



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PLURİPOTENT KÖK HÜCRE TEMELLİ
KARDİYOMİYOSİTLERİN RİTİM BOZUKLUĞU TEDAVİSİNE
YÖNELİK İN VIVO İNCELENMESİ**

GİZEM ÖRS

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. ESRA ÇAĞAVİ

İSTANBUL, 2019

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Tez Sahibi : Gizem ÖRS
Tez Başlığı : Pluripotent Kökenli Kök Hücre Temelli Kardiyomiyositlerin
Ritim Bozukluğu Tedavisine Yönelik İn Vivo İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Kampüsü
Sınav Tarihi : 18.01.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Kurumu

İmza

Doç. Dr. Esra ÇAĞAVİ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Yalçın

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

GÜNAL

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 28.01.2019 tarih ve 2019/04-03 sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gizem ÖRS



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgisinden ve tecrübesinden daima yararlandığım, karşılaştığım tüm zorluklara karşı beni cesaretlendiren, her daim pozitif düşünmem gerektiğini öğreten, değerli danışmanım Doç. Dr. Esra Çağavi'ye,

Tez çalışmalarımda destek olan Doç. Dr. Aylin Yaba Uçar ve Prof. Dr. Tunç Akkoç'a ve istatistik analizlerimde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Hanefi Özbek'e, akım sitometrisi analizinde yardımları için Emre Vatandaşlar'a, *in vivo* operasyonlarda değerli katkıları için Dr. Öğr. Üyesi Yalçın Günal'a, elektrokardiyografik ölçümlerde yardım ve desteği için Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kocatürk'e, tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e ve değerli tez jüri üyelerime,

Çalışma arkadaşlarım Arzuhan Koç, Sevilay Şahoğlu Göktaş, Gökçe İlayda Görgülü, Tuğçe Torun, Yusuf Enes Kazcı ve İlayda Kaya'ya,

Her istediğimde yardımına koşan, kısa zamanda çok anılar biriktirdiğim sevgili arkadaşım Zeynep Begüm Durdu'ya

İn vivo'daki değerli bilgilerini benimle paylaşan çalışma arkadaşlarım Tuba Akgül Çağlar ve Mehmet Uğurcan Turhan'a,

Lisans dönemimde hayatıma dahil olan her türlü zorluğa birlikte göğüs gerdiğim Elif Nur Yılmaz'a,

Destekleri ve yardımları için bütün REMER idari ve akademik personeline,

Haftasonu dahil her an yanımda olan ve destelerini esirgemeyen tüm MEDİTAM idari personeli ve çalışanlarına,

Desteğini her an hissettiğim, her zaman yanımda olan ve beni motive eden arkadaşım Cahit Burduroğlu'na,

Her zaman yanımda olan, maddi manevi desteğini esirgemeyen aileme ve dedeme

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEZ ONAY FORMU..... | i |
| BEYAN..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| KISALTMALAR LİSTESİ..... | viii |
| TABLolar LİSTESİ..... | x |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | xi |
| RESİMLER LİSTESİ | xiii |
| 1 ÖZET | 1 |
| 2 ABSTRACT..... | 2 |
| 3 GİRİŞ VE AMAÇ..... | 3 |
| 4 GENEL BİLGİLER | 7 |
| 4.1 Embriyonik Kök Hücre (EKH) | 7 |
| 4.2 Fare EKH Temelli Kardiyomiyosit Farklılaşma Metodları..... | 8 |
| 4.3 Kalp Gelişimi | 9 |
| 4.4 SA Nodu, AV Nodu ve Kalpte Elektriksel Akımın İletilmesi | 11 |
| 4.5 Elektrokardiyografi | 12 |
| 4.6 In vitro Elektrofizyolojik Ölçümler..... | 15 |
| 4.6.1 Çoklu elektrod dizileri (MEA)..... | 15 |
| 4.6.2 RTCA xCELLigence CardioECR..... | 15 |
| 4.6.3 Ca ⁺² görüntüleme | 16 |
| 4.7 Kardiyak Aritmiler | 16 |
| 4.7.1 Atriyal Aritmiler..... | 16 |
| 4.7.2 Ventriküler Aritmiler | 17 |
| 4.8 UQTS ve Alt tipleri | 19 |
| 4.9 UQTS'e Yönelik Tedavi Yaklaşımları..... | 24 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.9.1 | Ablasyon yöntemi | 24 |
| 4.9.2 | İlaç tedavisi | 24 |
| 4.9.3 | İmplant edilebilen kardiyoverter defibrilatör (ICD)..... | 25 |
| 4.9.4 | Sol servikal torasik sempatektomi (LCSD)..... | 25 |
| 4.10 | Aritminin Transgenik Fare Modelleri | 26 |
| 4.10.1 | UQTS tip1 aritmi transgenik fare modelleri | 26 |
| 4.10.2 | UQTS tip 2 aritmi transgenik fare modelleri | 27 |
| 4.10.3 | UQTS tip 3 aritmi transgenik fare modelleri | 28 |
| 4.10.4 | Diğer aritmi transgenik fare modelleri..... | 28 |
| 4.11 | Kalpte Hücresel Tedavi Yaklaşımları | 29 |
| 4.12 | Hücre Kaynakları | 29 |
| 4.12.1 | Miyoblastlar | 29 |
| 4.12.2 | Embriyonik kök hücreler..... | 30 |
| 4.12.3 | Kemik iliği kaynaklı hücreler..... | 30 |
| 4.12.4 | Kardiyak kök hücreler..... | 31 |
| 4.13 | Transplantasyon Teknikleri | 32 |
| 4.13.1 | Doğrudan Enjeksiyon..... | 32 |
| 4.13.2 | İntravenöz Transplantasyon | 33 |
| 4.13.3 | Hücre Tabakası Yöntemi..... | 34 |
| 4.13.4 | 3D Doku Mühendisliği..... | 34 |
| 5 | MATERYAL VE METOT | 36 |
| 5.1 | Deney Dizaynı | 36 |
| 5.2 | Fare Soyları | 36 |
| 5.3 | Kullanılan Sarf Malzemeler ve Besiyerleri | 37 |
| 5.4 | Cihazlar | 40 |
| 5.5 | Genotip Analizi | 41 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.6 | Fare Embriyonik Fibroblast (FEF) Kültürü..... | 42 |
| 5.6.1 | FEF İzolasyonu | 42 |
| 5.6.2 | FEF Pasajı | 43 |
| 5.6.3 | FEF Hücrelerinde Mitomiyosin-C Uygulaması..... | 43 |
| 5.7 | Fare Embriyonik Kök Hücre (EKH) Hattı Oluşturulması ve Kültürü | 43 |
| 5.8 | Fare EKH'lerin Kardiyomiyosit Farklılaşması | 44 |
| 5.9 | Fare EKH Temelli Kardiyomiyositlerin Karakterizasyonu..... | 45 |
| 5.9.1 | İmmünohistokimyasal boyamalar | 45 |
| 5.9.2 | Akım sitometrisi analizleri..... | 45 |
| 5.10 | Transplante Edilecek Hücrelerin Vybrant CFDA-SE Cell Tracker Kit ile Boyanması | 46 |
| 5.11 | İn Vivo Opere Edilecek Transgenik Farelerin Hücre Transplantasyonuna Hazırlanması..... | 46 |
| 5.12 | Trakeostomi | 47 |
| 5.13 | Torakotomi | 48 |
| 5.14 | İntramiyokardiyal Enjeksiyon | 48 |
| 5.15 | EKG Kaydı Alınması | 49 |
| 5.16 | Kalp Perfüzyonu ve Doku Tespiti | 51 |
| 5.17 | İmmünohistokimyasal Boyamalar..... | 52 |
| 5.18 | İstatistiksel Analizler | 52 |
| 6 | BULGULAR..... | 54 |
| 6.1 | Transgenik Farelerin Çoğaltılması ve Genotiplemesi..... | 54 |
| 6.2 | FEF Kültürü..... | 54 |
| 6.3 | Fare EKH Kültürü | 55 |
| 6.4 | Fare EKH'lerin Kardiyomiyosit Farklılaşması | 56 |
| 6.5 | Fare EKH Temelli Kardiyomiyositlerin ICC ve Akım Sitometrisi ile İncelenmesi..... | 57 |

| | | |
|------|---|-----|
| 6.6 | CFDA-SE Vybrant Floresan Hücre Boyaması ve Optimizasyonu | 58 |
| 6.7 | Transgenik Fare Soylarında EKG Ölçümlerinin Optimizasyonu..... | 60 |
| 6.8 | İn vivo uygulamalarda İzofloran ve Ketamin anesteziklerinin karşılaştırılması | 61 |
| 6.9 | Erişkin Transgenik Farelerde Yaş ve Genotipin Elektrokardiyografik Bulgulara Etkilerinin İncelenmesi..... | 62 |
| 6.10 | Transplantasyon Sonrası EKG ve IHC Analiz Gününün Optimizasyonu... | 63 |
| 6.11 | Aritmi Modeli Transgenik Farelerde SHAM ontrollerinin Elektrokardiyografik Verilerinin Değerlendirilmesi | 64 |
| 6.12 | Aritmi Modeli Transgenik Farelerde Fibroblast Tranplantasyonunun EKG ve IHC Değerlendirmesi | 67 |
| 6.13 | Fare EKH-temelli Kardiyomiyosit Transplantasyonunun Aritmi Modeli Transgenik Fareler Üzerindeki Elektrofizyolojik Etkilerinin İncelenmesi | 68 |
| 6.14 | Transplantasyon Sonrası Hücrelerin Takibi ve İmmünohistokimyasal Boyamalar | 77 |
| 7 | TARTIŞMA VE SONUÇ | 81 |
| 8 | KAYNAKLAR | 91 |
| 9 | ETİK KURUL ONAYI..... | 103 |
| 10 | ÖZGEÇMİŞ | 105 |

KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|--------------------|---|
| AKAP9= | A-kinaz bağlayıcı protein 9 |
| ANF= | Atriyal natriüretik faktör |
| AV= | Atrioventriküler |
| BF= | Aydınlık alan (Bright field) |
| Ca ⁺² = | Kalsiyum |
| CPVT= | Katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi |
| CTNT= | Kardiyak troponin T (Cardiac troponin T) |
| E= | Embriyonik gün |
| ECM= | Ekstraselüler matriks |
| EB= | Embriyonel cisimcik (embryoid body) |
| EKG= | Elektrokardiyografi |
| EKH= | Embriyonik kök hücre |
| FEF= | Fare embriyonik fibroblast |
| ICD= | İmlante edilebilir kardiyak defibrilatör |
| IKr= | Hızlı potasyum akımı |
| IKs= | Yavaş potasyum akımı |
| Ks= | Yavaş potasyum kanalı |
| Kv= | Voltaj kapılı potasyum kanalı |
| K ⁺ = | Potasyum |
| LVEF= | Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu |
| MEF= | Miyosit arttırıcı faktör |
| MHC= | Miyozin ağır zincir |

| | |
|-------------------|---|
| MLC= | Miyozin hafif zincir |
| MRI= | Manyetik rezonans görüntüleme |
| Na ⁺ = | Sodyum |
| PCR= | Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction) |
| PBS= | Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffered saline) |
| PFA= | Paraformaldehit |
| PKA= | Protein kinaz A |
| RyR= | Ryanodin reseptör |
| RWS= | Romano-Ward sendromu |
| TGF-β= | Transforme edici büyüme faktörü beta |
| J343= | Kcnq1 ^{A340E/A340E} fare soyu |
| JNLS= | Jervell ve Lange-Nielsen sendromu |
| J800= | Kcnq1 ^{-/-} fare soyu |
| UPK= | Uyarılmış pluripotent kök |
| UQTS= | Uzun QT sendromu |
| QTc= | Doğrulanmış QT aralığı (corrected QT) |
| VEGF= | Vasküler endotel büyüme faktörü |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 5.3.1. Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler | 37 |
| Tablo 5.3.2. Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler ve malzemeler..... | 37 |
| Tablo 5.3.3. Hücre kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri..... | 38 |
| Tablo 5.3.4. İmmün boyamalarda ve akım sitometrisinde kullanılan malzemeler ... | 39 |
| Tablo 5.3.5. Antikorlar ve floresan işaretleyiciler..... | 39 |
| Tablo 5.4.1. Analiz ve görüntüleme de kullanılan cihazlar ve yazılım programları .. | 40 |
| Tablo 5.4.2. İn vivo operasyonlarda kullanılan cihazlar ve malzemeler..... | 40 |
| Tablo 5.5.1. PCR’da kullanılan malzemeler | 41 |
| Tablo 5.5.2. Genotiplemede kullanılan PCR primerleri..... | 41 |
| Tablo 5.5.3. Genotiplemede kullanılan PCR protokolü | 42 |
| Tablo 5.5.4. Transgenik fare soylarında mutasyon blgelerinin baz boyları | 42 |
| Tablo 6.8.1. Kullanılan anestezi ajanının EKG parametrelerine etkisinin ölçülmesi. | 62 |
| Tablo 6.9.1. Transgenik fare soylarında yaşın EKG parametreleri ile ilişkisi | 62 |
| Tablo 6.9.2. Transgenik fare soylarının genotip özelliklerinin EKG parametreleri üzerine etkilerinin incelenmesi | 63 |
| Tablo 6.11.1. Açma kapama sham grubu farelerden alınan EKG verilerinin analizi | 66 |
| Tablo 6.11.2. Matrigel sham grubu farelerden alınan EKG verilerinin analizi..... | 66 |
| Tablo 6.11.3. İğne hasarı sham grubu farelerden alınan EKG verilerin analizi..... | 67 |
| Tablo 6.12.1. FEF hücresi transplante edilen J343 (Kcnq1 ^{A340E/A340E}) fare soyunda EKG verilerinin analizi | 68 |
| Tablo 6.13.1. Fare EKH temelli kardiyomyosit transplante edilen J343 transgenik farelerin EKG analizi | 69 |
| Tablo 6.13.2. Fare EKH temelli kardiyomyosit transplante edilen J800 transgenik farelerin EKG analizi | 70 |
| Tablo 6.13.3. Hücre transplantasyonu sonrası Kcnq1 ^{A340E/A340E} ve Kcnq1 ^{-/-} transgenik fare QTc verilerinde görülen değişimlerin yüzdesel gösterimi..... | 71 |
| Tablo 6.13.4. Vahşi tip farelere hücre transplantasyonu sonrası alınan EKG verilerinin analizi | 76 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 4.1.1. Embriyonik kök hücre izolasyonu ve kültürü..... | 8 |
| Şekil 4.3.1. İnsanda kalp gelişimi | 10 |
| Şekil 4.4.1. Aksiyon potansiyel grafiği..... | 12 |
| Şekil 4.5.1. EKG’de gözlenen negatif ve pozitif derivasyonların figürsel gösterimi | 13 |
| Şekil 4.5.2. EKG grafiği ve QT aralığının gösterimi | 15 |
| Şekil 4.7.1. Sinüs taşikardisi EKG grafiği | 17 |
| Şekil 4.7.2. Atriyal fibrilasyon EKG grafiği..... | 17 |
| Şekil 4.7.3. Ventriküler taşikardi EKG grafiği | 18 |
| Şekil 4.7.4. Katekolaminerjik ventriküler taşikardi EKG grafiği | 19 |
| Şekil 4.8.1. KCNQ1 iyon kanalının hücre membranındaki yerleşimi | 20 |
| Şekil 5.1.1. Tez çalışmasının grafiksel özeti | 36 |
| Şekil 6.1.1. Transgenik farelerin genotip analizi. | 54 |
| Şekil 6.2.1. FEF izolasyonu ve kültürü..... | 55 |
| Şekil 6.3.1 Fare EKH izolasyonu ve hücre hattı oluşturulması. | 55 |
| Şekil 6.4.1. Asılı damlacık yöntemiyle fare temelli EKH hücrelerinden kardiyomiyosit farklılaşması | 56 |
| Şekil 6.5.1.Fare EKH temelli kardiyomiyositlerin immünohistokimyasal karakterizasyon | 57 |
| Şekil 6.5.2. Fare EKH temelli kardiyomiyositlerin akım sitometrisi analizi..... | 58 |
| Şekil 6.6.1. Farklı konsantrasyonlarda CFDA-SE boyalı neonatal kardiyomiyositler | 58 |
| Şekil 6.6.2.Farklı konsantrasyonlarda CFDA-SE ile boyalı neonatal kardiyomiyositlerin <i>in vitro</i> ortamda uzun süreli takibi..... | 59 |
| Şekil 6.7.1. Transgenik fare EKG ölçümleri..... | 60 |
| Şekil 6.7.2. Transgenik farelerde gözlenen farklı elektrokardiyografik dalga morfolojisi | 61 |
| Şekil 6.8.1. İzofloran ve ketamin ile anesteziye alınan farelerden alınan EKG verileri. | 61 |
| Şekil 6.10.1. Kalp kesitlerinin fiksasyon öncesi ve sonrası görüntüleri. | 64 |
| Şekil 6.11.1. İn vivo deney ve kontrol gruplarının şematik gösterimi..... | 64 |

| | |
|---|----|
| Şekil 6.12.1. FEF transplantasyonu sonrası kalp kesitlerinin immünohistokimyasal boyaması | 68 |
| Şekil 6.13.1. J343 fare soyunda hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG verilerinin box plot grafiği | 72 |
| Şekil 6.13.2. J800 fare soyunda hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG verilerinin box plot grafiği | 73 |
| Şekil 6.13.3. J343 fare soyunda hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG verilerinin spagetti plot grafiği..... | 74 |
| Şekil 6.13.4. J800 fare soyunda hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG verilerinin spagetti plot grafiği..... | 75 |
| Şekil 6.13.5. Vahşi tip farelerde hücre transplantasyonu sonrası alınan EKG verileri. | 76 |
| Şekil 6.14.1. Hücre transplantasyonu sonrası doku kesitlerinin IHC boyaması..... | 77 |
| Şekil 6.14.2. Fare EKH temelli transplantasyon sonrası 7.günde IHC boyaması | 78 |
| Şekil 6.14.3. Fare EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyon sonrası 14. günde IHC boyaması | 78 |
| Şekil 6.14.4. Matrigel SHAM grubu farelerden alınan doku kesitlerinin IHC boyaması | 79 |
| Şekil 6.14.5. Hücre transplantasyonu sonrası doku kesitlerinin Cx43 ile IHC boyaması | 80 |

RESİMLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Resim 5.11.1. Cerrahi operasyon düzeneği. | 47 |
| Resim 5.12.1. Transgenik farelerin trakeostomi yöntemi ile entübasyonu. | 48 |
| Resim 5.13.1. İntramiyokardiyal hücre enjeksiyonu | 48 |
| Resim 5.15.1. Transgenik farelerden EKG kaydı alınması. EKG kayıt cihazı | 50 |
| Resim 5.15.2. Analiz edilebilir EKG ölçümü yapılabilmesi için elektrodların optimizasyonu | 51 |
| Resim 5.16.1. Kalplerin immün boyamalar öncesi perfüzyonu. | 51 |



1 ÖZET

PLURİPOTENT KÖK HÜCRE TEMELLİ KARDİYOMİYOSİTLERİN RİTİM BOZUKLUĞU TEDAVİSİNE YÖNELİK İN VIVO İNCELENMESİ

Uzun QT Sendromu (UQTS), kalp ritim bozukluklarının klinikte en sık rastlanan kalıtsal formudur. Kardiyak K⁺ kanalını kodlayan *KCNQ1* genindeki mutasyonlar, EKG ölçümlerinde QT aralığında uzama ile karakterize UQTS Tip 1'e neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında; UQTS Tip 1 transgenik fare modelinde hücre transplantasyonunun aritmi tedavisinde kullanım potansiyeli literatürde ilk olarak değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında, vahşi tip embriyonik kök hücre temelli kardiyomiyositlerin transgenik fare kalplerine intramiyokardiyal enjeksiyonu yapılmıştır. Hücresel tedavinin elektrofizyolojik etkilerini incelemek amacıyla, hücre transplantasyonu öncesi ve sonrasındaki 4. ile 7. günde alınan EKG ölçümleri, SHAM kontroller ile karşılaştırılmıştır. Bulgularımız, opere edilen transgenik farelerin, %50'sinde düzenlenmiş QT (QTc) değerinde düşüğe bağlı olarak, transplantasyonun hastalık fenotipini iyileştirici etkisini göstermiştir. Post-operatif değerlendirmelerde, transgenik farelerin %30'unda QTc değerinin değişmediği tespit edilirken %20'sinde QTc değerinde artış gözlenmiştir. Hücre transplantasyonu sonrası 7. ve 14. günde yapılan immünohistokimyasal analizler, transplante edilen hücrelerin canlı olduklarını ve kardiyomiyosit belirteci olan cTnT proteinini ürettiğini göstermiştir. Bu çalışma ile UQTS Tip 1 fare modellerinde hücresel tedavi yaklaşımı değerlendirilmiş ve hücre transplantasyonunun tedaviye yönelik iyileştirici etkileri tespit edilmiştir. Klinikte hastadan hastaya gözlenen elektrofizyolojik ve fenotip varyasyonlar ile tedaviye verilen cevabın çeşitliliği transgenik fare modellerinde de tespit edilmiştir. Tez çalışmasının ortaya koyduğu bulgular ışığında gelecekte yapılacak kliniğe yönelik translasyonel çalışmalar, aritmilerin tedavisine yönelik yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Aritmi fare modeli, elektrokardiyografi (EKG), embriyonik kök hücre temelli kardiyomiyosit, hücre transplantasyonu, Uzun QT sendromu (UQTS).

*Bu araştırma TÜBİTAK 1003 Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı tarafından 213S192 nolu Proje kapsamında desteklenmiştir.

2 ABSTRACT

IN VIVO ASSESMENT OF PLURIPOTENT STEM CELL DERIVED CARDIOMYOCYTES IN RHYTHM DISORDERS

Long QT syndrome (LQTS) is the most common hereditary form of irregular heart rhythm disorder, also known as arrhythmias. LQTS is occurred due to the mutations in cardiac ion channel coding genes. In LQTS Type-1 is the most widely observed arrhythmia in the population and is characterized by a prolongation at the QT interval because of a mutation in K⁺ channel-coding KCNQ1 gene leading to a functional defect. In the context of this thesis study, treatment potential of cell transplantation in LQTS Type-1 was tested on transgenic mouse for the first time in the literature. For this purpose, wild-type embryonic stem cell derived cardiomyocytes were injected into myocardium of transgenic mouse hearts. To understand the electrophysiological effects of the cell treatment, ECG measurements of operated mice taken before and 7 days after surgery were compared to the ECG measurements of SHAM controls. Intestingly, 50% of operated transgenic mice has shown shortened QT interval, suggesting an ameliorated disease phenotype. From all operated mice, 20% have shown an increase and 30% showed no significant difference before and after treatment. Heart tissues taken at day 7 and 14 after the operation were examined using immunohistochemical staining techniques and it was observed that cells which have integrated to myocardium were still alive and expressed cTnT protein. Through this study, cell therapy approach is tested for the treatment of LQTS Type 1 for the first time in the literature and thrapeutical effects of cell transplantation are confirmed. Together with further clinical and translational studies on large animal models have the potential to develop a novel therapeutic approach for arryhtmia treatment.

Key Words: Arrhythmia, cell transplantation, electrocardiography (ECG), embryonic stem cell derived cardiomyocytes, Long QT syndrome (LQTS).

*This study was supported by TÜBİTAK under 1003 Scientific and Technological Research Projects Funding Program by project no: 213S194.

3 GİRİŞ VE AMAÇ

Kalp hastalıkları Türkiye’de ve dünyada en fazla mortalite gözlenen hastalıkların başında gelmektedir. Kalıtsal aritmiler ve edinsel aritmiler arasında en sık rastlanan Uzun QT Sendromu (UQTS), EKG ölçümlerinde QT aralığındaki uzama ve T dalgasındaki abnormalite ile karakterize edilen bir kardiyak kanalopatidir (1). UQTS klinikte en sık görülen tipi olan UQTS Tip 1, kardiyak olayları egzersiz, duygusal stress ve hatta uyku hali tetikleyebilmektedir. Klinikte tespit edilerek literatüre aktarılan 17 alt tipi bulunan UQTS, dominant ya da resesif olarak kalıtılabilir (2). UQTS’in en sık görülen tipleri Tip 1, Tip 2 ve Tip 3’tür (3).

UQTS Tip 1 ile ilişkili *KCNQ1* geninde meydana gelen mutasyonlar, voltaj kapılı potasyum kanalının fonksiyonunu bozarak, repolarizasyonda uzamalara sebep olabilmektedir. Hasta kaynaklı kardiyak hücrelerin elde edilmesindeki zorluklar ve etik problemler nedeniyle insan hücrelerinde çalışmalar kısıtlı kalmıştır. Ancak UQTS’i modelleyebilen transgenik fare soyları bulunmaktadır (4-7). Pfeifer ve arkadaşları, 2001 ve 2004 yılında yaptıkları çalışmalarda, *KCNQ1* geninde oluşturdukları iki farklı mutasyon ile transgenik aritmi fare modelleri oluşturabilmişlerdir. Nokta mutasyonu oluşturarak ürettikleri *Kcnq1^{A340E/A340E}* transgenik fareler ile knock-out stratejisi uygulayarak oluşturdukları *Kcnq1^{-/-}* farelerde, QT, QRS ve düzenlenmiş QT (QTc) parametrelerinde, vahşi tipe göre anlamlı artış gözlemlenmiştir. Hastalığın homozigot kalıtıldığı *Kcnq1^{-/-}* farelerde, kardiyak defektin yanında, insandakine benzer olarak sağrlık ve hiperaktivite gözlemlenmiştir. Bu açıdan *Kcnq1^{-/-}* transgenik fareleri, klinikteki JLNS sendromunun fare modelidir. Pfeifer ve arkadaşları tarafından oluşturulan transgenik fare soyları, ritim bozukluğunun *in vivo* modellenmesine olanak sağlamıştır.

Embriyonik kök hücreler (EKH), blastosistlerinin iç hücre kütesinden elde edilen ve gelişimsel süreçteki tüm dokuları oluşturma potansiyeline sahip hücrelerdir. Yüksek telomeraz ve alkalen fosfataz aktivitesi, sınırsız bölünme kapasitesine sahip olmaları en karakteristik özelliklerindedir. EKH’ler, uygun şartlarda kültüre edildiklerinde mezoderm, endoderm ve ektodermi oluşturan 3 germ yaprağındaki hücrelere farklılaşabilme özelliğine sahiptirler. Bunun yanında yeniden programlama teknolojisi sayesinde, somatik hücrelerden, blastosiste ihtiyaç duyulmadan EKH

benzeri, uyarılmış pluripotent kök hücre (UPKH) elde edilebilmesi, etik problemleri ortadan kaldırmıştır. Hastaya özgü üretilen UPKH'ler, birçok hastalığın *in vitro* modellenmesine olanak sağlamıştır (8). Bu özellikleri sayesinde, pluripotent kök hücreler *in vitro* ortamda uygun koşul ve moleküller ile kardiyak hücreler dahil olmak üzere birçok özelleşmiş hücre tipine farklılaştırılabilmektedir (9).

EKH temelli hücre transplantasyonu çalışmaları, nörodejeneratif hatalıklar ve miyokard enfarktüsü gibi rejenerasyon kapasitesi olmayan hücrelerin kaybına bağlı olarak gelişen hastalıkların tedavisinde yönelik kullanım potansiyeli değerlendirilmektedir. Özellikle, literatürde miyokard enfarktüs sonrası hasarlı dokuyu yenilemeye yönelik, pluripotent kök hücre ve bu hücrelerden köken alan kardiyak progenitor ve kardiyomiyositlerin kullanıldığı pre-klinik ve klinik çalışmalar ile *in vivo* küçük-büyük hayvan modelleri bulunmaktadır (10).

Bu tez çalışması kapsamında; aritmi modeli olarak kullanılan *Kcnq1* gen mutasyonu transgenik farelerde, hücresel tedavi yaklaşımının aritmi tedavisinde kullanım potansiyelini değerlendirmek amacıyla, vahşi tip EKH'lerden farklılaştırılan kardiyomiyositlerin, transgenik fare kalplerine intramiyokardiyal enjeksiyonu yapılmıştır. Hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG ölçümleri, hücre enjeksiyonu yapılmadan, trakeostomi ve torakotomi işlemleri gerçekleştirilmiş "açma kapama SHAM" kontrolü ve transplante edilecek hücrelerin içerisinde bulunduğu taşıyıcı solüsyonunun transplante edildiği "matrigel SHAM" kontrollerinden alınan EKG verilerinin karşılaştırmalı analizleri yapılmıştır. *Kcnq1* geninde nokta mutasyonu oluşturmuş *Kcnq1*^{A340E/A340E} fare soyunda, EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyonu sonrası 4. ve 7. günlerde alınan EKG verileri incelendiğinde opere edilen farelerin (n=10), %50'sinde QTc değerinde düşüş (n=5) görülerek, hastalık fenotipini iyileştirici etkisi tespit edilmiştir. Farelerin, %20'sinde QTc değerinde artış (n=2) gözlenirken, %30'unda QTc değerinin değişmediği (n= 3) tespit edilmiştir. *Kcnq1* geninde null mutasyonun bulunduğu *Kcnq1*^{-/-} transgenik aritmi modeli farelerde, hücre transplantasyonu sonrası alınan EKG verileri incelendiğinde, opere edilen farelerin (n=10) %30'unda QTc değerinde kısalma (n=3) ile hastalık fenotipinin iyileştirici etkisi gözlenmiştir. Farelerin %40'ında QTc değerinde artış (n=4) görülürken, %30'unda QTc değerinin değişmediği (n= 3) tespit edilmiştir. *Kcnq1*^{-/-}

transgenik aritmi modeli farelerin sahip olduğu güçlü hastalık fenotipi sonucu operasyon sırasında ve sonrasında daha yüksek mortalite gözlenmiştir. SHAM kontrol grubundaki farelerin operasyon öncesi ve sonrası verilerinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bunun yanında deneysel ve cerrahi basamakların optimizasyonu için aritmi modeli transgenik farelere FEF hücresi transplante edildiğinde operasyon sonrası QTc değerinin operasyon öncesine göre anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Bu bulgu miyokard enfarktüs sonrası görülen fibrotik doku oluşumu ve kalp ritim bozuklukları ile koreledir. SHAM kontrol grubu verileri ile FEF transplantasyonu sonrası elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda EKH temelli kardiyomiyosit transplante edilen hücrelerin kalp elektrofizyolojisini düzenleyici yönde etkisinin olabileceği ve bu etkinin kardiyomiyositlere özgü olduğu düşünülmektedir.

Hücre tedavinin elektrofizyolojik etkileri transplantasyon öncesi ve sonrası alınan EKG verileri ile değerlendirilirken, transplante edilen hücrelerin dokudaki entegrasyonu ve canlılığı immünohistokimyasal boyamalar ile değerlendirilmiştir. Transplante edilecek hücrelerin konak miyokardiyumdaki takibinin yapılması amacıyla, transplantasyon öncesi hücreler floresan özellikte bir boya olan Vybrant CFDA-SE ile işaretlenmiştir. Enjeksiyon sonrası 14. günde kalpten alınan kesitler incelendiğinde boyalı hücrelerin sinyalinin azaldığı gözlenmiştir. Bu nedenle, transgenik farelerin, hücre transplantasyonu sonrası 7. güne kadar takip edilmesi uygun görülmüştür. Hücre enjeksiyonu sonrası 7. ve 14. günde kalplerden alınan kesitler kardiyak spesifik belirteç olan cTnT antikoruna ile immün boyaması yapıldığında enjeksiyon bölgesinde konumlanmış hücrelerin cTnT üreten kardiyomiyositler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca enjeksiyon bölgesindeki hücrelerin normal çekirdek boyamaları, konak miyokardiyuma entegre olan hücrelerin canlılığını işaret etmektedir.

Bu tez çalışması sonucu elde edilen veriler, UQTS Tip 1 fare modellerinde hücre tedavisi yaklaşımı literatürde ilk olarak değerlendirilmiş ve hücre transplantasyonunun tedaviye yönelik iyileştirici etkileri tespit edilmiştir. İleriki çalışmalarda, daha fazla sayıda deney hayvanı, MRI ve MRI ve benzer ileri görüntüleme teknikleri kullanılması ve transplantasyon sonrası uzun süreli takip yapılabilir. Kliniğe yönelik ileri translatyonel ve büyük hayvan modellerinde

alışmalar ile aritmilerde yeni bir tedavi yaklaşımı geliştirmeye yönelik çıktı potansiyeline sahiptir.



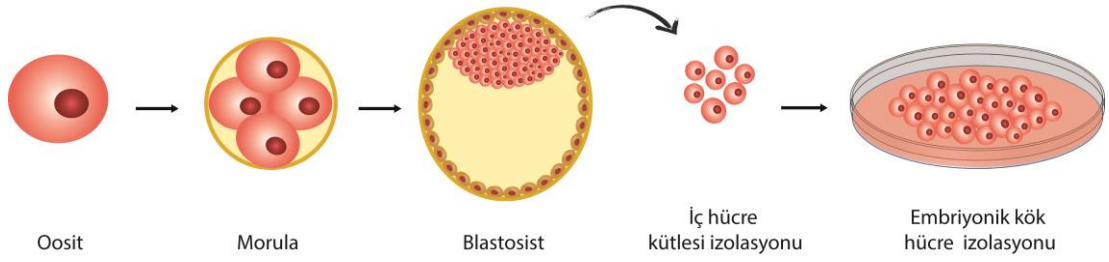
4 GENEL BİLGİLER

4.1 Embriyonik Kök Hücre (EKH)

Embriyonik kök hücreler, embriyonun iç hücre kütesinden elde edilen, embriyonik gelişim sürecinde vucüttaki tüm dokuları oluşturma potansiyeline sahip pluripotent hücrelerdir (Şekil 4.1.1). Fertilizasyondan sonraki 5. gün bu hücreler, blastosist adı verilen içi boşluklu hücre topluluklarına dönüşürler. Blastosistin iç hücre kütesindeki hücreler; 3 germ yaprağındaki hücelere farklılaşabilme yeteneğine sahiptir. Embriyonik hücrelerin, sınırsız bölünebilme ve kendi kendini yenileyebilmeleri karakteristik özellikleri arasında yer almaktadır (11). Bölünme kapasiteleri, telomeraz aktivitelerinin yüksek olmasıyla ilişkilidir. (12).

Pluripotent hücrelerden, çeşitli yöntemler ile elde edilen hücre hatları, uygun koşullar sağlandığında *in vitro* ortamda da pluripotent özellikte kalabilirler. 1981 yılında Evans ve Kaufman, erken dönemdeki fare embriyosunun iç hücre kitlesinden ilk kez embriyonik kök hücre elde etmeyi başarmışlardır (13). Thomson ve arkadaşları 1998 yılında, *in vitro* fertilizasyon yöntemiyle elde edilen insan embriyosundan, embriyonik kök hücre elde etmişlerdir (14).

Fare EKH'leri, mitotik aktiviteleri durdurulmuş fare embriyonik fibroblast (FEF) hücrelerinin bulunduğu ortamda kültüre edilir. Bunun yanında lösemi engelleyici faktör (LIF) varlığında farklılaşmadan çoğalabilmektedirler. LIF, STAT3 sinyal yolağını aktive ederek hücrelerin pluripotent özellikte kalmalarını sağlamaktadır. EKH'ler; Oct-4, Nanog, LIN28, SSEA-3, SSEA-4, Thy-1, CD9, CD24 gibi farklılaşmayan hücrelerin belirteçlerini eksprese ederler. EKH'ler süspanse halde kültüre edildiklerinde embriyonik cisim (embryoid body) oluşturabilirler. EKH'ler kültür ortamında, küçük moleküller ve büyüme faktörleri yardımıyla, kardiyomyositlerin de dahil olduğu birçok özelleşmiş hücre tipine farklılaştırılabilirler (15).



Şekil 4.1.1. Embriyonik kök hücre izolasyonu ve kültürü

4.2 Fare EKH Temelli Kardiyomiyosit Farklılaşma Metodları

EKH'lerin üç germ yaprağındaki hücelere farklılaşabilme potansiyelleri sayesinde, *in vitro* ortamda uygun koşullar sağlandığında EKH hücrelerinden, birçok hücre hattı elde edilebilmektedir (16). Bu sayede, hücrel elektrofizyolojiden protein biyokimyasına kadar temel araştırmalarda kullanılabilecek çeşitli hücre hattına kolayca erişim sağlanabilmektedir. Kalıtsal kalp hastalığı olan hastalardan elde edilen pluripotent kök hücrelerin kardiyak hücelere farklılaştırılması, hastalığın *in vitro* modelleyebilmesine olanak sağlamıştır. Ancak kardiyak hastalıkların, hücre temelli modellerinin geliştirebilmesi için güvenilir farklılaşma metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Son 10 yılda, pluripotent kök hücre temelli kardiyomiyosit farklılaşma metodlarında gelişme kaydedilmiştir (17). Bu sayede bu hücrelerin, çok çeşitli analizlerde kullanmak üzere yeterli miktarlarda ve saflıkta üretilmesi mümkün olmaktadır.

In vitro kardiyak farklılaşmada, ilk geliştirilen ve yaygın olarak kullanılan yöntem embriyoid cisim (EB) yöntemidir. EKH'ler, süspansiyon halinde kültüre edildiklerinde EB olarak adlandırılan üç boyutlu hücre gruplarını oluşturma eğilimi göstermektedirler. L-Askorbik asit varlığında, kardiyak progenitorlerin proliferasyonu artırılarak kardiyomiyosit farklılaşması indüklenebilmektedir. Bunun yanında, EB yapısındaki hücrelerin besiyeri içerisinde bulunan serum miktarları değiştirilerek kardiyak farklılaşma desteklenebilir. EB yapısını oluşturacak başlangıç hücre miktarı, EB'lerin kültüre edildikleri zaman dilimleri, farklılaşma besiyerinde kullanılan FBS içeriği, kullanılan büyüme faktörleri gibi kardiyomiyosit farklılaşmasını etkileyen birçok parametre vardır. Kardiyak farklılaşmanın erken dönemlerinde EB yapılarını

oluşturan kardiyomiyositlerin boyutları genellikle küçük ve yuvarlak olduğu bilinmektedir (18). EKH temelli kardiyomiyositler olgunlaşmaya başladığında uzayarak, miyofibril ve sarkomer yapılarını oluştururlar. Miyokardiyal gelişimin erken aşamalarında GATA-4, Nkx2.5, transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. Bunu takiben, atriyal natriüretik faktör (ANF), miyozin hafif zincir (MLC), miyozin ağır zincir (MHC), EKH kökenli kardiyomiyositler tarafından eksprese edilmektedir. Kardiyak farklılaşmanın 8.gününden itibaren kültürde spontan kasılmalar gözlenmektedir ve farklılaşmanın ilerleyen dönemlerinde atım gözlenen bölgelerin arttığı bilinmektedir. Tamamen farklılaşmış kardiyomiyositlerin atımı dursa da, *in vitro* ortamda haftalarca kültüre edilebilirler.

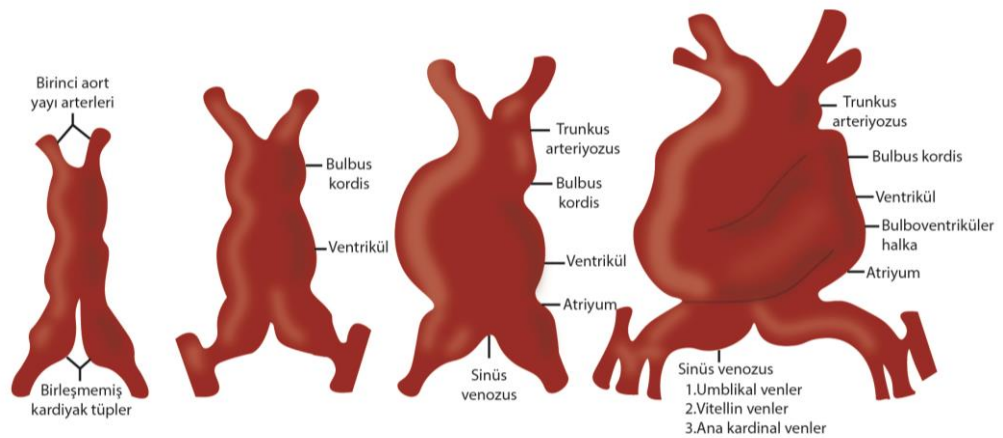
EKH temelli kardiyak farklılaşma, deksametazom, 5-aza, retinoik asit gibi küçük moleküller kullanılarak da indüklenebilmektedir. Bunun yanında Mummery ve arkadaşları, fare viseral endoderm hücreleri (END-2) ile EKH'leri ko-kültüre ettiklerinde kültürde kasılan kardiyomiyosit hücreleri gözlemlemişlerdir. Stromal hücrelerle yapılan kültürler, kullanılan hücre hattının büyüme ve farklılaşmalarını destekleyici etkileri bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu hücreler tarafından üretilen tanımlanmamış faktörler, EKH'lerin istenmeyen hücre tiplerine farklılaşmasını etkileyebilir. (19)

Ekstraselüler matriksin (ECM), proliferasyonda ve farklılaşmada gerekli fiziksel sinyalleri sağlamak üzere önemli görevleri vardır. Kolejen ve fibronektin ECM'leri, EKH hücrelerini endotel hücrelerine farklılaşmasını indüklerken; laminin, EKH hücrelerinin kasılabilen kardiyak hücrelere farklılaşmasını destekler (20).

4.3 Kalp Gelişimi

Kalp, embriyonik dönemin yaklaşık 19. gününde mezoderm dokusundan köken alarak gelişmeye başlamaktadır. Mezoderm, bütün doku ve organların gelişmesini sağlayan 3 germ yaprağından biridir (21). Kalp kardiyojenik bölge adı verilen embiyonun başında bulunan bölgeden gelişmeye başlar. Bu bölgeye primer kalp alanı (first heart field) adı verilir. Kalp gelişiminin erken döneminde, kardiyak progenitor hücreleri ve bunlardan köken alan kardiyomiyosit hücreleri NKX2-5 ve GATA4 transkripsiyon faktörlerini eksprese eder. Bunun yanında kalp gelişiminin ilk aşamalarında MEF (Myocyte Enhancer Factor) ailesine ait olan MEF2C

transkripsiyon faktörünün, prekardiyak crestte homojen olarak eksprese edildiği bilinmektedir (22). Ayrıca, kardiyojenik mezodermin gelişiminde BMP ve FGF sinyal yollarının etkili olduğu bilinmektedir. Endodermden salgılanan kimyasal faktörler ile kardiyojenik bölge kardiyojenik kordon yapılarını oluşturur. Kardiyojenik kordonlar gelişirken, içerisindeki lumenler de hızlıca gelişmeye başlar. Bu noktada lümenler endokardiyal kalp tüpleri olarak adlandırılır. Endokardiyal kalp tüpleri birbirine yaklaşarak ilkel kalp tüpünü oluşturur. İlkel kalp tüpü trunkus arteriyozus, bulbus kordis, ilkel ventrikül, ilkel atriyum ve sinüs venosus olmak üzere beş farklı yapıyı oluşturur. Truncus arteriosus yükselen aort ve pulmoner arter yapılarına ayrılır. Bulbus cordis sağ ventrikülleri oluşturur. Vaskülogenez endodermden salgılanan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ile tetiklenir. İlkel kalp uzadıkça perikardiyuma katlanmaya başlar. Bunun sonucunda ana damarları ve odaları yetişkin kalbe benzer şekilde hizaya getirecek S şeklindeki yapıyı oluşturur (Şekil 4.3.1). Bu süreç embriyonik dönemin 23-28. günleri arasında meydana gelir. Kalp gelişiminin ilk safhalarında oluşan yapılarda endotel hücreleri yoğun olarak bulunurken, gelişimin 22. gününde kalp tüpü kalın bir mezoderm tabakası ile sarılır. Bu mezoderm tabakasına epimiyokard adı verilir. Epimiyokard tabakası; miyokardiyum, kardiyomiyositler tarafından oluşturulan kardiyak jel ve epikardiyumu oluşturur. Miyokardiyum tabakası kardiyomiyositlerce zengin kas dokusudur. Epikardiyum kan damarları ve sinir hücrelerince zengin bağ dokudan meydana gelir (21).



Şekil 4.3.1. İnsanda kalp gelişimi

Kalpte spontan kasılmalar embriyonik gelişimin 28. gününden itibaren görülmektedir. Kardiyak kasılmalar aktin filamentlerin miyozin filamentlerin

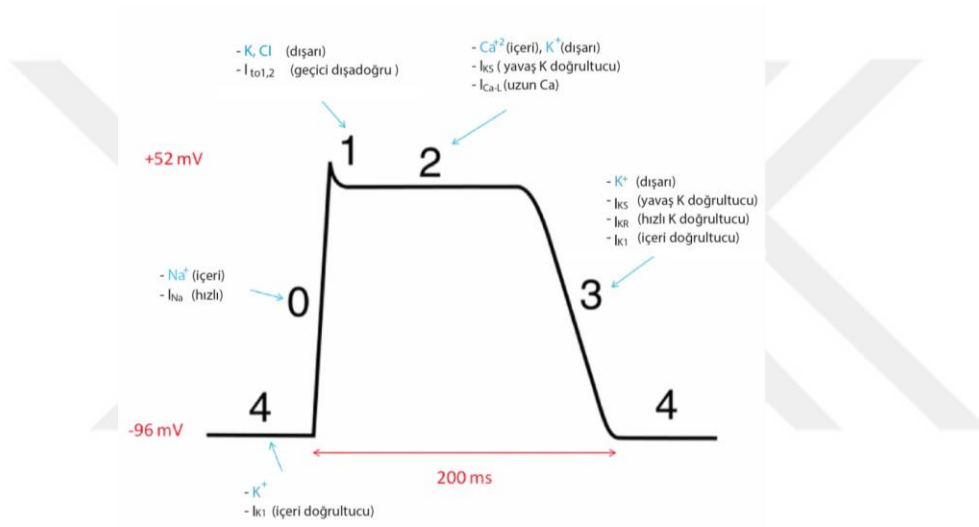
üzerinden kayması ile gerçekleşir. Kasılma ile ilgili proteinleri kodlayan MHC ve MLC gibi birçok gen ile troponin-tropomiyozin kompleksinin gelişiminin bu aşamasında karakteristik ekspresyon paterni vardır. Örneğin; MHC, MLC2a, kardiyak aktin ve kardiyak troponin I ekspresyonunun caudal bölgede sefal bölgede daha fazla iken BMHC'nin resiprokal bölgeye doğru ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. MLC'nin diğer isoformları, aktin, troponin, tropomiyozin ve tropomodulin ekspresyonlarının miyokardiyum boyunca heterojen bir dağılım gösterdiği bilinmektedir (23).

4.4 SA Nodu, AV Nodu ve Kalpte Elektriksel Akımın İletilmesi

Kalbin kasılması kardiyomiyositlerde aksiyon potansiyelinin oluşması ile başlar. Sinoatriyal nod olarak adlandırılan bölgedeki özelleşmiş hücreler, kasılma özelliklerini kaybedip spontan depolarize olabilme yeteneği kazanmışlardır. Sinoatriyal noddaki hücreler tarafından oluşturulan aksiyon potansiyeli, sağ atriyumdan atriyoventriküler noda ulaşır. Depolarizasyon dalgası, oluklu bağlantılar aracılığıyla miyokardiyumdaki diğer kardiyomiyositler arasında yayılır. Dalganın yayılımı, ventriküllere ulaşmadan önce atriyoventriküler bölgede bulunan fibröz doku sayesinde duraklatılır. Atriyoventriküler düğümünden başlayan ve özelleşmiş hücreleri barındıran His demetleri, depolarizasyon dalgasının ventrikül içerisinde dağılmasını sağlar (24).

Kardiyomiyositlerin kasılmaları için uyarılması Na^+ kanalları sayesinde gerçekleştirilir. Aksiyon potansiyelinin ilk safhasında eş zamanlı olarak dışarı K^+ akımı ve Na^+ iyonunun içeri alımı meydana gelir. Bu iyon değişiminde Na^+ iyonu daha baskın olduğu için hücre içi ve dışı arasında potansiyel fark meydana gelir ve merman potansiyeli -60mV 'dan, -40 mV 'a ulaşır (Şekil 4.4.1). Depolarizasyon dalgası kardiyomiyosit hücrelerinde sarkolemma boyunca iletilir ve L tipi Ca^{+2} kanallarının açılmasını sağlar. Bu kanallar Na^+ kanallarında olduğu gibi depolarizasyonla açılıp kapanır. Ancak kanalın açılıp kapanma kinetiği sodyum kanalına göre daha yavaştır. Kalsiyum kanalları açıldığında Ca^{+2} iyonlarının hücrenin içine akışı gerçekleşir. Buna bağlı olarak sarkoplazmik retikulumdaki ryanodine reseptör Ca^{+2} kanalı (RyR) açılarak sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} iyonlarının sitozole salınımı gerçekleşir. Ca^{+2} iyonları troponine bağlanarak kasılmayı başlatır. Bu safhada I_{K1} kanallarının

inaktivasyonu nedeniyle potasyum çıkışı azalır. Ayrıca bu safhada açık K^+ kanalları aracılığı ile potasyum iyonlarının dışarı çıkışı gerçekleşir. Ve böylece membran potansiyeli pozitif bir değerde sabitlenir. Safhanın sonunda kalsiyum kanalları kapanır ve hücreye depolarize edici akımın girişi önlenerek hücrenin repolarizasyonuna yardımcı olunur. Aksiyon potansiyelinin 3. safhasından yavaş ve hızlı dışa rektifiye edici potasyum kanalları (I_{Ks} , I_{Kr}) sorumludur. I_{Ks} ve I_{Kr} kanalları depolarizasyon ile açılarak yaklaşık $-55mV$ zar potansiyeli ile kapanır. Membran repolarizasyonunun sonlandırılmasından ve dinlenme zar potansiyelinin yeniden oluşturulmasından I_{K1} kanalının geç aktivasyonu sorumludur (25).



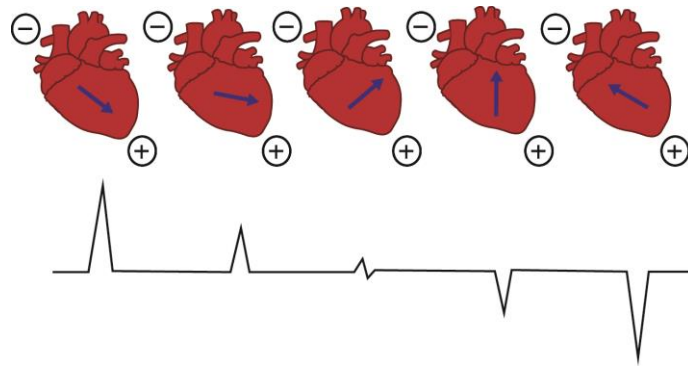
Şekil 4.4.1. Aksiyon potansiyel grafiği

4.5 Elektrokardiyografi

Elektrokardiyografi bilimi, galvanometre cihazının icat edilip Hollandalı fizyolog Wilhelm Einthoven tarafından 1903 yılında insanlar üzerinde kullanmasıyla tıbbi araştırma alanına sokulması sayesinde başlamıştır. O dönemden bu yana EKG kaydı alırken kullanılan derivasyon sayısı 3'ten 12'ye yükselmiştir ancak temel prepsileri değişmemiştir. EKG, miyokard hücrelerinin eş zamanlı depolarize ve repolarize olduğunda vücut yüzeyinde meydana gelen voltaj gradaynını ölçen bir sistemdir. Kardiyak patolojinin saptanması kalbin elektriksel aktivitesini etkileyecek tedavilerin tespitinde invazif bir yöntem olmaması ve göreceli olarak düşük maliyetli olması nedeniyle sıklıkla kullanılan bir tekniktir (26).

EKG kaydı almak için kollara bacaklara ve göğüse elektrotlar yerleştirilir. Tüm elektrodlar kablolar ile EKG kayıt cihazına bağlıdır. Cihazın hareketli iğnesi sıcaklık değişimine duyarlıdır. Alınan veriler özel bir kağıda kaydedilir. EKG cihazlarında, kağıdın dönme hızı saniyede 25mm olduğundan, ince çizgiler arası 0.04 saniyeye ve kalın düşey çizgiler arası 0.20 saniyeye karşılık gelmektedir (27).

EKG kayıt sisteminde ekstremiteler ve göğüs elektrodu olmak üzere 2 çeşit elektrot bulunmaktadır. 12 derivasyonlu bir EKG kaydında, derivasyonların 6 tanesi kol ve bacak ekstremiteleri, 6 tanesi göğüs derivasyonuna aittir. Göğüs derivasyonundan alınan kayıtlar horizontal planda değerlendirilirken, ekstremiteler derivasyonundan alınan kayıtlar frontal planda değerlendirilir. Göğüs derivasyonlarına “V derivasyonları” da denmektedir (28). Ekstremiteler derivasyonları da kendi içerisinde bipolar (I, II, III) ve unipolar (aVR, aVL, aVF) olmak üzere ikiye ayrılır. Bipolar derivasyonlar iki ekstremiteler arasındaki elektrik potansiyel değişimini ölçer. Unipolar derivasyonlar ise, tek konumlu bir elektrodun voltajını ölçer. Sağ kolun voltajını aVR, sol kolun aVL, sol bacağın voltajını aVF derivasyonu ölçer. Frontal ve horizontal elektrotlar kardiyak aktivitenin üç boyutlu yapısını yansıtmaktadır (29). EKG derivasyonlarında depolarizasyon dalgası pozitif kutba doğru yayılıyorsa dalgalar pozitif defleksiyon, negative kutba doğru yayılıyorsa negatif defleksiyon olarak kaydedilir (Şekil 4.5.1).



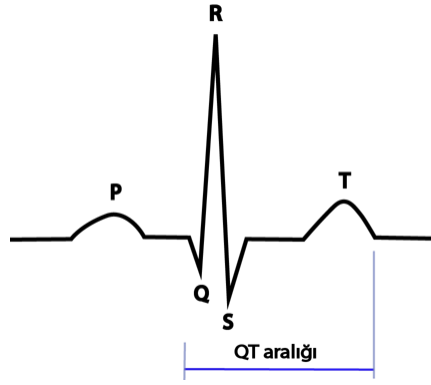
Şekil 4.5.1. EKG'de gözlenen negatif ve pozitif derivasyonların figürsel gösterimi

EKG ölçümlerinde P dalgası, atriyumdaki hücrelerin depolarizasyonunu yansıtır. Uyarı, sinus düğümünden çıkarak önce sağ atriyum sonra sol atriyuma ulaşır. Bu nedenle P dalgasının ilk bölümü sağ atriyumun, diğer bölümünü sol atriyumun depolarizasyonunu gösterir. P dalgası I, II, V5 ve V6 derivasyonlarında pozitif iken aVR'de negatiftir.

QRS kompleksi, ventriküler deplarizasyonu yansıtır. Depolarizasyon dalgası endokardiyumdan epikardiyum ve apekse doğru yayılır. Ventriküler depolarizasyon, 3 aşamada gerçekleşir. İlk aşamada ventriküler septum depolarize olur. İkinci aşamada, sağ ve sol ventrikül eş zamanda depolarize olur. Sol ventrikül sağ ventriküle göre kalın olması nedeniyle, sol ventrikül depolarizasyonu sağ ventrikülünkini baskılar. Ventriküler depolarizasyonun üçüncü aşamasında sağ ve sol ventrikül duvarları depolarize olur. Bu üç aşamaya ait depolarizasyonlar, farklı derivasyonlarda farklı QRS kompleksleri oluşturur. Genellikle I, V5, V6 derivasyonlarında QRS kompleksi pozitifken aVR ve V1 de negatiftir. Kilo, kalbinin pozisyonu nedeniyle göğüs ve ekstremiteler derivasyonlarında farklı QRS kompleksleri oluşabilir.

T dalgası kardiyomiyositlerin repolarizasyonu ile meydana gelmektedir. Yetişkinlerde T dalgasının süresi 0.10 ile 0.25 ms arasındadır. T dalgası farklı derivasyonlarda farklı şekilde görülebilmektedir. Bifazik, sivri, yassı morfolojide T dalgası gözlenebilir. T dalgası; I, V5, V6 derivasyonlarında genellikle pozitifken, aVR ve V1 derivasyonlarında negatiftir. T dalgasını izleyen U dalgası, her zaman görülmemektedir. U dalgası ventrikülün içindeki iletim sisteminin yavaş repolarizasyonunu yansıttığı düşünülse de dalganın oluşma nedeni tam olarak bilinmemektedir.

QT aralığı, ventriküler depolarizasyon ve repolarizasyon için geçen toplam süreyi gösterir. QT aralığı, QRS kompleksinin başlangıcından T dalgasının sonuna kadar geçen sürenin ölçülmesiyle belirlenir. Normal koşullarda QT aralığı; cinsiyet, yaş ve kalp atım hızı gibi etmenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Belirli bir kalp hızı için gereken normal QT aralığını öngerebilmek için çeşitli formüller bulunmaktadır. Bu formüllerden en sık kullanılanı Bazett formülüdür (25). Kalp hızına göre düzeltilmiş QT aralığı bu formüle göre; QT aralığının RR aralığının kareköküne bölünmesiyle hesaplanır. (30).



Şekil 4.5.2. EKG grafiği ve QT aralığının gösterimi

4.6 İn vitro Elektrofizyolojik Ölçümler

4.6.1 Çoklu elektrod dizileri (MEA)

Çoklu Elektrod Dizileri (Multi Electrode Array, MEA), içerdiği elektrotlar sayesinde kardiyomiyositlerin alan potansiyelleri ve aksiyon potansiyeli değişimlerini incelemeye olanak sağlar. Kardiyomiyositin aksiyon potansiyelindeki anlık değişim, hücrelere temas eden elektrotlar yardımıyla hücre dışı alan potansiyelindeki dalgalanmalar olarak kayıt edilebilmektedir. Hücreler tarafından üretilen aksiyon potansiyeli tek katlı hücreler boyunca ilgili elektroda göre yayılırken alan potansiyelinde meydana gelen değişim MEA tarafından ölçülür (31, 32). MEA sistemi ile ölçülen alan potansiyeli, kalbin elektrofizyolojik değişimini ölçen EKG sinyali ile benzemektedir (32).

4.6.2 RTCA xCELLigence CardioECR

RTCA xCELLigence CardioECR sisteminde bulunan alan potansiyeli ve empedans elektrotları sayesinde, kardiyomiyositlerin, elektriksel uyarımları ve kasılma aktiviteleri ölçülebilmektedir. MEA sistemlerinden farklı olarak empedans elektrotları ile kardiyak kültürdeki canlılık oranı görülebilmektedir. CardioECR sistemi, kasılabilen kardiyomiyositlerin, elektrofizyolojik özelliklerinin hücresel boyutta analizine olanak sağlar. Farmakolojik ajanların ve hedef moleküllerin pluripotent kökenli kardiyomiyositler üzerindeki etkileri incelenebilmektedir (31, 33).

4.6.3 Ca⁺² görüntüleme

Kalsiyum görüntüleme, hücre içindeki kalsiyum değişimini görüntülemek için kullanılan bir tekniktir. Kardiyomiyositlerin aktiviteleri hücre içi ve hücre dışı iyon değişimi ile gerçekleşmektedir. Hücre depolarizasyon durumundayken hücre dışı Na⁺ iyonu konsantrasyonu yüksektir. Sinyal ile birlikte hücre dışındaki Na⁺ iyonlarının hücre içine girişi gerçekleşir. İyonların değişimi ile meydana gelen potansiyel fark nedeniyle Ca⁺² kanalları açılarak hücre içerisine Ca⁺² iyonları girer. Hücre içi kalsiyum, sarkoplazmik retikulumdaki Ca⁺² rezervleri boşalarak kasılma gerçekleşir. (34). Kardiyomiyositlerin aktiviteleri Ca⁺² iyonuna, bağlı olması nedeniyle Ca⁺² görüntüleme yöntemleri, kardiyomiyositlerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fura-2, Rhod-2, Indo-1 veya Fluo-4 gibi kalsiyum değişimine duyarlı sentetik boyalar ticari olarak bulunmamaktadır. (35).

4.7 Kardiyak Aritmiler

Aritmi, kardiyak kasılma yolağındaki primer patolojiden veya diğer organlardaki abnormaliteler sonucunda meydana gelebilmektedir (36). Kardiyak aritmiler; hıza, mekanizmaya, süreye veya aritminin kaynaklandığı bölgeye göre sınıflandırılabilir. Bazı aritmiler klinik olarak hiçbir öneme sahip olmadığı halde, bazıları yapısal kalp bir hastalığının göstergesi olabilir. Aritmiler, felç gibi komplikasyonlara yatkınlığın artmasına, hemodinamik parametrelerin bozulmasına ve kardiyak arrest gibi ciddi sonuçlara neden olabilir (37).

4.7.1 Atriyal aritmiler

Atriyal aritmiler; aritminin köken aldığı bölgeye ve mekanizmasına, etiyolojik ve elektrofizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Atriyal erken vurular; ileri yaşlarda ve yapısal kalp hastalığı bulunan kişilerde daha sıklıkla görülmektedir. Hastaların EKG verilerinde sinus ritminden önce oluşmuş bir P dalgası gözlenmektedir. Bu hastalarda PR aralığı normale göre uzundur. Atriyal erken vuru görülen hastalarda, tedavinin ilk aşaması beta blokör uygulamasıdır. Ancak atriyoventriküler blok oluşması durumunda semptomlar şiddetlenebilir. Bu durumlarda sınıf IC anti aritmik ilaçların kullanılması gerekmektedir (38).

Bir başka atriyal aritmi çeşidi olan sinus taşikardisi; egzersiz, ateş, anksiyete gibi fizyolojik stress durumlarında ortaya çıkmaktadır (Şekil4.7.1). Hipotansiyon ve anemiye sahip hastalarda sinus taşikardisi görülebilmektedir. Supraventriküler taşikardiler arasından sinus taşikardisinin ayırt edilmesi önemlidir. Hastalığın semptomları baş dönmesi, senkop, çarpıntıdır çoğu zaman sinus taşikardisi viral hastalıklara bağlı olarak meydana gelmektedir. (39).



Şekil 4.7.1. Sinüs taşikardisi EKG grafiği

Atriyal fibrilasyon, sıklıkla karşılaşılan sürekli aritmi tipidir. Yapısal hastalıklar, diabetes ve miyokardiyal enfarktüs atrial fibrilasyona neden olabilmektedir. Atriyal fibrilasyonda, atriyumun aktivasyonu hızlı ve düzensizdir. Hızlı atriyal aktivasyona oluşturulan ventriküler yanıtlar düzensizdir (Şekil 4.7.2). Hasta, tedavi edilmediği durumda, hastalığın seyri kötüleşebilmektedir. Atriyal fibrilasyonun tedavisi, hastalığın etiyojisi ve semptomlarına bağlıdır. Hemodinamik olarak stabil olmayan hastalarda, kardiyoversiyon hastalığın tedavisinde etkilidir. Bunların yanında atriyal fibrilasyon tedavisi için radyofrekans, katater ablasyonu gibi cerrahi yöntemler de bulunmaktadır (40, 41).

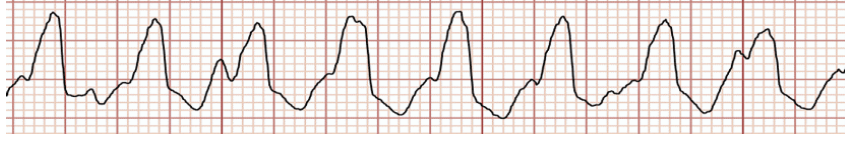


Şekil 4.7.2. Atriyal fibrilasyon EKG grafiği

4.7.2 Ventriküler aritmiler

Ventriküler aritmiler genel olarak, hücresel düzeyde normal olmayan elektrofizyolojik değişimler sonucunda meydana gelmektedir (42). Hücre düzeyinde transmembran özelliklerinin değişmesi, iletim bloklarına neden olabilir. Bunun sonucunda ventriküler aritmiler tetiklenebilir (43). Fibrozis, hücresel bağlantıdaki

kesintiler nedeniyle miyokardiyal fiberlerde meydana gelen yapısal anormallikler, kalpte, yavaş iletme veya bloklara neden olabilmektedir (44). Ventriküler taşikardi EKG ölçümlerinde geniş QRS kompleksleri görülmektedir (Şekil 4.7.3).

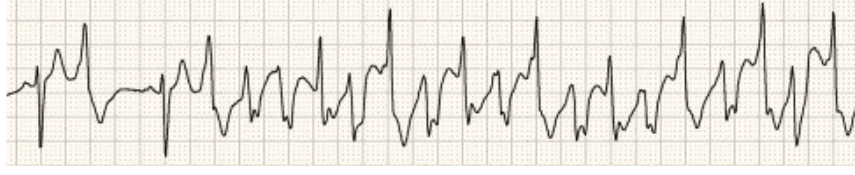


Şekil 4.7.3. Ventriküler taşikardi EKG grafiği

Ventriküler taşikardi, monomorfik ve polimorfik olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Monomorfik ventriküler taşikardinin en yaygın sebebi, yapısal kalp hastalıkları ve miyokart enfarktüsüne bağlı defektlerdir. Enfarktüs sonrası oluşan yara dokusu, elektriksel iletimi bloklayarak aritmiye yol açmaktadır (45). Monomorfik ventriküler taşikardiye sahip hastaların kalp ritimleri, polimorfik ventriküler taşikardi hastalarına göre daha organize dir. Bu nedenle monomorfik ventriküler taşikardi hastaları, normal hemodinamik durumlarını koruyabilmektedirler (46). Monomorfik ventriküler taşikardi, dinlenme halinde gözlenir ve sürekli değildir (47). Yapısal kalp hastalığına bağlı olmayan ventriküler taşikardilerin seyri genellikle daha ciddidir. UQTS dışında, asemptomatik sürekli olmayan ventriküler taşikardiye uygun bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (48).

Polimorfik ventriküler taşikardi; genellikle akut iskemi, miyokardit, QT aralığındaki değişiklikler sonucunda meydana gelebilmektedir. Hastalık, EKG’de QT aralığının uzaması ile karakterizedir. QT uzaması, kalıtsal veya sonradan kazanılmış olabilir. Sonradan kazanılan QT uzaması, genellikle ilaç toksisitesi veya elektrolit anormalliklerinden kaynaklanabilir veya miyokart iskemisinin bir sonucu olarak meydana gelebilir (49). Katekolaminerjik ventriküler taşikardi (CPVT), adrenerjik stres ile tetiklenen, kalıtsal polimorfik ventriküler taşikardi çeşididir (50). CPVT, kardiyak Ryanodin reseptör geninde (*RYR2*) veya kardiyak Calsequestrin geninde (*CASQ2*) meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. *RyR2* genindeki mutasyonlar otozomal dominant patern ile kalıtılırken, *CASQ2* genindeki mutasyonlar otozomal çekinik özellikte kalıtılır. Her iki gen, eksitasyon-kontraksiyon eşleşmesi için gerekli kalsiyum iyonlarının sarkoplazmik retikulumdan salınmasında görevlidir (51). Artan kalsiyum salınımı, diastol evresinde hücre içindeki pozitif yükün artmasına

neden olur. Bunun sonucunda depolarizasyon gecikerek ventriküler taşikardi meydana gelir (Şekil 4.7.4).



Şekil 4.7.4. Katekolaminerjik ventriküler taşikardi EKG grafiği

CPVT hastalarında, stres durumunda veya egzersiz halindeyken senkop, hatta ani ölümler gözlenmektedir. Semptomlar genellikle pediyatrik dönemde ortaya çıkmaktadır. Hastalık adrenerjik uyarılar tarafından tetiklediğinden, tedavi için öncelikle beta blokörlere başvurulmaktadır. Ancak beta blokörlerin uygulama dozu konusunda dikkat edilmelidir. Yüksek doz beta blokör uygulaması ölümcül aritmilere yol açabilmektedir. Beta blokörler ile birlikte verapamil gibi kalsiyum kanal blokörleri kullanımının etkili olduğu literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir (52, 53). Ayrıca tedavi sürecinde, flecainide gibi kardiyak ryanodine reseptör temelli kalsiyum salınımını inhibe eden ajanların kullanıldığı bilinmektedir. Moleküler defektin doğrudan hedeflendiği bu tedavi yaklaşımı, hastalığın ilerleyişi açısından etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (54). Bunun yanında aile hikayesinde ani ölüm gözlenen yüksek risk taşıyan CPVT hastalarında, kardiyoverter defibrilatör implantasyonuna başvurulmaktadır (55).

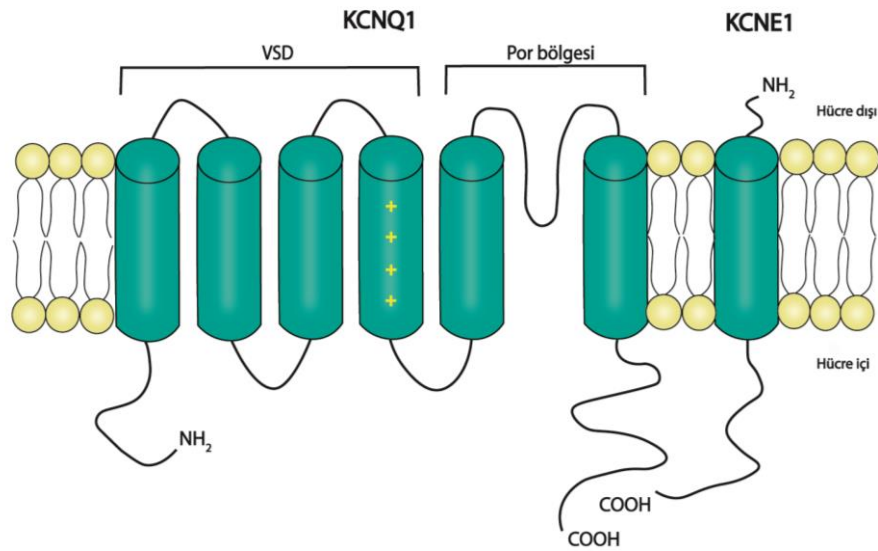
4.8 UQTS ve Alt Tipleri

EKG grafiğinde QT aralığı, depolarizasyon ve repolarizasyon evrelerini göstermektedir. Birçok iyon kanalının etkileşimi, aksiyon potansiyel süresini belirlemektedir. Repolarize edici, K^+ akımındaki düşüşler veya depolarize edici Na^+ ve Ca^{+2} akımlarındaki artışlar, QT aralığının uzamasına neden olabilir. Kardiyak iyon kanalının alt ünitesini kodlayan genlerde veya kanal fonksiyonunu modifiye eden adaptör proteinlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu kalıtsal UQTS'e neden olmaktadır (56).

UQTS'a sahip erkeklerde düzeltilmiş QT aralığı (QTc), 440ms'dan fazla iken bu sendroma sahip kadınlarda 460-480ms aralığındadır. UQTS'a sahip hastaların çoğunda QT aralığı nadiren normal sınırdadır. Erkek hastaların %80'inden fazlası ilk

kardiyak olaylarını 20'li yaşlarda yaşarlar. Bu nedenle bu hastalarda yüzme ve benzeri egzersizler sınırlandırılmalıdır. Özellikle ailede, çocukluk ve ergenlik döneminde açıklanamayan bayılmalar veya ani kardiyak ölümler gözlenmiş ise UQTS'den şüphelenilmelidir. Bugüne kadar UQTS ile ilişkili 17 farklı gen mutasyonu olduğu rapor edilmiştir (57). Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 bunlardan en sık görülenleridir.

UQTS Tip 1 ile ilişkili *KCNQ1* geni, 404 kb uzunluğunda olup kromozom 11'in p15.5 kolunda bulunmaktadır. Bu gen, voltaj kapılı potasyum kanalının alfa alt ünitesini kodlar (58). Her bir alt ünite 6 transmembran segment içerir (S1-S6). *KCNQ1* geninin kodladığı 4 alt ünite, *KCNE1* geninin kodladığı beta alt üniteleri ve Yotiao proteinleri ile bir araya gelerek yavaş potasyum kanalı olarak adlandırılan *Ks* kanalını meydana getirirler (Şekil 4.8.1).



Şekil 4.8.1. KCNQ1 iyon kanalının hücre membranındaki yerleşimi

Potasyum kanalının S1-S4 segmentlerinin voltaj sensör domain işlevi bulunmaktadır (59). *KCNQ1*'ın S4 heliksi, pozitif yüklü aminoasitlerden oluşur ve membran voltajını algılayarak kanalın açılabilirliğini kontrol eder (60). Kanal dinlenme halindeyken pozitif yüklü yan zincirler, membranın intraselüler bölgesine daha yakın konumlanmaktadır. Depolarizasyon süresince membranın elektrik alanından ekstraselüler bölgeye doğru efektif yük hareketi, voltaj sensör domaindeki bir dizi konformasyonel değişim ile kanalın açılması sağlanır (61). Kanalın por kısmı korunmuş aminoasitleri içeren 2 adet transmembran segmentten (S5 ve S6) oluşur (62,

63). KCNQ1 proteini, kanalın açılıp kapanması, bir araya gelmesi ve taşınması için önem taşıyan büyük COOH terminaline sahiptir. COOH terminali, dört amfipatik alfa heliks, sarmal ve temel aminoasit kümelerinden meydana gelir. A ve B proksimal helikslerinde kalmodulinin bağlanabileceği bölgeler bulunurken, heliks C ve heliks D tetramerizasyondan sorumludur (64). Heliks C, KCNE1'in distal COOH terminali ile etkileşim halindedir. Helix C, KCNE1'in COOH ucu ile etkileşim halindedir. Aynı zamanda Heliks C'nin kanalın açık konformasyonunun stabilitesini arttıran PIP2 (fosfatidil-nositol-4,5-bifosfat) modülasyonu için de önemli bir rolü olduğu tahmin edilmektedir. KCNQ1'in karboksil ucuna yakında yer alan bir domain de alt birimlerin bağlanma özgülüğünden sorumludur. Bu bölgedeki bir delesyon, kanal alt birimlerinin düzgün bir araya gelmesini engeller. Karboksil terminal kuyruğundaki özgün bir lösün fermuar motifi, PKA (protein kinaz A) ve PP1 (protein fosfataz 1) proteinlerini, AKAP9 (A-kinaz bağlayıcı protein 9) aracılığıyla KCNQ1 kompleksine bağlamaktadır.

UQTS'in 17 tipi arasından, Tip 1 en sık görülenidir (65). UQTS'e sahip hastaların %40-50'sinde KCNQ1 proteininin sentezlenmesinden sorumlu KCNQ1 geninde mutasyon bulunduğu bilinmektedir. WGA veri tabanında, çoğunluğu missence (kayıp) olan 250'den fazla *KCNQ1* gen mutasyonu olduğu bilinmektedir (66). *KCNQ1* geninde en fazla görülen mutasyonlar tek nükleotit değişimleri veya S1-S6 transmembran domaininde meydana gelen küçük boyuttaki insersiyon ve delesyonlardır. Bu mutasyonların, multimerik potasyum kanalı üzerinde farklı etkileri olabilir. Mutant ve vahşi tip protein alt üniteleri bir araya geldiğinde, işlevi olmayan iyon kanalının meydana gelmesine neden olur. Bu durum iyon akımı üzerinde dominant negatif etki oluşturabilir. Bunun yanında, mutant alt üniteye bir araya gelme ve iletimde meydana gelen defektler nedeniyle alt üniteler doğru bir şekilde taşınmayabilir veya tetramerik kanal oluşturulamayabilir. Bu durumun meydana getirdiği net etki, kanal fonksiyonunda %50'den az azalmadır. Bu etkiye haploinsufficiency denir.

KCNQ1 genindeki mutasyonlar sonucu, kardiyak aksiyon potansiyelinin plato fazında, dışarı doğru potasyum iyon akımını azalır. Bunun sonucunda, kanal daha uzun süre açık kalır ve ventriküler depolarizasyon gecikerek QT aralığı uzar (56). Bu gendeki mutasyonların tipi, mutasyonun bulunduğu spesifik bölge ve mutasyonun

meydana getirdiği fonksiyonel bozukluğun derecesi, UQTS Tip 1'in klinik fenotipinin seyrinde önemli rolü vardır (65). *KCNQ1*'in transmembran bağlayıcı ve por bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar, COOH terminalinde meydana gelen mutasyonlara göre daha ciddi kardiyak olaylara neden olduğu bilinmektedir (67, 68). Transmembran mutasyonuna sahip UQTS'li hastaların, C terminalinde mutasyon bulunan hastalara kıyasla daha uzun düzenlenmiş OT aralığına sahip olduğu ve daha yüksek T dalgası alterasyonu görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca bu hastalarda senkop, kardiyak arrest veya ani kalp ölümleri daha sık görülmektedir (68). Bunun yanında transmembran mutasyona sahip UQTS'li hastaların ilk kardiyak olayları 15 yaşından önce gerçekteşirken, C terminal mutasyona sahip hastaların sadece yarısında bu durumun 15 yaşından önce görüldüğü bilinmektedir. Litertürde kayıp mutasyonlar, sitoplazmik-loop mutasyonları, por mutasyonları ve bazı A341V gibi spesifik nokta mutasyonlarına sahip hastaların daha uzun QT aralığı ile ilişkilendirildiği ve bu hastalarda kardiyak olay görölme riskinin arttığı belirtilmiştir. Bunlara ek olarak sessiz mutasyonlar UQTS Tip 1 sendromunun fenotipini etkileyen önemli genetik faktörden biridir (69). Genetik temeli olan UQTS'li hastalarının yaklaşık %30'u, dinlenme halindeyken normal QT uzunluğuna sahiptir. Sessiz mutasyon taşıyan bu hastalarda yaşamı tehdit eden kardiyak olay görölme riski düşük olmasına rağmen normal düzenlenmiş QT değerine sahip bu kişilerin, kardiyak hastalıklardan etkilenmeyeceği düşünülmemelidir (70). Görünüşte sağlıklı olan ve sessiz mutasyon taşıyan hastalarda, özellikle duygusal stress ve egzersiz sırasında ölümcül aritmilerin görülebileceği birçok klinik çalışma ile gösterilmiştir (71-73).

UQTS Tip 2, *KCNH2* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşabilmektedir. *KCNH2* geni, voltaj kapılı potasyum kanalının alfa alt ünitesi Kv11.1'i kodlar. Tek bir Kv alt ünitesi sitozolik amino ve karboksil terminalleri ve 6 adet alfa helikal transmembran segmentlerinden oluşur. 4 adet Kv11.1 alfa alt ünitesi ile *KCNE2* geninin kodladığı MiRP1 alt ünitesi bir araya gelerek hızlı aktive olan gecikmiş doğrultucu potasyum akımının (I_{kr}) iletimini sağlayan tetramerik iyon kanalını meydana getirir. Kanalın voltaj sensör domaini S1-S4 segmentlerinden meydana gelirken, por domaini S5 ve S6 domainlerinden meydana gelmektedir.

KCNH2 geninde görülen mutasyonlar, I_{kr} akımında düşüşe neden olur. Akımda meydana gelen düşüşe, mutasyonun türüne göre değişiklik gösterir. Haploinsufficient

mutasyonlar, etkilenen allelde fonksiyon kaybına neden olur. Dominant negatif mutasyonlar ise, etkilenen allelde fonksiyon kaybına yol açarak Kv11.1 proteinini kodladığı normal veya vahşi tip allelin fonksiyonuna negatif olarak etki eder. Por bölgesinde bulunan UQTS Tip 2 dominant negatif mutasyonları, I_{Kr} akımında %70 gibi ciddi azalmaya sebep olur. Bu tip mutasyona sahip UQTS tip 2 hastaları, aritmik olaylar açısından daha fazla risk taşımaktadır (74). UQTS tip 2'ye bağlı Kv11.1'de meydana gelen mutasyonlar, dört sınıfta toplanabilir. Sınıf 1 mutasyonlar, Kv11.1 alfa alt ünitelerinin sentezi ve iletimini olumsuz yönde etkiler. Sınıf 2 mutasyonlar, Kv11.1 proteinlerinin hücre membranına iletilmesinde etkilidir. Ayrıca bu mutasyonlar, Kv11.1 proteinlerinin katlanma etkinliğini düşürür ve hücre kalite kontrol mekanizlarında, proteinin endoplazmik retikulumda kalmasına neden olup, membrana iletilmesi engeller. Sınıf 3 mutasyonlar, Kv11.1 kanal kapılamasını, sınıf 4 mutasyonlar da K^+ iyonları geçişini negatif olarak etkiler (75, 76). *KCNH2* mutasyonlarının yaklaşık %40'ı anlamsız mutasyon, çerçeve kayması, insersiyon, delesyon veya duplikasyonlardır. UQTS Tip 2 mutasyonlarının %60'ı amino asit kodonlarını değişmesine neden olan tek nükleotit mutasyonlarıdır.

UQTS vakalarının %7-10 Tip 3'e aittir ve 3. kromozomda bulunan *SCN5A* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşur. *SCN5A* geni, Nav1.5 sodyum kanalının alfa alt ünitesini kodlar. Sodyum kanalları, elektriksel potansiyeli olan hücrelerin birçoğunda aksiyon potansiyelin başlangıç fazından sorumlu voltaj kapılı membran proteinleridir (77). Kanal, depolarizasyon boyunca kısa süre açık kalır ve aksiyon potansiyelinin başlaması ve iletilmesi için hızlıca inaktive olur. UQTS Tip 3 ile ilişkili mutasyonlar, Na^+ kanalının doğru zamanda kapanmasını engelleyen, fonksiyon artışına neden olan mutasyonlardır. Bu mutasyonlar, aksiyon potansiyelinin ikinci fazında sodyum iyonlarının sürekli hücre içine girmesine ve bunun sonucunda da repolarizasyonun uzamasına neden olur. Repolarizasyonun uzaması QT aralığının, EKG grafiğinde uzaması ile sonuçlanır. UQTS Tip 3 hastalarında, QT aralığının uzamasını yanında ST segmentinde elevasyon da gözlenmektedir. UQTS Tip 1 ve Tip 2'ye göre UQTS Tip 3'e sahip hastalarda daha uzun düzenlenmiş QT aralığı gözlenmektedir (78). Hastaların %60'ında dinlenme ve uyku halinde ani kardiyak ölüm gözlenmektedir. Hastalığın tanısı, elektrokardiyografik bulgular ve aile hikayesine göre konulabilmektedir. UQTS tedavisinde genel olarak kullanılan beta

blokörlerin, kalp ritmini yavaşlatma etkisi nedeniyle, dinlenme sırasında brakardi gözlenen hastalarda kullanımına dikkat edilmesi gerekmektedir (79).

4.9 UQTS'e Yönelik Tedavi Yaklaşımları

4.9.1 Ablasyon yöntemi

Katater ablasyonu supraventriküler taşikardi, ventriküler taşikardi ve atriyal fibrilasyon gibi birçok aritmi çeşidi için etkili bir tedavi yöntemidir. Ablasyon; ısıtma ya da dondurma gibi bir termal yaralama ile yapılmaktadır. Kardiyak MRI, bilgisayarlı tomografi ve ultrason ile görüntüleme tekniklerinin elektrofizyolojik haritalama sistemlerine dahil edilmesiyle bu yöntem, uygulanabilirlik kazanmıştır. Elektroanatomik haritalama sistemleri ile, elektrofizyolojik verilerin haritalanması sayesinde, aritmi kaynağının lokalizasyonu tespit edilebilmektedir. Özellikle iskemi sonrası gelişen aritmilerin ve bazı idiyopatik aritmilerin ablasyonunu yönlendirebilmek için çok küçük amplitüd sinyallerinin tespit edilmesini sağlayacak kalitede kayıt sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Daha iyi haritalama kataterleri ve sinyal işleme ekipmanlarının geliştirilmesi, aritmilerin tanımlanması kolaylaştırarak ablasyonun daha doğru bir şekilde hedeflenmesini sağlayacaktır. Görüntüleme teknikleri geliştikçe, ablasyon yönteminin kardiyak aritmi tedavisindeki etkinliği artacaktır. Bilgisayarlı tomografi fibröz dokuyu miyositlerden ayırma konusunda ultrason ile görüntülemeye göre daha iyi uzamsal çözünürlük sağlamaktadır. Yüksek çözünürlüklü kayıt yöntemleri ile ablasyon lezyonları daha iyi tanımlanır hale getirilmelidir. Radyofrekans akımı, ablasyon için basit güvenli ve kolay uygulanabilen bir enerji kaynağıdır. Ancak ciddi aritmi substratlarının ablasyonu için, başka enerji kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır (80, 81).

4.9.2 İlaç tedavisi

İyon kanallarını hedefleyen antiaritmik ilaçların, aritmi tedavisinde kısıtlı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Farmakolojik ajanlar, hücrelerin eşleşmesini sağlar. Aritmi tedavisinde kullanılan bu ajanların, istenmeyen yan etkileri de bulunmaktadır. İlacın hedef bölgeye manyetik nanopartikül vb. taşıyıcılar ile iletilmesi, olası yan etkileri ortadan kaldırabilir. Kardiyak iletim sisteminde yapılan modülasyonlar, aritmiyi baskılayabileceği gibi pro-aritmi oluşturma riski de taşımaktadır. Bunların yanında farmokolojik tedaviler, yaşlanma ile beraber gözlenen apoptoz ve fibrozis gibi

aritmojeneze neden olan süreçleri yavaşlatması nedeniyle aritmi tedavisinde etkinliğini korumaktadır (82).

Beta blokerler, özellikle UQTS'li hastalarda temel tedavi seçeneğidir. Kronik tedavide iyi tolere edilip kan-beyin bariyerini kolayca geçebilmektedirler. Ancak beta blokerlerin en büyük dezavantajı, günlük çoklu uygulamaya ihtiyaç duyulmasıdır. Beta blokerler, UQTS Tip 1 hastaları için yüksek derecede etkili olsa da, UQTS Tip 2 ve Tip 3 hastaları için aynı derecede etkili değildir ve UQTS'e sahip erkeklerde kadınlardan daha etkilidir. UQTS Tip 3 hastalarının tedavisinde mexiletin, flekainid veya ranolazin gibi sodyum kanal blokerleri kullanılmaktadır (83).

4.9.3 İmplant edilebilen kardiyoverter defibrilatör (ICD)

İmplant edilebilen kardiyoverter defibrilatör (ICD), beta bloker tedavisi gördüğü halde tekrarlayan senkop atakları ve kardiyak arrest gözlenen hastalarda uygulanan bir tedavi yöntemidir. Defibrilatör cihazları anormal kalp ritmini algılar ve ihtiyaca göre düşük ya da yüksek enerjili elektrik şoku vererek kalp ritmini düzenler. Akü ile çalışan bir akım üretici, anjiyografi yöntemiyle, göğüs veya karın derisi altında bir cep oluşturularak yerleştirilir. Cihazın kabloları veya elektrodları akım üreten jeneratörden kalbin yüzeyine kadar uzanır. Bu sayede defibrilatöre, kalpten aldığı elektrik sinyallerini iletir. Günümüzde birçok kardiyoverter defibrilatör, açık kalp ameliyatına gerek kalmadan transvenöz teknoloji ile implant edilebilmektedir. Kabin elektriksel ihtiyacına göre defibrilatör pilinin kullanım süresi değişebilir. ICD uygulaması yapılan hastaların, X-Ray ve MRI gibi cihazlardan uzak durması önerilmektedir (84). 2017 yılında yapılan klinik çalışmalarda, ICD transplante edilen hastalarda placebo grubuna göre ölüm riskinin %23 azaldığı ve 5 yıl içerisinde mortalitenin %7.2 azaldığı görülmüştür (85).

4.9.4 Sol servikal torasik sempatektomi (LCSD)

Beta bloker tedavisi uygulanmış ancak sonuç alınamamış hastalarda veya ICD implantasyonunun riskli olduğu durumlarda, sol servikal torasik sempatektomi alternatif bir tedavi seçeneğidir (86). Bu tedavi yönteminde, subklavikuler bölgede küçük bir insizyon yapılarak anterior scalene kası ve phrenik sinir ve uydu gangliyonu izole edilir ve ayrılır. Operasyon süresi kısa olduğu için açık torakotominin getirdiği riskleri taşımaktadır (87). Bu yöntem alternatif olarak video aracılı torakoskopi ile

toraksik sempatektomi yöntemi 1990'ların sonunda uygulanmaya başlanılmıştır. Bu yöntemde hasta genel anesteziye alınarak sol göğüs kafesinin midaksilar hattı boyunca iki veya üç bölgeden insizyon ile sempatektomi gerçekleştirilir. Torakoskopi, komplikasyon riskinin düşük olması, operasyondan sonra daha kısa süre hastanede kalma gerekliliği nedeniyle açık torakotomiye göre çok daha düşük bir risk profili bulunmaktadır. Sol servikal torasik sempatektomi, UQTS'li hastaların 40 yılı aşkın süredir kullanılan bir tedavi yöntemidir. LSCD sonrası hastalarda görülen kardiyak olayların %99'dan %45'e kadar düştüğü literatürde belirtilmektedir (88).

4.10 Aritminin Transgenik Fare Modelleri

Yeniden programlama ile birçok hastalık *in vitro* ortamda modellenebilmektedir. Transgenik teknolojiler ile üretilen fare modelleri, genlerin patofizyolojik rolünü incelemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Transgenik hayvan modelleri, hastalıkların genetik kökeni hakkında literatüre büyük katkısı bulunmaktadır. Bunun yanında transgenik fare modelleri, hastalıkların tespitinde yeni araçlar ve terapötik stratejilerin geliştirilmesine yardımcı oldukları için yaygın olarak kullanılmaktadır (89).

4.10.1 UQTS tip1 aritmi transgenik fare modelleri

Kalıtımsal UQTS'u genellikle potasyum kanalının alfa alt ünitesini kodlayan *KCNQ1* genindeki mutasyonlar ile ilişkilendirilmektedir (90). Lee ve arkadaşlarının 2001 yılında, *KCNQ1* geninin tahrip edildiği *Kcnq1^{-/-}* transgenik farelerde klinikte olduğu gibi anormal T dalgası ve QTc değerinin vahşi tipe göre uzadığı görülmüştür.

İşitmenin sağlanabilmesi için epitel hücrelerince salgılanan endolimfik sıvının K^+ iyonu konsantrasyonu yüksek olması gerekmektedir. *KCNQ1* ve *KCNE1* geni, iç kulaktaki striya vaskülaris hücrelerinde eksprese edilir ve vestibüler hücreleri apikal membranda I_{Ks} akımını meydana getirir. Pfeifer ve arkadaşlarının oluşturdukları *Kcnq1^{-/-}* transgenik farelerde, iç kulak sıvısı miktarında ve sıvıdaki K^+ iyonundaki azalmaya bağlı olarak, kliniktekine benzer sağırılık fenotipi gözlenmektedir. Bunun yanında *Kcnq1^{-/-}* homozigot transgenik farelerde, iç kulaktaki defekte bağlı olarak hiperaktif davranışlar gözlemlenmiştir (4).

Pfeifer ve arkadaşları, 2004 yılında *Kcnq1* geninde meydana gelen mutasyonun oluşturduğu kardiyak defekti, iç kulakta meydana gelen işitsel defektten bağımsız olarak değerlendirebilmek için farklı bir transgenik fare soyu oluşturmuşlardır. *Kcnq1* geninde oluşturdukları A340E nokta mutasyonu, klinikteki görülen ve UQTS'in bir alt tipi olan otozomal dominant geçişli Romano Ward Sendromunu (RWS) modellemişlerdir. QTc değerinin 65ms'den düşük olan fareler sağlıklı fenotip gösterirken QTc değeri 73ms ve üzerinde olan fareler hastalık fenotipini gösterdiğini belirtmişlerdir. Aritmi modeli transgenik farelerden alınan EKG dataları incelendiğinde klinikte görülene benzer olarak QT aralığında ve QTc değerlerinde, istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Bunun yanında *Kcnq1* geninde meydana getirdikleri T311I mutasyonu, otozomal resesif kalıtım gösteren JLNS sendromunun *in vivo* modelini temsil etmektedir. Bu mutasyonu taşıyan farelerde, *Kcnq1*^{-/-} farelerde olduğu gibi hiperaktivite ve sağırılık fenotipi gözlemlenmiştir. Pfeifer ve arkadaşlarının oluşturdukları, bu üç farklı fare soyundan A340E mutasyonunu taşıyan transgenik farelerde, iç kulaktaki defektten bağımsız olarak kardiyak aritminin *in vivo* modeli oluşturulmuştur (5).

4.10.2 UQTS tip 2 aritmi transgenik fare modelleri

UQTS ile ilişkili HERG (KCNH2) geninin faredeki homoloğu olan *Merg1* geninin, fare kalbinde eksprese olduğu bilinmektedir. Babij ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, HERG genindeki dominant negatif konstraktların faredeki yüksek seviyede ekspresyonu kardiyomiyositlerde APD uzamasına yol açarken, iskelet kası hücrelerinin bu durumdan etkilenmediğini gözlemlenmiştir (6).

London ve arkadaşlarının, *Merg1* geninde oluşturduğu hedeflenmiş mutasyonların homozigot kalıtıldığı durumlarda, embriyonik dönemde mortalite gözlenmiştir. *Merg1*^{+/-} genotipine sahip transgenik farelere, α -adrenerjik agonist uygulaması sonrasında QT uzaması ve aritmiler gözlenmiştir (91). *Merg1*'in kardiyak izoformu olan N-ucu, hücre içi domaini değişmiş *Merg1b*, *Merg1a* ile deaktivasyonu hızlandırmak üzere bir araya gelmektedir. Milller ve arkadaşları 2003 yılında, *Merg1b*'de hedeflenmiş mutasyonlar meydana getirerek oluşturdukları transgenik fare soyunda, yetişkin kardiyomiyositlerde I_{Kr} 'de azalma tespit etmişlerdir. Ayrıca

Merg1b^{-/-} genotipine sahip farelerin bradiaritmilere yatkın olduğunu gözlemlemişlerdir (7).

4.10.3 UQTS tip 3 aritmi transgenik fare modelleri

SCN5A genindeki mutasyonlar ile ilişkili UQTS, popülasyonda daha az gözlenmektedir ancak UQTS Tip 1 ve Tip 2'ye göre daha ölümcül olduğu bilinmektedir. Diğer UQTS çeşitlerinde olduğu gibi, UQTS Tip 3'te de ventriküler repolarizasyon evresindeki uzamaya bağlı olarak senkop ve ani ölümlere yol açabilecek ventriküler fibrilasyon ve torsades de pointes olarak adlandırılan ventriküler taşikardiler meydana gelmektedir (92).

Nuyens ve arkadaşları, KPQ rezidularında knock-in teknolojisi ile UQTS Tip 3 fare modeli oluşturmuşlardır (93). *Scn5a*^{Δ/+} mutasyonunun heterozigot olarak kalıtıldığı farelerde spontan olarak meydana gelen ventriküler aritmi gibi UQTS'de görülen tipik kardiyak olayları gözlemlemişlerdir. *Scn5a*^{Δ/+} mutant farelerin ventriküler preparatlarından alınan transmembran aksiyon potansiyelinde, vahşi tipe kıyasla, anlamlı olarak uzama gözlenmiştir. Bunların yanında aksiyon potansiyeli genliğinde ve yukarı vuruş hızında, herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Mutant farelerden izole ettikleri kardiyomiyositlerde, tüm hücre yama kıskacı analizi yaptıklarında, aksiyon potansiyelin uzamasını açıklayacak şekilde geç içeri doğru sodyum akımında artış gözlemişlerdir. Ancak bu bulgular, aynı model üzerinde çalışan Fredj ve arkadaşları tarafından doğrulanmamıştır (94). *Scn5a*^{Δ/+} mutasyonuna sahip farelerde, tekrarlanan intrakardiyak uyarılar ile kalp hızının ani hızlanması, polimorfik ventriküler aritmeyi tetiklerken, aynı uyaranlara vahşi tip fareler maruz bırakıldığında herhangi bir aritmik olay gözlenmemiştir. *Scn5a*^{Δ/+} fareleri, aynı zamanda, erken ard depolarizasyon sırasında görülen pacing hızının ani hızlanması nedeniyle meydana gelen, paradoksal geçici aksiyon potansiyeli uzaması ile de karakterize edilmiştir. Kardiyak elektriksel aktivitenin otonomik modülasyonu ve aritmi *Scn5a*^{Δ/+} transgenik fare modellerinde hem *in vivo* hem *ex vivo* olarak ayrıntılı olarak araştırılmıştır (95).

4.10.4 Diğer aritmi transgenik fare modelleri

UQTS Tip 7 olarak da adlandırılan Andersen Sendromu, muskuloskeletal anormallikler, QT aralığında uzama torsades de pointes aritmilerinden farklı aritmiler

ile ilişkili kongenital bir hastalıktır. Anderson Sendromu geciktirici K⁺ kanalını kodlayan *KCNJ2* genindeki fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir (96).

Zaritsky ve arkadaşlarının *Kir2.1*'de oluşturdukları delesyon sonucu elde ettikleri transgenik fare soyundaki homozigot genotipli farelerin, doğumdan kısa bir süre sonra mortalite gözlemlemişlerdir. Ayrıca mutasyona sahip transgenik neonatal farelerde, APD uzaması ve sinüs brakardisi tespit etmişlerdir. Bunun yanında *Kir2.2*'nin delesyonu, I_{K1} akımında %50'lik bir düşüşe sebep olmuştur (97).

UQTS Tip 4, *Ankyrin-B* geninde meydana gelen mutasyon sonucu görülmektedir. *Ankyrin-B*'nin birçok kardiyak iyon kanalı ve reseptörü ile etkileşimi olduğu bilinmektedir. İçeri doğru Na⁺ ve Ca⁺² akımındaki değişiklikler, QT aralığının uzamasına ve aritmiye neden olduğu bilinmektedir. Chauhan ve arkadaşlarının knockout teknoloji ile oluşturdukları Ankyrin-B mutant farelerde, I_{Na} genliğindeki azalma ve kanalların geç açılması ile ilişkili aksiyon potansiyeli ve QT aralığında uzama görülmüştür. UQTS Tip 4'e sahip kişilerde, Ankyrin-B'nin hangi kanal ile etkileşime girerek hastalık fenotipini oluşturduğu, transgenik fare modelleri yardımıyla detaylı bir şekilde incelenebilir (98).

Wickenden ve arkadaşları, dominant negatif strateji ile *Kv4.2*'nin kesilmiş bir formunu farelerde yüksek seviyede ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu şekilde oluşturdukları transgenik fare soyunda progresif kardiyomiyopati gözlemlemişlerdir (99).

4.11 Kalpte Hücresel Tedavi Yaklaşımları

4.12 Hücre Kaynakları

4.12.1 Miyoblastlar

Miyoblastlar miyositlere dönüşebilmeleri, kasılmaları ve kendi kendine yenilenebilir olmaları nedeniyle kardiyak onarım alanındaki temel ve klinik araştırmalarda sıklıkla tercih edilen hücrelerdir. Küçük bir kas biyopsisinden yüksek sayıda otolog miyoblast elde edilebilmesi ve miyoblastların tümör formasyonu oluşturma riskinin düşük olması, transplantasyon çalışmalarında miyoblastlar sıklıkla kullanılmaktadır (100). Yapılan hayvan çalışmalarında, miyoblast enjeksiyonundan

sonra hücrelerin canlılığını koruduğunu ve iki hafta içerisinde infarkt bölgesindeki fibröz dokunun %75'inin miyokardiyal doku ile yer değiştirdiği gözlenmiştir. Miyoblastlar, Troponin I ve MHC gibi kardiyak spesifik proteinleri eksprese ettiği için kardiyak benzeri fenotip gösterdiği bilinmektedir (101).

Miyokard enfarktüs sonrası miyoblast transplantasyonunun etkinliği fare, şıçan, tavşan, koyun ve köpek gibi birçok hayvan modelinde gösterilmiştir (101-103). Miyoblast transplantasyonunun ejeksiyon-fraksiyon gibi fonksiyonel parametreleri iyileştirdiği ve enfarktüs bölgesindeki duvar kalınlaşması ve miyokardiyal doku velositesi gibi birçok bölgesel parametreleri düzenlediği gösterilmiştir (104).

4.12.2 Embriyonik kök hücreler

Embriyonik kök hücreler; blastosist aşamasındaki embriyonun iç hücre kütesinden kaynaklanan, kendi kendine yenilebile koloniler halinde çoğalabilen ve birçok farklı hücre tipine farklılaşabilme kapasitesi olan hücrelerdir. Ancak bazı özellikleri nedeniyle klinik translasyonel çalışmalarda kullanılması kısıtlanmaktadır. Farklılaşmamış, primitif aşamadaki bu hücrelerin transplante edildiğinde teratoma yapıları oluşturma riski bulunmaktadır. Bunun yanında allojenik özellikte olmalarına rağmen immün rejeksiyon riski taşımaktadırlar.

4.12.3 Kemik iliği kaynaklı hücreler

Kemik iliği kaynaklı kök hücreler kemik iliği biyopsisi veya aspirasyonu sırasında kolayca elde edilebilecek otolog hücrelerdir. Kemik iliği kaynaklı hücreleri içinde sıklıkla kullanılan kemik iliği mononükleer hücreleri, genellikle kemik iliğinden gradiyent santrifüjleme ile izole edilmektedir. Kemik iliği, hemoteopetik kök hücre endotel ve mezankimal kök hücre gibi birçok farklı hücre popülasyonunu içerdiğinden oldukça heterojen bir dokudur. İnsan hematopoetik kök hücreleri, tüm kan hücrelerini oluşturabilme kapasitesine sahip olup, kardiyomiyosit, endotel ve düz kas hücrelerine *in vivo* farklılaşma yeteneğine de sahiptir. İskemik kalp dokusunda kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin enjeksiyonu sonrası bu hücrelerin kardiyomiyositlere, düz kas hücrelerine, endotel hücrelerine trans-diferansiye kapasitesi olduğu gözlenmiştir, ancak bu sonuçlar tartışmalıdır (105). Bazı çalışmalar, kemik iliği kökenli hücrelerin dokuda parakrin etkiler sonucu iyileşme sağladığı ve bu hücrelerin kardiyomiyositlere farklılaşma kapasitesinin olmadığı yönünde veriler

sunmuştur (106). Başka bir hipotez ise hematopetik kök hücrelerin kalpteki kardiyomiyositler ile füzyon yoluyla birleştiği yönündedir (107).

Çeşitli hayvan modeli çalışmalarında gözlenen kardiyak fonksiyonlardaki gelişmeler, akut miyokard enfarktüsünden sonra kemik iliği hücresi transplantasyonunun etkinliğini araştırmak için bir dizi klinik çalışmanın yapılmasına yol açmıştır. Miyokard enfarktüs geçirmiş hastalara kemik iliği hücresi transplantasyonu yapıldıktan 4 ay sonra sol ventrikül ejeksiyon-fraksiyon (LVEF) ve duvar hareketi skor indeksinde, ventriküler fonksiyonunun iyileştiği gözlenmiştir. Bunların yanında enfarktüs bölgesinin etrafında kan akışının kısmi olarak sağlandığı görülmüştür (108). Tüm bunlar göz önüne alındığında, kalp fonksiyonundaki kısa dönemli iyileşme, enfarktüs bölgesinin revaskülarizasyonu sayesinde hipertrofik kardiyomiyositlerin ve miyofibroblastların apoptozunun azaltılmasına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Kemik iliği kaynaklı hücrelerin kullanıldığı 1 ile 5 yıl arasında süren 725 hastanın bulunduğu 8 klinik çalışmanın sonuçlarına göre, kemik iliği hücre transplantasyonu yapılan hastalarda, LVEF fonksiyonlarının iyileştiği gözlenmiş ve hücre transplantasyonu yapılmayan gruba göre ölüm riskinin daha az olduğu görülmüştür (109).

4.12.4 Kardiyak kök hücreler

Embriyogenez sırasında epikardiyal progenitör hücreleri miyokardiyuma göç ederek düz kas hücrelerine, kardiyak fibroblastlara ve vaskülarizasyonu sağlabilmek için endotel hücrelere farklılaşırlar. Ayrıca bu hücreler, kardiyomiyositlere farklılaşma kapasiteleriyle kalp rejenerasyonu için hücre kaynağı potansiyeli taşımaktadırlar. Epikardiyal progenitör hücrelerinin Wt1 ve T-box transkripsiyon faktörlerini eksprese eden iki farklı popülasyonları bulunur. Ayrıca Thymosin-beta 4 (TB4)'ün epikardiyal hücrelerin kardiyak farklılaşmasına yardımcı olduğu ve kardiyomiyosit canlılığını olumlu yönde etkilediği bilinmektedir (110). Yetişkin farelerde miyokardiyal enfarktüs sonrası intrakardiyak veya sistemik TB4 enjeksiyonu ardından kardiyak fonksiyonun geliştiği gözlenmiştir. Eksojen TB4'ün embriyonik miyogenez yollarını yeniden aktive ettiği ve miyokardiyumdaki anjiyogenezi arttırdığı

düşünülmektedir. Ayrıca farelerde LAD igasyonu yapıldıktan sonra ve önce TB4 uygulamasının, miyokardiyal rejenerasyonu desteklediği görülmüştür (111).

Nkx2.5 geni, kardiyak gelişimin erken döneminde, kardiyak crescentte bulunan progenitör hücreleri tarafından eksprese edilir. Nkx2.5 knockout farelerde, yapısal abnormalitelerin görüldüğü bilinmektedir (112). Matsuura ve arkadaşları, miyokardiyal enfarktüs sonrası farelere, Nkx2.5⁺ hücrelerinin transplantasyonu sonrası, SDF-1 (stromal cell derived factor) salgılanmasını takiben diğer kardiyak progenitör hücrelerin enfarktüs bölgesine göçünü sağlayıp, kalp fonksiyonunu iyileştirdiğini gözlemlemişlerdir. (113) Bunun yanında yapılan bir diğer çalışmada, sıçan enfarktüs modeline Nkx2.5⁺ kardiyomiyosit transplantasyonundan 10 hafta sonra, hücrelerin enfarktüs bölgesine entegre olarak, kardiyomiyosit ve düz kas hücrelerine farklılaştığını gözlemişlerdir. Ayrıca kardiyak fonksiyonunun kontrol grubuna oranla anlamlı derecede iyileştiğini tespit etmişlerdir (114).

Isl1 kardiyak progenitör hücreleri, kalpte bulunan tüm kardiyak soyları oluşturabilecek potansiyele sahiptir ve bu özellikleri nedeniyle hücresel tedavi uygulamalarında kullanılmaya aday hücrelerdir. Isl1⁺ hücrelerinin, enfarktüs modeli oluşturdukları farelere transplantasyonu sonrası, üç kardiyak soya farklılaşabildiği gösterilmiştir (115). Transplantasyon sonrası farelerin enfarkt bölgesindeki fibröz dokunun azalma ve kardiyak fonksiyonda iyileşme gözlenmiştir. Isl1⁺ kardiyak progenitör transplantasyonunun, miyokardiyumun rejenerasyonun yanında vasküler yapının iyileşmesine de katkı sağladığı düşünülmektedir.

4.13 Transplantasyon Teknikleri

4.13.1 Doğrudan enjeksiyon

İntramiyokardiyal hücre transplantasyonun, en önemli avantajı hasar gören bölgeye hücrelerin doğrudan ulaşmasının sağlanmasıdır. Bu yöntem ile hücreler, hedef bölgeye transplante edildiği için, hücrelerin homing sinyallerine ihtiyaçları kalmadan miyokardiyumda canlılığını koruduğu düşünülmektedir. Ayrıca diğer transplantasyon yöntemlerinde gözlenen; başta akciğer olmak üzere, diğer organlardaki infiltrasyon problemi, doğrudan enjeksiyon yöneminde herhangi bir sorun teşkil etmemektedir (116).

Reinecke ve arkadaşları fetal neonatal ve yetişkin kardiyomyositlerini sağlıklı ve soğuk hasarı verilmiş kalbe intramiyokardiyal enjeksiyon ile transplante etmişlerdir. 8 hafta içerisinde neonatal sıçan kardiyomyositlerinin, hipertrofiye uğrayarak yetişkin kardiyomyositlere benzer boyutlara geldiğini gözlemlemişlerdir (117). Watanaba ve arkadaşları miyokard enfarktüs modeli domuzlara, neonatal domuz kardiyomyositlerinin transplantasyonu sonrası yaptıkları gözlemlerde, hücre canlılığının düşük olduğunu görmüşlerdir. Transplantasyon sonrası düşük etkinliğin sebebinin, konak ve hücre kaynağının türlerinin farklı olmasına bağlı olarak oluşan immün yanıtın kaynaklandığı düşünülmektedir (118). Kollosov ve arkadaşları kardiyak hücre transplantasyon çalışmalarında yüksek saflıkta kardiyomyosit yerine saflaştırdıkları kardiyomyositleri kardiyak fibroblastlar ile birlikte transplante ettiklerinde donör kardiyomyositlerin konak kalbe tutunma etkinliğini arttırdığını gözlemlemişlerdir (119). Laake ve arkadaşları immün deficient fare kalplerine insan kök hücre kaynaklı kardiyomyosit transplantasyonu sonrası kardiyomyosit kökenli olmayan hücre verilen kalplere oranlara, grafitin daha uzun süreli konak kalp dokusuna entegre olduğu bulunmuştur (120). Laflamme ve arkadaşları 10×10^6 hücre içeren insan EKH kaynaklı kardiyomyositlerinin enfarktüs oluşturdukları sıçan kalbine transplantasyonu sonrası, hücrelerin konak miyokardiyuma tutunduğunu ve canlılıklarını koruduğunu histolojik olarak göstermişlerdir (121).

4.13.2 İntravenöz transplantasyon

İntravenöz transplantasyon yaklaşımının en büyük avantajı, uygulamasının kolay olması sayesinde çoklu terapötik uygulamalara elverişli olmasıdır. Bunun yanında, diğer transplantasyon yöntemlerine kıyasla non-invaziv bir yöntem olması nedeniyle klinikte hücre transplantasyonunda tercih edilen bir yöntemdir. Uygulanabilirliği ve güvenliği ve fare ve domuzda yapılan çalışmaların ardından faz I klinik çalışmaları ile doğrulanmıştır. Akut miyokard enfarktüs sonrası *ex vivo* kültüre edilmiş mezankimal kök hücrelerin, intravenöz transplantasyonu sonrası hücrelerin infüzyon etkinliğini değerlendirmeyi amaçlayan faz II çalışması da bulunmaktadır (122). Ancak bunların yanında intravenöz transplantasyonda, hücreler vücuda sistematik dolaşım yoluyla verildiği için, hücrelerin özellikle akciğer gibi farklı organlarda hapsedilme olasılığının arttığı göz önünde bulundurulmalıdır. Literatürde

de kliniktekinе benzer olarak, birçok hayvan modelinde miyokard enfarktüsü sonrası intravenöz hücre transplantasyonu çalışması bulunmaktadır. Lee ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada, mezankimal kök hücreleri, enfarktüs modeli farelere intravenöz olarak transplante etmişlerdir. Transplantasyondan 14 gün sonra, kalp kesitlerini incelediklerinde doku yenilenmesinin kontrol kalplere göre anlamlı şekilde arttığını gözlemlemişlerdir (123).

Kania ve arkadaşları, farklı kök hücre gruplarının, miyokarditte görülen kardiyak fonksiyon bozukluğuna etkilerini incelemek üzere yaptıkları çalışmada, kemik iliği kaynaklı prominin-L eksprese eden progenitör hücreleri otoimmün miyokardit fare modellerine intravenöz transplantasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Transplantasyon sonrasındaki 30 gün boyunca hastalığın neovaskülarizasyonun indüklendiğini tespit etmişlerdir (124). Wang ve arkadaşları, virüs kullanarak oluşturdukları miyokardit modelinde, kuyruk veninden EKH transplantasyonu sonrası viral miyokardite sahip hayvanlarda yaşam sürelerinde anlamlı bir şekilde artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca, transplantasyon yaptıkları farelerde nekrozun ve enflamuar hücrelerin infiltrasyonunun azaldığını tespit etmişlerdir (125).

4.13.3 Hücre tabakası yöntemi

Okano ve arkadaşları, oluşturdukları 3 katmanlı kardiyak hücre tabakalarını sıçan kalbine transplante etmişlerdir. Ancak transplante ettikleri hücre tabakalarının kardiyak fonksiyonu düzenleyeci bir etkisini gözlemleyememişlerdir. Buna alternatif olarak fonksiyonel miyokardiyal hücre tabakası üretebilmek için insan fibrin ve trombin scaffoldları kullanmışlardır (126).

4.13.4 3D doku mühendisliği

Kardiyak doku mühendisliği çalışmaları, 2000 yılında Leor ve arkadaşlarının alginat poröz iskele üretmesiyle başlamıştır (127). Silindirik alginat scaffoldların üzerine ekilmiştir kardiyomiyosit ekilerek mühendislik yöntemleriyle üretilmiş kalp dokusu, miyokard enfarktüs modeli farelere, enfarktüstten 7 gün sonra transplante edilmiştir. Histolojik incelemeler sonucunda düzenli yerleşen miyofiberlerin konak miyokardiyum hücreleri ile gap bağlantısı oluşturduğunu ve fibroblast, lenfosit ve makrofajların da graft dokusunda bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Bunun yanında transplantasyon sonrası sol ventrikül fonksiyonunun düzeldiği, fraksiyonel shortening

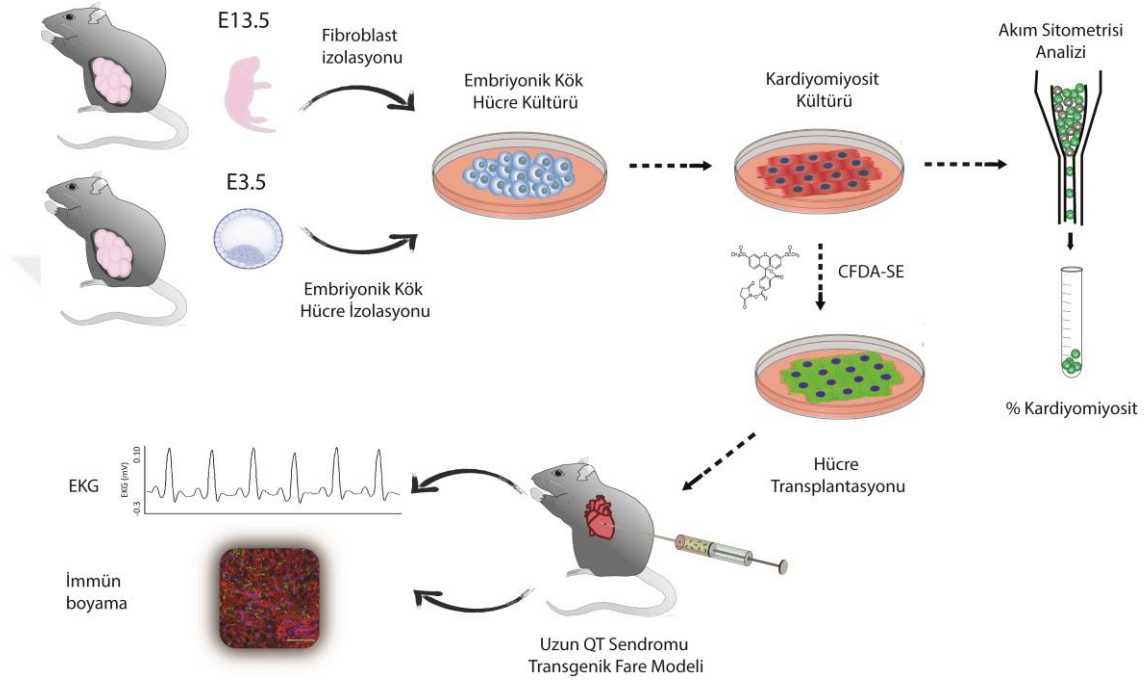
%47'den %53'e yükselmiştir (128). Zimmerman ve arkadaşları kardiyomiyosit içeren, 4mm kalınlığında ve 15mm çapında oluşturdukları iskeleye kollejen, matrigel, ve kültür besiyeri içerisinde kardiyak hücreleri ile oluşturdukları doku tabakasını, immun sistemi baskılanmış sıçan kalbine transplante ettikten 28 gün sonra, mühendislik yöntemleriyle üretilmiş kalp dokusunun konak miyokardiyum ile eşleştiğini gözlemlemişlerdir. Bunun yanında kardiyak doku transplantasyonu yapılan kalplerde, kontrol kalplere oranla, miyokardiyal segmentlerin sistolik duvar kalınlaşmasını indüklediğini ve fraksiyonel alan shorteningi azalttığını görmüşlerdir (129).



5 MATERYAL VE METOT

5.1 Deney Dizaynı

Tez çalışması süresince izlenen basamakların özeti Şekil 5.1.1’de belirtilmiştir.



Şekil 5.1.1. Tez çalışmasının grafiksel özeti

5.2 Fare Soyları

Tez çalışmasında deney hayvanlarında yapılan işlemler, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun 38828770-604.01.01-E10185 numaralı izni ile gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında, C57BL/6 vahşi tip fareler ile 10-12 haftalık yetişkin *Kcnq1*^{A340E/A340E} (J343), *Kcnq1*^{-/-} (J800) transgenik fareler kullanıldı. Hücre transplantasyonunda kullanılan transgenik fareler, çalışmalarını National Institute of Health'de yürüten Prof. Dr. Karl Pfeifer tarafından laboratuvarımıza hibe olarak verilmiştir (4, 5). Transgenik fare soylarının bakımı, çoğaltılması ve kardiyak hücre transplantasyonu işlemleri, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) bünyesinde gerçekleştirildi.

5.3 Kullanılan Sarf Malzemeler ve Besiyerleri

Tablo 5.3.1. Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler

| Sarf Malzemeler | Firma | Katalog Numarası |
|---------------------------------|---------------|------------------|
| Agarose jel | Multicell | 800-015-EG |
| Rnase/Dnase içermeyen su | Sigma Aldrich | W4502 |
| REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit | Sigma Aldrich | XNAT-100RXN |
| Eppendorf tüpleri | Axygen | MCT-150-R |

Tablo 5.3.2. Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler ve malzemeler

| Sarf Malzemeler | Firma | Katalog Numarası |
|--|------------------------|------------------|
| %0.05 Tripsin/EDTA | Gibco | 25300054 |
| %0.25 Tripsin/EDTA | Gibco | 25200056 |
| Fare rekombinant LIF | Sigma Aldrich | L5158 |
| Mitomiyosin-C | Sigma Aldrich | M4287 |
| Gelatin from bovine serum | Sigma Aldrich | G9391-100g |
| DPBS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂) | Gibco | 14190-094 |
| DPBS (+CaCl ₂ , + MgCl ₂) | Gibco | 14040-091 |
| 100 mm bakteri petri | Sigma Aldrich, Corning | CLS430167 |
| 150 mm bakteri petri | Sigma Aldrich, Corning | CLS430599 |
| 100 mm TC petri | Sigma Aldrich, Corning | 430167 |
| 6 well plate | Sigma Aldrich, Corning | 3516 |
| T75 flask | Sigma Aldrich, Corning | 430725U |
| 60mm TC plate | Sigma Aldrich, Corning | 430196 |
| 15 ml Falkon | Falcon | 352096 |
| 50 ml Falkon | Falcon | 352070 |
| Cryotube vial | Nunc | 363401 |
| 0.22 µm filtre | Millipore | SLGP033RS |
| Multipipet | GILSON, pipetman | FA10009 |

Tablo 5.3.3. Hücre kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri

| Sarf Malzeme | Miktar | Marka | Katalog Numarası |
|--|---------------|---------------|-------------------------|
| Yeniden Programlama Besi Yeri | | | |
| DMEM | %81 | Gibco | 41966-029 |
| KOSR | % 15 | Gibco | 10828-028 |
| Glutamax | % 1 | Gibco | 35050-61 |
| MEM NEAA | % 1 | Gibco | 11140-050 |
| Na-pyruvate | % 1 | Gibco | 11360-070 |
| P/S | % 1 | Sigma Aldrich | M3148 |
| mLIF | 5000X | Sigma Aldrich | L5158 |
| B-mercaptoethanol | 130000X | Gibco | 15140-122 |
| FEF Besi Yeri | | | |
| DMEM | %87 | Gibco | 41966-029 |
| FBS | % 10 | Gibco | 10270-106 |
| Glutamax | % 1 | Gibco | 35050-61 |
| MEM NEAA | % 1 | Gibco | 11140-050 |
| P/S | % 1 | Gibco | 35050-61 |
| Adaptasyon Besi Yeri | | | |
| IMDM | %83 | Gibco | 12440-053 |
| KOSR | % 15 | Gibco | 10828-028 |
| Glutamax | % 1 | Gibco | 35050-61 |
| P/S | % 1 | Gibco | 15140-122 |
| 1-Thioglycerol | 130000X | Sigma Aldrich | M6145 |
| mLIF | 5000X | Sigma Aldrich | L5158 |
| Kardiyak Farklılaştırma Besi Yeri | | | |
| IMDM | %84 | Gibco | 12440-053 |
| FBS | % 15 | Gibco | 10270-106 |
| Glutamax | % 1 | Gibco | 35050-61 |
| L-ascorbic asit | 50 µg/ml | Sigma Aldrich | A4544-100 mg |
| 1-Thioglycerol | 130000X | Sigma Aldrich | M6145 |

Tablo 5.3.4. İmmün boyamalarda ve akım sitometrisinde kullanılan malzemeler

| Sarf Malzemeler | Firma | Katalog Numarası |
|---|------------------|-------------------------|
| Tissue Freezing Medium | Leica Biosystems | 14020108926 |
| Fluoromount Aqueous Mounting Medium | Sigma Aldrich | F4680 |
| PAP Pen | Sigma Aldrich | Z672648-1EA |
| Citrate Buffer | Bio-Optica | 15M103 |
| Hydrogen Peroxide Solution | Sigma Aldrich | H1009 |
| Pozitif yüklü mikroskop slaytları (26x76mm) | Laborant | 201504 |
| Lamel (24x60mm) | Deckglaser | |
| Sodyum Azide | Sigma | S8032 |
| Paraformaldehit | Sigma | 158127 |
| BSA | Capricorn | BSA1S |

Tablo 5.3.5. Antikorlar ve floresan işaretleyiciler

| Sarf Malzemeler | Firma | Katalog Numarası | Konsantrasyonu |
|------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|
| CTNT | Thermo Scientific | MS-295-P | 1:500 |
| Alexa Flour 488 | Cell Signaling | 4408S | 1:1000 |
| Alexa Flour 633 | Molecular Probes | A21050 | 1:500 |
| DAPI | Sigma | D9542 | 1:1000 |
| Vybrant CFDA-SE | Invitrogen | V12883 | 1:1000 |

5.4 Cihazlar

Tablo 5.4.1. Analiz ve görüntülemelerde kullanılan cihazlar ve yazılım programları

| Cihaz/Yazılım Programı | Marka | Model |
|--------------------------|-------------------|----------------------|
| Konfokal Mikroskopu | Zeiss | LSM780 |
| Santrifüj | Thermo Scientific | ST16R |
| Elektroforez cihazı | BIO-RAD | PowerPac Basic Power |
| Jel görüntüleme cihazı | BIO-RAD | ChemiDoc |
| PCR cihazı | BIO-RAD | Thermal Cycler |
| Mikrosantrifüj | Thermo Scientific | MicroCL 17R |
| Cryostat | Leica | CM1950 |
| Biopac Student Lab | BSL Analysis | Versiyon 4.1 |
| Akım sitometrisi analizi | FlowJo | Versiyon 10.5 |
| SPSS | IBM Statistics | Versiyon 19 |

Tablo 5.4.2. İn vivo operasyonlarda kullanılan cihazlar ve malzemeler

| Cihaz/Malzeme | Firma Adı | Katalog Numarası |
|--------------------|--|------------------|
| Ketasol | Richterpharma | 3516 |
| Roumpun | Bayer | 430720U |
| Heparin | Mustafa Nevzat İlaç | Nevparin |
| Metilprednisolon | Sigma | PHR1717 |
| Hamilton enjektörü | Hamilton | 80301-701LT |
| Minivent | Harvard Apparatus | D-79232 |
| Ventilasyon Tüpü | Harvard Apparatus | 73-0027 |
| Trakeal Kanül | Harvard Apparatus | 73-2830 |
| Eğitim Mikroskopu | Zeiss | Discovery V8 |
| Isıtıcı Plaka | WPI | Hot cold plate |
| EKG Kayıt Cihazı | Biopac Systems Ins | MP36 |
| Perfüzyon Pompası | Ismatec | NP40 |
| Forseps | Dumont #5 standard | 11252-30 |
| Makas | Vannas Spring scissors/3 mm cutting edge | 1500--00 |

5.5 Genotip Analizi

Transgenik fare dokusundan genomik DNA izolasyonu ve farelerin genotiplerinin belirlenmesi RED Extract-N-Amp Tissue PCR kiti protokolü takip ederek yapıldı (Tablo 5.5.1). Kısaca, 3-4 haftalık yavru farelerden, alkolle sterilize edilmiş kulak delgeçi yardımıyla 0,5-1cm çapında kulak dokusu örneği alındı. Dokular, farenin bulunduğu kafes ve soy bilgileri yazan steril eppendorf tüplere aktarıldı. Her bir örneğe 25 µl ekstraksiyon solüsyonu ve 6.25 µl doku preperasyon solüsyonu eklendi ve 10 saniye boyunca vortekslenerek karıştırıldı. Solüsyonların içerisinde bulunan doku, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra örnekler, 95°C’de 3 dakika inkübe edildi. Her bir örneğe 25 µl nötralizasyon solüsyonu eklenerek genomik DNA izolasyonu tamamlandı. Kulak dokularından izole edilen genomik DNA ile PCR yapıldı.

Tablo 5.5.1. PCR’da kullanılan malzemeler

| | |
|------------------|-------------------------------------|
| Red Extract | 5 µl |
| Primer (10 µM) | 1 µl (2 primer), 1.5 µl (3 primer) |
| DNA | 1 µl |
| H ₂ O | 3 µl |
| Toplam hacim | 10 µl |

Tablo 5.5.2. Genotiplemede kullanılan PCR primerleri

| Primer | Baz dizisi 5’-3’ |
|---------------|----------------------------|
| Kcnq1 Point F | GCC TCA CTA TCC TGG TAG GC |
| Kcnq1 Point R | GCC GCT TCT GTG AAG TAC C |
| J800 F | CCA GGA GTG GGT GGT TCT AC |
| J800 R | GCC AGC ACT AAA GAT CTT GC |
| J800 Neo F | CGC TTC CTC GTG CTT TAC G |

Tablo 5.5.3. Genotiplemede kullanılan PCR protokolü

| Sıcaklık | Zaman |
|----------|----------------------|
| 95°C | 5 dakika |
| 95°C | 30 saniye (35 döngü) |
| 55-65°C | 30 saniye (35 döngü) |
| 72°C | 1 dakika (35 döngü) |
| 72°C | 10 dakika |
| 4°C | o/n |

Tablo 5.5.4. Transgenik fare soylarında mutasyon blgelerinin baz boyları

| J800 | J343 |
|------------------|------------------|
| 240 bp-vahşi tip | 388 bp-vahşi tip |
| 370 bp-mutant | 508 bp-mutant |

Kcnq1^{A340E/A340E} ve *Kcnq1*^{-/-} transgenik farelerin mutasyon bölgesine spesifik olarak tasarlanmış Tablo 5.5.2’de primerler ile Tablo 5.5.3’ de belirtilen protokol ile yapılan PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri; %1.5 agaroz jelde, bantların yeterince ayrılması için 45 dakika boyunca elektroforez cihazında yürütüldü. Biorad Chemi-doc cihazı ile görüntülen PCR ürünleri, Tablo 5.5.4’ deki referans bantları ile karşılaştırılarak transgenik farelerin genotip analizi tamamlandı.

5.6 Fare Embriyonik Fibroblast (FEF) Kültürü

5.6.1 FEF izolasyonu

Fertilizasyon sonrası embriyonik dönemin 13.5 gününde olan transgenik fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Rahim boynuzları çıkartılarak hızlıca, önce %70 etanol ardından Ca⁺² ve Mg⁺² içeren PBS ile yıkandı. Rahim boynuzları, PBS içeren petri kabına yerleştirildi ve her bir embriyo, plesanta ve embriyonik boynuzdan ayrılarak temiz petri kabına aktarıldı. Embriyoların baş bölgesi ve kırmızı organları çıkarıldı. Doku, steril bistüri yardımıyla, pipetleme yapılabilecek duruma gelene kadar parçalara ayrıldı. Her bir embriyo için 1ml, 100 Kunitz ünite DNaz I içeren %0.05’lik Tripsin/EDTA ile 37°C’de 15 dakika inkübe edildi. Her 5 dakikada

bir pipetleme yapılarak dokunun açılması sağlandı. Enzim aktivitesi her bir embriyo için FBS içeren besiyeri ile inhibe edildi. Hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet, FEF besiyeri ile süspanse edilerek %0.1 gelatin kaplı T75 flasklara yaklaşık her bir flaska 3-4 embriyo gelecek şekilde ekildi. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştığında, bir kısmı stok oluşturmak üzere donduruldu. Diğer flasklar, 1:4 oranında pasajlanarak, pasaj 5'e kadar çoğaltıldı.

5.6.2 FEF pasajı

Hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında, besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler, %0.25'lik Tripsin/EDTA ile 3 dakika 37°C'de inkübasyonun ardından enzim aktivitesi FBS içeren besiyeri ile inhibe edildi. Hücre süspansiyonu, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve pellet, FEF besiyeri ile süspanse edilerek %0.1 jelatin kaplı T75 flasklara eşit şekilde dağıtıldı. Hücrelerin besiyeri 2-3 günde bir değiştirildi.

5.6.3 FEF hücrelerinde mitomiyosin-C uygulaması

Fare EKH'lerin kültür ortamını desteklemek üzere FEF hücreleri %90-95 yoğunluğa ulaştığında, hücrelerin mitotik aktiviteleri Mitomyosin-C ajanı ile durduruldu. Pen/Strep içermeyen besiyerinin içerisine 20 µg/ml konsantrasyonunda Mitomiyosin-C eklenerek 37°C'de 3 saat inkübasyonun sonunda hücre kapları, Ca⁺², Mg⁺² içeren PBS ile yıkandı. Mitotik aktivitesi durdurulmuş FEF hücreleri, fare EKH kültüründe destekleyici hücre olarak kullanıncaya kadar, 2-3 günde bir FEF besiyeri ile değiştirildi.

5.7 Fare Embriyonik Kök Hücre (EKH) Hattı Oluşturulması ve Kültürü

Aritmi modeli transgenik farelerde, hücresel tedavi yaklaşımını incelemek amacıyla, sağlıklı hücre kaynağı olarak C57BL/6 vahşi tip farelerden EKH hattı oluşturuldu. C57BL/6 vahşi tip farelerin süperovülasyonu için, 10 iu folligon enjeksiyonundan 48 saat sonra 10 iu chorulon enjeksiyonu yapılarak üretim kafesi koyuldu. Üretim kafesindeki dişi fareler, embriyonik gün 3.5 (E3.5)'ta sakrifiye edildi. Rezekte edilen uterus, yağ doku ve bağ dokudan ayrıldı. Uterin boynuzları ve ovaryumun uç kısımlarına küçük bir kesik atıldı. Uterin boynuzları M2 besiyeri içeren şırınga yardımıyla yıkanarak blastosistler toplandı. Blastosistlerin zona pellusidasını eritmek amacıyla, 100mm'lik petri kaplarının kapağına, tyroid solüsyonu damlalar

halinde konuldu. Blastositler 1. Tyroid solüsyonunda 30-45 saniye boyunca inkübe edildi. Ardından 2. Tyroid solüsyonunda en az 3 dakika inkübe edildi. Mikroskop altında zona pelucidanın erimeye başladığı gözlemlendiğinde, blastositler hızlıca M2 besiyeri ile yıkandı. Her blastosit 1 kuyucuğa gelecek şekilde mitotik olarak bölünmesi durdurulmuş FEF içeren 12 kuyucuklu hücre kaplarına LIF içeren fare EKH besiyeri ile ekildi. Blastositlerin FEF hücreleriyle kaplı kuyucuklara yapışabilmesi için 48 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. 48 saat sonrasında, yapışan blastositlerin besiyeri EKH besiyeri ile değiştirildi. Hücre göçü ve koloni büyümesi görülen blastositler hücre stoğu oluşturmak üzere çoğaltıldı. EKH kolonileri, %70-80 yoğunluğa ulaştığında, %0.25 Trypsin/EDTA ile 37°C'de 3 dakika muamele edilerek 1:20 oranında pasajlandı. Geriye kalan hücreler FEF dondurma besiyeri ile dondurularak hücre stoğu oluşturuldu.

5.8 Fare EKH'lerin Kardiyomiyosit Farklılaşması

Fare EKH'leri %70-80 yoğunluğa ulaştığında, hücrelerin bulunduğu besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak %0.25'lik Tripsin EDTA ile 3 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından enzim aktivitesi FBS içeren besiyeri ile inhibe edildi. Hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 1:10 dilüsyon oranında adaptasyon besiyeri ile jelatin kaplı 100'lük petrilere ekilerek 2 gün boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler, %0.25'lik Tripsin/EDTA ile kaldırıldı. 1000rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pellet 1 ml kardiyak farklılaşma besiyeri ile dilüe edilerek hücre sayımı yapıldı. Her bir 150mm'lik petri için 80 bin hücre olacak şekilde hücre süspansiyonundan alınan hücreler, 50 µg/ml L-Askorbik asit içeren kardiyak farklılaşma besiyerine eklendi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 4 ml besiyeri rezervuarına alındı. Çok kanallı pipet ile 150mm'lik petri kapı kapaklarında, 20'şer µl'lik asılı damlacıklar (hanging drop) oluşturuldu. Petriler 2 gün boyunca EB yapılarının bozulmaması için hareket ettirilmeden 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından petri kapaklarındaki, asılı damlacık yöntemiyle oluşan EB'ler, L-Askorbik asit içeren kardiyak farklılaşma besiyeri ile toplanarak 100mm'lik bakteri bakteri petrilere alındı. 2 gün boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra EB'ler, kardiyak farklılaşma besiyeri ile %0.2 gelatin kaplı 6 kuyucuklu hücre kaplarına alındı. EB'lerin petriye yapışarak hücre göçü ile kardiyak farklılaşması gerçekleştirildi. Farklılaşmanın 8 ile 12. gününde atımın görülmesi ile beraber

besiyerinde bulunan FBS miktarı, kültürdeki fibroblast kontaminasyonunu engellemek amacıyla %15'ten %2.5'a düşürüldü. Farklılaşma kültürünün besiyeri, *in vivo* transplantasyon çalışmalarında kullanılıncaya kadar 50 µg/ml L-askorbik asit içeren kardiyak farklılaşma besiyeri ile gün aşırı değiştirildi.

5.9 Fare EKH Temelli Kardiyomiyositlerin Karakterizasyonu

5.9.1 İmmünohistokimyasal boyamalar

EKH temelli kardiyomiyositlerde kardiyak spesifik marker üretimini tespit etmek amacıyla hücreler PBS ile yıkandıktan sonra, hücreler %4 PFA ile oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek fikse edildi. Ardından hücreler, bloklama solüsyonu %3 BSA, %0.01 Sodyum azide, %5 Serum, %0.1 Triton X içeren PBS solüsyonu ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Kardiyak hücre kültürlerinde eksprese edilen ve kardiyak spesifik bir belirteç olan cTnT proteinin işaretlemek amacıyla, 1:500 konsantrasyonunda birincil antikorlar fikse kültürlerle eklenerek 12-16 saat boyunca 4°C'de inkübe edildi. Ardından hücreler PBS ile yıkanarak floresan özellikteki sekonder antikorlar 1:1000 konsantrasyonunda fikse kültürlerle eklenerek oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi. Floresan boyama sonrası hücreler, %0.02 Tween-20 içeren PBS ile yıkanarak çekirdek boyası olan 1µg/ml konsantrasyonunda DAPI ile 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücre kaplarına PBS eklenerek hücreler, LSM780 konfokal mikroskopunda görüntülendi.

5.9.2 Akım sitometrisi analizleri

Fare EKH temelli kardiyomiyosit kültürlerinde kardiyomiyosit hücrelerinin yüzdesini tespit etmek amacıyla, hücrelerin bulunduğu 6 kuyucuklu hücre kabına TrypLE enzimi eklenerek 3 dakika 37°C'de inkübe edildi. Enzim aktivasyonu FBS içeren besiyeri ile durdurularak hücreler, konik tüplerde toplandı. Hücre debris gözlendiğinde solüsyona, 1:100 DNaz I eklenerek tek hücreli hale getirildi. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası PBS ile yıkandı. Hücre süspansiyonu 40 µm'lik filtrelerden geçirilerek akım sitometrisi tüplerine aktarıldı. Ardından hücreler, 1:1 oranında %4 PFA ile karıştırılarak oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. PBS ile 1800 rpm'de yıkamalar sonrasında hücreler, %0.1 Tween-20 içeren PBS solüsyonu ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 1800 rpm'de 5 dakika yıkama sonrası pellet; %0.5 BSA ve %2 FBS içeren PBS solüsyonunda buzda,

karıştırıcı yardımıyla, 30 dakika inkübe edildi. Bloklama işleminin ardından hücreler akım sitometrisi tüplerine boyanmış grup, izotip kontrol ve boyanmamış grup olarak bölündü. Hücreler, 1:500 konsantrasyonunda cTnT primer antikor solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından tüpler Tween-20 PBS ile 3 kez 1800 rpm'de 5 dakika yıkanarak 1:1000 konsantrasyonunda 488 keçi anti fare sekonder antikor solüsyonu ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Boyanmayan antikorların ortamdaki uzaklaşmasını sağlamak amacıyla örnekler, Tween-20 PBS ve PBS ile yıkandı ve 70 µm'lik filtreden geçirilip akım sitometrisi tüplerine aktarılarak BD Influx Cell Sorter cihazı ile analiz edildi. Akım sitometrisi sonuçları, FlowJo programıyla yorumlandı.

5.10 Transplante Edilecek Hücrelerin Vybrant CFDA-SE Cell Tracker Kit ile Boyanması

İn vivo transplantasyon çalışmalarında kullanılacak EKH temelli kardiyomiyositlerin, kalp dokusunda takibini yapabilmek için hücreler intramiyokardiyal enjeksiyon öncesi, floresan bir boya olan Vybrant CFDA-SE ile işaretlendi. Hücreler, %1 FCS içeren RMPI besiyerine 0.5, 5, 10 ve 20 µM konsantrasyonlarında CFDA-SE ile hazırlanan besiyeri ile 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yıkama yapılmadan hücrelerin boyanıp boyanmadığı konfokal mikroskopu altında kontrol edildi. Hücreler boyamanın yapıldığı bazal besiyeri ile yıkandıktan sonra kardiyak farklılaşma besiyeri eklenerek *in vivo* transplantasyon yapılanaya kadar 37°C'de inkübe edildi.

5.11 İn Vivo Opere Edilecek Transgenik Farelerin Hücre Transplantasyonuna Hazırlanması

Opere edilecek fareler tartılarak ağırlıkları belirlenerek 100mg/kg ketamin ve 10mg/kg roumpun intraperitoneal olarak enjekte edildi. Uygulanan anestezi dozu farenin canlılığı açısından oldukça önemlidir. Yapılan ek dozların mortaliteyi artırdığı gözlenmiştir. Farenin etkili bir şekilde anesteziye girmesini sağlamak amacıyla dış ortamla etkileşimini azaltmak için, fare karanlık ve sıcak bir ortama alındı. Farenin anesteziye girip girmediğini tespit etmek için alt ekstermitelerine bir miktar baskı uygulanarak ağrıya verdiği tepkiler incelendi. Anestezi sağlandıktan sonra, trakeostomi ve torakotomi için farenin boyun ve sol torakal bölgesindeki tüyleri bistüri

yardımıyla batikon ile tıraş edildi. Fare, entübasyon için üst dişlerinden sabitleneceği plastik plakaya alınarak Resim 5.11.1’de görülen operasyon düzeneğinin bulunduğu bölgeye alındı.



Resim 5.11.1. Cerrahi operasyon düzeneği. (A) Operasyonun yapıldığı mikroskop, (B) İntramiyokardiyal enjeksiyonda kullanılan cerrahi aletler, (C) Entübasyonda kullanılan ventilasyon cihazı.

5.12 Trakeostomi

Göğüs kafesinde fizyolojik koşullarda negatif basınç bulunmaktadır ve bu basınç sayesinde akciğerlerin hava alışverişi sağlanır. Cerrahi müdahalenin torakotomi basamağı esnasında negatif basınç bozulacağından, deney hayvanının akciğerleri söner. Bunun sonucunda solunum deprese olarak hipoksiye bağlı mortalite gözlenir. Bunu komplikasyonu önleyebilmek amacıyla, deney hayvanına cerrahi müdahale yapılmadan entübe edilmesi gerekmektedir. Bu çalışma kapsamında kullanılan C57BL/6 transgenik farelerin trakelerinin çapı ve segment aralıklarının küçük olması nedeniyle oral yol ile entübe edilirken yüksek mortalite gözlenmiştir. Bu nedenle operasyonlarda kullanılan fareler, trakeostomi yöntemi ile entübe edildi. Boğazın orta hattından yaklaşık 1 cm'lik dikey bir kesi yapıldı. Altta yatan bağ doku disekte edilerek submandibular tükrük bezleri yan tarafa toplandı. Bu esnada karotid arter ve vagus sinirinin tahrip edilmemesine dikkat edildi. Trake görünür hale geldikten sonra

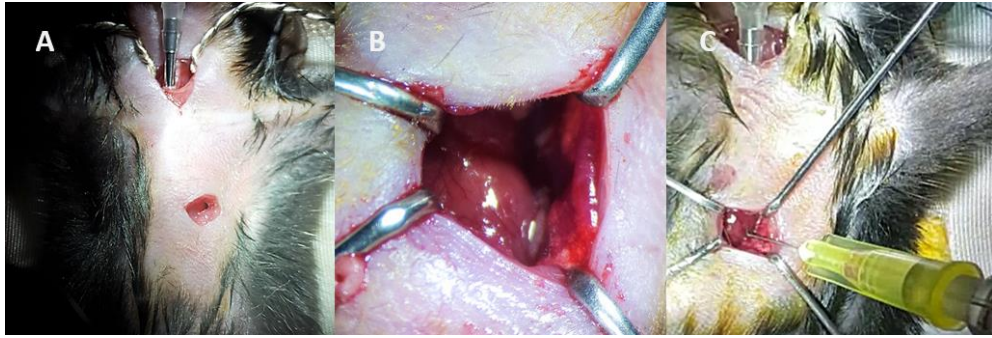
trakenin bir segmenti arasındaki bağ dokuda, makas ile küçük bir kesi oluşturuldu. Farenin ağırlığına göre cihazın aspirasyon ve ventilasyon değerleri ayarlandı ve endotreal tüp, trakede oluşturulan boşluğa yerleştirildi (Resim 5.12.1).



Resim 5.12.1. Transgenik farelerin trakeostomi yöntemi ile entübasyonu. (A) Trakeeye ulaşmak için bağ doku diseksiyonu (B) Ventilasyon için trakeeye kesi oluşturma (C) Trakeostomi tüpünün yerleştirilmesi (D) Operasyonun ardından kesinin dikilmesi

5.13 Torakotomi

Farenin göğüs kafesinin hareketinin, ventilasyon cihazı ile senkronize olduğu gözlemlendiğinde, torakotomi için insizyon alanı belirlendi. Sol axillar bölge ile xiphoid çıkıntı arasında hayali bir çizgi çizildiğinde bu çizginin orta noktası insizyon alanını oluşturur. Üst deri, m. pectoralis major ve m. pectoralis minor kasları disekte edilerek 4. ve 5. kosta arasından toraksa ulaşıldı. Kalp, ekartör yardımıyla görünür hale getirildi (Resim 5.13.1).



Resim 5.13.1. İntramiyokardiyal hücre enjeksiyonu. Deri altındaki kasların kesilip, toraks arasının açılması (A) Kalbin apeks bölgesine ulaşma (B) Hücrelerin kalbin apeks bölgesine enjekte edilmesi (C)

5.14 İntramiyokardiyal Enjeksiyon

İntramiyokardiyal enjeksiyonda kullanılmak üzere kardiyomiyositlerin bulunduğu besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak 5 dakika boyunca PBS ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından TrypLE enzimi, kuyucuklara eklenerek 3 dakika

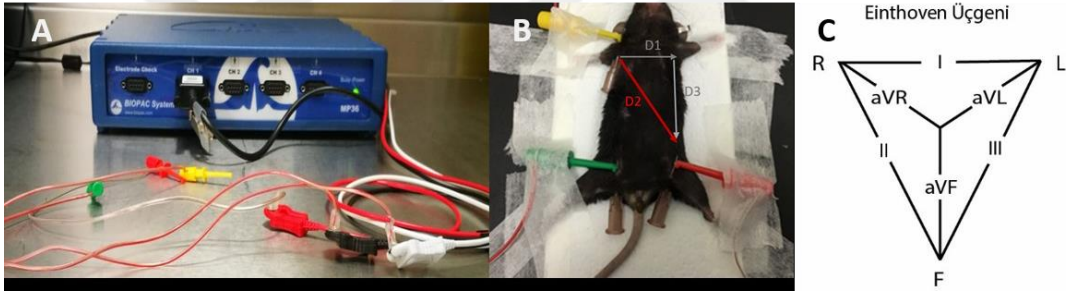
boyunca 37°C’de inkübe edildi. 3 dakika sonunda mikroskop altında enzimsel aktivite kontrol edildi. Hücre sitoplazması toplanmaya başladığı gözlemlendiğinde FEF besiyeri ile enzim aktivitesi inhibe edildi. Hücre süspansiyonu 1200 rpm’de 4 dakika santrifüj edildikten sonra, kardiyak farklılaşma besiyeri ile hücre sayımı yapıldı. Hücre süspansiyonu tekrar 1200 rpmde 5 dakika santrifüj edilip 3,5 µl içerisinde 1×10^5 hücre olacak şekilde kardiyak farklılaşma besiyeri ile dilüe edildi. Hücrelerin kalp dokusuna entegrasyonunu arttırmak amacıyla, hücre süspansiyonuna 1,5 µl 1:4 oranında DMEM-F12 ile dilüe edilmiş matrigel ve 5µg/ml rock inhibitörü eklendi. Besiyeri ve matrigel içeren 4-5 µl karışımın içerisinde 1×10^5 fare EKH temelli kardiyomiyosit, sol ventrikülün apeks bölgesine 30 gauge hamilton enjektörü yardımıyla enjekte edildi (Resim 5.13.1). Enjeksiyonun ardından hızlı bir şekilde önce kostalar, ardından disekte edilen kaslar ve üst deri dikildi. Toraks kapatıldıktan sonra ventilasyon borusu trakeden yavaşça çekildi. Farenin desteksiz soluk aldığı gözlenince trake, 6-0 ipek iplik yardımıyla ile dikildi. Trakenin üzerindeki kaslar ve tükürük bezleri tek bir dikiş ile bir araya getirildi. Üst deri dikildikten sonra, dikiş bölgeleri enfeksiyon riskine karşın batikon ile temizlendi.

Anestezinin yan etkilerini azaltmak amacıyla farenin sırt bölgesine, 100-200 µl subkutan serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Operasyon sonrasında, hipotermiyi önlemek amacıyla fare, ısıtıcı tabla üzerinde muhafaza edildi. Hücre transplantasyonu kaynaklı immün rejeksiyonu engellemek amacıyla SHAM kontroller de dahil olmak üzere bütün deney gruplarında, operasyondan hemen sonra ve operasyon sonrası 4.günde, immün yanıtın azaltılması ve hücrelerin konak miyokardiyuma entegrasyonunu artırmak amacıyla literatürde ve klinikte sıklıkla kullanılan bir immün baskılayıcı olan 2 µg/ml konsantrasyonunda metilprednisolon kullanılmıştır.

5.15 EKG Kaydı Alınması

Transgenik fareler, 100 mg/kg ketamin, 10 mg/kg roumpun ile anesteziye alındı. Farenin anesteziye girip girmediği, ekstremitelere uygulanan baskıya verdikleri refleksleriye kontrol edildi. Fare bu uyarılara herhangi bir refleks göstermiyor ise, EKG kaydı almak üzere ön ve arka ekstremiteleri bant yardımıyla plastik tabaka üzerine sabitlendi. EKG ölçümleri Biopac System Ins cihazıyla

Einthoven üçgeni referans alınarak kaydedildi. Sağ arka ekstremiteye pozitif elektrot, sol arka ekstremiteye topraklama için nötr elektrot ve sol ön ekstremiteye negatif elektrot, insulin enjektörü yardımıyla Resim 5.15.1’de görüldüğü gibi subkutan olarak yerleştirildi. Elektrodların bağlı olduğu soket, “Kanal 1” girişine takıldı. Cihazın bağlı olduğu bilgisayardan Biopac Student Lab yazılımından “L05 Lead II” sekmesi seçildi. Cihazın kalibrasyonu sonrası 60 saniye boyunca kayıt alındı. EKG ölçümleri, kayıt cihazının analiz için geliştirilen “Biopac Student Lab” yazılım programı ile incelendi. QRS genliği görüldüğü gibi QRS kompleksinin maksimum ve minimum voltaj çıkışları arasındaki farkının ölçülmesi ile belirlendi QT aralığı QRS kompleksinin başlangıcından T dalgasının bitimine kadar olan sürenin ölçümüyle belirlendi. JT aralığı, ST segmentinin başlangıcı olan J noktası ile T dalgasının bittiği noktalar arasındaki zamanın ölçülmesi ile belirlendi. RR aralığı ard arda gelen iki R dalgası arasındaki zamanın ölçülmesi ile belirlendi.

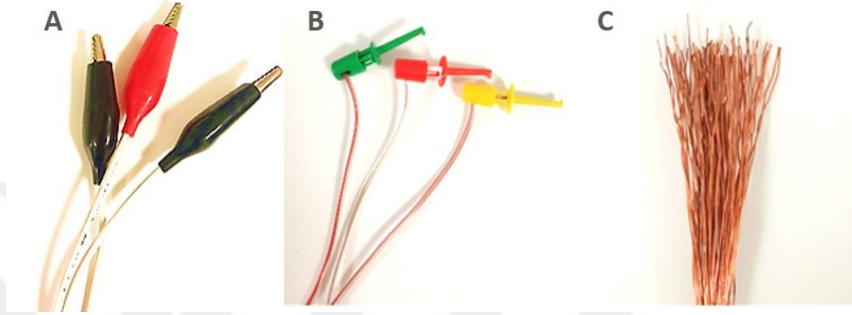


Resim 5.15.1. Transgenik farelerden EKG kaydı alınması. EKG kayıt cihazı (Biopac Student Ins.) (A), Lead II elektrotlarının kayıt almak üzere fareye bağlanması (B)

Ortamdaki herhangi bir ses veya hareket, EKG kaydı sırasında gürültü (noise) oluşturabileceği için EKG kaydı sırasında ortamın sessiz olmasına özen gösterildi. Biopac cihazı, öğrenci fizyoloji laboratuvarında kullanımına uygun olarak tasarlandığından, fareden EKG kaydı almak için birtakım iyileştirmeler yapıldı. Öncelikle, Resim 5.15.2 A’da görülen, EKG kayıt sisteminin içerisinde bulunan elektrotlar, Resim 5.15.2 B’de görülen elektrotlar ile değiştirildi. İletkenliği arttırmak amacıyla insulin enjektörlerinin ucuna Resim 5.15.2 C’de görülen bakır tel sarı olarak EKG kaydı alındı.

Bunların yanında fare EKG cihazına yakın bir konumdayken kayıt alınmasına dikkat edildi. Elektrot kablolarının hareketinden kaynaklı gürültüyü engellemek amacıyla kablolar bant ile kayıt düzeneğine sabitlendi. Ortamdaki ses ve hareketin

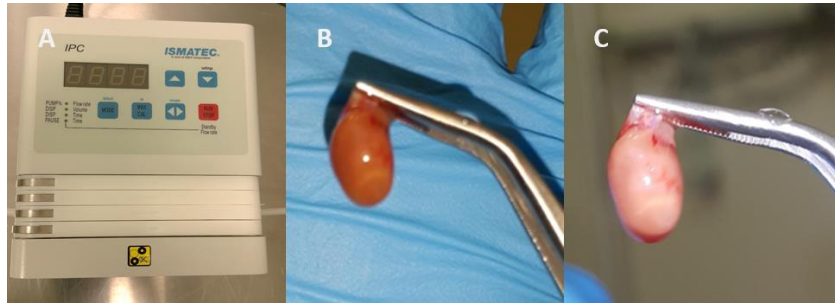
EKG kaydında meydana getireceği gürültüyü ve sapmaları önlemek için kayıtlar, sessiz ve izole bir alanda alındı. Ayrıca insulin elektrodlarıyla fareye bağlanan elektrodların birbirine paralel takılmasına özen gösterildi. Tüm bunların yanında farenin tam olarak anesteziye girdiğinden emin olduktan sonra kayıt alındı. Farenin daha kolay anesteziye girebilmesi için karanlık ve sıcak bir ortamda tutulması sağlandı. İzoelektrik çizgisinin belirgin hale gelmesiyle EKG parametrelerinin tayini kolaylaştırıldı.



Resim 5.15.2. Analiz edilebilir EKG ölçümü yapılabilmesi için elektrodların optimizasyonu. (A) Biopac EKG kayıt sistemi içerisinde bulunana elektrodlar, (B) Problara iletken kablunun bağlanmasıyla oluşturulan elketrodlar, (C) İnsulin elektrodlarına sarılan bakır teller.

5.16 Kalp Perfüzyonu ve Doku Tespiti

Transgenik fare kalbine transplante edilen hücrelerin, miyokard dokusuna entegrasyonunu ve hücrelerin canlılığını tespit etmek amacıyla, transplantasyondan sonraki 7. günde opere edilen fareler, servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Ismatec peristaltik pompa kullanılarak, heparinizasyon solüsyonu ile kalp perfüze edildi (Şekil 5.16.1). Perfüzyonu takiben kalp hızlı bir şekilde disekte edildi. İmmünohistokimyasal boyamalarda kullanılmak üzere OCT'ye gömülerek -80°C 'ye kaldırıldı.



Resim 5.16.1. Kalplerin immün boyamalar öncesi perfüzyonu. (A) Perfüzyon pompası, (B) Perfüze edilmemiş kalp, (C) Perfüze edilmiş kalp.

5.17 İmmünohistokimyasal Boyamalar

Aritmi modeli transgenik farelere hücre transplantasyonu sonrası, hücrelerin kalp dokusundaki lokalizasyonunu ve entegrasyonunu değerlendirebilmek için doku tespiti sonrası immünohistokimyasal boyamaları yapıldı. Kesitler %4 PFA ile 20 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Fiksasyon sonrası PFA'nın uzaklaştırılması için PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini inaktive etmek için, kesitler %0.3 hidrojen peroksit ile yıkandı. Epitop açığa çıkarmak için, slaytlar sitrat içerisinde 700w mikrodalgada 5 dakika ara sıra sıvının seviyesi kontrol edilerek bekletilmesini takiben mikrodalganın gücü 300w'a düşürülerek 12 dakika inkübe edildi. Mikrodalgadan çıkartılan doku kesitleri oda sıcaklığına geldiğinde pap kalemi ile dokuların etrafına bariyer hidrofobik bir bariyer oluşturulur. Dokular, bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyon sonunda bloklama solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı. Doku kesitleri, cTnT antikorunu 1:200 dilüsyon oranında içeren solüsyon ile gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün kesitler PBS ile 5 dakika boyunca yıkandı ve 1:500 dilüsyon oranında hazırlanan 633 keçi anti-fare sekonder antikorunu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile yıkamanın ardından kesitler, 1µg/ml konsantrasyonunda DAPI solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkamanın ardından slaytlar Fluoromount Aqueous kaplama medium ile dikkatlice kapatıldı ve LSM780 konfokal mikroskopu ile görüntüleme yapılana kadar 4°C'ye kaldırıldı.

5.18 İstatistiksel Analizler

Aritmi modeli oluşturulan transgenik farelere hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası 4 ve 7. günde alınan EKG ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi Windows işletim sisteminde kullanılan SPSS programıyla yapıldı. Öncelikle, EKG verilerinin dağılımları "Shapiro-Wilk" testi ile belirlendi. Normal dağılım gösteren, EKG değerleri için "Two tailed paired T-Test" ile operasyon öncesi alınan EKG ölçümleri transplantasyon sonrası alınan EKG ölçümleri ile karşılaştırıldı. Bunların yanında anestezi ajanlarının EKG parametrelerine etkisini tespit etmek için izofloran ve ketamin ile alınan EKG verilerinin istatistiksel değerlendirmesi, "Student T-Testi" ile yapıldı. Benzer şekilde aritmi modeli oluşturulan transgenik farelerde, genotipin EKG parametrelerine etkisini tespit etmek için heterozigot ve homozigot farelerden alınan

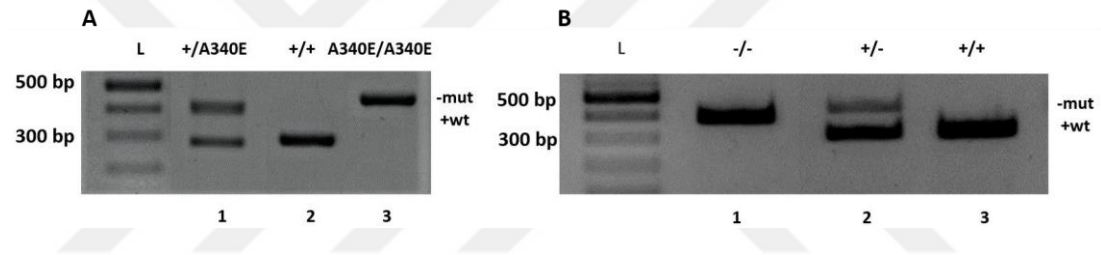
EKG verilerinin istatistiksel değerlendirmesi, "Student T-Testi" ile yapıldı. Değerler ortalama±standart sapma şeklinde ifade edildi. Sonuğların anlamlılık değeri %95 güven aralığında ($p<0.05$) değerlendirildi.



6 BULGULAR

6.1 Transgenik Farelerin Çoğaltılması ve Genotiplemesi

Çalışmalarını, Amerika'da National Institute of Health laboratuvarlarında devam eden Prof. Dr. Karl Pfeifer tarafından hibe edilen *Kcnq1*^{A340E/A340E} (J343) ve *Kcnq1*^{-/-} (J800) transgenik farelerin 21-30 günlük yavrularından, genotipleme yapmak amacıyla delgeç yardımıyla kulak dokusu örneği alındı (4, 5). Doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. Her bir fare soyu için transgen bölgesine spesifik primerler ile PCR yapılarak elde edilen DNA fragmanları %1 agarose jelde bant boylarına göre ayrıldı. J343 fare soyu için 388 bp vahşi tip alleli belirlerken, 508 bp mutant allelin varlığını gösterdi (Şekil 6.1.1 A). J800 fare soyu için 240 bp vahşi tip alleli belirlerken, 370 bp mutant allelin varlığını gösterdi (Şekil 6.1.1 B).



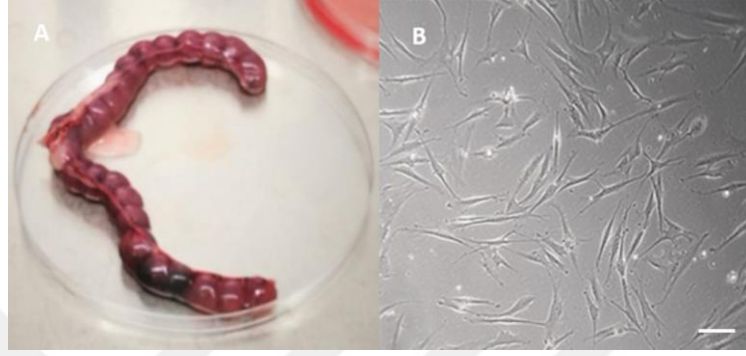
Şekil 6.1.1. Transgenik farelerin genotip analizi. (A) J343 (*Kcnq1*^{A340E/A340E}), L: Ladder, 1: heterozigot, 2: vahşi tip, 3: homozigot, (B) J800 (*Kcnq1*^{-/-}), L: Ladder, 1: homozigot, 2: heterozigot, 3: vahşi tip.

Laboratuvarımızda bulunan J800 transgenik fare soyunda, *KCNQ1* genindeki tahrip nedeniyle, sağırılık fenotipi ve iç kulaktaki defekte bağlı olarak literatürde shaker-waltzer fenotipi olarak bilinen, kendi eksenleri etrafında dönme davranışı gözlenmiştir. Bu gözlemin ve işitmenin gerçekleşebilmesi için iç kulakta, endolimpik sıvısı K⁺ iyonunca zengin olması ve iç kulaktaki vestibular hücrelerce *KCNQ1* geninin ekspresyonuna bağlı olarak işitmede abnormalite görüldüğü düşünülmektedir.

6.2 FEF Kültürü

Transplantasyon için hücre kaynağı olarak kullanılacak fare EKH hattının kültüre edilebilmesi için FEF hücreleri izole edilip çoğaltıldı. Embriyonik dönemin 13.5'uncu gününde (E13.5) olan vahşi tip BalbC farelerden süperovülasyon sonrası elde edilen embriyoların iç organ, baş ve uzuvları ayrıldı. Geriye kalan fibroblastça zengin doku küçük parçalara kesilerek %0.05 Tripsin/EDTA enzimiyle muamele

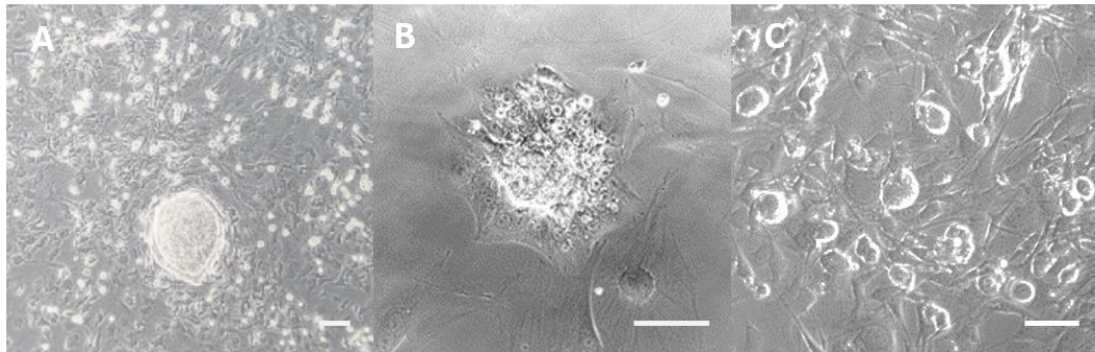
edildi. Elde edilen hücreler jelatin kaplı T75 flasklara ekildi. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştığında, %0.25 Tripsin/EDTA ile pasajlandı ve hücre stoğu oluşturuldu. Pasaj 5'e kadar, üretilen vahşi tip FEF hücrelerinin mitotik aktiviteleri, Mitomyocin-C ajanı ile durdurularak, fare EKH kültürlerinde besleyici hücre kaynağı olarak kullanıldı (Şekil 6.2.1).



Şekil 6.2.1. FEF izolasyonu ve kültürü. (A) Süperovüle edilen fareden FEF izolasyonu yapmak üzere disekte edilen E13.5 embriyoların bulunduğu ovaryum, (B) FEF hücrelerinin pasaj 1'deki görüntüsü. Ölçek çubuğu: 50µm

6.3 Fare EKH Kültürü

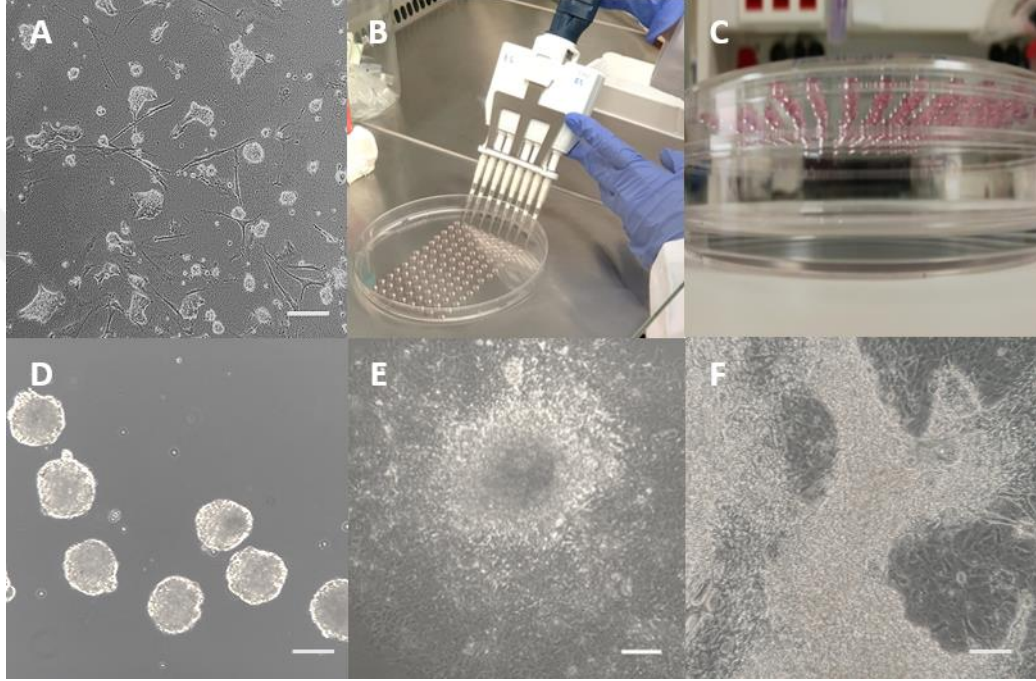
Hücre hattı oluşturmak amacıyla izole edilen E3.5'teki blastosistler, mitotik aktiviteleri durdurulmuş FEF hücresi içeren kuyucuklara ayrı ayrı konularak kültüre edildi (Şekil 6.3.1 A). FEF hücresi üzerinde tutunan blastosistlerden EKH kaynağı olan iç hücre kütesinden 48 saat içerisinde hücre göçü gözlemlendi (Şekil 6.3.1 B). Kolonilerin yoğunluğu %70-80'e ulaştığında hücreler %0.25 Tripsin/EDTA enzimi ile pasajlandı ve hücre stoğu oluşturuldu (Şekil 6.3.1 C).



Şekil 6.3.1 Fare EKH izolasyonu ve hücre hattı oluşturulması. (A) Blastosist izolasyonu sonrası 2. Gün, (B) FEF hücreleri üzerinde pasaj 0'daki EKH kolonisi, (C) Pasaj 2'de fare EKH kolonilerinin ışık mikroskobu görüntüleri. Ölçek çubuğu: 50µm

6.4 Fare EKH'lerin Kardiyomiyosit Farklılaşması

Vahşi tip EKH'leri, literatürde yaygın olarak kullanılan embriyonal cisimcik yöntemiyle L-askorbik asit varlığında kardiyak hücelere farklılaşması sağlandı. Bu yöntem ile fare EKH hücreleri farklılaşmanın ilk iki günü, fibroblast hücrelerinden arınması için, jelatin kaplı kuyucuklarda adaptasyon besi yeri ile ekilerek kültüre edildi (Şekil 6.4.1 A).



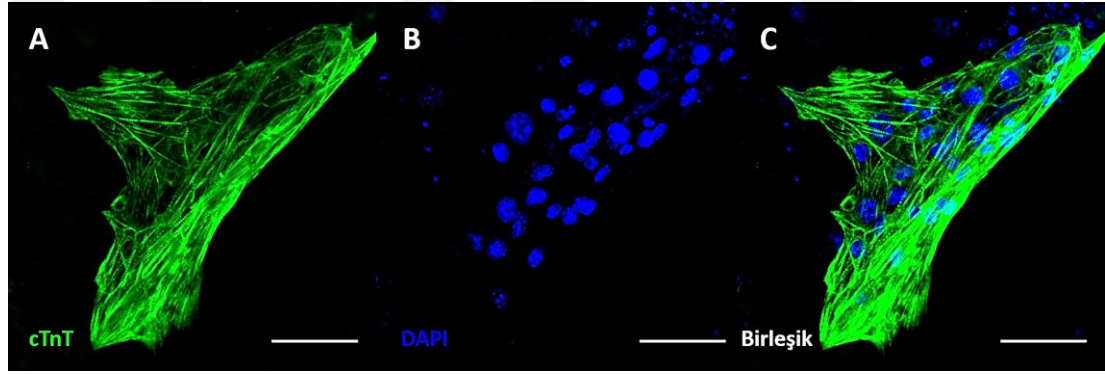
Şekil 6.4.1. Asılı damlacık yöntemiyle fare temelli EKH hücrelerinden kardiyomiyosit farklılaşması (A) FEF eliminasyonu için adaptasyon besiyerine alınan fare EKH kolonileri, (B, C) Petri kapağındaki hücre damlaları, (D) Asılı damlacık metoduyla oluşturulan embriyonik cisimler, (E) Farklılaşmanın 7. günündeki EKH temelli kardiyomiyosit kültürü, (F) Spontan kasılma gözlenen fare EKH temelli kardiyomiyosit hücrelerinin ışık mikroskopi görüntüsü. Ölçek çubuğu: 50µm

Ardından farklılaşmanın 2. günündeki EKH kolonileri, Şekil 6.4.1 B ve Şekil 6.4.1 C'de görüldüğü gibi petri kapağında asılı damlacıklar halinde 2 gün 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda yerçekiminin etkisiyle damlacıkların ucunda bir araya gelen hücrelerin EB yapıları oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 6.4.1 D). EB'ler, 2 gün boyunca bakteri plakalarında süspansiyon halinde inkübasyonlarının ardından jelatin kaplı plakalara ekildi. Plakalara yapışan EB'lerden farklı hücre tiplerinin göç ettiği görüldü (Şekil 6.4.1 E). Farklılaşmanın başlangıcını takip eden 9. günden itibaren atım gözlemlendi. Küçük hücre kümelerinde görülen kasılmaların, farklılaşmanın ileri

günlerinde Şekil 6.4.1 F’de görüldüğü gibi hücre kabının diğer bölgelerine yayıldığı gözlemlendi.

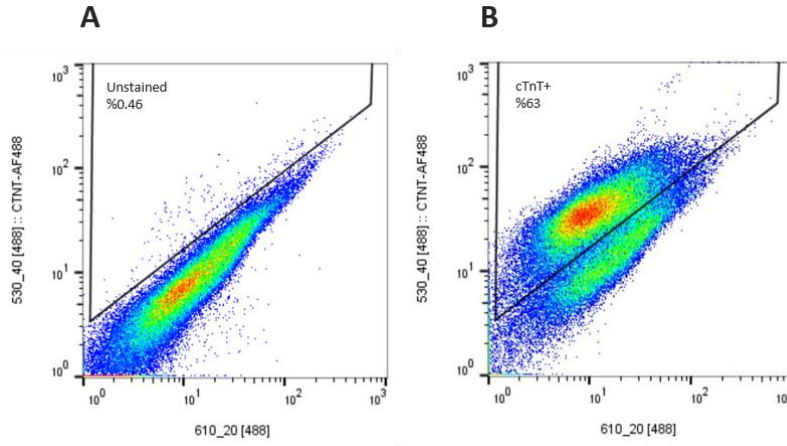
6.5 Fare EKH Temelli Kardiyomiyositlerin ICC ve Akım Sitometrisi ile İncelenmesi

Vahşi tip fare EKH temelli kardiyomiyosit kültürlerinde gözlenen spontan atımlar ile tutarlı olarak, bu hücrelerde kardiyomiyositlere özgü kardiyak troponin-T (cTnT) proteininin varlığı immünohistokimyasal boyamalar ile tespit edildi. Farklılaşmanın 16. günündeki fare EKH temelli kardiyomiyosit kültürlerinde cTnT proteininin ifadesi immün boyama sonrası konfokal mikroskopu ile görüntülendi (Şekil 6.5.1).



Şekil 6.5.1. Fare EKH temelli kardiyomiyositlerin immünohistokimyasal karakterizasyonu. (A) cTnT, (B) DAPI, (C) Merged. Ölçek çubuğu: 50 µm

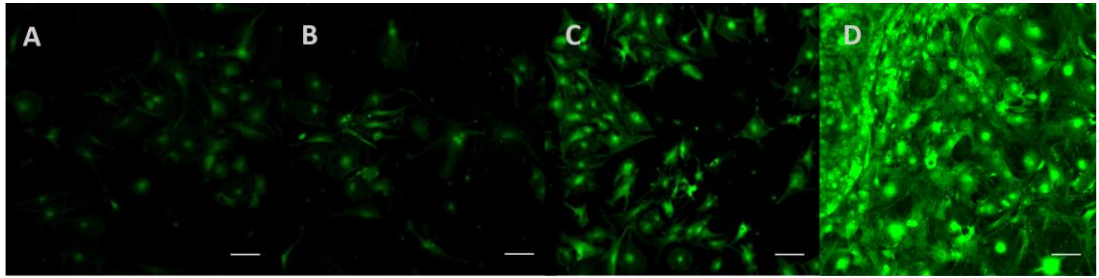
Fare EKH hücrelerinden farklılaştırılan kardiyomiyositlerin, kültürdeki yüzdesel dağılımını ve farklılaşma verimi akım sitometrisi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kardiyak farklılaşmanın 15-20.günleri arasında fare EKH temelli kardiyomiyosit kültürleri kardiyak spesifik belirteç olan cTnT antikoru ile yapılan akım sitometrisi analizi sonucu, literatüre benzer olarak %55-%63 oranında cTnT⁺ kardiyomiyosit tespit edilmiştir (Şekil 6.5.2).



Şekil 6.5.2. Fare EKH temelli kardiyomiyositlerin akım sitometrisi analizi. **(A)** boyanmamış (unstained) hücrelerin yüzdesi, **(B)** Canlı ve boyanmamış hücre popülasyonuna göre kaplandıktan sonra belirlenen cTnT⁺ hücrelerin yüzdesi.

6.6 CFDA-SE Vybrant Floresan Hücre Boyaması ve Optimizasyonu

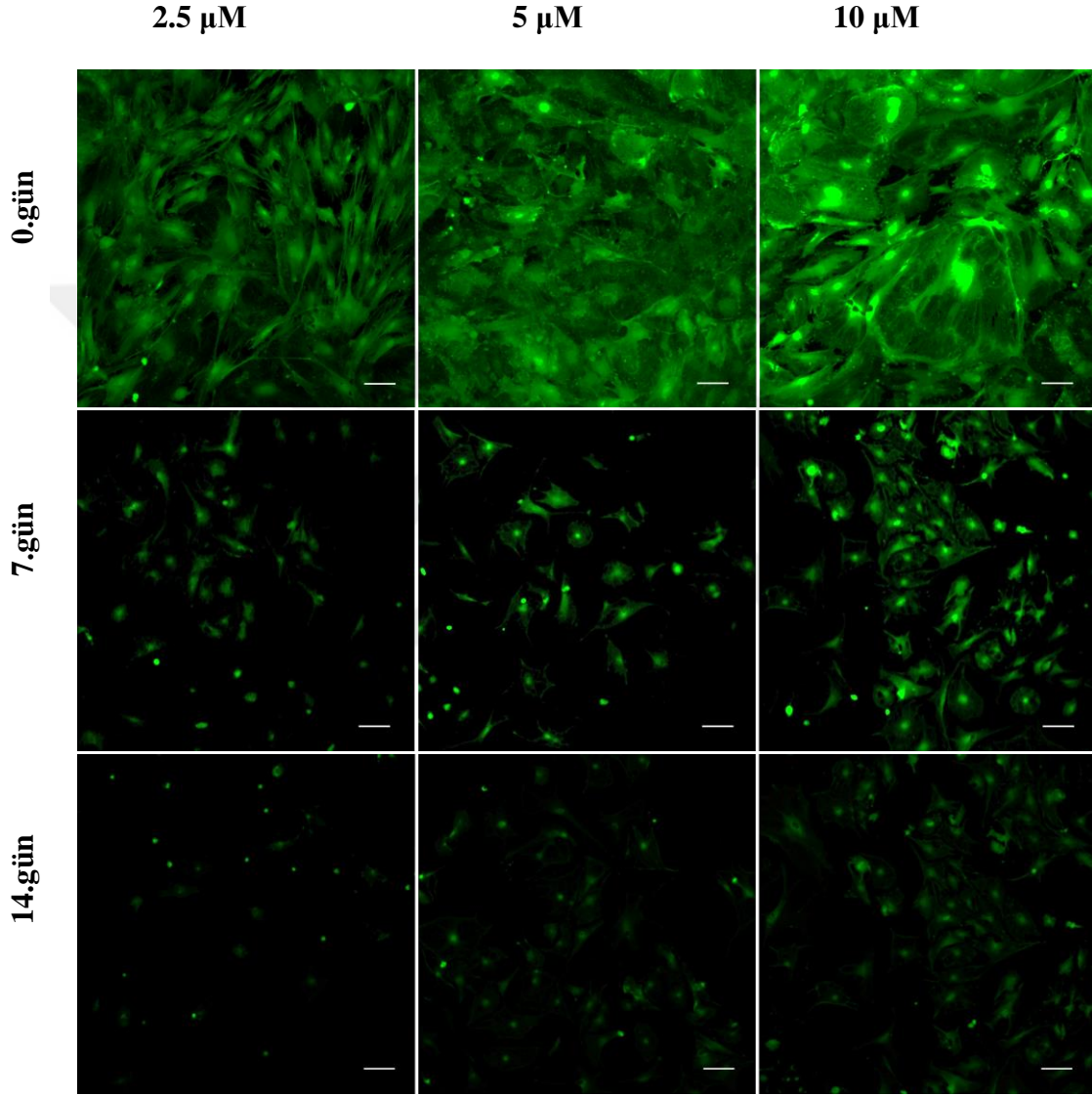
Hücre transplantasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere temin edilen floresan özellikte bir boya olan CFDA-SE'nin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla neonatal kardiyomiyosit hücreleri 0.5, 5, 10 ve 20 μM konsantrasyonlarda *in vitro* ortamda işaretlendi (Şekil 6.6.1). Boyama sonrası alınan konfokal görüntüleri incelendiğinde, 0.5 μM CFDA-SE ile boyalı kültürdefloresan sinyalin zayıf olduğu gözlenirken, 20 μM CFDA-SE ile boyanan neonatal kardiyomiyositlerde boyama sonrası toksiste gözlemlendi. Bu nedenle 0.5 μM ve 20 μM konsantrasyonları çalışmanın dışında bırakıldı.



Şekil 6.6.1. Farklı konsantrasyonlarda CFDA-SE boyalı neonatal kardiyomiyositler **(A)** 0.5 μM , **(B)** 5 μM **(C)** 10 μM , **(D)** 20 μM . Ölçek çubuğu: 50 μm

Ardından CFDA-SE sinyalinin, *in vitro* ortamdaki kalıcılığını test edebilmek için uygun aralık olarak belirlenen 2.5, 5 ve 10 μM CFDA-SE ile boyanan neonatal kardiyomiyosit kültürleri, 14 gün boyunca takip edildi. Kültürden, boyama sonrasında 7 ve 14. günlerde alınan konfokal görüntüleri incelendiğinde özellikle boyama sonrasındaki 14. günde CFDA-SE sinyalinin azaldığı tespit edildi (Şekil 6.6.2). Bu

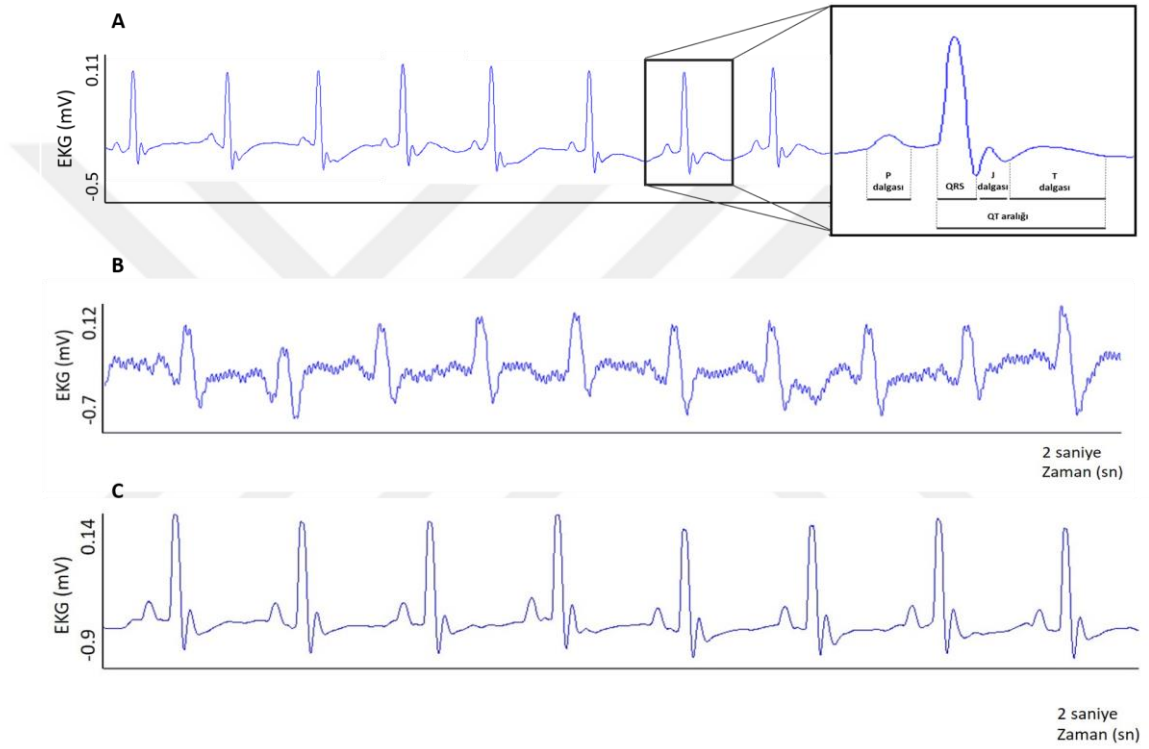
bulgular doğrultusunda, transplantasyon öncesi hücrelerin 10uM CFDA-SE ile boyanmasına ve *in vivo* transplantasyon sonrası hücrelerin 7 gün boyunca takip edilmesine karar verildi.



Şekil 6.6.2. Farklı konsantrasyonlarda CFDA-SE ile boyalı neonatal kardiyomiyositlerin *in vitro* ortamda uzun süreli takibi. (A) Boyamadan hemen sonra, (B) Boyamadan 7 gün sonra, (C) Boyamadan 14 gün sonra neonatal kardiyomiyositlerin konfokal görüntüsü. Ölçek çubuğu: 50μm

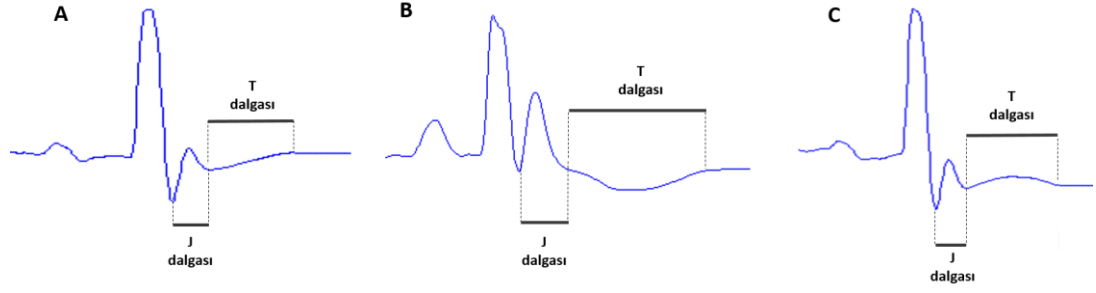
6.7 Transgenik Fare Soylarında EKG Ölçümlerinin Optimizasyonu

Transgenik farelerde EKG ölçümleri, materyal metotta detaylıca bahsedildiği gibi, Einthoven üçgeni referans alınarak kaydedildi. Lead II'de 1 dakika boyunca alınan kayıtlar, Biopac Student Lab programıyla analiz edilerek EKG parametreleri belirlendi (Şekil 6.7.1 A). Doğrulanmış QT aralığı (QTc), Bazett formülünün fare vb. kalp atım hızı yüksek canlılar için uyarlanmış formu olan; $QT/\sqrt{(RR/100)}$ formülü ile hesaplandı. EKG ölçümlerinin istatistiksel analizleri SPSS programı ile yapıldı.



Şekil 6.7.1. Transgenik fare EKG ölçümleri. (A) Transgenik fareden alınan EKG verilerinde P, QRS, J ve T dalgalarının tanımlanması, (B) Biopac cihazı ile transgenik fareden alınan EKG verisi, (C) Optimizasyon ve elektrotlarda yapılan iyileştirmeler sonrası alınan EKG verisi.

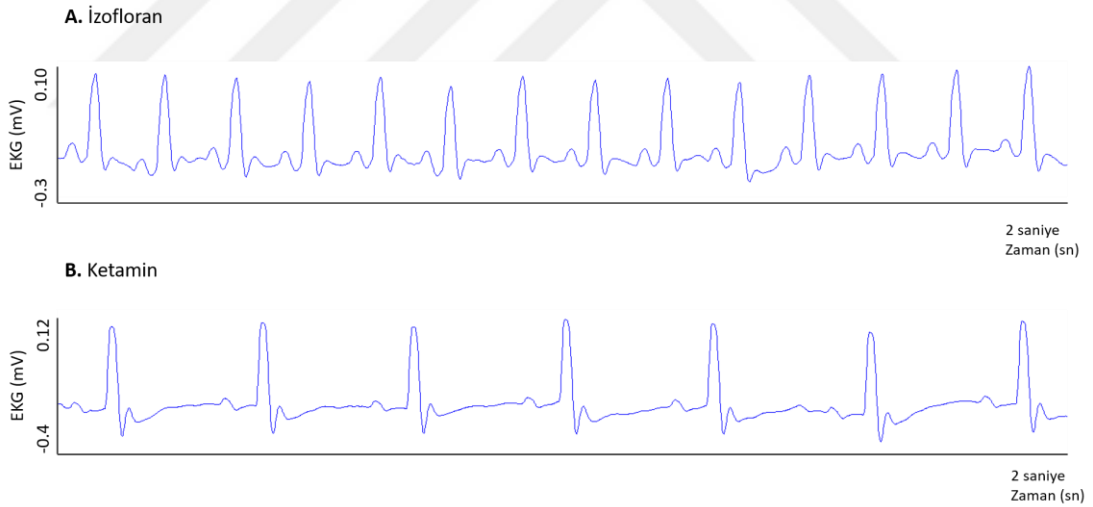
EKG kayıt cihazında yapılan optimizasyon ve elektrotlarda yapılan değişiklikler sayesinde, Şekil 6.7.1 B'de görülen gürültü içeren EKG verileri, Şekil 6.7.1 C'de görüldüğü gibi iyileştirildi. Optimizasyon çalışmaları ile belirgin izoelektrik çizgisi elde edilmesi, EKG parametrelerini belirlenmede kolaylık sağladı. Transgenik aritmi fare soylarından alınan EKG ölçümlerinde, literatüre benzer olarak farklı morfolojide ve genlikte J ve T dalgaları tespit edildi. Fare EKG verilerinde negatif T dalgası daha sıklıkla rastlansa da pozitif T dalgası içeren EKG verileri de tespit edildi (Şekil 6.7.2).



Şekil 6.7.2. Transjenik farelerde gözlenen farklı elektrokardiyografik dalga morfolojileri. (A, B) Negatif T dalgası, (C) Pozitif T dalgası.

6.8 İn vivo uygulamalarda İzofloran ve Ketamin Anesteziklerinin Karşılaştırılması

İn vivo çalışmalarda sıklıkla kullanılan ketaminin QT aralığını uzamasına sebebiyet verdiği bilinmektedir (130). Anestezik ajanın QTc değerine etkisini ölçmek amacıyla, izofloran ve ketamin anestezik ajanı ile anestezide alınan transjenik fare soylarının EKG verileri karşılaştırıldı (Şekil 6.8.1).



Şekil 6.8.1. İzofloran ve ketamin ile anestezide alınan farelerden alınan EKG verileri. (A) İzofloran, (B) Ketamin.

Transjenik fare soylarında, literatüre benzer olarak ketamin ile anestezide altına alınan farelerin, izofloran ile anestezide altına alınan farelere kıyasla QTc değerlerinin anlamlı derecede uzadığı tespit edildi (Tablo 6.8.1). Ancak izofloran sisteminin opere edilen farelerde kardiyak operasyon için yeterli ve derin anesteziyi sağlayamaması ve teknik olarak MEDİTAM koşullarında stabil olamaması nedeniyle *in vivo*

operasyonlarda anestezi ajan olarak ketamin kullanılması tercih edildi. Operasyon öncesi ve sonrasında alınan EKG ölçümleri, ketamin anesteziği kullanılarak alındığı için veriler, kullanılan anestezi ajanının kardiyak elektrofizyolojiye olan etkisinden bağımsız olarak değerlendirilebilmiştir.

Tablo 6.8.1. Kullanılan anestezi ajanının EKG parametrelerine etkisinin ölçülmesi

| EKG Parametreleri (ms) | J343 Ketamine (n=30) | J343 İsoflurane (n=15) | P değeri J343 Ketamine vs. Isoflurane | J800 Ketamine (n=10) | J800 İsoflurane (n=26) | P değeri J800 Ketamine vs. Isoflurane |
|------------------------|----------------------|------------------------|---------------------------------------|----------------------|------------------------|---------------------------------------|
| QT | 134±18 | 67±5 | <0.01 | 127±19 | 72±8 | <0.01 |
| RR | 329±79 | 134±15 | <0.01 | 287±67 | 133±17 | <0.01 |
| QTc | 75±4 | 58±3 | <0.01 | 76±3 | 62±5 | <0.01 |

6.9 Erişkin Transgenik Farelerde Yaş ve Genotipin Elektrokardiyografik Bulgulara Etkilerinin İncelenmesi

Elektrokardiyografik parametrelerin klinikte, yaşa ve cinsiyete göre farklılık gösterdiği bilinmektedir (131). Laboratuvarımızda bulunan transgenik fare soylarında yaşın EKG parametreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 3-8 aylık ve 8-12 aylık transgenik farelerden alınan EKG ölçümleri karşılaştırıldığında, her iki grup arasında QTc değerinde istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 6.9.1). Bu nedenle, aritmi transgenik fare modellerinde hücresel tedavi yaklaşımı için yapılan *in vivo* operasyonlarda, 3-12 aylık fareler birlikte değerlendirildi.

Tablo 6.9.1. Transgenik fare soylarında yaşın EKG parametreleri ile ilişkisi

| EKG Parametreleri (ms) | J343 3-8 aylık (n=18) | J343 8+ aylık (n=12) | P değeri J343 3-8 aylık vs. 8+ aylık | J800 3-8 aylık (n=5) | J800 8+ aylık (n=5) | P değeri J800 3-8 aylık vs. 8+ aylık |
|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------------------|
| QT | 130±18 | 142±16 | 0.06 | 128±21 | 126±19 | 0.93 |
| RR | 309±59 | 360±66 | 0.08 | 305±52 | 269±29 | 0.42 |
| QTc | 74±3 | 76±4 | 0.25 | 73±3 | 76±2 | 0.13 |

EKG verilerini etkileyebilecek diğer bir parametre ise genotiptir. Laboratuvarımızda bulunan biri nokta mutasyonu diğeri null mutasyona sahip iki transgenik fare soyundan, özellikle null mutasyonun bulunduğu J800 fare soyundaki homozigot mutant farelerde daha güçlü hastalık fenotipi gözlenmiştir. Bu nedenle transgenik farelerin EKG parametrelerine sahip oldukları heterozigot ya da homozigot genotip özelliklerin herhangi bir etkisinin olup olmadığını belirlemek için her iki fare soyunda heterozigot farelerin EKG verileri homozigot farelerin verileri ile karşılaştırıldı. Verilerin istatistiksel analizi sonucu J343 ve J800 transgenik fare soylarında heterozigot ve homozigot farelerin EKG parametreleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmedi. (Tablo 6.9.2). Bu bulgular doğrultusunda, heterozigot ve homozigot fareler *in vivo* hücre transplantasyon çalışmalarında birlikte değerlendirildi.

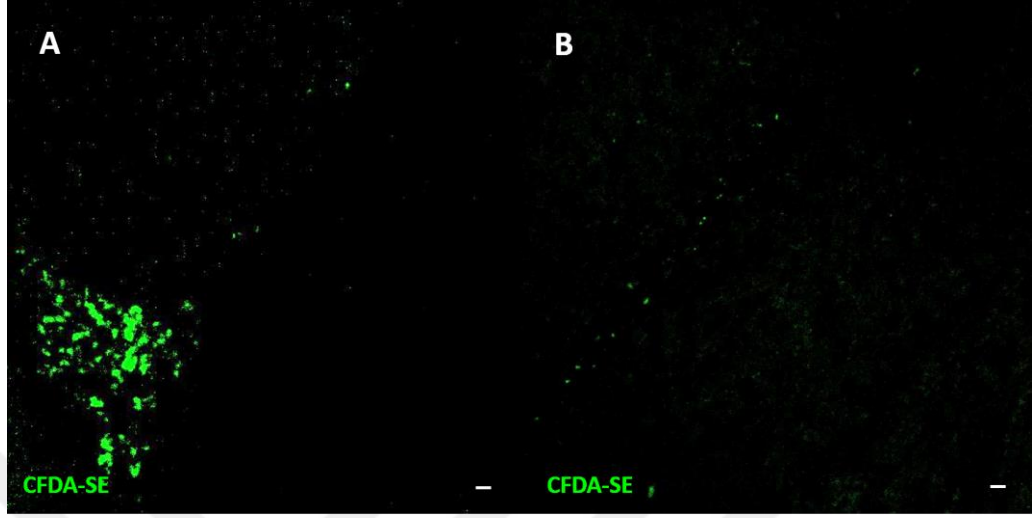
Tablo 6.9.2. Transgenik fare soylarının genotip özelliklerinin EKG parametreleri üzerine etkilerinin incelenmesi

| EKG Parametreleri (ms) | J343 Het (n=15) | J800 Het (n=9) | P değeri J343 Het vs. J800 Het | J343 Homo (n=10) | J800 Homo (n=8) | P değeri J343 Homo vs. J800 Homo |
|------------------------|-----------------|----------------|--------------------------------|------------------|-----------------|----------------------------------|
| QT | 135±15 | 132±22 | <0.77 | 135±12 | 124±11 | <0.15 |
| RR | 335±61 | 317±94 | <0.71 | 351±62 | 274±43 | <0.44 |
| QTc | 73±3 | 74±3 | <0.82 | 74±3 | 77±2 | <0.16 |

6.10 Transplantasyon Sonrası EKG ve IHC Analiz Gününün Optimizasyonu

Fare EKH temelli kardiyomiyositlerin transplantasyon sonrası, konak dokuda takibinin yapılması amacıyla floresan özellikte bir boya olan CFDA-SE ile hücreler, transplantasyon öncesi boyandı. Hücre transplantasyonundan 14 gün sonra disekte edilen kalpten alınan kesitler konfokal mikroskopu ile incelendiğinde enjeksiyon bölgesindeki hücrelerde az miktarda CFDA-SE sinyali gözlemlendi. Boyalı hücrelerin görüldüğü kesitlerde, fiksasyon sonrası CFDA-SE sinyalinin tamamen kaybolduğu gözlemlendi. Bunun yanında transplantasyon sonrası 7.günde disekte edilen kalpten alınan kesitlerde enjeksiyon bölgesinde 14.gün kesitlerine kıyasla daha yüksek CFDA-SE sinyali gözlemlendi (Şekil 6.10.1). Hücre transplantasyonunda kullanılan floresan

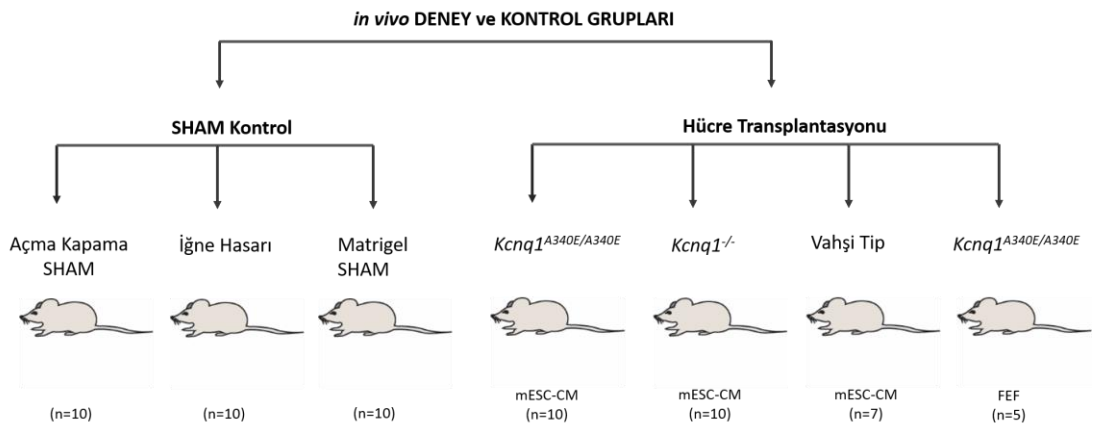
boyanın *in vivo*'da uzun süreli stabil olarak kalmaması nedeniyle, hücre transplante edilen transgenik farelerin transplantasyon sonrası 7 gün gözlemine karar verildi.



Şekil 6.10.1. Kalp kesitlerinin fiksasyon öncesi ve sonrası görüntüleri. (A) Transplantasyondan 7 gün sonra disekte edilen kalpten alınan kesitin görüntüsü, (B) Transplantasyondan 14 gün sonra alınan kesitlerin görüntüsü. Ölçek çubuğu: 50µm.

6.11 Aritmi Modeli Transgenik Farelerde SHAM kontrollerinin Elektrokardiyografik Verilerinin Değerlendirilmesi

Ritim bozukluğuna yönelik hücresel tedavi yaklaşımını değerlendirmek üzere belirlenen deney ve kontrol grupları Şekil 6.11.1'de belirtilmiştir.



Şekil 6.11.1. *In vivo* deney ve kontrol gruplarının şematik gösterimi

Ritim bozukluğuna yönelik hücre transplantasyonu deneylerinde, kontrol grubu olarak belirlenen ilk grup, herhangi bir enjeksiyonun yapılmadan, yalnızca trakeostomi ve torakotomi işlemlerinin gerçekleştirildiği “açma-kapama SHAM” grubu fareleri opere edildi. Operasyon sonrası alınan EKG verileri operasyon öncesi EKG verileri ile karşılaştırıldığında, QTc değerlerinde anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 6.11.1). Cerrahi operasyonlar sırasında ve sonrasında gözlenen mortalitede düşüş sağlandığında, çalışmamızın önemli bir kontrol grubu olan, hücre transplantasyonu sırasında hücrelerin bulunduğu matrigel, rock inhibitörü ve kardiyak farklılaşma besiyeri içeren taşıyıcı solüsyonun enjekte edildiği “Matrigel SHAM” grubu fareleri opere edildi. Açma kapama kontrol grubuna benzer olarak, matrigel transplantasyonu öncesi ve sonrası transgenik farelerden alınan EKG verileri arasında istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 6.11.2).

Aritmi modeli oluşturulan transgenik farelerde; hücre transplantasyonundan sonra QTc değerlerinde gözlenen değişimlerin, enjeksiyon sırasında aritmojenik bölgenin ablasyonuna bağlı olup olmadığını belirleyebilmek için, hücre transplantasyonu yapılmadan, yalnızca Hamilton enjektörünün apekse batırıldığı “iğne hasarı SHAM” grubu fareleri opere edildi. Operasyon sonrası transgenik farelerden alınan EKG verilerinin operasyon öncesi EKG verileri ile karşılaştırmalı analizleri yapıldığında, iki grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 6.11.3). SHAM kontrol gruplarından elde edilen veriler değerlendirildiğinde, QTc’de gözlemediğimiz düşüşün, transplante edilen taşıyıcı karışım veya enjeksiyon sırasında aritmojenik bölgenin ablasyonundan bağımsız olarak, transplante edilen hücrelerin terapatik etkisinden kaynaklı olduğunu göstermektedir.

Tablo 6.11.1. Açma kapama sham grubu farelerden alınan EKG verilerinin analizi

| Fare No | Pre-op QT | Pre-op RR | Pre-op QTc | Post-op Day4 QT | Post-op Day4 RR | Post-op Day4 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day4 | Post-op Day7 QT | Post-op Day7 RR | Post-op Day7 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day7 |
|---------|-----------|-----------|------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|
| 1 | 121±4 | 288±5 | 71±2 | 147±5 | 466±6 | 68±2 | <0.31 | 141±7 | 460±7 | 66±4 | <0.1 |
| 2 | 143±5 | 393±7 | 72±2 | 186±6 | 657±9 | 73±2 | | 130±6 | 350±5 | 70±3 | |
| 3 | 151±8 | 401±6 | 76±4 | 117±7 | 256±3 | 73±5 | | 109±7 | 208±3 | 76±4 | |
| 4 | 142±7 | 3638 | 74±4 | 126±5 | 288±4 | 74±3 | | 149±5 | 442±5 | 71±3 | |
| 5 | 131±5 | 353±4 | 69±3 | 132±5 | 439±7 | 63±3 | | 138±8 | 408±5 | 68±4 | |
| 6 | 146±5 | 439±5 | 70±2 | 148±6 | 436±6 | 71±3 | | 147±7 | 467±7 | 67±3 | |
| 7 | 129±6 | 317±6 | 72±4 | 138±8 | 385±6 | 70±4 | | 112±8 | 256±11 | 70±6 | |
| 8 | 142±6 | 350±8 | 76±3 | 140±6 | 350±10 | 75±3 | | 131±9 | 332±8 | 72±5 | |
| 9 | 135±7 | 369±6 | 71±4 | 190±6 | 673±7 | 74±3 | | 149±8 | 394±11 | 75±4 | |
| 10 | 116±9 | 236±5 | 75±5 | 143±5 | 355±7 | 76±3 | | 147±5 | 378±6 | 76±3 | |

Tablo 6.11.2. Matrigel sham grubu farelerden alınan EKG verilerinin analizi

| Fare No | Pre-op QT | Pre-op RR | Pre-op QTc | Post-op Day4 QT | Post-op Day4 RR | Post-op Day4 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day4 | Post-op Day7 QT | Post-op Day7 RR | Post-op Day7 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day7 |
|---------|-----------|-----------|------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|
| 1 | 127±4 | 265±9 | 78±2 | 151±7 | 366±9 | 79±4 | <0.89 | 117±6 | 225±5 | 78±4 | <0.21 |
| 2 | 124±8 | 266±10 | 76±5 | 152±6 | 361±10 | 80±3 | | 168±10 | 467±12 | 77±5 | |
| 3 | 142±5 | 407±5 | 70±3 | 110±6 | 241±4 | 71±4 | | 128±6 | 326±7 | 71±3 | |
| 4 | 155±8 | 434±5 | 74±4 | 143±5 | 399±9 | 72±3 | | 135±4 | 319±5 | 76±2 | |
| 5 | 121±3 | 282±8 | 72±2 | 109±7 | 236±7 | 71±4 | | 107±5 | 228±10 | 70±4 | |
| 6 | 120±5 | 242±8 | 77±3 | 137±4 | 317±6 | 77±3 | | 137±5 | 306±9 | 78±3 | |
| 7 | 128±7 | 341±7 | 69±4 | 110±7 | 240±3 | 71±4 | | 129±5 | 317±6 | 72±3 | |
| 8 | 139±6 | 348±4 | 74±3 | 136±4 | 336±6 | 75±2 | | 125±5 | 294±4 | 73±4 | |
| 9 | 107±6 | 195±3 | 77±5 | 145±9 | 408±10 | 72±5 | | 179±8 | 549±4 | 77±3 | |
| 10 | 143±7 | 396±4 | 72±3 | 146±4 | 409±7 | 72±2 | | 132±6 | 331±6 | 73±3 | |

Tablo 6.11.3. İğne hasarı sham grubu farelerden alınan EKG verilerin analizi

| Fare No | Pre-op QT | Pre-op RR | Pre-op QTc | Post-op Day4 QT | Post-op Day4 RR | Post-op Day4 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day4 | Post-op Day7 QT | Post-op Day7 RR | Post-op Day7 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day7 |
|---------|-----------|-----------|-------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|
| 1 | 84±2 | 173±3 | 64±1 | 132±9 | 339±3 | 71±5 | <0.1 | 158±7 | 507±6 | 70±3 | <0.1 |
| 2 | 150±4 | 467±2 | 70±2 | 148±3 | 460±2 | 70±1 | | 168±7 | 465±4 | 78±3 | |
| 3 | 137±3 | 386±7 | 69±1 | 153±5 | 439±4 | 73±2 | | 142±3 | 383±5 | 73±1 | |
| 4 | 108±3 | 216±5 | 74±1 | 167±6 | 513±3 | 74±3 | | 167±6 | 528±8 | 73±2 | |
| 5 | 155±2 | 443±7 | 74±2 | 157±2 | 455±4 | 74±1 | | 138±7 | 430±2 | 68±3 | |
| 6 | 176±3 | 652±3 | 69±1 | 122±4 | 340±9 | 66±1 | | 172±4 | 650±6 | 68±2 | |
| 7 | 121±6 | 278±4 | 73±5 | 149±5 | 405±10 | 74±3 | | 144±5 | 386±8 | 74±2 | |
| 8 | 135±5 | 317±3 | 76±3 | 234±8 | 644±15 | 92±3 | | 225±6 | 607±10 | 91±2 | |
| 9 | 117±2 | 263±5 | 72±2 | 124±6 | 277±3 | 74±3 | | 154±6 | 433±10 | 74±4 | |
| 10 | 129±7 | 326±5 | 72±4 | 135±5 | 360±4 | 71±2 | | 125±4 | 280±7 | 75±2 | |

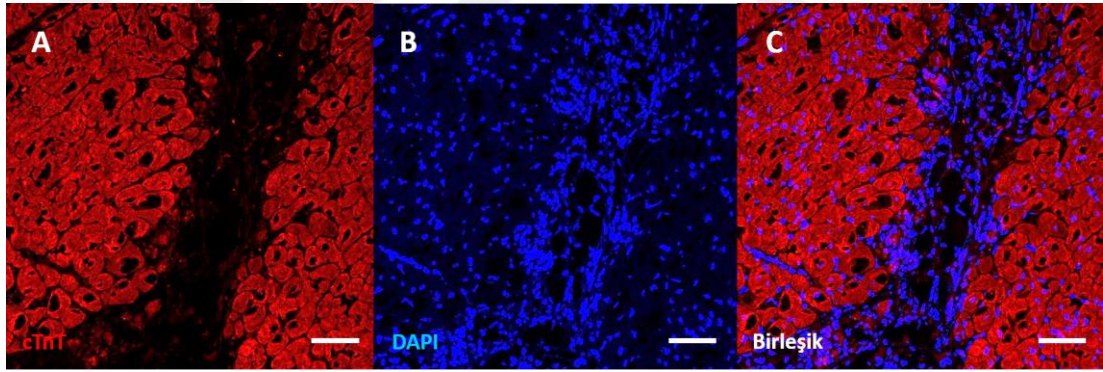
6.12 Aritmi Modeli Transgenik Farelerde Fibroblast Tranplantasyonunun EKG ve IHC Değerlendirmesi

Hücre transplatasyonu çalışmalarında cerrahi ve deneysel basamaklarının optimizasyonu amacıyla, laboratuvarımızda kolaylıkla temin edebildiğimiz fare embriyosundan üretilen FEF hücreleri tercih edildi. Bu deneysel yaklaşım aynı zamanda, MI sonrası fibrotik doku oluşumunu deneysel olarak taklit etmesi yönüyle önemli bir kontrol grubu oluşturdu. Transplante FEF hücrelerinin dokuda takibi amacıyla transplantasyon öncesi hücreler floresan ve lipid yapıda bir boya olan Di8 AnnapQ ile boyandı. Transplante edilen hücrelerin kalp elektrofizyolojisine etkisini incelemek amacıyla operasyondan sonraki 4. ve 7.günlerde opere edilen farelerden EKG kayıtları alındı. Alınan bu veriler, operasyon öncesinde alınan EKG verileri ile karşılaştırıldı. Tablo 6.12.1’de görüldüğü gibi transplantasyon sonrası FEF hücresi transplante edilen farelerde, operasyon öncesine göre QTc değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi.

Tablo 6.12.1. FEF hücresi transplante edilen J343 (Kcnq1^{A340E/A340E}) fare soyunda EKG verilerinin analizi

| Fare No | Pre-op QT | Pre-op RR | Pre-op QTc | Post-op Day4 QT | Post-op Day4 RR | Post-op Day4 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day4 | Post-op Day7 QT | Post-op Day7 RR | Post-op Day7 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day4 |
|---------|-----------|-----------|------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|
| 1 | 84±4 | 160±1 | 66±3 | 164±6 | 372±11 | 85±3 | <0.107 | 187±6 | 344±7 | 101±3 | <0.008 |
| 2 | 117±4 | 262±5 | 72±2 | 132±5 | 315±7 | 74±2 | | 137±5 | 277±4 | 82±3 | |
| 3 | 120±5 | 277±5 | 71±3 | 134±5 | 325±10 | 75±4 | | 140±7 | 245±7 | 90±5 | |
| 4 | 143±6 | 417±6 | 70±3 | 152±5 | 451±8 | 72±2 | | 137±4 | 252±9 | 87±3 | |
| 5 | 83±5 | 155±2 | 66±4 | 113±10 | 340±8 | 72±5 | | 210±10 | 587±8 | 86±4 | |

Transplante edilen hücrelerin, konak miyokardima entegrasyonunu tespit etmek amacıyla transplantasyondan 7. gün sonra alınan kalplerin, perfüzyonu takiben immünohistokimyasal boyamaları yapıldı. Fiksasyon öncesi konfokal mikroskopu ile gözlenen boyalı hücrelerin bulunduğu kesitlerde, fiksasyon sonrası sinyal kaybı gözlemlendi. Doku kesitlerinin kardiyak spesifik bir belirteç olan kardiyak troponin T (cTnT) ile immün boyamaları incelendiğinde, transplantasyonun gerçekleştirildiği apeks bölgesine entegre olmuş fibroblast hücrelerinin canlı olduğu gözlenmektedir (Şekil 6.12.1).



Şekil 6.12.1. FEF transplantasyonu sonrası kalp kesitlerinin immünohistokimyasal boyaması. (A) cTnT, (B) DAPI, (C) Birleşik. Ölçek çubuğu: 50µm

6.13 Fare EKH Temelli Kardiyomiyosit Transplantasyonunun Aritmi Modeli Transgenik Fareler Üzerindeki Elektrofizyolojik Etkilerinin İncelenmesi

Aritmi modeli transgenik fare soylarında, EKH'lerinden farklılaştırılan kardiyomiyositlerle tasarlanan hücresel tedavi yaklaşımı, transplantasyon sonrası alınan EKG verileri ve immünohistokimyasal boyamalar ile değerlendirildi.

Transplante edilen hücrelerin dokudaki canlılıkları ve kalp elektrofizyolojisine etkileri incelendi. İntramiyokardiyal hücre transplantasyonu sonrası entegrasyonunu arttırmak amacıyla hücreler, ticari bir ekstraselüler matriks olan matrigel ve rock inhibitörü içeren karışım içerisinde miyokardiyuma enjekte edildi. Transplante edilen hücrelerin kardiyak elektrofizyolojisine etkisini incelemek için opere edilen farelerden, operasyondan hemen önce, operasyon sonrası 4. ve 7. günlerde EKG kaydı alınarak istatistiksel analizleri yapıldı (Tablo 6.13.1 ve Tablo 6.13.2).

Tablo 6.13.1. Fare EKH temelli kardiyomiyosit transplante edilen J343 transgenik farelerin EKG analizi

| Fare No | Pre-op QT | Pre-op RR | Pre-op QTc | Post-op Day4 QT | Post-op Day4 RR | Post-op Day4 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day4 | Post-op Day7 QT | Post-op Day7 RR | Post-op Day7 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day7 |
|---------|-----------|-----------|-------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|
| 1 | 134±7 | 356±7 | 71±3 | 125±9 | 331±6 | 69±5 | <0.045 | 109±10 | 307±12 | 62±6 | <0.63 |
| 2 | 120±8 | 293±4 | 70±5 | 161±12 | 548±6 | 69±5 | | 134±8 | 347±6 | 72±5 | |
| 3 | 131±5 | 350±7 | 70±2 | 100±3 | 268±5 | 61±2 | | 112±13 | 319±14 | 63±7 | |
| 4 | 148±8 | 350±11 | 79±4 | 145±12 | 328±12 | 77±6 | | 116±11 | 271±8 | 70±7 | |
| 5 | 114±5 | 268±5 | 70±3 | 140±11 | 434±4 | 67±6 | | 137±7 | 390±3 | 69±4 | |
| 6 | 112±6 | 193±3 | 81±4 | 134±9 | 272±6 | 82±5 | | 132±5 | 250±2 | 83±3 | |
| 7 | 145±7 | 399±9 | 73±3 | 136±6 | 307±6 | 78±4 | | 122±8 | 206±6 | 85±6 | |
| 8 | 143±7 | 290±4 | 84±4 | 137±5 | 347±9 | 74±3 | | 125±7 | 280±5 | 75±4 | |
| 9 | 147±14 | 286±5 | 87±8 | 141±14 | 315±4 | 80±7 | | 129±11 | 330±9 | 71±7 | |
| 10 | 149±5 | 378±12 | 77±2 | 103±4 | 238±4 | 70±5 | | 111±4 | 221±2 | 75±3 | |

Tablo 6.13.2. Fare EKH temelli kardiyomiyosit transplante edilen J800 transgenik farelerin EKG analizi

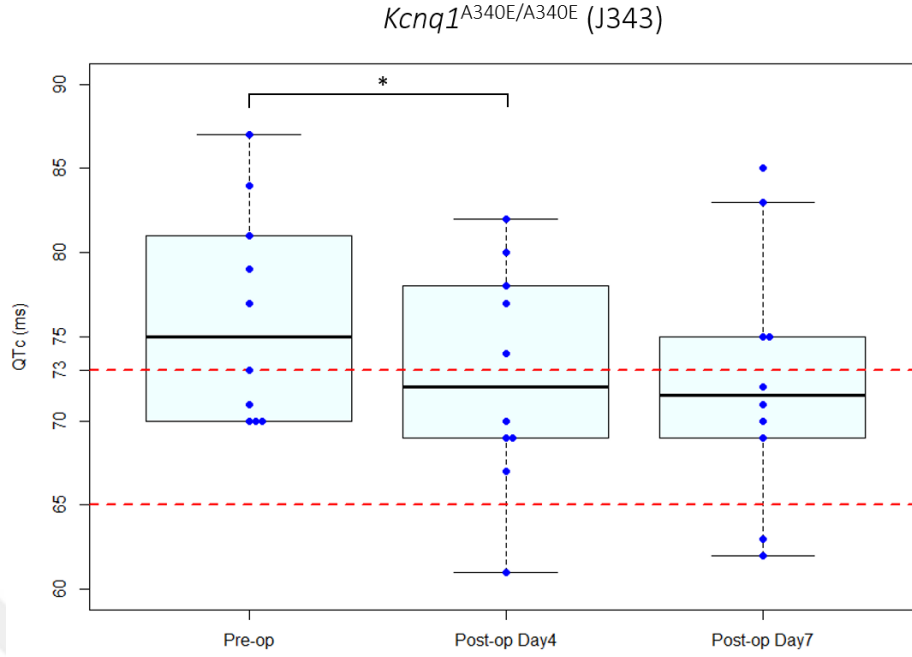
| Fare No | Pre-op QT | Pre-op RR | Pre-op QTc | Post-op Day4 QT | Post-op Day4 RR | Post-op Day4 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day4 | Post-op Day7 QT | Post-op Day7 RR | Post-op Day7 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day7 |
|---------|-----------|-----------|-------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|
| 1 | 153±11 | 300±12 | 79±6 | 130±7 | 375±12 | 67±4 | <0.5 | 109±6 | 241±6 | 70±4 | <0.52 |
| 2 | 159±12 | 431±6 | 76±6 | 118±7 | 257±4 | 73±4 | | 165±11 | 486±7 | 75±6 | |
| 3 | 136±6 | 301±2 | 78±4 | 129±4 | 250±5 | 82±4 | | 158±6 | 356±4 | 84±3 | |
| 4 | 130±4 | 303±3 | 74±2 | 120±3 | 248±3 | 76±3 | | 124±4 | 286±4 | 73±3 | |
| 5 | 138±3 | 357±6 | 73±2 | 122±4 | 273±3 | 74±2 | | 129±5 | 270±3 | 78±3 | |
| 6 | 110±11 | 248±5 | 70±7 | 142±14 | 335±12 | 78±8 | | 140±5 | 356±4 | 74±3 | |
| 7 | 100±7 | 187±6 | 73±5 | 90±5 | 181±12 | 67±5 | | 150±12 | 381±16 | 77±7 | |
| 8 | 135±9 | 304±10 | 78±6 | 143±14 | 379±15 | 73±7 | | 171±8 | 588±15 | 70±4 | |
| 9 | 122±8 | 260±7 | 76±5 | 142±11 | 405±8 | 71±6 | | 98±7 | 230±4 | 65±5 | |
| 10 | 109±6 | 238±6 | 71±4 | 127±7 | 293±8 | 74±5 | | 113±7 | 272±6 | 69±4 | |

Aritmi modeli oluşturulan transgenik fare soylarında QTc değerlerindeki değişim, verilerin standart sapmaları göz önünde bulundurularak değerlendirildi. J343 fare soyunda, vahşi tip EKH temelli kardiyomiyosit hücre transplatasyonu sonrası, opere edilen farelerin (n=10) %50'sinde QTc değerinde düşüş (n=5) görülerek, hastalık fenotipini iyileştirici etkisi görüldü. Opere edilen farelerin %20'sinde QTc değerinde artış (n=2) gözlenirken, %30'unda QTc değerinin değişmediği (n= 3) tespit edildi. Null mutasyonun bulunduğu J800 transgenik aritmi farelerde, hücre transplantasyonu sonrası alınan EKG verileri incelendiğinde, opere edilen farelerin (n=10), %30'unda QTc değerinde kısalma (n=3) ile hastalık fenotipinin iyileştirici etkisi gözlemlendi. Farelerin %40'ında QTc değerinde artış (n=4) görülürken, %30'unda QTc değerinin değişmediği (n= 3) tespit edildi (Tablo 6.13.3).

Tablo 6.13.3. Hücre transplantasyonu sonrası $Kcnq1^{A340E/A340E}$ ve $Kcnq1^{-/-}$ transgenik fare QTc verilerinde görülen değişimlerin yüzdesel gösterimi

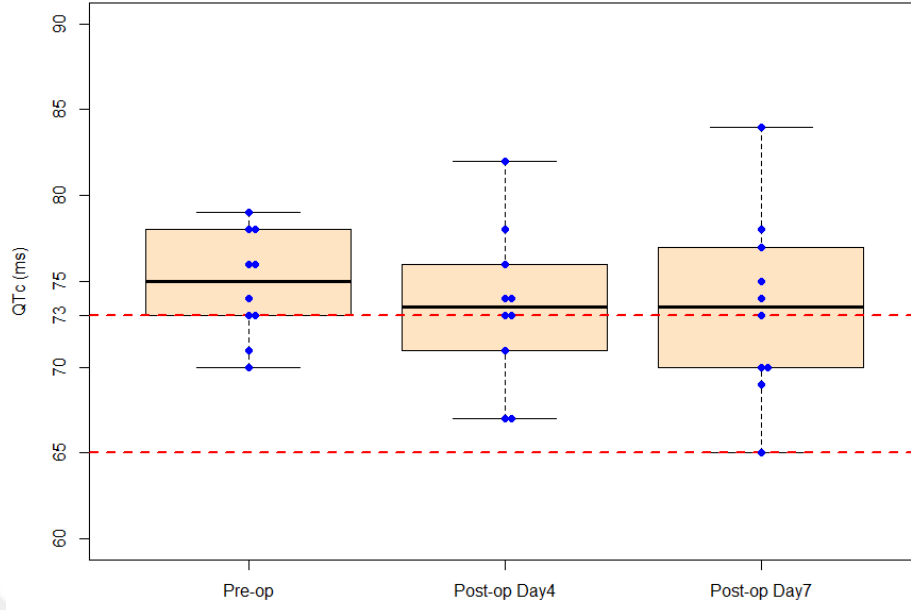
| Fare soyu | QTc ↓ | QTc - | QTc ↑ |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| $Kcnq1^{A340E/A340E}$ (n=10) | %50 (n=5) | %30 (n=3) | %20 (n=2) |
| $Kcnq1^{-/-}$ (n=10) | %30 (n=3) | %40 (n=4) | %30 (n=3) |

Fare EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyonundan önce ve sonra alınan EKG verileri ile box plot grafikleri çizilerek verilerin yorumlanması kolaylaştırıldı. Pfeifer ve arkadaşlarının J343 transgenik fareler ile yaptığı çalışmaları içeren makalede, QTc değeri 65 ms altında olduğu durumda sağlıklı fenotipin gözleendiği, 73 ms ve üzeri olduğu durumda hastalık fenotipinin gözleendiği belirtilmiştir (4). Bu bilgi ışığında J343 EKG verilerinin box plot grafiği değerlendirildi. Hücre transplantasyonu sonrası 4. ve 7. günde QTc değeri medyanlarının, transplantasyon öncesine göre azaldığı görülmektedir (Şekil 6.13.1). Önemli olarak, operasyon sonrası 4. günde alınan EKG verileri ile operasyon öncesi EKG verileri arasında gözlenen farkın istatistiksel anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Hücre transplantasyonu sonrası 4. günde bir farenin sağlıklı QTc değeri aralığında bulunduğu, 4 farede de QTc değerinin hastalık fenotipini belirleyici değer olan 73 ms'den düşük olduğu gözleendi. Transplantasyon sonrası 7. günde alınan veriler incelendiğinde, 2 farenin sağlıklı QTc değerine sahip olduğu ve 4 farede QTc değerinin 73 ms'den düşük olduğu görülmektedir. Transplantasyon sonrası 7. günde QTc değerlerinde varyasyonun artmasıyla beraber, QTc değerlerinin kendi arasında birbirlerine yaklaştığı görülmektedir. Bunun yanında, hücre transplantasyonu öncesi QTc verilerinin medyanları, hastalık fenotipinin görüldüğü alanda iken, transplantasyon sonrası 4. ve 7. günde QTc değerlerinin medyanlarının hastalık fenotipini belirleyen 73 ms değerinin altında olduğu görülmektedir. Elde ettiğimiz bu bulgular, hücre transplantasyonunun ritim bozukluğu tedavisindeki terapötik etkilerini destekler niteliktedir.



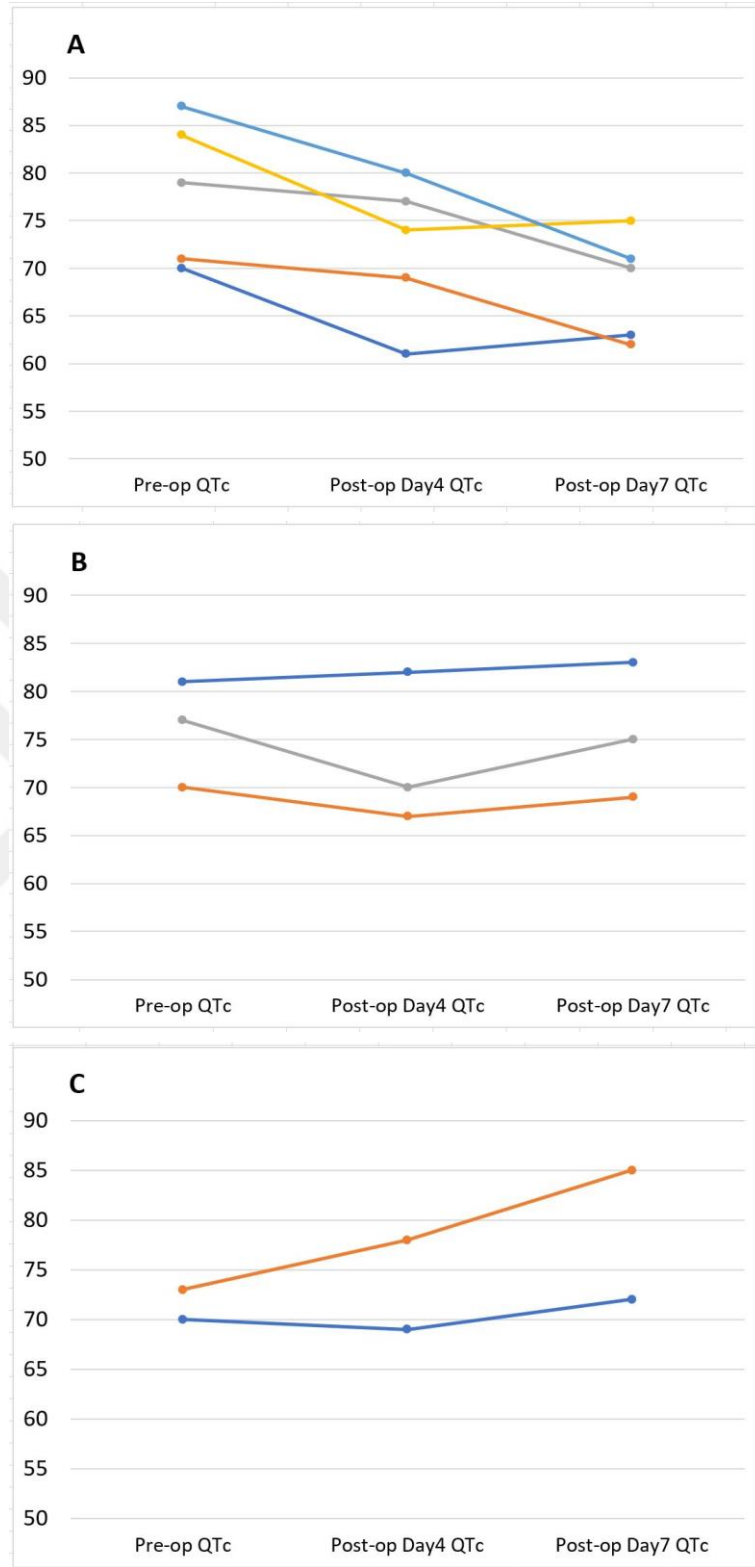
Şekil 6.13.1. J343 fare soyunda hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG verilerinin box plot grafiği

J800 fare soyunda hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG verileri ile oluşturulan box plot grafiği değerlendirildiğinde, hücre transplantasyonu sonrası 4. ve 7.gün QTc değerlerinin medyanlarının azaldığı, ancak QTc değeri medyanlarının hastalık fenotipi içerisinde olduğu görülmektedir. Hücre transplantasyonu sonrası 7. günde hastalık fenotipini belirleyici olan QTc değerinin altında olan 4 fare olduğu görülmektedir. Bunların yanında, J800 fare soyunda özellikle hücre transplantasyonu sonrası 7. günde, QTc değerlerinde operasyon öncesine göre varyasyonun arttığı görülmektedir. J800 fare soyunda operasyon sonrası elde ettiğimiz elektrofizyolojik veriler ile operasyon sırasında gözlenen yüksek mortalite beraber değerlendirildiğinde, JLNS modeli J800 transgenik fare soyunda hücresel tedavi yaklaşımının olumlu etkileri tartışmalıdır.

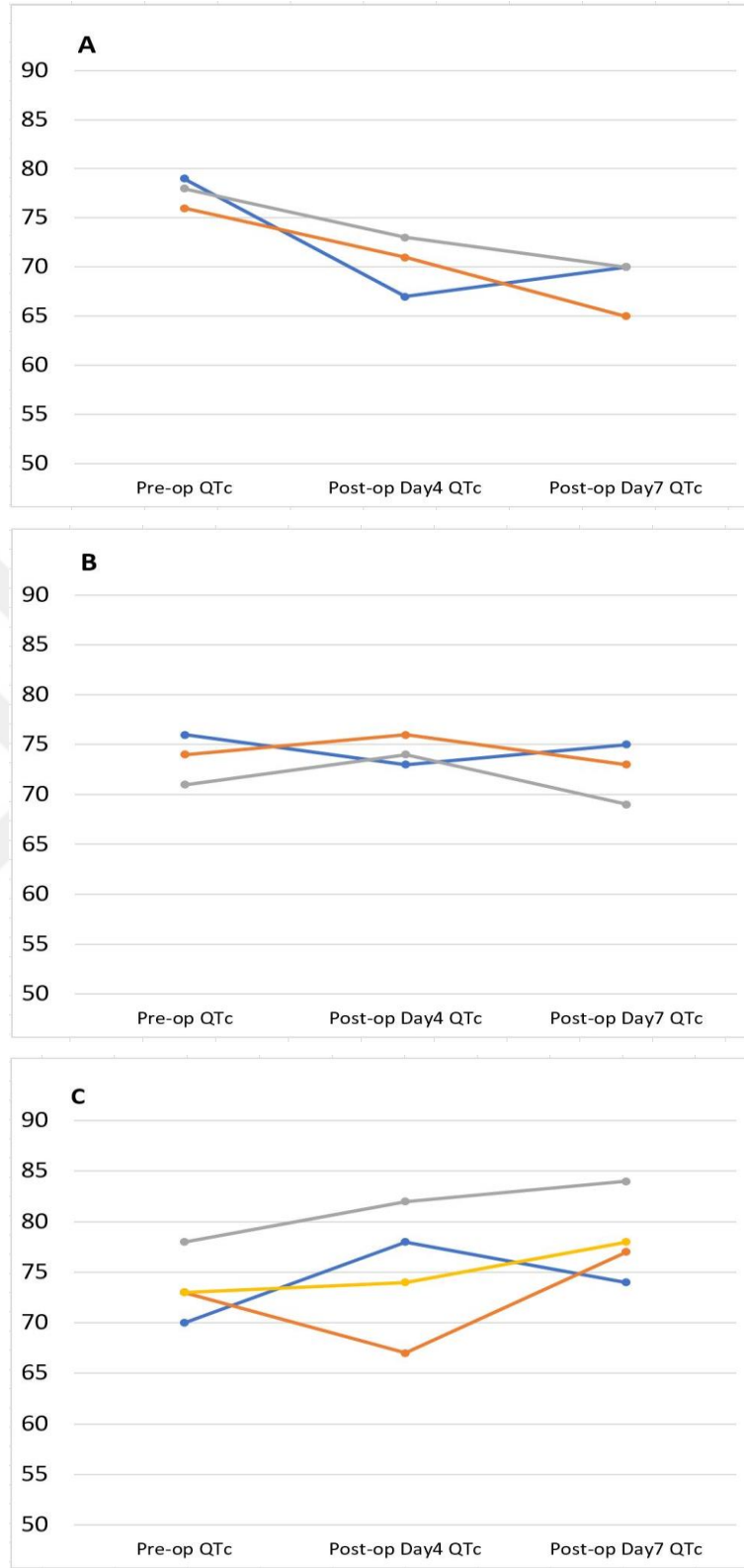


Şekil 6.13.2. J800 fare soyunda hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG verilerinin box plot grafiği

Hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası transgenik farelerden alınan EKG verileri ile çizilen box plot grafikleri, QTc değerlerinde meydana gelen değişimlerin genel olarak yorumlanmasında kolaylık sağlamıştır. Ancak her bir fareden alınan verilerin kendi içinde değerlendirilebilmesi için, hücre transplantasyonu öncesinde ve sonrasında alınan EKG verileri ile spagetti plot grafikleri çizilmiştir (Şekil 6.13.3 ve Şekil 6.13.4). Her iki fare soyu için, QTc değerleri artan, azalan ve değişim görülmeyen farelere ait verilerin bir arada bulunduğu grafiklerin çizilmesi tercih edilmiştir. J343 fare soyunda QTc değerinde azalma görülen farelerin spagetti plot grafiği incelendiğinde, QTc değerlerinin transplantasyon sonrası 4. ve 7. günde kademeli olarak azaldığı görülmektedir. J800 fare soyunda, J343 fare soyuna benzer şekilde QTc değerinde kademeli olarak azalma gözlenmektedir. Ancak J343 fare soyundan farklı olarak J800 fare soyunda, operasyon sonrası 7.günde QTc değerinde artış görülen 2 fareden, operasyon sonrası 4. günde QTc değerinde azalma gözlenmiştir.



Şekil 6.13.3. J343 fare soyunda hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG verilerinin spagetti plot grafiği. **(A)** Transplantasyon sonrası QTc değerinde düşüş görülen veriler, **(B)** Transplantasyon sonrası QTc değeri değişmeyen veriler, **(C)** Transplantasyon sonrası QTc değerinde artış görülen veriler.



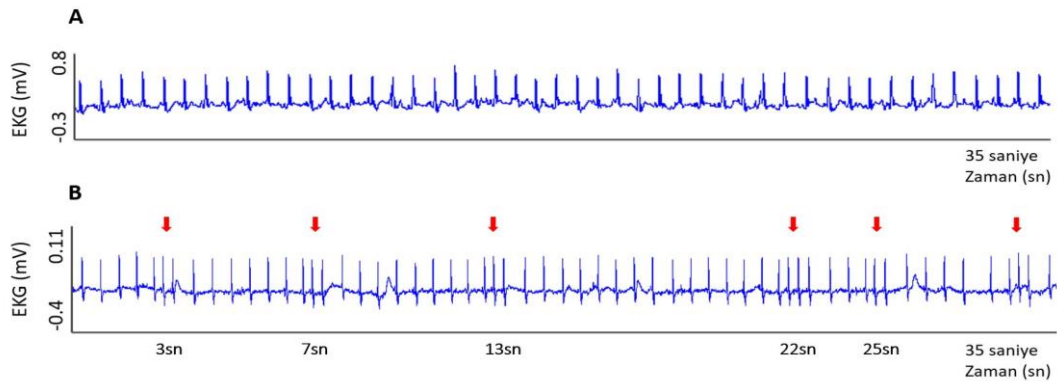
Şekil 6.13.4. J800 fare soyunda hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG verilerinin spagetti plot grafiği. **(A)** Transplantasyon sonrası QTc değerinde düşüş görülen veriler, **(B)** Transplantasyon sonrası QTc değeri değişmeyen veriler, **(C)** Transplantasyon sonrası QTc değerinde artış görülen veriler.

Bir diğer kontrol grubu olarak vahşi tip farelere (n=7), EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyonu gerçekleştirildi. Hücre transplantasyonu sonrası alınan EKG verileri değerlendirildiğinde, transplantasyon sonrasındaki 4. ve 7. gün QTc değerlerinin transplantasyon öncesine göre istatistiksel anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Tablo 6.13.4).

Tablo 6.13.4. Vahşi tip farelere hücre transplantasyonu sonrası alınan EKG verilerinin analizi

| Fare No | Pre-op QT | Pre-op RR | Pre-op QTc | Post-op Day4 QT | Post-op Day4 RR | Post-op Day4 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day4 | Post-op Day7 QT | Post-op Day7 RR | Post-op Day7 QTc | P değeri Pre-op vs Post-op Day7 |
|---------|-----------|-----------|------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------------|
| 1 | 125±3 | 372±8 | 65±1 | 141±6 | 428±19 | 68±3 | <0.08 | 187±7 | 629±9 | 75±4 | <0.07 |
| 2 | 106±3 | 277±4 | 64±2 | 142±11 | 424±7 | 69±5 | | 127±9 | 373±2 | 66±5 | |
| 3 | 118±5 | 315±11 | 67±2 | 186±13 | 583±17 | 77±4 | | 187±7 | 559±14 | 79±2 | |
| 4 | 119±2 | 319±7 | 67±1 | 140±6 | 390±5 | 71±3 | | 137±7 | 316±5 | 77±4 | |
| 5 | 153±7 | 619±8 | 62±3 | 122±3 | 312±5 | 69±1 | | 156±8 | 364±4 | 82±4 | |
| 6 | 127±3 | 339±5 | 69±1 | 137±2 | 372±3 | 71±1 | | 128±4 | 306±2 | 73±2 | |
| 7 | 71±1 | 161±1 | 56±1 | 71±1 | 159±1 | 57±2 | | 162±5 | 426±5 | 78±2 | |

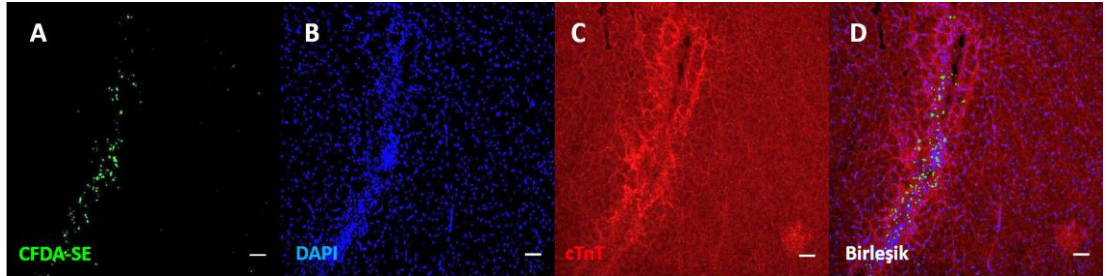
Önemli olarak, UQTS modeli transgenik farelere hücre transplantasyonundan farklı olarak vahşi tip farelerde, bir farede EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyonu sonrası 7. günde Şekil 6.13.3’de görüldüğü gibi aritmi fenotipi gözlemlendi. Vahşi tip farelerde gözlenen bu durumdan farklı olarak, UQTS modeli transgenik farelerde kardiyomiyosit transplantasyonu sonrası aritmi fenotipi gözlenmemiştir.



Şekil 6.13.5. Vahşi tip farelerde hücre transplantasyonu sonrası alınan EKG verileri. (A) Hücre transplantasyonu öncesi EKG verisi, (B) Hücre transplantasyonundan 7 gün sonra alınan aritmi fenotipi görülen EKG verisi

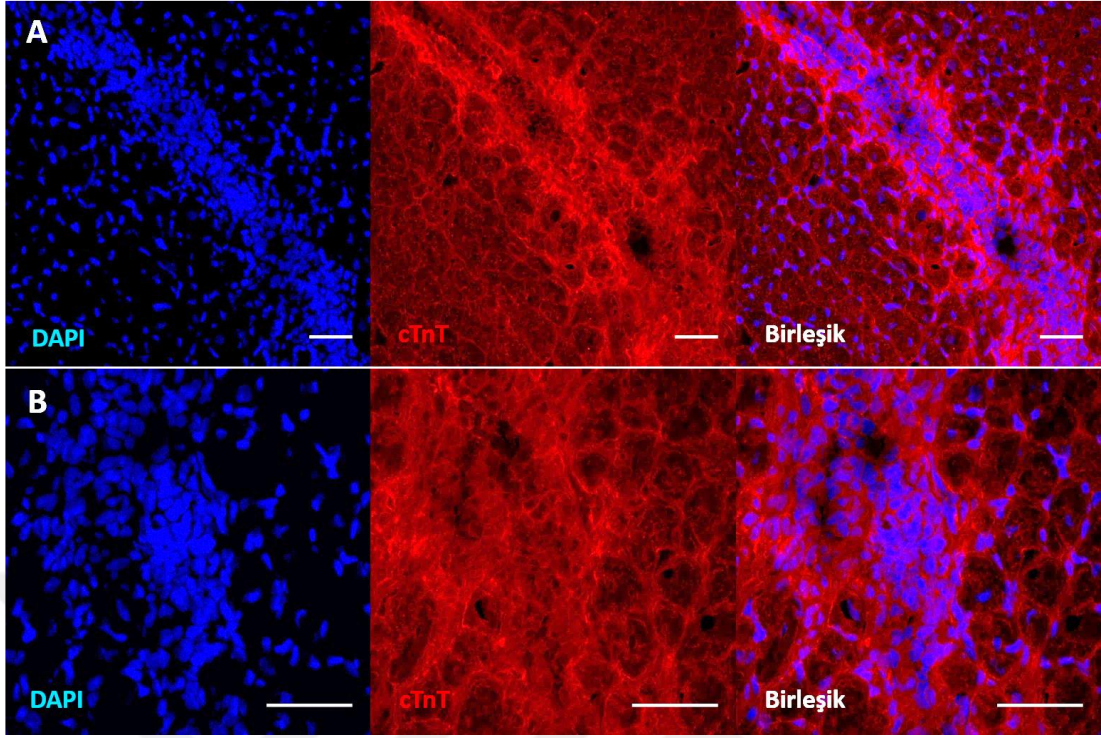
6.14 Transplantasyon Sonrası Hücrelerin Takibi ve İmmünohistokimyasal Boyamalar

Aritmi transgenik farelerde hücresele tedavi yaklaşımını değerlendirmek üzere vahşi tip EKH temelli kardiyomyositlerin dokuda takibini yapabilmek amacıyla hücreler, transplantasyon öncesi floresan özellikte bir boya olan CFDA-SE Vybrant ile *in vitro* ortamda işaretlendi. Transplante edilen hücrelerin konak miyokardiyuma entegrasyonunu arttırmak amacıyla hücreler, ticari bir ekstraselüler matriks olan matrigel ve rock inhibitörü ile karıştırılarak miyokardiyuma enjekte edildi. Transplante edilen hücrelerin dokudaki lokalizasyonunu ve entegrasyonunu değerlendirmek için transplantasyon sonrası 7. ve 14. günde kalp, immünohistokimyasal boyamalar için disekte edildi. CFDA-SE boyalı hücreleri içeren doku kesitleri konfokal mikroskonu ile tespit edildi. Ancak CFDA-SE ile boyanan hücrelerde, fiksasyon ve immünohistokimyasal boyamalardaki yıkamalar esnasında CFDA-SE sinyalinin azaldığı gözlemlendi. Fiksasyon ve immün boyamalar sırasında CFDA-SE sinyalinin kaybolması nedeniyle, boyalı hücrelerin bulunduğu doku kesitlerinin fiksasyon öncesi 10X magnifikasyondaki görüntüleri, aynı dokunun immün boyamalar sonrası alınan fotoğrafları ile eşleştirildi (Şekil 6.14.1)

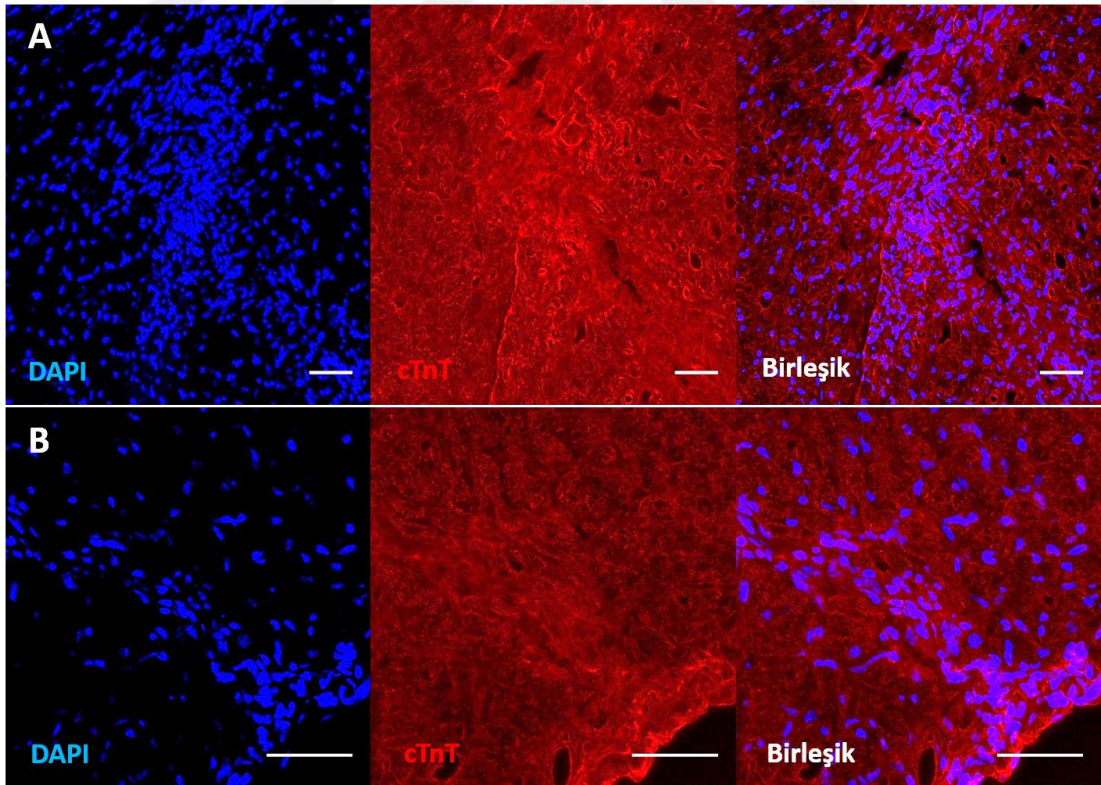


Şekil 6.14.1. Hücre transplantasyonu sonrası doku kesitlerinin IHC boyaması. (A) CFDA-SE, (B) DAPI, (C) cTnT, (D) Merged. Ölçek çubuğu: 5µm.

Hücre transplantasyonu sonrası 7 ve 14. günde disekte edilen kalplerden alınan kesitlerde boyalı hücrelerin bulunduğu örnekler, kardiyak spesifik belirteç olan cTnT immün boyamaları değerlendirildiğinde, enjeksiyonun yapıldığı apeks bölgesinde konumlanmış hücrelerin cTnT proteinini ürettiği tespit edildi (Şekil 6.14.2 ve Şekil 6.14.3). Ayrıca transplantasyon bölgesinde konumlanan hücrelerin normal çekirdek yapısı, transplante edilen hücrelerin canlılıklarını koruduğu konusunda bilgi vermektedir.

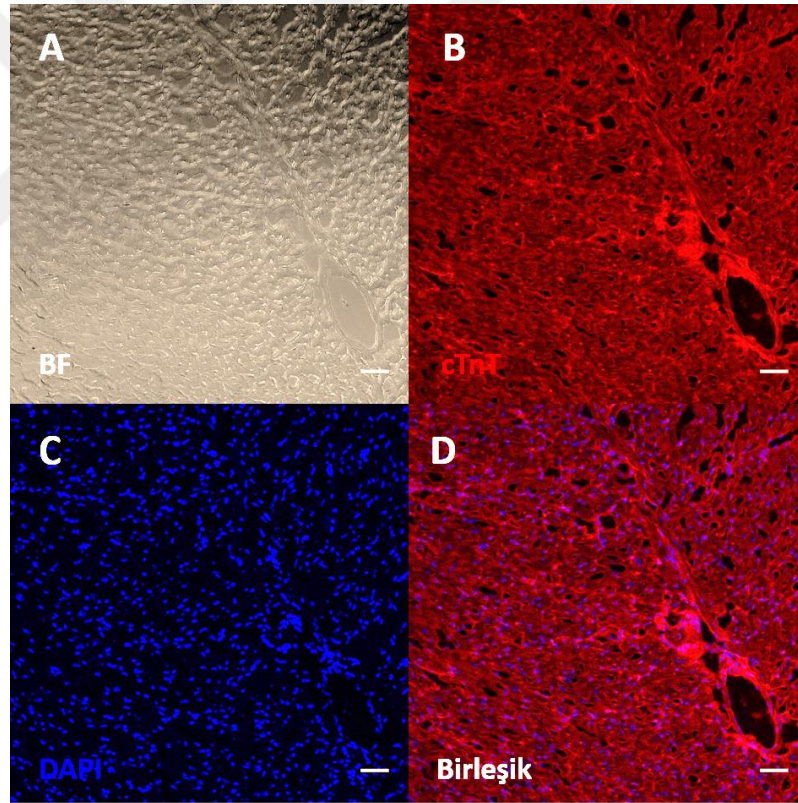


Şekil 6.14.2. Fare EKH temelli transplantasyon sonrası 7.günde IHC boyaması (A) 20X, (B) 40X. Ölçek çubuğu: 50µm



Şekil 6.14.3. Fare EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyon sonrası 14. günde IHC boyaması (A) 20X, (B) 40X. Ölçek çubuğu: 50µm

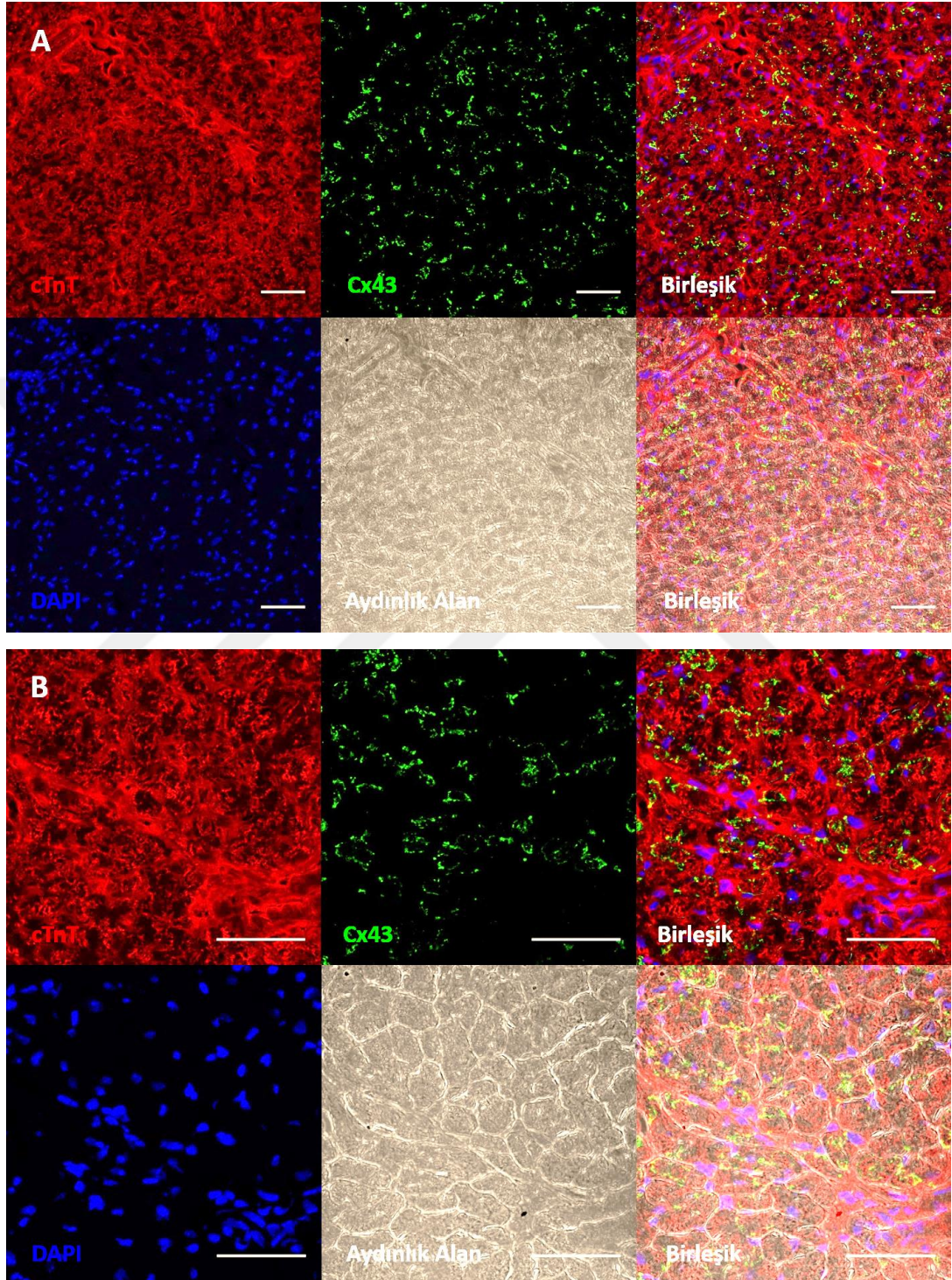
Hücre transplantasyonu çalışmalarında önemli bir kontrol grubu olan, yalnızca taşıyıcı solüsyonun, aritmi modeli transgenik farelere transplante edildiği matrigel SHAM kontrol grubu farelerden, operasyon sonrası 7.günde disekte edilen kalpten immünohistokimyasal boyamalar için kesit alındı. İmmün boyamanın yapılacağı doku örnekleri, enjektörün miyokardiyuma girdiği bölgeye göre konfokal mikrosobu ile tespit edildi. Doku kesitleri cTnT proteini ile immün boyamaları yapıldığında matrigel enjeksiyonunun yapıldığı bölgede cTnT proteinini üreten hücreler tespit edildi (Şekil 6.14.4). Hücre transplantasyonu çalışmalarında, transplante edilen hücrelerin konak miyokardiyuma entegrasyonunu arttırmak amacıyla kullanılan ve ticari bir ekstraselüler matriks olan matrigelin; içerdiği büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığı ile, hamilton enjektörünün meydana getirdiği skar dokusuna benzeyen bölgedeki iyileşme sürecine olumlu yönde etkisi olduğu düşünülmektedir.



Şekil 6.14.4. Matrigel SHAM grubu farelerden alınan doku kesitlerinin IHC boyaması. (A) BF, (B) cTnT, (C) DAPI, (D) Merged. Ölçek çubuğu: 50µm.

Bunların yanında fare EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyonu sonrası elde edilen doku kesitlerinin, oluklu bağlantı proteini olan konneksin 43 ile immün

boyamaları yapıldığında, enjeksiyon bölgesinde bulunan kardiyomiyositlerin konak miyokardiyum ile bağlantı kurduğu tespit edildi (Şekil 6.14.4).



Şekil 6.14.5. Hücre transplantasyonu sonrası doku kesitlerinin Cx43 ile IHC boyaması. (A) 20X, (B) 40X. Ölçek çubuğu: 50µm

7 TARTIŞMA VE SONUÇ

Kalp hastalıkları ülkemizde ve dünya genelinde en çok mortalite görülen hastalıkların başında gelmektedir. Kalp hastalıklarında görülen en sık ölüm şekli olan edinsel ya da kalıtsal aritmiler, kalp ritminin düzensizleşmesi ve anormal kalp atışı olarak tanımlanır. Kalıtsal aritmilerin en sık rastlanan tipi olan Uzun QT sendromu, EKG ölçümlerinde QT aralığında uzama ile karakterize edilen bir kardiyak iyon kanalı bozukluğudur. Klinikte, UQTS'in farklı genlerde farklı mutasyonların bulunduğu 17 farklı alt tipi vardır (2). Hastalığın belirtileri, ritim bozukluğuna bağlı fibrilasyon, ani kalp durması, ani senkop ve nörolojik temeli olmayan sara benzeri nöbetlerdir. Hastalığın tedavisi için genellikle kalp ritmini düzenleyici etkisi olan beta blokörler kullanılmaktadır. Ayrıca, kardiyak defibrillatör implantasyonu, aritmojenik bölgenin ablasyonu, hastalığın tedavisinde kullanılan alternatif yöntemlerdir. Popülasyonda 1:2000 oranında görülen UQTS'nin, çocuklarda ve ergenlik döneminde görülen yılda yaklaşık 3000-4000 ani ölüme sebebiyet verdiği bilinmektedir (132). Kök hücre temelli kardiyomiyositler; hastalıkların moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına ve hastaya özgü tedavi seçeneklerini değerlendirebilmeye ve geliştirebilmeye olanak sağlamaktadır. Literatürde, kardiyak hastalıkların tedavisine yönelik kök hücre kaynaklı hücre transplantasyonu çalışmaları bulunmaktadır. Bu alandaki çalışmalar özellikle rejenerasyon kapasitesi olmayan kardiyak hücrelerin kaybı ile sonuçlanan miyokard enfarktüsü üzerinde yoğunlaşmıştır. Literatürde, miyokard enfarktüs sonrası hasarlı dokuyu yenilemeye yönelik birçok hücre transplantasyonu hayvan modeli bulunmaktadır. Ancak EKH ve EKH'ten farklılaştırılan hücrelerin kullanıldığı kardiyak transplantasyon çalışmalarında, hücrelerin elde edilmesi için erken dönem embriyonun tahrip edilmesi etiksel birtakım soruları da beraberinde getirmektedir. Bunun yanında EKH kökenli hücrelerin transplantasyon sonrası immün rejeksiyonu, pluripotent özellikteki hücrelerin teratoma oluşturma potansiyeli ve ayrıca transplante edilen hücrelerin konak miyokardiyumdaki hücreler arasında zayıf hücresel etkileşimleri sonucu aritmik olayları tetikleme potansiyelleri hücrelerin kullanımındaki başlıca riskler arasında yer almaktadır.

Kalpte transplantasyon uygulamalarının en yaygın örneği miyokard enfarktüs sonrası fare ve diğer hayvan modellerinin yanında, pre-klinik ve klinik çalışmalardır.

bulunmaktadır. Bu çalışmalar arasında, Isl-1⁺ SSEA1⁺ hücrelerin, miyokard enfarktüs geçirmiş bir hastaya transplantasyonu sonrası ilk 3 ayda LVEF'in, %26'dan %36 ya çıktığı gözlenmiştir. Bununla beraber hastada, transplantasyondan sonrasında ritim bozukluğu ve tümör oluşumu gibi bir komplikasyon gelişmemiştir (133). Bir diğer çalışmada, yaş ortalaması 66 olan 6 hastaya, insan EKH temelli kardiyak progenitor hücresi, epikardiyal transferi gerçekleştirilmiştir (134). Deney grubundaki tüm hastalarda semptomatik olarak iyileşme gözlenmiş ve hücre trasplante edilen bölgelerde sistolik hareketlerin arttığı ve takip boyunca hastalarda tümör yapısının gelişmediği gözlenmiştir. Bunun yanında, hücre transplantasyonu sonrası hastalarda, ritim bozukluğu gözlenmemiştir. Bu çalışmada, tümörojenik EKH'lerden arındırılmış ve farklılaştırılmış kardiyak hücrelerinin, klinik çalışmalarda kardiyak fonksiyonu iyileştirici yönde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Hücre sel tedavi çalışmalarında, transplante edilen hücrelerin, kalp dokusunda bulunan kök hücre, progenitor hücreleri ve kardiyomiyositlerin proliferasyonu ile endojen rejenerasyonu aktive ettiği düşünülmektedir. Transplantasyon sonrası hücrelerin, hangi yolla kardiyak fonksiyona iyileştirici etki gösterdiği tam olarak bilinmemektedir. Ancak hücre transplantasyonu sonrası, kalp rejenerasyonunun baskın mekanizmasının, transplante edilen hücrelerden salgılanan çeşitli çözünebilir faktörlerden kaynaklı parakrin sinyali kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Sitokinler, transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) stromal hücre kökenli faktör-1, (SDF-1) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörleri transplante edilen hücreler tarafından intestinal boşluğa veya kan dolaşımına salınarak, dokuya özgü progenitör hücrelerin aktivasyonu, kalp dokusundaki kardiyomiyositlerin apoptozunun bloklanması, ve neovaskülarizasyon gibi birçok rejenaratif süreçlerin tetiklenmesini sağlamaktadır (135).

Transplante edilen hücrelerin konak miyokardiyumdaki parakrin etkilerinin yanında, kasılabilen kardiyomiyositlerin miyokardiyuma entegre olarak da kardiyak fonksiyonu düzenlediği düşünülmektedir. EKH temelli kardiyak yamaların, enfarktüs oluşturulan fare modellerine transplantasyonu sonrası, deney grubundaki bazı farelerde transplante edilen kardiyomiyositlerin, kalp dokusuyla elektriksel eşleşme gösterdiği literatürde belirtilmektedir (136). Bu alandaki çalışmalar, rejenerasyon

kapasitesi olmayan kardiyak hücrelerin kaybı ile sonuçlanan miyokard enfarktüsü sonrası doku rejenerasyonu üzerinde yoğunlaşmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında ise; literatürde ilk olarak ritim bozukluğuna yönelik hücresel tedavi yaklaşımını incelemek amacıyla, Pfeiffer ve arkadaşlarının C57BL/6 farelerde, *KCNQ1* geninde null J800 (*Kcnq1*^{-/-}) ve nokta mutasyonu J343 (*Kcnq1*^{A340E/A340E}) oluşturdukları iki transgenik aritmi fare soyu kullanılmıştır (4, 5). Transgenik fare soylarının üretimi, bakımı ve *in vivo* cerrahi müdahaleleri MEDİTAM deney hayvanları merkezinde gerçekleştirilmiştir. Transgenik farelerden alınan EKG kayıtları analiz edildiğinde, literatüre benzer olarak QT, JT ve QTc değerlerinde, vahşi tipe oranla istatistiksel anlamlı uzama görülmüştür (Tablo 6.8.1). Hastalığın homozigot olarak kalıtıldığı fareler ile heterozigot olarak kalıtıldığı farelerde EKG parametrelerinde istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Bu nedenle heterozigot ve homozigot fareler, transplantasyon çalışmalarında birlikte değerlendirilmiştir. Elektrokardiyografik parametrelerin klinikte, yaşa ve cinsiyete göre farklılık gösterdiği bilinmektedir (131). Laboratuvarımızda genç ve yaşlı farelerden alınan EKG verileri değerlendirildiğinde iki grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu nedenle, her iki grup *in vivo* hücre transplantasyon çalışmalarında birlikte değerlendirilmiştir.

Laboratuvarımızda bulunan transgenik fare soylarından özellikle null mutasyonun bulunduğu J800 homozigot farelerde, canlı doğum oranının düşük ve doğumdan sonra mortalinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Transgenik farelerde, doğurganlıkta azalma literatürde gözlenen bir olgudur (137). Bu durumu iyileştirmek amacıyla, vahşi tip ile transgenik farelerin üretimi, hamile dışının besin değeri yüksek yemler ile beslenmesi üretim verimini arttırdığı gözlenmiştir. Bunun yanında, bazı mutant farelerin yavrularında geç tüylenme ve gelişim geriliği gözlenmiştir. Klinikte, *KCNQ1* geninde homozigot mutasyona sahip bireylerde görülen, JLNS sendromuna benzer olarak J800 homozigot farelerde kulaktaki tüy hücre sayısının ve endolimfik sıvıdaki K⁺ konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak “shaker-waltzer” olarak adlandırılan kontrolsüz baş hareketleri kendi etraflarında dönme ile karakterize edilen hiperaktif davranışlar ve sağırılık, çalışmalarımızda gözlenmiştir (4). Ayrıca J800 fare soyundaki transgenik farelerde klinikte görülenden farklı olarak, farelerin EKG verilerindeki T dalgasında varyasyon gözlenmiştir.

Yetişkin aritmi modeli transgenik farelerin, vahşi tip C57BL/6 farelere göre boyutlarının küçük ve ağırlıklarının az olması nedeniyle, *in vivo* operasyon sırasında, oral yol ile entübe edilme girişimleri yüksek mortalite ile sonuçlanmıştır. Buna alternatif olarak fareler, oral entübasyona göre daha invaziv bir yöntem olan ancak düşük mortalite gözlemlendiğimiz trakeostomi yöntemi ile entübe edilmişlerdir. Ayrıca trakeostomi sırasında gözlenen mortaliteyi önlemek amacıyla, trake çap ve segment boşluğu daha geniş olan ve ağırlığı 25 gramın üzerindeki fareler çalışmaya dahil edilmiştir.

Ketamin ve izofloran *in vivo* çalışmalarda sıklıkla kullanılan anestezi ajanları arasındadır. Ancak ketaminin belirli dozlarının Na^+ ve K^+ kanallarını bloklayarak QT aralığının uzamasına sebebiyet verdiği bilinmektedir (130). Literatürde yer alan bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, laboratuvarımızda bulunan transgenik aritmi fare modellerinden, ketamin anesteziği kullanılarak alınan EKG verileri, izofloran anesteziği kullanılarak alınan EKG verileri ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. J343 ve J800 transgenik fare soyunda, ketamin anesteziği ile alınan kayıtlarında, izofloran ile alınanlara göre QT ve QTc değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. Ancak izofloran sisteminin opere edilen farelerde kardiyak operasyon için yeterli ve derin anesteziyi sağlayamaması ve teknik olarak MEDİTAM koşullarında stabil olamaması nedeniyle *in vivo* operasyonlarda anestezi ajanı olarak ketamin kullanılması tercih edilmiştir. Ayrıca hücre transplantasyonu çalışmalarında, literatürde QT uzamasını tetikleyen dozdan daha düşük dozlar kullanılarak anestezi sağlanmıştır. Ayrıca operasyon öncesi ve sonrasında alınan EKG verileri ketamin anesteziği kullanılarak alındığı için, verilerin kullanılan anestezi ajanının kardiyak elektrofizyolojiye olan etkisinden bağımsız bir şekilde değerlendirilmesi sağlanmıştır.

İnsanda kalp atımı dakikada 60 ile 80 arasında değişirken, farede bu değer 300-600 arasındadır. Her bir kalp atımının arasında geçen sürenin kısa olması nedeniyle fare PQ, QRS ve QT parametreleri, insanlara kıyasla düşüktür. Ayrıca, depolarizasyon ve repolarizasyon dalgalarının üst üste binmesi nedeniyle fare EKG verilerinde net bir plato fazı görülmemektedir. Bunun yanında insanlarda hiperkalsemi ve hipotermi durumlarında EKG’de gözlenen J dalgası, normal fizyolojik koşullardaki fare EKG datasında belirgin olarak görülebilmektedir (138). J343 ve J800 fare soyundan alınan

EKG kayıtları incelendiğinde literatüre benzer olarak, QRS kompleksini takiben J dalgası gözlenmiştir (Şekil 6.7.2).

Ritim bozukluğuna yönelik hücresel tedavi yaklaşımını incelemek amacıyla, vahşi tip C57BL/6 farenin E3.5 embriolarından izole edilen kök hücreler ile, kardiyak farklılaşma çalışmalarında kullanılmak üzere sınırsız hücre kaynağı oluşturulmuştur. Transgenik aritmi farelere transplantasyonda kullanılacak vahşi tip EKH'lerin, kardiyak farklılaşması için, literatürde sıklıkla tercih edilen yöntem olan, embriyonel cisimcik yöntemi kullanılmıştır (139, 140). Laboratuvarımızda bulunan farklı lot numarasına sahip FBS'ler optimizasyon amacıyla denenmiş, kardiyak farklılaşmayı destekleyecek olan FBS'ler belirlenmiştir. Kardiyomiyosit kültürlerinde, farklılaşmanın 8 ile 10. gününden itibaren spontan atım gözlenmiştir. Spontan atıma tutarlı olarak, kardiyak spesifik belirteç olan cTnT proteinin varlığı immünohistokimyasal boyamalar ile tespit edilmiştir. Literatürde farklı protokollerde kardiyak farklılaşma verimliliği %40-80 arasında değişkenlik göstermektedir (141, 142) Fare EKH temelli kardiyomiyosit kültürlerinde yapılan akım sitometri analizi sonucu, literatüre benzer olarak %55-63 oranında cTnT⁺ kardiyomiyosit tespit edilmiştir.

Transplante edilen hücrelerin dokuda takibini yapabilmek için hücreler, floresan özellikte bir boya olan Vybrant CFDA-SE ile işaretlenmiştir. Hücre transplantasyonundan 14 gün sonra disekte edilen kalplerden alınan kesitlerde, enjeksiyon bölgesindeki boyalı hücre sinyalinin azaldığı gözlenmiştir. İmmün boyamalarımızın sonucunda, boyanın *in vivo* ve *in vitro* ortamda uzun süreli takibinin yapılamaması ve literatürdeki bilgiler ışığında hücre transplantasyonu sonrası farelerin 7 günlük gözlemine karar verilmiştir.

Transplantasyon çalışmalarındaki deneysel ve cerrahi operasyon basamaklarının optimizasyonu için, öncelikle hücre kaynağı olarak kolaylıkla temin edebildiğimiz fare embriyosundan ürettiğimiz fibroblastlar (FEF) kullanılmıştır. Transgenik aritmi modeli farelere transplante edilen FEF hücrelerinin (n=5), kardiyak elektrofizyolojiye etkisini incelemek amacıyla operasyon öncesinde, operasyondan sonra EKG kayıtları alınmıştır. FEF transplantasyonundan önce ve sonra alınan EKG verileri karşılaştırmalı incelendiğinde; operasyon sonrasında 4. ve 7.günlerde,

operasyon öncesine göre, QT ve QTc değerlerinde istatistiksel anlamlı artış gözlenmiştir. FEF transplante edilen fare kalplerinden alınan kesitlerin immünohistokimyasal boyamaları, enjeksiyon bölgesinde yoğun olarak konumlanmış fibroblast hücrelerinin, miyokardiyumun elektriksel aktivitesini olumsuz yönde etkileyecek bir bariyer oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu durum, EKG verilerinde tespit edilen FEF transplantasyonu sonrası, QT ve QTc parametrelerindeki artışı destekler niteliktedir. Literatürde özellikle MI sonrası gelişen fibrozis ve skar oluşumu, bulgularımıza benzer nitelikte kalp fonksiyonunda bozukluklara neden olduğu bilinmektedir. Sonuçlarımız bu yönüyle literatür ile tutarlıdır.

Transgenik farelerden *Kcnq1* geninde nokta mutasyonu bulunan J343 fare soyunda, vahşi tip EKH temelli kardiyomiyosit hücre transplatasyonu sonrası, opere edilen farelerin (n=10) %50'sinde QTc değerinde düşüş (n=5) görülerek, hastalık fenotipini iyileştirici etkisi görülmüştür. Opere edilen farelerin %20'sinde QTc değerinde artış (n=2) gözlenirken, %30'unda QTc değerinin değişmediği (n= 3) tespit edilmiştir. SHAM kontrol grubu verileri ile FEF transplantasyonu sonrası elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda EKH temelli kardiyomiyosit transplante edilen hücrelerin kalp elektrofizyolojisini düzenleyici yönde etkisinin olabileceği ve bu etkinin kardiyomiyositlere özgü olduğu düşünülmektedir.

Null mutasyonun bulunduğu J800 transgenik aritmi farelerde, hücre transplantasyonu sonrası alınan EKG verileri incelendiğinde, opere edilen farelerin (n=10) %30'unda QTc değerinde kısalma (n=3) ile hastalık fenotipinin iyileştirici etkisi gözlenmiştir. Farelerin %40'ında QTc değerinde artış (n=4) görülürken, %30'unda QTc değerinin değişmediği (n= 3) tespit edilmiştir. J800 transgenik aritmi farelerin sahip olduğu ağır kardiyak ve diğer sistemlerdeki fonksiyonel abnormaliteler nedeniyle, operasyon sırasında ve sonrasında daha yüksek mortalite gözlenmiştir.

Ritim bozukluğu tedavisine yönelik hücre transplantasyonu çalışmalarımızda, kontrol grubu olarak belirlenen ilk grup, herhangi bir enjeksiyonun yapılmadan, trakeostomi ve torakotomi işlemlerinin gerçekleştirildiği "açma-kapama SHAM" grubu fareleri opere edilmiştir. Operasyon sonrası QTc değerlerinde operasyon öncesine göre anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. İn vivo cerrahi operasyonlar sırasında ve sonrasında gözlenen mortalitede düşüş sağlandığında, çalışmamızın

önemli bir kontrol grubu olan, hücre transplantasyonu sırasında hücrelerin bulunduğu taşıyıcı solüsyonun enjekte edildiği “Matrigel SHAM” grubu fareleri opere edilmiştir. Açma kapama kontrol grubuna benzer olarak, matrigel transplantasyonu öncesi ve sonrası transgenik farelerden alınan EKG verileri arasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Aritmi modeli oluşturulan transgenik farelerde; hücre transplantasyonundan sonra QTc değerlerinde gözlenen değişimlerin, enjeksiyon sırasında aritmojenik bölgenin ablasyonuna bağlı olup olmadığını belirleyebilmek için, hücre transplantasyonu yapılmadan, yalnızca hamilton enjektörünün apekse batırıldığı “iğne hasarı SHAM” grubu fareleri opere edilmiş ve operasyon sonrası, QTc değerinde istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmemiştir. SHAM kontrol gruplarından elde edilen veriler değerlendirildiğinde, QTc’de gözlemlediğimiz düşüşün, transplante edilen taşıyıcı karışım veya enjeksiyon sırasında aritmojenik bölgenin ablasyonundan bağımsız olarak, transplante edilen hücrelerin terapatik etkisinden kaynaklı olduğunu göstermektedir.

Bir başka kontrol grubu olarak vahşi tip farelere (n=7), fare EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyonu gerçekleştirilmiştir. Önemli olarak, hücre transplantasyonu sonrası 4. ve 7.günde alınan EKG verileri incelendiğinde sonrası QTc değerinde istatistiksel anlamlı artış gözlenmiştir (Tablo 6.13.4). Bunun yanında, bir farede transplantasyon sonrası 7. günde alınan EKG ölçümünde, aritmi fenotipi gözlenmiştir. Vahşi tip farelerde gözlenen bu durumdan farklı olarak, UQTS modeli transgenik farelerde EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyonu sonrası aritmi fenotipi gözlenmemiştir.

Vahşi tip EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyonu öncesi ve sonrası alınan EKG kayıtları ile hücresel tedavinin kardiyak elektrofizyolojiye etkisi değerlendirilirken, enjekte edilen hücrelerin kalp dokusuna lokalizasyonu ve entegrasyonu, doku tespitini takiben yapılan immünohistokimyasal boyamalar ile değerlendirilmiştir. Transplante edilecek hücrelerin konak miyokardiyumda takibinin yapılabilmesi için hücreler, transplantasyon öncesi floresan özellikte bir boya olan CFDA-SE ile işaretlenmiştir. Transplantasyon sonrası 7. günde perfüzyonu takiben kalp disekte edilerek, kardiyak spesifik bir belirteç olan cTnT ile

immünohistokimyasal boyamaları sonucunda, enjeksiyon bölgesinde yoğun olarak konumlanmış hücrelerin canlılıklarını koruduğunu ve aynı zamanda kardiyomiyosit belirteci olan cTnT proteinini ürettiği tespit edilmiştir. Ayrıca fare EKH temelli kardiyomiyosit transplantasyonu yapılan kalplerden alınan kesitlerin oluklu bağlantı proteini olan connexin 43 proteini ile immün boyaması yapılmıştır. Boyama sonrası alınan görüntüler incelendiğinde enjeksiyon bölgesine entegre olan hücreler ile konak miyokardiyum arasında oluklu bağlantı proteinleri aracılığı ile bağlantının kurulduğu tespit edilmiştir.

İmmün boyamalarda kullanmak üzere, transplantasyondan sonra 7. ve 14. günlerde disekte edilen kalplerden alınan kesitler incelendiğinde, konak miyokardiyumun morfolojisinden farklı olarak, iğnenin dokuya girdiği enjeksiyon bölgesi ışık mikroskopu ile tespit edilebilmiş ve skar dokuya benzer bir yapı gözlenmiştir. Bu gözlemin EKG bulgularında QTc değerinin azalmasına, direkt ya da dolaylı etkisi olabileceği düşünülmüştür. Bu gözlemimizden sonra sadece iğne hasarının oluşturulduğu yeni bir kontrol SHAM grubu belirenmiştir. Ayrıca boyalı hücrelerin bulunduğu kalp kesitlerinde, CFDA-SE sinyalinin fiksasyon ve immün boyamalar sırasında azaldığı görülmüştür. Fiksasyon süresi, sıcaklığı ve kullanılan fiksatifin değiştirilmesi ile yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, sinyal kaybı sorunu çözümlenememiştir. Bu nedenle kalp kesitlerinden immün boyama sonrası alınan konfokal görüntüleri, fiksasyon öncesi alınan görüntüler ile üst üste getirilerek değerlendirilmiştir.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, immünohistokimyasal boyamalara uygun farklı bir işaretleyici ile transplantasyon öncesi hücrelerin boyanması veya genetik özelliklerden faydalanarak hücre takibinin yapılması ile immün boyamalar sonrasında gözlenen sinyal kaybı engellenebilir. Dişi farelere, erkek embriyonun blastosistinden köken alan EKH kolonisinin farklılaştırılması ile elde edilen EKH temelli kardiyomiyositlerin transplantasyonu sonrası, disekte edilen kalpte Y-FISH ile dokuya entegre olan hücreler tespit edilebilir. Buna alternatif olarak GFP hücre hatları kullanılarak transplante edilen hücrelerin dokuda takibi sağlanabilir. MRI ve benzeri ileri görüntüleme teknikleri kullanılarak transplantasyon sonrası hücrelerin dokudaki konumlanmaları daha detaylı bir şekilde incelenebilir. Buna benzer şekilde; transplante edilen hücreler, voltaja duyarlı boyalar ile işaretlenip, özel görüntüleme

sistemleri ile takip edilerek transplantasyon sonrası kalbin elektrofizyolojik haritası çıkartılarak hücresel tedavinin terapötik mekanizması aydınlatılabilir.

Ritim bozukluğu tedavisine yönelik hücresel tedavi yaklaşımı, deney gruplarındaki fare sayıları artırılarak tekrarlanması, istatistiksel analizlerde daha doğru sonuç alınmasını sağlayacaktır. Bunun yanında transplante edilen hücrelerin konak miyokardiyuma entegrasyonunu artırmak için enjeksiyon yapılan bölgeye fibrin glue ve benzeri materyaller uygulanabilir.

Kardiyak hastalıkların tedavisine yönelik hücre transplantasyonu çalışmalarında transplante edilecek hücrelerin miktarı, veriliş şekli ve hangi hücre çeşidinin kullanılması gerektiği konusu tartışmalıdır. Kasılabilen kardiyomiyositlerin, kardiyak fibroblast ve endotel hücreleri ile belirli oranda karıştırılarak verilmesi, enjeksiyon sonrası hücrelerin entegrasyonu ve vaskülarizasyonu artırıcı etkisi olduğu düşünülmektedir (143). Bunun yanında kardiyomiyosit ve kardiyak fibroblast hücrelerinin birlikte transplante edilmesinin, hücrelerin dokuya entegre olmasını kolaylaştırdığını raporlayan çalışmalar mevcuttur (144). Bu nedenle, transplantasyon çalışmalarımızda kullandığımız hücreleri saflaştırmadan, kardiyak hücre kültürleri kardiyomiyosit hücrelerinin yanında, içinde barındırdığı fibroblast ve düz kas hücreleri gibi diğer kardiyak destek hücrelerinin transplante edilen hücrelerin konak dokuya entegrasyonuna yardımcı olabileceği düşünülmüştür.

Tez kapsamındaki tüm deney ve kontrol gruplarında bulunan farelerin EKG ölçümleri, REMER bünyesinde bulunan ve fizyoloji laboratuvarında kullanılmakta olan Biopac System Ins. cihazı ile yapılmıştır. İnsandan EKG almak üzere tasarlanmış bu sistem üzerinde birtakım optimizasyonlar yapılarak fareden EKG kaydı yapılabilir duruma getirilmiştir. Öncelikle, cihaza ait olan elektrotlar daha stabil probalar ile değiştirilmiştir. Farenin anestezide tam olarak girebilmesi için ketamin enjeksiyonu sonrası karanlık ve sıcak bir ortamda anestezide girmesi beklenmiştir. Fare, kayıt cihazına yakın şekilde konumlandırılmış ve elektrotların kabloları farenin bulunduğu plastik palakaya sabitlenmiştir. Bunun yanında elektrotların ilekenliğini artırmak amacıyla insülin enjektörleri ince bakır teller ile sarı elektrotlara bağlanmıştır. En önemlisi, EKG kaydı alınan ortamın sessiz olmasına dikkat edilmiştir. Yapılan bu optimizasyon çalışmaları ile transgenik farelerden alınan EKG verilerindeki gürültünün

azaltılması sağlanmıştır. Ancak küçük kemirgenlere uygun olarak tasarlanmış EKG kayıt sistemlerin kullanılmasıyla kayıt sırasındaki hassasiyetin artırılması, alınan verilerin daha doğru yorumlanmasına olanak sağlayacaktır. Fare kalbinin boyutunun küçük olması nedeniyle EKG ölçümlerinde dalga genlikleri düşüktür. EKG kayıt sistemine adapte edilen ve ticari olarak temin edilebilen, sinyal artırıcılar kullanılabilir. Kablosuz EKG kayıt cihazlarının kullanılması, kayıt esnasında kabloların hareketinden kaynaklanan gürültüyü engelleyemeye yönelik iyi bir alternatiftir. Özellikle uzun süreli takip çalışmalarında telemetri yöntemi ile EKG kaydı alınması yararlı olacaktır. Fare ve sıçanlar için tasarlanmış giyilebilir EKG kayıt sistemleri sayesinde, anestezi ajanlarının elektrofizyolojik etkilerinden bağımsız olarak kayıt almak mümkün olabilmektedir (145). CPVT transgenik farelerde olduğu gibi, egzersiz ile tetiklenen aritmi modeli farelerin EKG ölçümleri bahsedilen sistemler ile alındığında daha doğru sonuçlar verebilir.

Tez çalışması kapsamında, bir transgenik aritmi tipi olan UQTS Tip 1 fare modellerinde hücresel tedavi yaklaşımı literatürde ilk kez değerlendirilmiştir. Çalışmamızda klinikte hastadan hastaya gözlenen elektrofizyolojik fenotip varyasyon ile tedaviye verilen cevabın çeşitliliği transgenik fare modellerinde de tespit edilmiştir. Kardiyomiyosit transplantasyonunun, SHAM kontrollerine kıyasla aritmi tedavisine yönelik iyileştirici etkileri tespit edilmiştir. Daha fazla sayıda deney hayvanı ve büyük hayvan modellerinin kullanılması, MRI ve benzeri görüntüleme teknikleri ile fonksiyonel değerlendirme, transplantasyon sonrası uzun süreli takibin yapılması, ritim bozukluğuna yönelik hücre transplantasyonu yaklaşımının güvenilirliğini arttıracaktır. Bu tez çalışması temel alınarak translasyonel çalışmalar geliştirilebilir. Ayrıca bulgularımız, sağlık, klinik ve ekonomik katkı sağlama potansiyeline sahiptir.

8 KAYNAKLAR

1. Alders, M. and I. Christiaans, Long QT syndrome. 2015.
2. Schwartz, P.J., Impact of genetics on the clinical management of channelopathies. *Journal of the American College of Cardiology*, 2013. 62(3): p. 169-180.
3. Kapplinger, J.D., Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION® long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm*, 2009. 6(9): p. 1297-1303.
4. Casimiro, M.C., Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. 98(5): p. 2526-2531.
5. Casimiro, M.C., Targeted point mutagenesis of mouse *Kcnq1*: phenotypic analysis of mice with point mutations that cause Romano-Ward syndrome in humans. *Genomics*, 2004. 84(3): p. 555-564.
6. Babij, P., Inhibition of cardiac delayed rectifier K⁺ current by overexpression of the long-QT syndrome HERG G628S mutation in transgenic mice. *Circulation research*, 1998. 83(6): p. 668-678.
7. Lees-Miller, J.P., Selective knockout of mouse *ERG1 B* potassium channel eliminates IKr in adult ventricular myocytes and elicits episodes of abrupt sinus bradycardia. *Molecular and cellular biology*, 2003. 23(6): p. 1856-1862.
8. Shi, Y., Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature reviews Drug discovery*, 2017. 16(2): p. 115.
9. Schroeder, I.S., Differentiation analysis of pluripotent mouse embryonic stem (ES) cells in vitro, in *Gene Knockout Protocols*. 2009, Springer. p. 219-250.
10. Kwon, Y.-W., H.-M. Yang, and H.-J. Cho, Cell therapy for myocardial infarction. *International journal of stem cells*, 2010. 3(1): p. 8.
11. Nichols, J. and A. Smith, The origin and identity of embryonic stem cells. *Development*, 2011. 138(1): p. 3-8.
12. Nagy, A., Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993. 90(18): p. 8424-8428.
13. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*, 1981. 292(5819): p. 154.

14. Thomson, J.A., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*, 1998. 282(5391): p. 1145-1147.
15. Schuldiner, M., Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. 97(21): p. 11307-11312.
16. Sun, Q., Z. Zhang, and Z. Sun, The potential and challenges of using stem cells for cardiovascular repair and regeneration. *Genes & diseases*, 2014. 1(1): p. 113-119.
17. Wobus, A.M., G. Wallukat, and J. Hescheler, Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation*, 1991. 48(3): p. 173-182.
18. Boheler, K.R., Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circulation research*, 2002. 91(3): p. 189-201.
19. Keller, G., Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & development*, 2005. 19(10): p. 1129-1155.
20. Pall, E., In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiac cells. *Romanian Biotechnological Letters*, 2011. 16(3): p. 6170-6180.
21. Moorman, A., Development of the heart:(1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart*, 2003. 89(7): p. 806-814.
22. Lin, Q., Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science*, 1997. 276(5317): p. 1404-1407.
23. Schiaffino, S. and C. Reggiani, Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological reviews*, 1996. 76(2): p. 371-423.
24. Bers, D.M., Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 2002. 415(6868): p. 198.
25. Bazett, H.C., An analysis of the time relations of electrocardiograms. *Heart*, 1920. 7: p. 353-370.
26. Yang, X.-L., The history, hotspots, and trends of electrocardiogram. *Journal of geriatric cardiology: JGC*, 2015. 12(4): p. 448.
27. Becker, D.E., Fundamentals of electrocardiography interpretation. *Anesthesia progress*, 2006. 53(2): p. 53-64.

28. AlGhatrif, M. and J. Lindsay, A brief review: history to understand fundamentals of electrocardiography. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, 2012. 2(1): p. 14383.
29. Fye, W.B., A history of the origin, evolution, and impact of electrocardiography. *American Journal of Cardiology*, 1994. 73(13): p. 937-949.
30. Viskin, S., The QT interval: too long, too short or just right. *Heart rhythm*, 2009. 6(5): p. 711-715.
31. Zhang, X., Multi-parametric assessment of cardiomyocyte excitation-contraction coupling using impedance and field potential recording: A tool for cardiac safety assessment. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 2016. 81: p. 201-216.
32. Clements, M., Multielectrode array (mea) assay for profiling electrophysiological drug effects in human stem cell-derived cardiomyocytes. *Current protocols in toxicology*, 2016. 68(1): p. 22.4. 1-22.4. 32.
33. Scott, C.W., An impedance-based cellular assay using human iPSC-derived cardiomyocytes to quantify modulators of cardiac contractility. *Toxicological Sciences*, 2014. 142(2): p. 331-338.
34. Fearnley, C.J., H.L. Roderick, and M.D. Bootman, Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2011: p. a004242.
35. Paredes, R.M., Chemical calcium indicators. *Methods*, 2008. 46(3): p. 143-151.
36. Kerton, M., J. Wiggins, and M. Purkiss, Cardiac arrhythmias in the critically ill. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 2018.
37. Bhaumik, A., A review on cardiac arrhythmia and cardiac ablation: Invasive techniques and future perspective.
38. Ahn, M.-S., Current concepts of premature ventricular contractions. *Journal of lifestyle medicine*, 2013. 3(1): p. 26.
39. Krahn, A.D., Inappropriate sinus tachycardia: evaluation and therapy. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 1995. 6(12): p. 1124-1128.
40. Cox, J.L., The surgical treatment of atrial fibrillation. III. Development of a definitive surgical procedure. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 1991. 101(4): p. 569-583.

41. Krahn, A.D., The natural history of atrial fibrillation: incidence, risk factors, and prognosis in the Manitoba Follow-Up Study. *The American journal of medicine*, 1995. 98(5): p. 476-484.
42. Pye, M.P. and S.M. Cobbe, Mechanisms of ventricular arrhythmias in cardiac failure and hypertrophy. *Cardiovascular research*, 1992. 26(8): p. 740-750.
43. Bigger Jr, J.T., Ventricular arrhythmias in ischemic heart disease: mechanism, prevalence, significance, and management. *Progress in cardiovascular diseases*, 1977. 19(4): p. 255-300.
44. Tse, G., Mechanisms of cardiac arrhythmias. *Journal of arrhythmia*, 2016. 32(2): p. 75-81.
45. Gaztañaga, L., F.E. Marchlinski, and B.P. Betensky, Mechanisms of cardiac arrhythmias. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 2012. 65(2): p. 174-185.
46. Smith, W. and M. Hood, Arrhythmias, in *Cardiothoracic Critical Care*. 2007, Elsevier. p. 316-341.
47. Lerman, B.B., Mechanism of repetitive monomorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 1995. 92(3): p. 421-429.
48. Fauci, A.S., *Harrison's principles of internal medicine*. Vol. 2. 1998: McGraw-hill New York.
49. Baldzizhar, A., Ventricular tachycardias: characteristics and management. *Critical Care Nursing Clinics*, 2016. 28(3): p. 317-329.
50. Pflaumer, A. and A.M. Davis, Guidelines for the diagnosis and management of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart, Lung and Circulation*, 2012. 21(2): p. 96-100.
51. Liu, N., Ryanodine receptor and calsequestrin in arrhythmogenesis: what we have learnt from genetic diseases and transgenic mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2009. 46(2): p. 149-159.
52. Rosso, R., Calcium channel blockers and beta-blockers versus beta-blockers alone for preventing exercise-induced arrhythmias in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart Rhythm*, 2007. 4(9): p. 1149-1154.
53. Swan, H., Calcium channel antagonism reduces exercise-induced ventricular arrhythmias in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia patients with RyR2 mutations. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 2005. 16(2): p. 162-166.

54. van der Werf, C., et al., Flecainide therapy reduces exercise-induced ventricular arrhythmias in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of the American College of Cardiology*, 2011. 57(22): p. 2244-2254.
55. Pizzale, S., Sudden death in a young man with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia and paroxysmal atrial fibrillation. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 2008. 19(12): p. 1319-1321.
56. Schwartz, P.J., L. Crotti, and R. Insolia, Long-QT syndrome: from genetics to management. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 2012. 5(4): p. 868-877.
57. Nakano, Y. and W. Shimizu, Genetics of long-QT syndrome. *Journal of human genetics*, 2016. 61(1): p. 51.
58. Vincent, G.M., Long QT syndrome. *Cardiol Clin*, 2000. 18(2): p. 309-25.
59. Wu, J., W.-G. Ding, and M. Horie, Molecular pathogenesis of long QT syndrome type 1. *Journal of arrhythmia*, 2016. 32(5): p. 381-388.
60. Schow, E.V., Down-state model of the voltage-sensing domain of a potassium channel. *Biophysical journal*, 2010. 98(12): p. 2857-2866.
61. Swartz, K.J., Sensing voltage across lipid membranes. *Nature*, 2008. 456(7224): p. 891.
62. Tai, K.-K. and S.A. Goldstein, The conduction pore of a cardiac potassium channel. *Nature*, 1998. 391(6667): p. 605.
63. Kurokawa, J., H. Abriel, and R. Kass, Molecular Basis of the Delayed Rectifier Current IKs in Heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2001. 33(5): p. 873-882.
64. Wiener, R., The KCNQ1 (Kv7. 1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. 283(9): p. 5815-5830.
65. Moss, A.J., Clinical aspects of type-1 long-QT syndrome by location, coding type, and biophysical function of mutations involving the KCNQ1 gene. *Circulation*, 2007. 115(19): p. 2481-2489.
66. Shimizu, W., Genotype-phenotype aspects of type 2 long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009. 54(22): p. 2052-2062.
67. Thomas, D., Biophysical characterization of KCNQ1 P320 mutations linked to long QT syndrome 1. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2010. 48(1): p. 230-237.

68. Shimizu, W., Mutation site-specific differences in arrhythmic risk and sensitivity to sympathetic stimulation in the LQT1 form of congenital long QT syndrome: multicenter study in Japan. *Journal of the American College of Cardiology*, 2004. 44(1): p. 117-125.
69. Goldenberg, I., Risk for life-threatening cardiac events in patients with genotype-confirmed long-QT syndrome and normal-range corrected QT intervals. *Journal of the American College of Cardiology*, 2011. 57(1): p. 51-59.
70. Priori, S.G., Risk stratification in the long-QT syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2003. 348(19): p. 1866-1874.
71. Chen, S., KCNQ1 mutations in patients with a family history of lethal cardiac arrhythmias and sudden death. *Clinical genetics*, 2003. 63(4): p. 273-282.
72. Creighton, W., Identification of novel missense mutations of cardiac ryanodine receptor gene in exercise-induced sudden death at autopsy. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2006. 8(1): p. 62-67.
73. Wu, J., A molecular mechanism for adrenergic-induced long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 2014. 63(8): p. 819-827.
74. Moss, A.J., Increased risk of arrhythmic events in long-QT syndrome with mutations in the pore region of the human ether-a-go-go-related gene potassium channel. *Circulation*, 2002. 105(7): p. 794-799.
75. Gong, Q., Nonsense mutations in hERG cause a decrease in mutant mRNA transcripts by nonsense-mediated mRNA decay in human long-QT syndrome. *Circulation*, 2007. 116(1): p. 17-24.
76. Nakajima, T., Novel mechanism of HERG current suppression in LQT2: shift in voltage dependence of HERG inactivation. *Circulation Research*, 1998. 83(4): p. 415-422.
77. Khan, I.A., Clinical and therapeutic aspects of congenital and acquired long QT syndrome. *The American journal of medicine*, 2002. 112(1): p. 58-66.
78. Priori, S.G., Differential response to Na⁺ channel blockade, β -adrenergic stimulation, and rapid pacing in a cellular model mimicking the SCN5A and HERG defects present in the long-QT syndrome. *Circulation Research*, 1996. 78(6): p. 1009-1015.
79. Schwartz, P.J., Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na⁺ channel blockade and to increases in heart rate: implications for gene-specific therapy. *Circulation*, 1995. 92(12): p. 3381-3386.

80. Albert, C.M. and W.G. Stevenson, The future of arrhythmias and electrophysiology. *Circulation*, 2016. 133(25): p. 2687-2696.
81. Svenson, R.H. and W. King, Process of identification of a ventricular tachycardia (VT) active site and an ablation catheter system. 1992, Google Patents.
82. Kennedy, H.L., Beta-blocker therapy in the cardiac arrhythmia suppression trial. *American Journal of Cardiology*, 1994. 74(7): p. 674-680.
83. Tester, D.J. and M.J. Ackerman, Genetics of long QT syndrome. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*, 2014. 10(1): p. 29.
84. Mirowski, M., Termination of malignant ventricular arrhythmias with an implanted automatic defibrillator in human beings. *N Engl j Med*, 1980. 303(6): p. 322-4.
85. Boersma, L., Implant and midterm outcomes of the subcutaneous implantable cardioverter-defibrillator registry: the effortless study. *Journal of the American College of Cardiology*, 2017. 70(7): p. 830-841.
86. Wang, Q., SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*, 1995. 80(5): p. 805-811.
87. Li, C., Surgical left cardiac sympathetic denervation for long QT syndrome: effects on QT interval and heart rate. *Heart and vessels*, 2005. 20(4): p. 137-141.
88. Schwartz, P.J., Left cardiac sympathetic denervation in the management of high-risk patients affected by the long-QT syndrome. *Circulation*, 2004. 109(15): p. 1826-1833.
89. Petters, R.M. and J.R. Sommer, Transgenic animals as models for human disease. *Transgenic research*, 2000. 9(4-5): p. 347-351.
90. Schwartz, P.J., M. Periti, and A. Malliani, The long QT syndrome. *American heart journal*, 1975. 89(3): p. 378-390.
91. London, B., QT interval prolongation and arrhythmias in heterozygous Merg1-targeted mice. in *Circulation*. 1998. Lippincott Williams & Wilkins 227 East Washington Sq, Philadelphia, Pa 19106 USA.
92. Schwartz, P., Long QT syndrome: genotype-phenotype correlations. Zipes, Jalife: *Cardiac Electrophysiology From Cell to Bedside*, 2004: p. 651-659.

93. Nuyens, D., Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nature medicine*, 2001. 7(9): p. 1021.
94. Fabritz, L., Autonomic modulation and antiarrhythmic therapy in a model of long QT syndrome type 3. *Cardiovascular research*, 2010. 87(1): p. 60-72.
95. Ellinor, P.T., Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 2008. 5(1): p. 99-105.
96. Plaster, N.M., Mutations in Kir2. 1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell*, 2001. 105(4): p. 511-519.
97. Zaritsky, J.J., The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K⁺ current (IK1) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2. 1 and Kir2. 2 genes. *The Journal of physiology*, 2001. 533(3): p. 697-710.
98. Splawski, I., Ca^v 1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*, 2004. 119(1): p. 19-31.
99. Wickenden, A.D., Targeted expression of a dominant-negative Kv4. 2 K⁺ channel subunit in the mouse heart. *Circulation research*, 1999. 85(11): p. 1067-1076.
100. van den Bos, E., W. Van Der Giessen, and D. Duncker, Cell transplantation for cardiac regeneration: where do we stand? *Netherlands Heart Journal*, 2008. 16(3): p. 88-95.
101. Horackova, M., Cell transplantation for treatment of acute myocardial infarction: unique capacity for repair by skeletal muscle satellite cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2004. 287(4): p. H1599-H1608.
102. Jain, M., Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation*, 2001. 103(14): p. 1920-1927.
103. Thompson, R.B., Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation*, 2003. 108(10 suppl 1): p. II-264-II-271.
104. Ghostine, S., Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation*, 2002. 106(12 suppl 1): p. I-131-I-136.
105. Copelan, E.A., Hematopoietic stem-cell transplantation. *New England Journal of Medicine*, 2006. 354(17): p. 1813-1826.

106. Tang, Y.L., Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *The Annals of thoracic surgery*, 2005. 80(1): p. 229-237.
107. Nygren, J.M., Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature medicine*, 2004. 10(5): p. 494.
108. Balsam, L.B., Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 2004. 428(6983): p. 668.
109. Zhang, C., Efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow-derived cell transplantation in patients with acute myocardial infarction: insights from randomized controlled trials with 12 or more months follow-up. *Clinical cardiology*, 2010. 33(6): p. 353-360.
110. Kumar, S. and S. Gupta, Thymosin beta 4 prevents oxidative stress by targeting antioxidant and anti-apoptotic genes in cardiac fibroblasts. *PloS one*, 2011. 6(10): p. e26912.
111. Riley, P.R. and N. Smart, Thymosin β 4 induces epicardium-derived neovascularization in the adult heart. 2009, Portland Press Limited.
112. Tanaka, M., The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2. 5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development*, 1999. 126(6): p. 1269-1280.
113. Matsuura, K., Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *The Journal of clinical investigation*, 2009. 119(8): p. 2204-2217.
114. Wang, W.E., Potential of cardiac stem/progenitor cells and induced pluripotent stem cells for cardiac repair in ischaemic heart disease. *Clinical science*, 2013. 125(7): p. 319-327.
115. Li, Y., Transplantation of multipotent *Isl1*⁺ cardiac progenitor cells preserves infarcted heart function in mice. *American journal of translational research*, 2017. 9(3): p. 1530.
116. Hou, D., Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*, 2005. 112(9 suppl): p. I-150-I-156.
117. Reinecke, H., Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation*, 1999. 100(2): p. 193-202.

118. Watanabe, E., Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplantation*, 1998. 7(3): p. 239-246.
119. Kolossov, E., Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *Journal of Experimental Medicine*, 2006. 203(10): p. 2315-2327.
120. van Laake, L.W., Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem cell research*, 2007. 1(1): p. 9-24.
121. Laflamme, M.A., Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature biotechnology*, 2007. 25(9): p. 1015.
122. Krishna, K.A., Myocardial infarction and stem cells. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2011. 3(2): p. 182.
123. Lee, R.H., Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*, 2009. 5(1): p. 54-63.
124. Kania, G., Heart-Infiltrating Prominin-1+/CD133+ Progenitor cells represent the cellular source of transforming growth factor β -mediated cardiac fibrosis in experimental autoimmune myocarditis. *Circulation research*, 2009. 105(5): p. 462-470.
125. Wang, W., Localized SDF-1 α gene release mediated by collagen substrate induces CD117+ stem cells homing. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2010. 14(1-2): p. 392-402.
126. Shimizu, T., Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets. *Tissue engineering*, 2006. 12(3): p. 499-507.
127. Leor, J., Y. Amsalem, and S. Cohen, Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacology & therapeutics*, 2005. 105(2): p. 151-163.
128. Zhao, Y.-S., Construction of a unidirectionally beating 3-dimensional cardiac muscle construct. *The Journal of heart and lung transplantation*, 2005. 24(8): p. 1091-1097.
129. Zimmermann, W.-H., Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nature medicine*, 2006. 12(4): p. 452.

130. Singh, T.S.S., F. Elahi, and B. Cheney, Ketamine-induced QTc interval prolongation. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 2017. 33(1): p. 136.
131. Surawicz, B. and S.R. Parikh, Prevalence of male and female patterns of early ventricular repolarization in the normal ECG of males and females from childhood to old age. *Journal of the American College of Cardiology*, 2002. 40(10): p. 1870-1876.
132. Moss, A.J., The long QT syndrome. Prospective longitudinal study of 328 families. *circulation*, 1991. 84(3): p. 1136-1144.
133. Yu, H., Stem cell therapy for ischemic heart diseases. *British medical bulletin*, 2017. 121(1): p. 135-154.
134. Wei, H., Cell delivery and tracking in post-myocardial infarction cardiac stem cell therapy: an introduction for clinical researchers. *Heart failure reviews*, 2010. 15(1): p. 1.
135. van Mil, A., Modelling inherited cardiac disease using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: progress, pitfalls and potential. *Cardiovascular research*, 2018.
136. Biehl, J.K. and B. Russell, Introduction to stem cell therapy. *The Journal of cardiovascular nursing*, 2009. 24(2): p. 98.
137. Weber, E.M., Pup mortality in laboratory mice—infanticide or not? *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2013. 55(1): p. 83.
138. Speerschneider, T. and M.B. Thomsen, Physiology and analysis of the electrocardiographic T wave in mice. *Acta Physiologica*, 2013. 209(4): p. 262-271.
139. Rajala, K., M. Pekkanen-Mattila, and K. Aalto-Setälä, Cardiac differentiation of pluripotent stem cells. *Stem cells international*, 2011. 2011.
140. Mummery, C., Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Journal of anatomy*, 2002. 200(3): p. 233-242.
141. Xun-wu, Z., Preparation of Mouse Embryonic Stem Cells and Cardiomyocyte Differentiation Induced with Retinoic Acid and Ascorbic Acid. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 2015. 22(3): p. 62-66.
142. Hartman, M.E., An optimized and simplified system of mouse embryonic stem cell cardiac differentiation for the assessment of differentiation modifiers. *PLoS One*, 2014. 9(3): p. e93033.

143. Payne, T.R., A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. *Journal of the American College of Cardiology*, 2007. 50(17): p. 1677-1684.
144. Pfannkuche, K., Fibroblasts facilitate the engraftment of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes on three-dimensional collagen matrices and aggregation in hanging drops. *Stem cells and development*, 2010. 19(10): p. 1589-1599.
145. Pereira-Junior, P.P., Noninvasive method for electrocardiogram recording in conscious rats: feasibility for heart rate variability analysis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2010. 82(2): p. 431-437.



9 ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.10185
Konu : Etik Kurulu Kararı

28/03/2018

Sayın Gizem ÖRS

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Pluripotent Kök Hücre Temelli Kardiyomiyositlerin Ritim Bozukluğu Tedavisine Yönelik İn Vivo İncelenmesi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 28.03.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 1E3704C0XB kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kavacak Mah. Ekinçiler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

| Toplantı Tarihi | Karar No | İlgi | Proje Yürütücüsü |
|-----------------|----------|------|------------------|
| 26/03/2018 | 22 | | Gizem ÖRS |

“Pluripotent Kök Hücre Temelli Kardiyomyositlerin Ritim Bozukluğu Tedavisine Yönelik İn Vivo İncelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 01.04.2018- 2 yıl

| GÖREVİ | ADI SOYADI | İMZA |
|--------|-----------------------------------|------|
| Başkan | Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK | |
| Üye | Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK | |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN | |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM | |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY | |
| Üye | Öğr. Gör. Dr. Taha KELEŞTEMUR | |
| Üye | Uzm. Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR | |
| Üye | Özge Şeyda DURGUT | |
| Üye | Fahriye ŞENBAHÇE | |

10 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

| | | | |
|-------------------|-------------------|---------------------|-------------|
| Adı | Gizem | Soyadı | Örs |
| Doğum Yeri | Osmaniye | Doğum Tarihi | 13/08/1992 |
| Uyruğu | TC | TC Kimlik No | 46879969918 |
| E-mail | g.ors@hotmail.com | Tel | 05425631911 |

Eğitim Düzeyi

| | Mezun Olduğu Kurumun Adı | Mezuniyet Yılı |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Doktora/Uzmanlık | | |
| Yüksek Lisans | | |
| Lisans | Yıldız Teknik Üniversitesi | 2016 |
| Lise | Ahmet Vefik Paşa Anadolu Lisesi | 2010 |

İş Deneyimi

| Görevi | Kurum | Süre |
|---------------|--|-------------|
| Bursiyer | İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜBİTAK Proje No: 213S192 | 6 ay |
| Bursiyer | Sakarya Üniversitesi, TÜBİTAK Proje No: 214S672 | 8 ay |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* |
|------------------------|--------------------------|-----------------|---------------|
| İngilizce | Çok iyi | İyi | İyi |
| Almanca | Orta | Orta | Orta |

Yabancı Dil Sınav Notu

| | |
|------------|----|
| YDS | 74 |
|------------|----|

| | |
|-------------|----|
| ALES | 72 |
|-------------|----|

Bilgisayar Bilgisi

| Program | Kullanma Becerisi |
|----------------|--------------------------|
| Windows Office | İyi |
| Illustrator | Orta |
| Image J | Orta |

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikalari/Ödülleri

Sözlü Sunum

1. Gökteş Şahoğlu S., **Örs G.**, Torun T., Durdu Z. B., Akgül Çağlar T., Kazcı Y. E., Söztekin G. İ., Yıldırım Koç A., Tuzcu V., Çağavi E. (Mayıs 2018). CRISPR/Cas9 ile Genetiği Düzeltilmiş Uzun QT Sendromu UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerin Elektrofizyolojik İncelemesi. *7. Kök Hücre Sempozyumu*, İstanbul, Türkiye.
2. Koç A., **Örs G.**, Söztekin G. İ., Tuzcu V., Çağavi E. (Mayıs 2018). İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerin Yeniden Ekim Koşullarının Tanımlanması. *7. Kök Hücre Sempozyumu*, İstanbul, Türkiye.

Poster Sunumları

1. **Örs G.**, Görgülü Söztekin G. İ., Turhan M. U., Akgül Çağlar T., Durdu Z. B., Çağavi E. (2018). Pluripotent Kök Hücre Temelli Kardiyomiyositlerin Ritim Bozukluğu Tedavisine Yönelik İn Vivo İncelenmesi. *1. Yüksek Lisans-Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
2. Söztekin G. İ., **Örs G.**, Tuzcu V., Çağavi E. (2018) Uzun QT Sendromlu Transgenik ve Vahşi Tip Farelerden Pluripotent Kök Hücre Üretilmesi ve Kardiyomiyosite Farklılaştırılarak Hastalık Fenotipinin İncelenmesi. *1. Yüksek Lisans- Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
3. Şahoğlu Gökteş S., **Örs G.**, Torun T., Durdu Z. B., Görgülü G. İ., Akgül Çağlar T., Kazcı Y. E., Tuzcu V., Çağavi E. (2018). İnsan Uzun QT Sendromu Kökenli Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerde İlgili Mutasyonun CRISPR/Cas9 ile Düzeltilecek Hastalık Fenotipinin İncelenmesi. *1. Yüksek Lisans- Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
4. **Örs G.**, Görgülü Söztekin G. İ., Turhan M. U., Akgül Çağlar T., Durdu Z. B., Çağavi E. (2018). Pluripotent Kök Hücre Temelli Kardiyomiyositlerin Ritim Bozukluğu Tedavisine Yönelik İn Vivo İncelenmesi. *7. Kök Hücre Sempozyumu*, Marmara Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
5. Koc A, **Örs G.**, Söztekin Görgülü G. İ., Tuzcu V., Çağavi E. (2018). İnsan uyarılmış pluripotent kök hücre kökenli kardiyak hücrelerin yeniden ekim koşulların tanımlanması, *7. Kök Hücre Sempozyumu*, Marmara Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
6. Söztekin G. İ., **Örs G.**, Çağavi E. (2017). Uzun QT Sendromlu Transgenik Farelerden Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Eldesi ve Kardiyomiyosite Farklılaştırılması. *15. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Fethiye, İstanbul, Türkiye.
7. Söztekin Görgülü G. İ., **Örs G.**, Çağavi E. (2017). Uzun QT Sendromlu Transgenik Farelerden Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Üretilmesi. *5.*

Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

8. Göктаş Şahoğlu, S., **Örs G.**, Torun T., Durdu B. Z., Görgülü G. İ., Kazci Y. E., Deniz E., Erman B., Tuzcu V., Çağavi E. (2017). Uzun QT sendromlu Hasta Kökenli Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerde CRISPR/Cas9 ile KCNQ1 Mutasyonun Düzeltilmesi. 5. *Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.*

