiyak kontüzyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış olduğu görüldü (Şekil 2b). Kardiyak kontüzyon+CAPE grubunda ise Kardiyak kontüzyon grubuna kıyasla TNF- α immünreaktivitesinde anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 2c).



(a; kontrol, b; kardiyak kontüzyon, c; kardiyak kontüzyon+CAPE, d; CAPE, okbaşı; TNF- α pozitif boyanan kardiyomiyositler, bar; 100 μ m)

Şekil 2. Kalp dokusunda TNF- α boyamasına ait görüntüler

iNOS immünohistokimyasal boyama bulguları incelendiğinde Kontrol ve CAPE gruplarında zayıf iNOS immünreaktivitesi izlendi (Şekil 3a-d). Kardiyak kontüzyon grubunda ise boyanmanın istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu belirlendi (Şekil 3b). Kardiyak kontüzyon+CAPE grubunda ise Kardiyak kontüzyon grubuna göre anlamlı derecede bir azalma olduğu belirlendi (Şekil 3c).



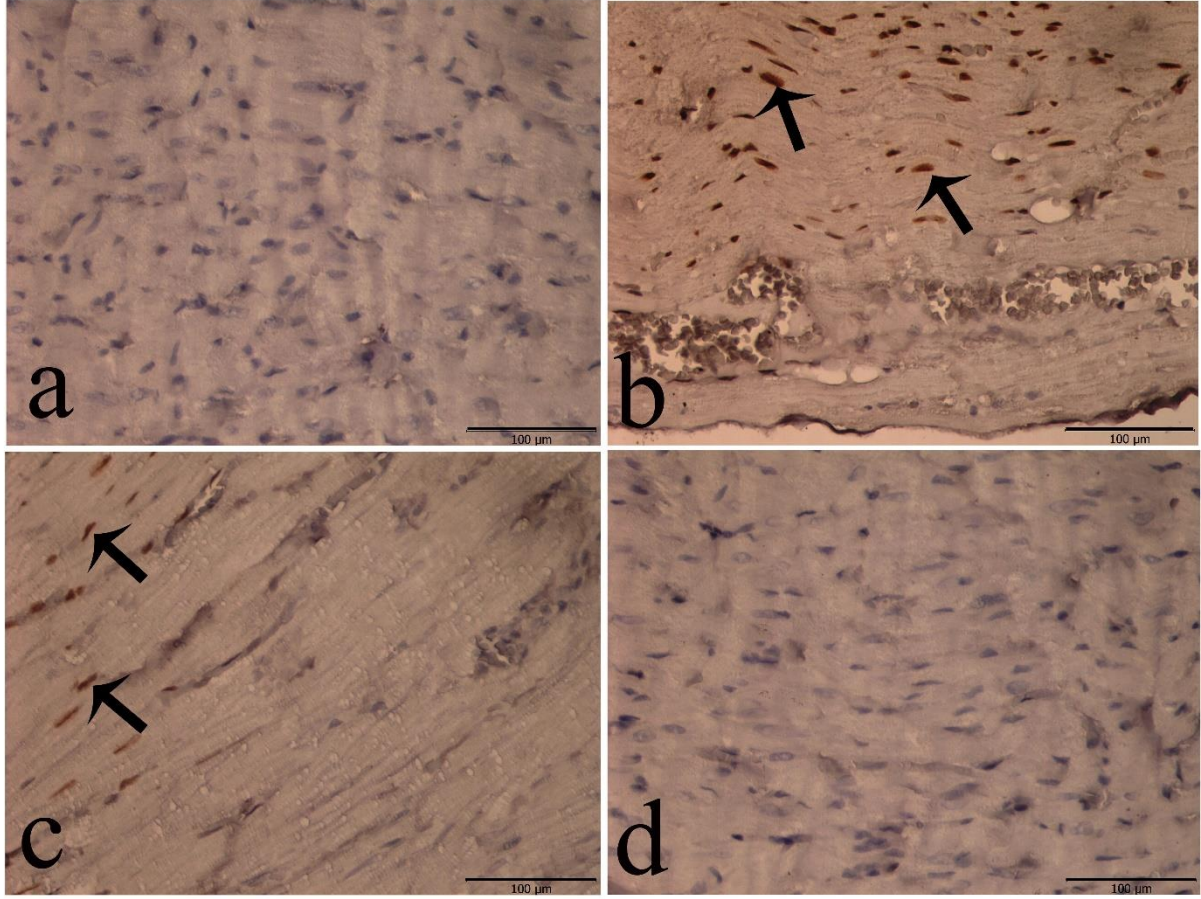
(a; kontrol, b; kardiyak kontüzyon, c; kardiyak kontüzyon+CAPE, d; CAPE, oklar; iNOS pozitif boyanan kardiyomiyositler, bar; 100 µm)

Şekil 3. Kalp dokusu iNOS immünohistokimyasal boyaması

TUNEL boyama bulguları

Kardiyomiyositlerde meydana gelen apoptozis kırık DNA uçlarını işaretlemeye yarayan TUNEL metodu ile belirlendi. TUNEL boyamada pozitif hücrelerin çekirdekleri koyu kahverengi olarak izlendi.

Kontrol ve CAPE grubunda TUNEL pozitif hücreler hücre çok nadir gözlenebilirken özellikle kardiyak kontüzyon grubunda TUNEL pozitif hücre sayısındaki artış belirgin olarak izlendi (Şekil 4b). Kardiyak kontüzyon+CAPE grubunda ise TUNEL pozitif hücreler kardiyak kontüzyon grubuna kıyasla daha seyrek olarak izlendi (Şekil 4c).



(a; kontrol, b; kardiyak kontüzyon, c; kardiyak kontüzyon+CAPE, d; CAPE, oklar; iNOS pozitif boyanan kardiyomiyositler, bar; 100 µm)

Şekil 4. Kalp dokusunda TUNEL boyama bulguları

Biyokimyasal bulgular

Gruplara ait serum CK, CK-MB, LDH ve C-TI seviyeleri Tablo 1' de verilmiştir. Künt göğüs travması grubunda, kontrol grubuna kıyasla CK, CK-MB, LDH ve C-TI enzim seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi ($p < 0.01$). CAPE tedavisinin tüm kardiyak enzim düzeylerinde, kardiyak travma grubuna göre anlamlı bir azalma sağladığı belirlendi ($p < 0.01$).

Tablo 1. CAPE uygulamasının serum CK, CK-MB, LDH ve C-TI seviyelerine etkisi

Grouplar	CK (IU/L)	CK-MB (IU/L)	LDH (IU/L)	C-TI (pg/ml)
Kontrol	154.7 ± 42.8	195.4 ± 32.8	144.1 ± 29.1	346.6 ± 67.7
Kardiyak kontüzyon	339.9 ± 93.3*	390.4 ± 65.2*	225.7 ± 27.9*	514 ± 43.9*
Kardiyak kontüzyon+CAPE	162.8 ± 59.3**	232 ± 80.2**	155.3 ± 38.8**	360.1 ± 32.4**
CAPE	168.9 ± 28.1	201.3 ± 37	166.8 ± 48.5	322.2 ± 50.9

Veriler ortalama±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir

CK: Creatine kinase, CK-MB: Creatine kinase – muscle/brain, LDH; lactate dehydrogenase, C-TI: cardiac troponin I, CAPE; Caffeic acid phenethyl ester, *, p < 0.01 kontrol grubu ile kıyaslandığında, **, p < 0.01 kardiyak travma grubu ile kıyaslandığında

TARTIŞMA VE SONUÇ

Travma, 40 yaşın altındaki kişilerde önde gelen ölüm nedenlerinden birisidir. Kardiyovasküler yaralanmalar, merkezi sinir sistemi yaralanmalarından sonra ikinci ölüm nedenidir. Her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 30.000 kardiyak travma vakası gerçekleşmektedir (Kalbitz ve ark. 2017). Künt kapalı göğüs travması klinik serisinde, saptanması güç olmakla birlikte, kardiyak hasar insidansının % 8 ile % 76 arasında olduğu bildirilmiştir (Feghali ve Prisant 1995). Bu geniş aralık, temel olarak kullanılan tanı ölçütlerindeki farklılıktan ve bu tanı için altın standart test olmamasından kaynaklanmaktadır. Öte yandan majör künt travmadan sonra ölen hastaların otopsi çalışmalarında, kardiyak kontüzyon insidansı % 14 ile % 16 arasında bulunmuştur (Wisner ve ark. 1990; El-Chami ve ark. 2008).

Motorlu taşıt kazaları, künt travmanın en önemli nedenidir, vakaların % 81' ini oluşturur, bunu ezilme yaralanmaları izler (% 5.7) (Van Wijngaarden ve ark. 1997). Kardiyopulmoner resüsitasyon çalışmaları sırasında göğüs kompresyonları da kalp yaralanmasına neden olabilir (El-Chami ve ark. 2008).

Kalp yaralanmasının mekanizması, kinetik kuvveti hastaya ileterek göğüs duvarı üzerinde doğrudan etki ile başlayan ve sternum ile omurga arasındaki kalbin sıkışmasına neden olan bir dizi olaydan oluşur (Orliaguet ve ark. 2001).

Künt göğüs travması sonrası kalpte, miyokardiyal kontüzyon, miyokardiyal rüptür, valvüler bozulmalar ve büyük damarlara veya koroner arterlere zarar da dahil olmak üzere geniş bir potansiyel yaralanma potansiyeli vardır. Ayrıca perikard tutulumu ve disritik komplikasyonlar ortaya çıkabilir (El-Chami ve ark. 2008).

Bu deneysel çalışmada sıçan künt göğüs travması sonrasında meydana gelen kardiyak kontüzyon hasarına karşı CAPE' nin kardiyak hasarı önleyici etkisi histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle ortaya koyulmuştur.

Çalışmamızda kardiyak kontüzyon hasarı histopatolojik olarak H&E boyama yöntemi ile ortaya konmuştur. Önceki çalışmalara benzer olarak kardiyak kontüzyon grubu kardiyomiyositlerde nekroz ve miyofibriller kayıp bulguları gözlenmiştir (Duran ve ark. 2014). CAPE uygulaması yapılan grupta histopatolojik bulgular açısından kardiyak kontüzyon grubuna belirgin bir azalma izlenmiştir.

Künt göğüs travması, inflamatuvar bir cevabı tetikleyerek lokal ve sistemik inflamasyonu tetikleyebilir (Hoth ve ark. 2006). Bu durum nötrofil ve makrofajların aktivasyonunu tetikler, reaktif oksijen türlerinin (ROS), proteolitik enzimlerin ve sitokinlerin salınımını artırır (Türüt ve ark. 2009). Göğüs travmasını takiben, İnterlökin - 1 Beta (IL-1 β), İnterlökin-6 (IL-6) ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin sentezi artmaktadır (Wu ve ark. 2012; Wu ve ark. 2013).

Güçlü bir proinflamatuvar sitokin olan TNF- α , romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalıkları, kanser, diyabet ve kardiyomiyopati gibi birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynar (Shanmugam ve ark. 2016; Karaboga ve ark. 2017). TNF- α ' nın fibroblastlar, makrofajlar ve kardiyomiyositler gibi hücrelerden salındığı, inflamatuvar mediatörlerin ve sitokin aracılı nötrofil göçünün salınımı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bradley 2008; Chen ve ark. 2014). TNF- α , reseptörlerine (TNFR1 ve TNFR2) bağlanarak; oksidatif stres, nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonu, NF-kB ve apoptozis aktivasyonu gibi birçok hücrel süreçleri düzenler (Ozsoy ve ark. 2008; Varfolomeev ve Vucic 2008).

Nitrik oksit (NO), Nitrik oksit sentazın (NOS) katalizinde yer alan, birçok biyolojik etkiye sahip bir haberci moleküldür (Chen ve ark. 2015). Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir rol oynar (Chen ve ark. 2013). NOS' un 3 tipi bulunmaktadır, bunlar iNOS, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nöral nitrik oksit sentaz (nNOS)' tur (Tian ve ark. 2013). Kalp ve birçok dokuda inflamasyon durumunda iNOS aktivitesinde artış meydana gelmektedir (Otani 2009; Demir, Güzel et al. 2014; Chen ve ark. 2015; Karaboğa ve ark. 2017). Demir ve ark. (2014) ile uyumlu olarak çalışmamızda da kardiyak kontüzyon oluşturulan grupta kontrol grubuna kıyasla iNOS aktivitesinde anlamlı bir artış izlenmiştir. CAPE uygulaması ise iNOS aktivitesinde anlamlı bir azalma sağlamıştır.

Çalışmamızın sonuçlarına paralel olarak, daha önceki çalışmalarda künt göğüs travması modelinde artmış TNF- α ekspresyonu bildirilmiştir (Karaboğa 2018; Demir ve ark. 2014). Çalışmamızda, CAPE uygulamasının immünohistokimyasal olarak TNF- α ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Hepatorenal oksidatif hasar, demans, ülseratif kolit gibi birçok farklı deney modelinde CAPE' nin TNF- α sentezini azalttığı ve doku hasarını önlediği bildirilmiştir (Fitzpatrick ve ark. 2001; Çakır ve ark. 2011; Kumar ve ark. 2017).

İn vivo ve in vitro çalışmalar, kardiyak apoptoz ile TNF- α ekspresyonunun ilişkili olduğunu bildirmiştir. Yu ve diğ. TNF- α 'nın kardiyomiyosit hücre kültüründe NF-kB ve P38 Mitojen ile aktive olmuş protein kinazlar (MAPK) yollarını aktive ederek apoptosisi indüklediğini göstermiştir (Yu ve ark. 2014). Benzer şekilde Wang ve ark (2015) TNF- α 'nın kardiyomiyosit hücre kültüründe kaspaz-3 ve kaspaz-12' yi aktive ederek apoptosisi tetiklediğini göstermişlerdir (Wang, Zhao et al. 2015). Duran ve ark. künt göğüs travması ile indüklenen kardiyak yaralanma modelinde artmış proinflamatuvar iNOS ve anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Duran ve ark. 2014). Bizim çalışmamızda kardiyak apoptozis TUNEL yöntemi ile gösterilmiştir. Kardiyak kontüzyon + CAPE grubunda, kardiyak kontüzyon grubuna kıyasla, CAPE tedavisi apoptotik hücre sayısında anlamlı bir düşüşe neden olmuştur ($p < 0.05$).

Elektrokardiyografi ve anjiyografi gibi yöntemlerin yanı sıra klinik ve deneysel çalışmalarda kardiyak hasarı belirlemek için kardiyak hasar biyobelirteçleri, LDH, CK, CK-MB ve C-TI seviyelerinin belirlenmesi sıkça kullanılmaktadır (Yu ve ark. 2014; Bodor 2016). CK, CK-MB ve LDH kardiyomiyositlerde bulunan sitoplazmik enzimlerdir. Bu enzimlerin serum seviyesini artması, kardiyomiyosit hücre zarında meydana gelen hasarın belirteci olarak kabul edilir (Cheng ve ark. 2018). C-TI, kardiyomiyositlerin miyofibriler kontraktıl aparatının düşük moleküler ağırlıklı bir protein bileşenidir ve aktin-miyozin miyofilamentlerinin degradasyonu ile artan serum seviyeleri ile güçlü bir kardiyak hasar göstergesidir (Joukar ve ark. 2014; Dhivya ve ark. 2017). Miyokardiyal iskeminin modelinde Cheng ve ark. histopatolojik bulgularla uyumlu olarak kardiyak enzim (CK, CK-MB, LDH, C-TI) sentezi ve TNF- α ekspresyonunda anlamlı bir artış bildirmişlerdir (Cheng ve ark. 2018). Ayrıca, TNF- α 'daki artışın Bax ve kaspaz-3 aktivasyonunu uyararak kardiyak apoptozu artırdığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, kardiyak kontüzyon grubunda daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak LDH, CK, CK-MB ve C-TI düzeylerinde artış saptanmıştır (Demir ve ark. 2014; Duran ve ark. 2014). CAPE tedavisi hem histopatolojik bulguları hem de kardiyak hasar biyobelirteçlerini önemli ölçüde iyileşme sağlamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada künt göğüs travması sonucu kalp dokusunda nekroz ve miyofibriler kayıp gibi histopatolojik değişiklikler saptandı. CAPE uygulaması kardiyak dokudaki histopatolojik değişikliklerin azaltmasının yanı sıra kardiyak hasar belirteçleri (CK, CK-MB, LDH ve C-TI) ve TNF- α ekspresyonunda iyileşme sağlamıştır. Bulgular, künt göğüs travmasını takiben uygulanan CAPE' nin kardiyak kontüzyona karşı koruyucu etkisini açıkça göstermektedir. CAPE kardiyak hasarı önleyici bir ajan olarak kullanılabilir, ancak ayrıntılı mekanizmasının aydınlatılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Akil, M., Coban, F. K., & Yalcinkaya, O. (2016). The Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Fortification on the Liver Element Distribution that Occurs After Exercise. *Biological trace element research*, 172(2), 419-423.
- Battistella, F. and J. R. Benfield (2000). "Blunt and penetrating injuries of the chest wall, pleura and lungs." *General thoracic surgery*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 815-831.
- Bodor, G. S. (2016). "Biochemical markers of myocardial damage." *Ejifcc* **27**(2): 95.
- Bradley, J. (2008). "TNF-mediated inflammatory disease." *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* **214**(2): 149-160.
- Chen, H., Y. Xu, et al. (2015). "Baicalin ameliorates isoproterenol-induced acute myocardial infarction through iNOS, inflammation and oxidative stress in rat." *International journal of clinical and experimental pathology* **8**(9): 10139.
- Chen, J., C. Huang, et al. (2013). "The effects of carvedilol on cardiac structural remodeling: The role of endogenous nitric oxide in the activity of carvedilol." *Molecular medicine reports* **7**(4): 1155-1158.
- Chen, Z. W., J. Y. Qian, et al. (2014). "TNF- α -induced cardiomyocyte apoptosis contributes to cardiac dysfunction after coronary microembolization in mini-pigs." *Journal of cellular and molecular medicine* **18**(10): 1953-1963.
- Cheng, Y., J. Tan, et al. (2018). "Cardioprotective effects of total flavonoids from Jinhe Yangxin prescription by activating the PI3K/Akt signaling pathway in myocardial ischemia injury." *Biomedicine & Pharmacotherapy* **98**: 308-317.
- Çakır, T., E. Özkan, et al. (2011). "Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **63**(12): 1566-1571.
- Demir, F., A. Güzel, et al. (2014). "A combination of methylprednisolone and quercetin is effective for the treatment of cardiac contusion following blunt chest trauma in rats." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **47**(9): 766-772.
- Dhivya, V., L. B. Priya, et al. (2017). "Piperine modulates isoproterenol induced myocardial ischemia through antioxidant and anti-dyslipidemic effect in male Wistar rats." *Biomedicine & Pharmacotherapy* **87**: 705-713.

- Duran, L., A. Guzel, et al. (2014). "Cardioprotective effect of aminoguanidine in combination with steroid therapy after blunt chest trauma." Bratislavske lekarske listy **115**(9): 538-543.
- El-Chami, M. F., W. Nicholson, et al. (2008). "Blunt cardiac trauma." The Journal of emergency medicine **35**(2): 127-133.
- Feghali, N. T. and L. M. Prisant (1995). "Blunt myocardial injury." Chest **108**(6): 1673-1677.
- Fitzpatrick, L. R., J. Wang, et al. (2001). "Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor- κ B, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **299**(3): 915-920.
- Ho, Y.-J., A.-S. Lee, et al. (2014). "Caffeic acid phenethyl amide ameliorates ischemia/reperfusion injury and cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats." Cardiovascular diabetology **13**(1): 98.
- Hoth, J. J., J. D. Stitzel, et al. (2006). "The pathogenesis of pulmonary contusion: an open chest model in the rat." Journal of Trauma and Acute Care Surgery **61**(1): 32-45.
- İlhan, S., N. Yılmaz, et al. (2014). "The effect of caffeic acid phenethyl ester on isoproterenol-induced myocardial injury in hypertensive rats." Anadolu Kardiyol Derg **14**(7): 576-582.
- Jones, K. W. (1980). "Thoracic trauma." Surgical Clinics of North America **60**(4): 957-981.
- Joukar, S., H. Najafipour, et al. (2014). "Cardioprotective effect of mumie (shilajit) on experimentally induced myocardial injury." Cardiovascular toxicology **14**(3): 214-221.
- Kalbitz, M., E. M. Amann, et al. (2017). "Experimental blunt chest trauma-induced myocardial inflammation and alteration of gap-junction protein connexin 43." PLoS one **12**(11): e0187270.
- Kamdar, G., K. Santucci, et al. (2011). "Management of pediatric cardiac trauma in the ED." Clinical Pediatric Emergency Medicine **12**(4): 323-332.
- Karaboga, İ., S. Demirtas, et al. (2017). "Investigation of the relationship between the Th17/IL-23 pathway and innate-adaptive immune system in TNBS-induced colitis in rats." Iranian journal of basic medical sciences **20**(8): 870.
- Karaboğa, İ. (2018). "Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Suppresses Systemic Inflammation In Rat Trauma Model". J Apither, 3 (2), 31-35.

- Karaboğa, İ., Dökmeci, A.H., Ovalı, M.A., Yılmaz, A. (2017) "Etanol Uyarımlı Sıçan Akut Mide Mukoza Hasar Modelinde Hypericum Perforatum'un Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi", *Namık Kemal Tıp Dergisi*, 5(3); 99-108.
- Kumar, M., D. Kaur, et al. (2017). "Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents development of STZ-ICV induced dementia in rats." *Pharmacognosy magazine* **13**(Suppl 1): S10.
- Kuśmierczyk, M., A. Drohomirecka, et al. (2013). "Delayed diagnosis of pericardial hematoma compressing the right ventricle after blunt chest trauma." *Journal of Cardiac Surgery: Including Mechanical and Biological Support for the Heart and Lungs* **28**(6): 701-701.
- Malangoni, M. A., C. R. McHenry, et al. (1994). "Outcome of serious blunt cardiac injury." *Surgery* **116**(4): 628-632; discussion 632-623.
- Orliaguet, G., M. Ferjani, et al. (2001). "The heart in blunt trauma." *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* **95**(2): 544-548.
- Otani, H. (2009). "The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling." *Antioxidants & redox signaling* **11**(8): 1913-1928.
- Ozsoy, H. Z., N. Sivasubramanian, et al. (2008). "Oxidative stress promotes ligand-independent and enhanced ligand-dependent tumor necrosis factor receptor signaling." *Journal of Biological Chemistry* **283**(34): 23419-23428.
- Patil, R. R., D. Mane, et al. (2013). "Acute myocardial infarction following blunt chest trauma with intracranial bleed: a rare case report." *Indian heart journal* **65**(3): 311-314.
- Shanmugam, G., M. Narasimhan, et al. (2016). "A biphasic effect of TNF- α in regulation of the Keap1/Nrf2 pathway in cardiomyocytes." *Redox biology* **9**: 77-89.
- Sirmali, M., H. Türüt, et al. (2003). "A comprehensive analysis of traumatic rib fractures: morbidity, mortality and management." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **24**(1): 133-138.
- Tian, G. X., X. T. Zeng, et al. (2013). "Association between the endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and coronary heart disease: A meta-analysis of 39 case-control studies." *Molecular medicine reports* **7**(4): 1310-1318.
- Türüt, H., H. Ciralik, et al. (2009). "Effects of early administration of dexamethasone, N-acetylcysteine and aprotinin on inflammatory and oxidant-antioxidant status after lung contusion in rats." *Injury* **40**(5): 521-527.
- Van Wijngaarden, M., R. Karmy-Jones, et al. (1997). "Blunt cardiac injury: a 10 year institutional review." *Injury* **28**(1): 51-55.

- Varfolomeev, E. and D. Vucic (2008). "(Un) expected roles of c-IAPs in apoptotic and NFκB signaling pathways." *Cell Cycle* **7**(11): 1511-1521.
- Wang, Q.-L., L. Zhao, et al. (2015). "Lacidipine attenuates TNF-α-induced cardiomyocyte apoptosis." *Cytokine* **71**(1): 60-65.
- Wisner, D. H., W. H. Reed, et al. (1990). "Suspected myocardial contusion. Triage and indications for monitoring." *Annals of surgery* **212**(1): 82.
- Wu, X.-J., Z.-Y. Xia, et al. (2012). "Effects of penehyclidine hydrochloride on pulmonary contusion from blunt chest trauma in rats." *Injury* **43**(2): 232-236.
- Wu, X., X. Song, et al. (2013). "Protective effects of dexmedetomidine on blunt chest trauma–induced pulmonary contusion in rats." *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* **74**(2): 524-530.
- Yu, L., Y. Zhao, et al. (2014). "Leptin confers protection against TNF-α-induced apoptosis in rat cardiomyocytes." *Biochemical and biophysical research communications* **455**(1): 126-132.