

MURAT CENK ÇELEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2016-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**HİPERTROFİK KALP YETMEZLİĞİNDEKİ
ELEKTRİKSEL MODELLEMENİN R_{ho} /ROCK YOLAĞI
İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

MURAT CENK ÇELEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2016-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

HİPERTROFİK KALP YETMEZLİĞİNDEKİ
ELEKTRİKSEL MODELLEMENİN R_{ho} /ROCK YOLAĞI
İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

MURAT CENK ÇELEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. SEMİR ÖZDEMİR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2014-51 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2016-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma jürimiz tarafından Biyofizik Anabilim Dalı Biyofizik Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 28/06/2016.

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR

Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ

Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Nazmi YARAŐ

Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukandaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.



MURAT CENK ÇELEN



PROF. DR. SEMİR ÖZDEMİR

TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın yapılması için gerekli tım olanakları sağlayan, yüksek lisans eğitimim süresince ilgisini ve desteğini esirgemeyen;

Değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR'e

Kaliteli bir yüksek lisans eğitimi için olanak sağlayan Akdeniz Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı ğretim yelerine;

Eğitimimi Antalya'da tamamlamam yönünde kanaat kullanarak baőladıėım projeleri bitirme imkânını bana veren Sayın Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ ve Meram Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı ğretim Elemanlarına;

Çalışmanın yürütülmesinde ve cerrahi giriőimlerin yapılmasında büyük emeği olan Sayın Erol NİZAMOğLU'na

Çalıőmalarımda maddi ve manevi katkıları olan ve her zaman desteğini grdğim değerli çalışma arkadaşlarım Bilge Eren YAMASAN, Yusuf OLėAR ve Nihal ÖZTÜRK ERBOğA'ya

Bu günlere gelmemin yegâne sebebi olan ailem; babam Mevlt, annem Emine ve abim Cem ÇELEN'e, yoğun çalışma temposu nedeniyle ona zorluklar çıkarmama rağmen her zaman anlayıőı ve katkısı ile bana yardımcı olan sevgili eőim Esra ÇELEN'e ve tezimin son aşamasında hayatımıza katılan biricik kızım İpek ÇELEN'e gönülden bir teőekkürü borç bilirim.

Teknik olanakları ile bu çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleőmesini sağlayan Deney Hayvanları nitesi çalıőanlarına, Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline ve BAP yetkililerine çok teőekkürü ederim.

ÖZET

Amaç: RhoA/ROCK sinyal yolağının miyokardiyal enfraktüs, kalp yetmezliği ve kardiyak hipertrofi gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda çalışmamızda basınç yüklemesine bağlı kardiyak hipertrofi modelinde ROCK inhibisyonunun potasyum (K^+) akımları ve aksiyon potansiyeli (AP) üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Yöntem: Sıçan kalplerinde basınç yüklemesi modeli transvers aort konstriksiyonu (TAK) ile sağlanmıştır. SHAM grubu bağlama işlemi yapılmadan ameliyat edilmiştir. SHAM, TAK ve 10 hafta boyunca fasudil (5mg/kg) uygulanan TAK (T+F) gruplarından elektrofizyolojik ve protein ekspresyon analizi yöntemleri ile veri alınmıştır. İçeri doğrultucu K^+ akımı (I_{K1}) kaydı için -70 mV düzeyinde kenetlenmiş hücrelere -120 mV ile 10mV arasında, geçici dışarı doğru K^+ akımı (I_{to}) için ise -50mV ile 70mV arasında 10 mV'luk adımlarla artan voltaj pulsları uygulanmıştır.

Bulgular: TAK grubunun 1 Hz frekansında kaydedilen AP sürelerinde anlamlı uzama görülürken, bu uzamanın T+F grubunda düzeldiği gözlemlenmiştir. Her iki K^+ akımının yoğunluğu da anlamlı şekilde azalmış, fakat fasudil bu seviyeleri kontrole çekmiştir. Protein analizlerine göre Kv4.2 ekspresyonu, TAK grubunda yükselmesine rağmen T+F grubunda düzelmemiştir. RhoA ekspresyonu TAK grubunda artarken, ROCK1&2 ve Kir2.1 anlamlı şekilde azalmış, 10 haftalık fasudil uygulamasının ardından bu proteinlerin seviyelerinde önemli bir düzelme gözlenmiştir.

Sonuç: Özetle, fasudil uzamış AP süresini kısaltıp, I_{K1} ve I_{to} gibi potasyum akımlarını ve RhoA/ROCK yolağı elemanlarının protein ekspresyonunu da düzeltmiştir. Sonuç olarak, RhoA/ROCK yolağı kalbin elektriksel yeniden modellenmesinde rol sahibi olabilir ve bu yolağın inhibisyonun gelecekte terapötik amaçlar için kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Rho, ROCK, fasudil, K^+ akımları, aksiyon potansiyeli

ABSTRACT

Objective: Various cardiovascular diseases like myocardial infarction, heart failure and cardiac hypertrophy are associated with the RhoA/Rho kinase (ROCK) signaling pathway. In this respect, we examined the effect of ROCK inhibition on potassium K^+ currents and AP in pressure overload (PO) cardiac hypertrophy model.

Method: PO model is created by aortic constriction (TAC) of rat's heart. SHAM animals underwent surgery without banding. All data taken from three groups SHAM, TAC and 10 weeks fasudil (5mg/kg) administered TAC (T+F) group using electrophysiological and protein expression analysis techniques. Data were recorded by applying voltage steps from holding potential of -70 mV in 10 mV increments, between -120 to 10 mV for inward rectifier K^+ currents (I_{K1}) and -50 to 70 mV for transient outward K^+ currents (I_{to}).

Results: There was significant prolongation Aps of TAC myocytes recorded at 1 Hz which was restored in T+F group. Density of both potassium currents decreased significantly with cardiac hypertrophy but fasudil reversed currents to control level. According to protein analysis, Kv4.2 expression was higher in TAC group and it didn't reverse in T+F group. Despite RhoA expression increased significantly, ROCK1&2 and Kir2.1 decreased in TAC group. Fasudil treatment restored the expression level of these proteins after 10 weeks decreased after 10 weeks.

Conclusion: In summary, fasudil improves not only I_{K1} and I_{to} currents but also protein expressions of RhoA/ROCK pathway elements and shortens AP duration. As a result, RhoA/ROCK pathway may play role in electrical remodeling of heart and thus inhibition of this pathway may be used as potential therapeutic purposes.

Key words: Rho, ROCK, fasudil, K^+ currents, action potential

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar	iv
ŞEKİLLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalp Kasının Yapısı	3
2.2. Kalpteki Elektrofizyolojik Olaylar	3
2.2.1. Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi	3
2.2.2 Ventriküler Aksiyon Potansiyeli	5
2.2.3. Potasyum Kanalları	7
2.3. Kardiyak Hipertrofi	9
2.3.1. Hipertrofinin Tanımı ve Sınıflandırması	9
2.3.2. Hipertrofinin Epidemiyolojisi	10
2.3.3. Deneysel Hipertrofi Modelleri	11
2.3.4. TAK Kaynaklı Hipertrofide Gerçekleşen Değişimler	11
2.4. G-Proteinleri ve Genel Özellikleri	13
2.5. RhoA/ROCK Yolağı ve Kardiyovasküler Hastalıklar	17
2.6. RhoA/ROCK Yolağı ve Fasudil	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Deney Gruplarının oluşturulması	20
3.2. Transvers Aort Konstriksiyonu	21
3.3. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu	21
3.4. Aksiyon Potansiyelinin Kaydedilmesi	23

3.5. Potasyum Akımlarının Kaydedilmesi	24
3.6. Western Blot Yöntemi	24
3.7. Kullanılan Kimyasallar	26
3.8. İstatistik Analiz	26
4. BULGULAR	27
4.1. Kardiyak Hipertrofinin Gösterge Parametreleri	27
4.2. Hipertrofik Kalplerde Fasudil Uygulamasının Aksiyon Potansiyeline Etkisi	28
4.3. Hipertrofik Kalplerde Fasudil Uygulamasının Potasyum Akımlarına Etkisi	29
4.4. Protein Ekspresyonlarının Fasudil Uygulaması ile Değişimi	32
4.5. Karşılaştırmalı Deney Sonuçları	34
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	57

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
1. AP sürelerinin analiz sonuçları	29
2. Toplu deney sonuçlarının karşılaştırması	36



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Kardiyomiyositlerde hücre içi Ca^{2+} düzenlenmesi	4
2.2. Aksiyon Potansiyeli Bileşenleri ve Fazları	6
2.3. Kardiyak hipertrofinin fizyolojik ve patofizyolojik gelişimi	10
2.4. G Protein Kenetli Reseptör (GPCR)	14
2.5. G Proteinler ve alt birimleri ile etki mekanizması	16
3.1. Tedavi grubuna uygulanan Fasudil gösterimi	20
3.2. TAK operasyonunda bağlama yapılan noktanın gösterimi	21
3.3. Sıçan kalbi izolasyonunun temel basamakları	22
3.4. Sol ventrikül hücrelerden kaydedilen bir aksiyon potansiyeli eğrisi üzerinde ölçülen parametreler	23
4.1. Kardiyak hipertrofinin gösterge parametreleri	27
4.2. Fasudil uygulamasının aksiyon potansiyeline etkisi	28
4.3. Gruplara ait örnek I_{to} örnekleri ve I-V değişim eğrileri	30
4.4. Gruplara ait örnek I_{K1} örnekleri ve I-V değişim eğrileri	31
4.5. Western Blot yöntemi ile protein ekspresyonu analizi	33
4.6. Birbiri ile ilişkili deney sonuçlarının karşılaştırması	35

SİMGELER ve KISALTMALAR

HKM	: Hipertrofik kardiyo miyopati
SVH	: Sol ventrikül hipertrofisi
PKA	: Protein kinaz A
PKG	: Protein kinaz G
PKC	: Protein kinaz C
ROCK	: Rho-kinaz
WB	: Western Blot
TAK	: Transvers aort konstriksiyonu
AP	: Aksiyon potansiyeli
GTP	: Guanozin tri fosfat
GPCR	: G protein kenetli reseptör
cGMP	: Siklik guanine mono fosfat
cAMP	: Siklik adenozin mono fosfat
SA	: Sinoatriyal düğüm
LTCC	: L-tipi kalsiyum kanalları
SR	: Sarkoplazmik retikulum
RyR	: Riyanodin reseptörü
SERCA	: Sarko endoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz
NCX	: Na^+/Ca^{2+} değiş tokuşcusu
PMCA	: Sarkolemmal Ca^{2+} ATPaz

Ca²⁺	: Kalsiyum
Na⁺	: Sodyum
K⁺	: Potasyum
Cl⁻	: Klor
I_{to}	: Geçici dışarı doğru potasyum akımı
I_{K1}	: İçeri doğrultucu potasyum akımı
I_{ss}	: Kararlı durumdaki potasyum akımları
G_K	: Potasyum geçirgenliği
PAK	: p21-aktif kinaz
BSA	: Bovin serum albümin
TTBS	: Tris-Buffered Saline and Tween
ECL	: Enhanced Chemiluminescence

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre, 2012 yılında gerçekleşen 56 milyon ölümün 38 milyon ile %68'lik bölümü bulaşıcı olmayan hastalıklardan kaynaklanmıştır. Ölüm oranları içerisinde, başı çeken dört bulaşıcı olmayan hastalık çeşidi; kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet ve kronik akciğer hastalıklarıdır(WHO, 2012). Yine aynı raporun verilerine göre bu dört hastalığın içinde 17,5 milyon ölüm ile kanserin dahi önünde bulunan kardiyovasküler hastalıklar, hem insanlığın hem de bilim dünyasının en önemli gündem maddelerinin başında gelmektedir.

Kardiyovasküler hastalıkların içerisinde ise hipertrofik kardiyomiyopati (HKM) özellikle genç ölümlerinde ciddi bir orana sahiptir. Maron BJ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1435 genç atletin ölümü incelenmiş ve bu ölümlerin %44'ünün HKM ve sol ventrikül hipertrofisi (SVH) ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Maron ve ark., 2007). Son yıllarda bu ölümlere neden olan mekanizmaların çözülmesine yönelik kapsamlı çalışmalar artmış ve varılan sonuçlar ışığında Rho-kinaz'ın (ROCK) bu tip patolojilerin tedavisinde hedef protein olabileceği belirtilmiştir (Hahmann and Schroeter, 2010).

Serin/theronin kinazların AGC (PKA/PKG/PKC) ailesinden küçük G proteini Rho'nun alt efektörü olan ROCK, ROK α / ROCK 2 ve ROK β / ROCK 1 olmak üzere iki izoforma sahiptir. Bu iki izoform %92 oranında birbiri ile benzerlik göstermektedir (Amano ve ark., 1996; Matsui ve ark., 1996). ROCK 1 ve ROCK 2 izoformları insan ve sıçanlarda çeşitli dokularda yaygın şekilde bulunmaktadır (Nakagawa ve ark., 1996). Hücre düzeyinde yapılan araştırmalar Rho/ROCK ailesinin birçok hücreysel aktivitede doğrudan ya da dolaylı olarak görevli olduğunu göstermektedir (Amano ve ark., 2010; Dong ve ark., 2010; Nunes ve ark., 2010; Shi and Wei, 2007).

Kardiyak hipertrofi modeli kullanılarak oluşturulan deneylerde seçici ROCK inhibitörleri Y27632 ve fasudil sıklıkla kullanılmaktadır. Bu inhibitörlerin çalışma prensibi olarak ROCK 1 ve ROCK 2'nin ATP-bağımlı kinaz domainini hedef aldığı belirtilmiştir(Matsui ve ark., 1996). Yine çalışma modelleri oluşturulurken HKM oluşumuna dair farklı uygulamalar mevcuttur. Bunlardan yaygın olarak kullanılanı, bir

cerrahi girişime ihtiyaç duyan transvers aort daraltmadır (TAK). Bu operasyon ile daraltılan aort, kalbin sol ventrikülünde art yük artışına neden olarak kalpte hipertrofi oluşumunu tetikler. Operasyonun ardından uzun dönem deney sonuçları bu büyümenin patolojik bir hipertrofi ile sonuçlandığını söylemektedir (Songstad ve ark., 2014; Zhou ve ark., 2015).

Kalp fizyolojisinin belirleyici unsurları iyonik ve elektriksel temellerdir. Bu temel unsurlarda meydana gelen herhangi bir değişim domino taşı etkisi ile bütün kalbi hatta bütün vücudu etkilemektedir. Kardiyovasküler hastalık modellerinde elektriksel aktivite değişimlerinin incelenmesi hastalıkların kökeninin aydınlatılmasına yardımcı olmaktadır. Oluşturulan hipertrofi modellerinde iyonik ve elektriksel değişimler incelenmiş ve Rho/ROCK yolağı ilişkilendirilebileceği söylenmiştir (Brown ve ark., 2006; Hoshijima ve ark., 1998; Kuwahara ve ark., 1999; Wei, 2004). Ancak HKM durumunda oluşan akım değişimlerinin ROCK inhibitörü kullanılarak yapılmış çalışmalarla aydınlatılması ve Rho/ROCK yolağı ile bu akım değişimlerinin ilişkisinin açıklanması ve terapötik bir hedef olup olmadığının belirlenmesi beklenmektedir. Bu bağlamda aksiyon potansiyeli (AP) ve potasyum kanal akımlarının hastalık durumundaki değişimleri ve bu değişimlere neden olduğu düşünülen kanal proteinlerinin ekspresyonlarının incelenmesi büyük önem arz etmektedir. Bu bilgiler ışığında planlanan çalışmamızda; basınç yüklemesine dayalı hipertrofi modelinde ortaya çıkan aksiyon potansiyeli değişikliklerinin kapsamlı bir şekilde ortaya konulması ve RhoA/ROCK yolağının inhibisyonunun bu anormallikleri düzeltici etkisinin olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir.

Kardiyovasküler hastalıkların hayvan modellemesinde sıklıkla çalışılan RhoA/ROCK yolağının bir takım hastalıklar için tedavi geliştirilmesine yardım edeceği beklenmektedir. Bu yolağın çalışılması sırasında, yolak etkisini net şekilde ortaya koyabilmek için sıklıkla kullanılan madde olan fasudil bu alanın önde gelen bilim insanları tarafından rutin bir deney modeli uygulaması haline gelmiştir. Yapılan tüm bu detaylı çalışmalara rağmen RhoA/ROCK yolağının olası etkileri ve Fasudilin bu duruma katkısı gelecekte birçok çalışmaya konu olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp Kasının Yapısı

Kalp insan vücudunda dış kısmında toraks, iç kısmında fibröz bir yapı olan perikardiyum ile çevrili, kas yapısı sayesinde organlara kan pompalamak suretiyle onları besleyen hayati bir organdır. Pompalama için gerekli kasılma gücü kalp boyunca belli bir nizam ile yayılan biyoelektriksel bir dalga tarafından tetiklenir. Kalbin diğer kesimlerinden farklı özelleşmiş hücreleri ile bu elektriksel aktivitenin sorumlusu olan yapıya sinoatriyal düğüm (SA) denir ve bu düğüm kalbin biyoelektrik aktivitesinin başlangıç noktasıdır. Normal çalışan bir kalpte SA'nın başlattığı bir uyarı atriyumlardan atriyoventriküler düğüme gelir. Burada oluşan gecikme sayesinde ventriküllere kan dolması için gerekli olan süre temin edilmiş olur. Bu noktadan sonra ise biyoelektrik uyarı ventrikülleri sarmalayan purkinje liflerine ulaşır ve burada saniyede metrelerce hıza ulaşarak tüm bölgelerin eş zamanlı olarak uyarılmasını ve kalbin atımını sağlar.

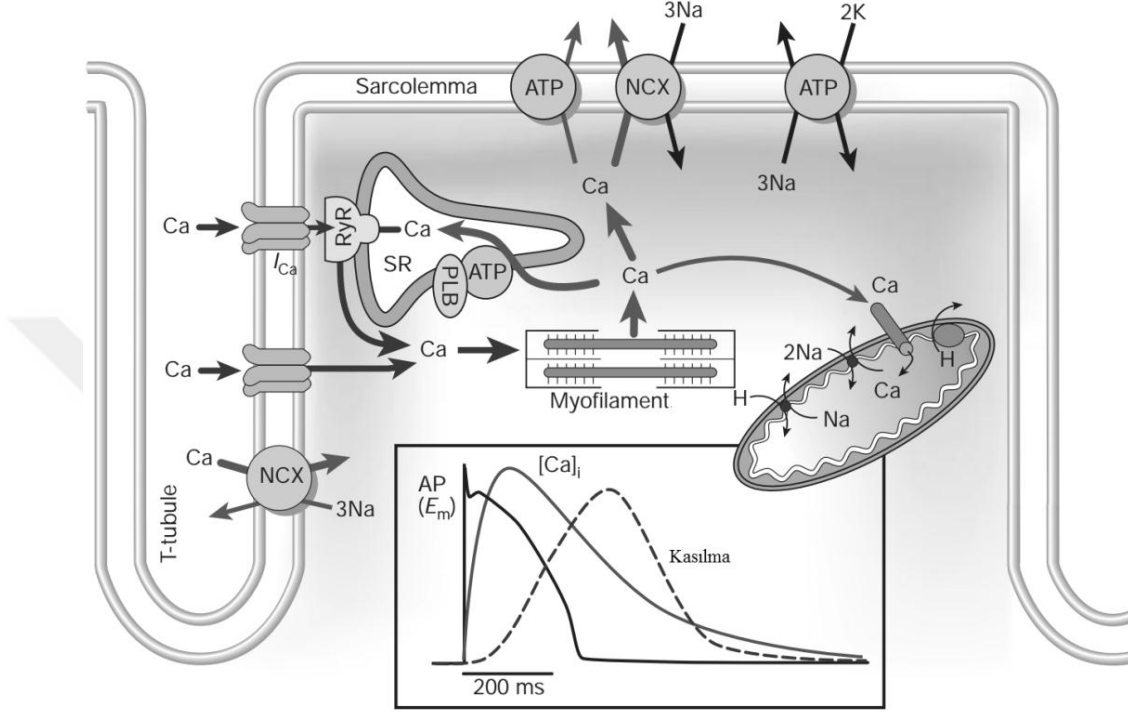
Morfolojik yapısı ortalama bir insan için 12 cm uzunluğunda ve 9 cm genişliğinde olan kalbin temel yapıtaşları olan kalp kasları “miyokardiyum” olarak tanımlanmıştır. Bu hücreler sıkıca bağlanmış tabakalar halinde kanın bulunduğu odacıkları sarmıştır. İnterkale diskler denen özel yapılar sayesinde birbiri ile iletişimi güçlenen hücreler, yine bu diskler içerisinde bulunan desmozomlar sayesinde uç uca sıkıca eklenmiş vaziyettedir. Tüm bu özel durumlara sahip olan kalp iki atrium ve iki ventrikülden oluşan, oksijence zengin kanı vücudun tüm uzuvlarına gönderebilecek güce sahiptir. Ortalama bir insan kalbi bir günde 100 000 kere atmaktadır. Bu atımlar ile günde yaklaşık 16 ton kan pompalamaktadır(Hall, 2012).

2.2. Kalpteki Elektrofizyolojik Olaylar

2.2.1. Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

Kalbin en temel görevini yerine getirmesini sağlayan olaylar dizinine uyarılma-kasılma çiftlenimi denir. Hücre zarı depolarizasyonundan kalbin kasılmasına kadar süren olaylar zincirini kapsamakta alan bu süreç kardiyomiyositler arasında bulunan gedik-kavşaklar (gap junctions) sayesinde senkronize şekilde gerçekleşmektedir. Kasılma olayı SA'dan çıkan elektriksel uyarının depolarizasyon dalgası oluşturması ile tetiklenir. Geçici

depolarizasyon durumu olarak nitelenebilen AP tüm hücreler boyunca yayılarak ventriküllerdeki kanın pompalanmasını sağlayan kasılma olayına sebep olur.



Şekil 2.1. Kardiyomiyositlerde hücre içi Ca^{2+} düzenlenmesi (Bers, 2002) Ca^{2+} indüklü Ca^{2+} salınımı ile kasılma süresince çalışan mekanizmalar şekilde gösterilmiştir. Alt kısımda gösterilen grafikte ise hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu ile kasılma ve AP eş zamanlı gösterilmiştir.

Kardiyak AP'nin oluşumu bir takım iyon kanallarının aktivasyonu ve inaktivasyonu ile gerçekleşir. Depolarizasyon sırasında aktive olan L-tipi Ca^{2+} kanalları (LTCC) hücre içinde Ca^{2+} artışına neden olur. Bu artış sarkoplazmik retikulum (SR) üzerinde bulunan ve Ca^{2+} 'un hücre içine bol miktarda salınmasını sağlayan ryanodin reseptörlerini (RyR) uyarır. Bu olay Ca^{2+} indüklü Ca^{2+} salınımı olarak adlandırılmaktadır (Fabiato and Fabiato, 1979). İntrasellüler ortama çıkan Ca^{2+} iyonları troponin C'ye bağlanarak hücrenin kasılmasını sağlar. Gevşeme için ortamdaki Ca^{2+} 'un uzaklaşması gerekmektedir ve bu dört şekilde gerçekleşir; sarko-endoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz (SERCA), Na^+/Ca^{2+} değiş-tokuşucusu (NCX), sarkolemmal Ca^{2+} ATPaz (PMCA) ve mitokondriyal Ca^{2+} uniporter (Bers, 2002).

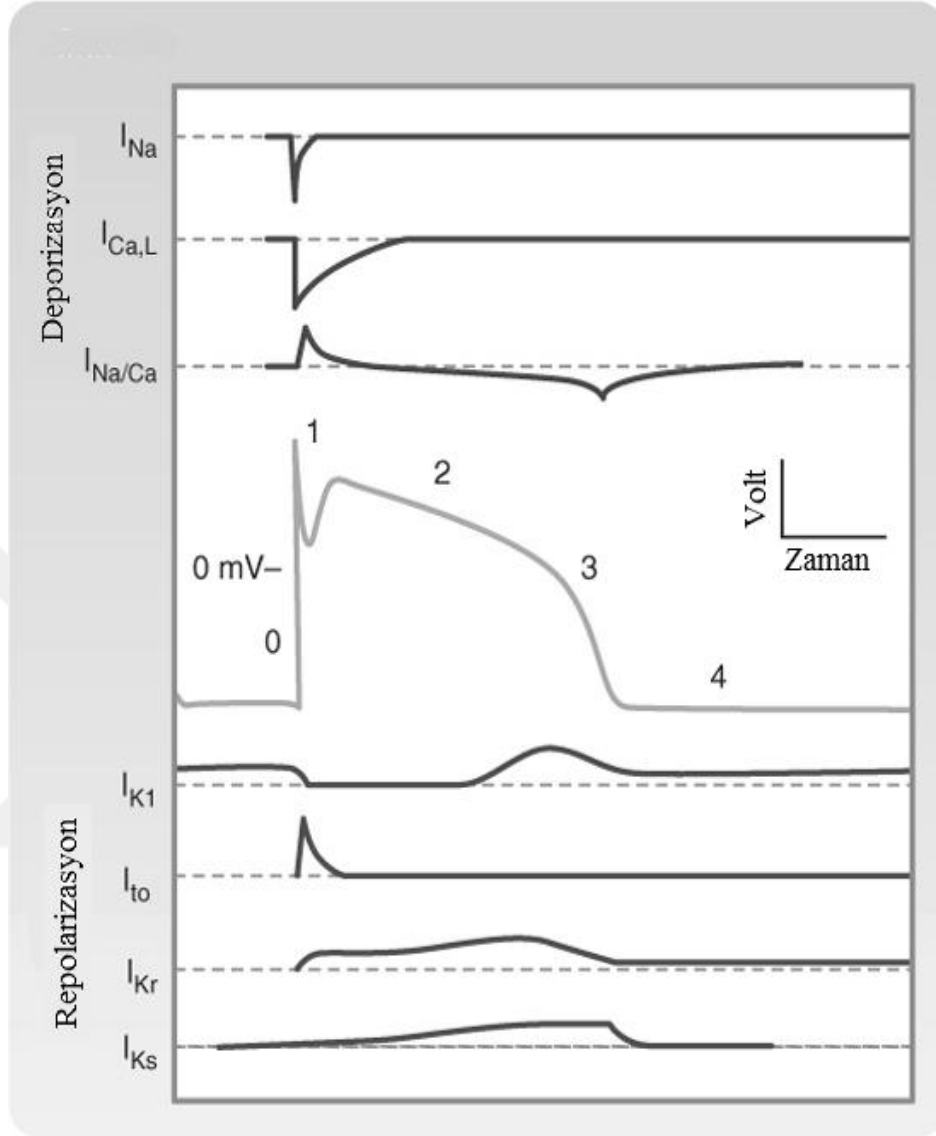
2.2.2. Ventriküler Aksiyon Potansiyeli

Geçici depolarizasyon durumu olarak tanımlanan AP, zar geçirgenliklerindeki değişimler neticesinde ortaya çıkmaktadır. Dinlenme durumundaki hücre zarı potasyum (K^+) iyonları için daha geçirgen olduğundan, dinlenme zar potansiyeli K^+ denge potansiyeline yakındır.

Kalp AP'nin konfigürasyonu çeşitli fazlara bölünebilir. AP temel olarak 5 faza bölünmüştür ve bu fazlardan sorumlu akımlar belirlenmiştir. Faz 0 AP'nin sıçraması; faz 1 erken repolarizasyon evresi; faz 2 plato evresi; faz 3 asıl repolarizasyon fazı ve faz 4 dinlenme evresidir. Şekil 2.5'te AP'nin evreleri ve bu evrelerden sorumlu iyon akımları yoğunlukları esas alınarak oluşturulan grafikte detaylı olarak gösterilmiştir. Bu şekil incelenerek hangi fazda hangi akımın ortalama hangi yoğunlukta etkili olduğunu anlamak mümkündür.

Faz 0: Na^+ akımlarına bağlı olarak AP'nin hızlı sıçrama bölümüdür. AP'nin bu kısmında hızlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri vardır. Tepe değerine yaklaşık 1 ms'de ulaştıktan sonra spontan şekilde azaldığı kısım kanalın inaktivasyonu ile ilişkilidir. Başlangıçta küçük bir depolarizasyondan dolayı Na^+ kanalları hızlı bir şekilde açılmaya başlar. Bu noktada elektrokimyasal gradyentten dolayı hücre dışındaki Na^+ hücre içine girer. Bu olay neticesinde hücre daha fazla depolarize olur ve depolarize oldukça da yeni Na^+ kanallarını açmak suretiyle işlemi pozitif geri-beslemeli bir süreç olarak devam ettirir.

Faz 1: Geçici ve bağıl olarak küçük repolarizasyon evresi olup, AP'nin hızlı depolarizasyon evresini izleyen dönemi ifade eder.. Bu faz depolarizasyonla açılan bir tip K^+ kanalının, geçici dışarı doğru akımına (transient outward current; I_{to}) bağlıdır. Bu kısımda oransal olarak az olmakla birlikte klor (Cl^-) akımının da katkısı vardır.



Şekil 2.2. Aksiyon potansiyeli bileşenleri ve fazları (Tomaselli and Marbán, 1999). Platolu bir AP'de hangi akımların ortaya çıkması ile AP'nin hangi kısmının oluştuğu gösterilmiştir. AP örneği üstünde bulunan 3 ana akım depolarizasyon sorumlu olarak, örnek altındaki 4 ana akım ise repolarizasyondan sorumlu olarak gösterilmiştir.

Faz 2: Bu faz erken repolarizasyon fazını izleyen dönemdir ve zar potansiyelinin görece olarak sabit olduğu süreci kapsar. Plato evresi olarak bilinen bu faz kalp hücrelerinde görülen uzun AP'nin sebebidir. İçeri doğru olan bazı pozitif akımların, dışarı doğru olan repolarize edici pozitif akımları neredeyse dengelemesi platonun temel nedenidir. Daha açık bir ifadeyle, bu evrede L-tipi Ca^{2+} kanallarından içeri doğru Ca^{2+} girişine karşılık,

yavaş aktive olan K^+ (gecikmiş doğrultucu akım; I_{Ks}) kanallarından K^+ dışarı çıkmaktadır. Tüm bunların yanında I_{to} 'da erken aşamada platoya katkıda bulunmaktadır.

Faz 3: Platoyu takip eden son repolarizasyon evresidir. Yavaş aktive olan I_K artar ve baskın hale gelirken, bu sırada inaktivasyon nedeniyle L-tipi Ca^{2+} akımı (I_{CaL}) zamanla azalır. Bu akımın inaktivasyonu olmaması uzun süreli olarak görülmesine sebep olur.

Faz 4: Dinlenme potansiyeli ventrikül hücreleri için dördüncü fazdır. Bu dönemde hücre zarının yüksek K^+ geçirgenliğe sahip olması nedeniyle dinlenme zar potansiyeli K^+ denge potansiyeline yakın bir değer almaktadır. Büyük ölçüde içeri doğrultucu K^+ akımı (I_{K1}) denen bir tip akım tarafından belirlenen bir dinlenme potansiyelinden söz edilir.

2.2.3. Potasyum Kanalları

Potasyum kanalları kardiyak miyositlerdeki en kalabalık kanal proteini grubudur ve birçok amaca hizmet ederler. Bu amaçları içinse fizyolojik dinlenme potansiyelleri kapsamında çoğunlukla dışarı doğru akım üretirler ve dinlenme zar potansiyelini K^+ denge potansiyeline çekmeye çalışırlar. Yapısal olarak ikiye ayrılırlar. Na^+ ve Ca^{2+} kanallarının çoğu gibi depolarizasyon ile aktive olan K^+ kanalları bir grubu tanımlamaktadır ve bu grubun bazı üyeleri inaktivasyon fazı gösterirken bazıları göstermemektedir. İkinci grup ise içeri doğrultucular grubu; bu grubun üyeleri ligand kapılı kanallardır ve transmembran segment sayıları daha azdır..

Kalpte K^+ kanallarının içeri doğrultucu özelliği fonksiyonel olarak çok önemlidir. Aktivite esnasında hücre içi K^+ kaybını sınırlayarak, AP'nin uzun plato fazına izin verir. Eğer AP süresince K^+ geçirgenliği düşmeseydi, büyük bir elektrokimyasal sürücü kuvvet ile dışarı doğru büyük K^+ akımları olurdu. Bu içeri doğrultucu akımlar bu bağlamda durağan ve dengeli bir AP plato fazı sağlamaktadır. AP'nin plato fazının ve dinlenme zar potansiyelinin belirlenmesinde bu kadar önemli rollere sahip olan potasyum kanalları ailesi birçok alt grubu ile pek çok çalışmaya konu olmuştur. Bunlardan AP'de gerçekleşen değişimleri özellikle uzamaları açıklamaya çalışan modellerde incelenmesi öncelikli hale gelen iki tanesi I_{K1} ve I_{to} 'dur (Algalarrondo and Nattel, 2016; Tay ve ark., 2016).

İçe Doğrultucu Potasyum Akımları (I_{K1})

I_{K1} dinlenim zar potansiyelinin K^+ denge potansiyeline yakın yerlerde sabit kalması ve düzenlenmesini sağlayan K^+ kanallarınca oluşturulur. Bu akımların Kir2.1 kanal proteini yardımıyla olduğu belirlenmiştir (Kubo ve ark., 1993). Pacemaker hücrelerinde yok denecek kadar azdır, hatta SA'da olmadığı söylenmektedir (Irisawa ve ark., 1993). Bu durum bu hücrelerde kendiliğinden AP oluşumuna yardım etmektedir. Bunun sebebi daha az I_{K1} akımının I_{Na} ve I_{CaL} 'ni üstesinden gelmeye çalışmasıdır. Netice olarak bu durum ardışık üretilebilen AP'ler oluşturmaktadır. I_{K1} akımının bu etkisi membran potansiyelinin düzenlenmesinde ne kadar önemli olduğunu açıkça göstermektedir.

Potasyum geçirgenliği (g_K) hücre dışında bulunan K^+ miktarına bağlıdır. Hücre dışı K^+ artışına hiperkalemiya denir. Potasyum iyonlarının geçirgenliğinin değişmesiyle I_{Na} dinlenim potansiyelini AP oluşması için gerekli eşik seviyesine yükseltir. I_{K1} hakkındaki en temel söylem ve gösterim AP sırasındaki zar potansiyeli değişiminde repolarizasyonun son aşamasına önemli katkıda bulunmasıdır. Protein kinaz A (PKA) tarafından modüle edilmediği düşünülen bu kanal, AP'nin plato ve tepe (peak) kısmına yüksek sürücü kuvvet etkisine rağmen müdahil olabilecek düzeyde değildir. Yalnızca AP oluşumunun son aşamasında membran potansiyelinin uygun seviyeye çekilmesi görevini üstlenir(Lee ve ark., 2016).

Geçici Dışarı Doğru Potasyum Akımı (I_{to})

Geçici dışarı doğru potasyum akımları (I_{to}) Ca^{2+} ile aktive olan Cl^- akımları ile birlikte AP'nin erken repolarizasyon evresine katkıda bulunmaktadır. Bu potasyum kanalları dinlenim zar potansiyelindeki değişime göre hızlı aktivasyon ve inaktivasyon gösterirler. İki temel bileşeni olduğuna inanılmaktadır. Bunlar hızlı ($I_{to,fast}$)ve yavaş ($I_{to,slow}$) olarak adlandırılır ve sorumlu olan kanal proteinleri de hızlı I_{to} için Kv 4.2 ve Kv 4.3, yavaş içinse Kv 1.4'tür (Nerbonne, 2000; Nerbonne ve ark., 2001; Xu ve ark., 1999). Bu iki akımda son derece hızlı olmalarına rağmen $I_{to,fast}$ 5 milisaniyeden kısa sürede aktif ve 100 milisaniyeden kısa sürede inaktif olur. Aktivasyon süresi hemen hemen aynı olan $I_{to,slow}$ akımı ise 200 milisaniyeden kısa sürede inaktif olmaktadır. İki akımın da sebebi olan kanala aminopyridine ile inhibe edilebilmektedir.

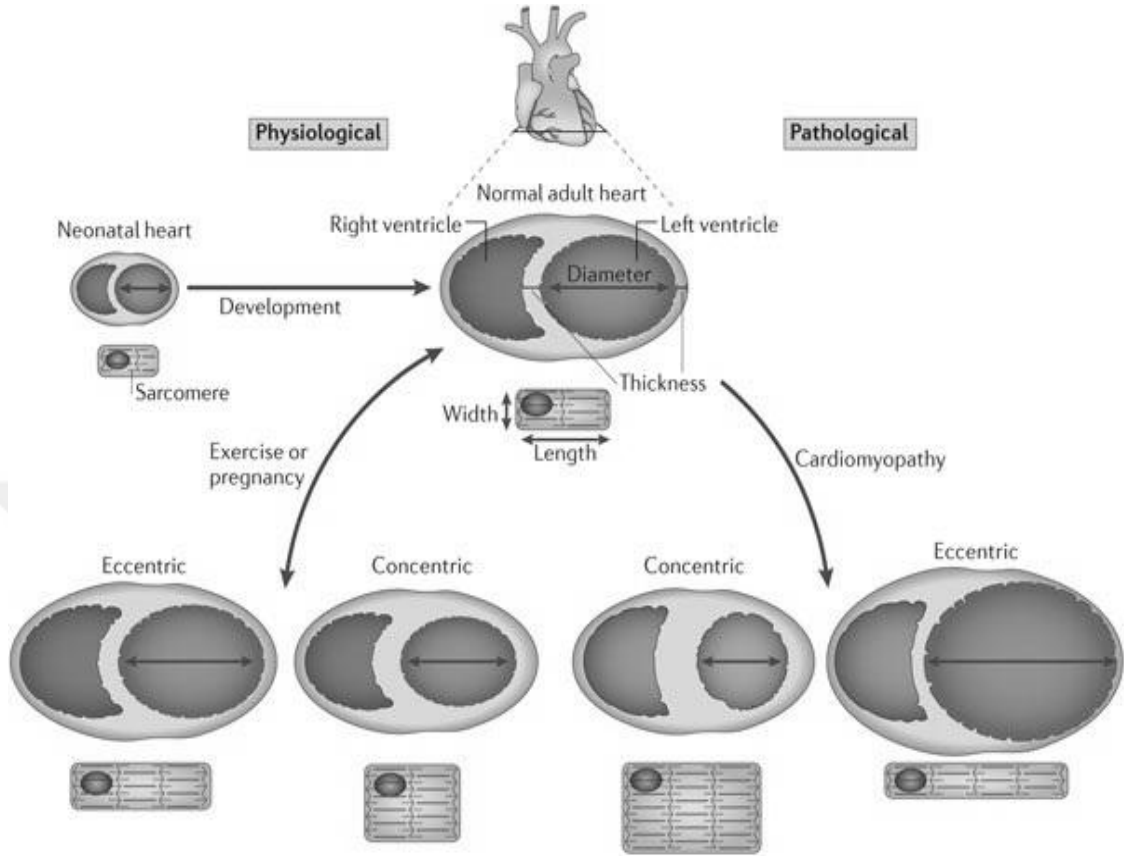
İnsan ve gelincik ventriküllerindeki epikardiyal ve endokardiyal hücrelerde, hızlı inaktivasyon ve bu inaktivasyondan dönüşteki yüksek I_{to} nedeniyle transmural gradyent oluşmaktadır (Brahmajothi ve ark., 1999). Köpeklerde ise daha hızlı repolarizasyon ve kısa AP oluşumunda 5-6 kat daha fazla $I_{to,fast}$ akımı görülmektedir. Kimi hastalık modellerinde düşük I_{to} AP uzamasının temel nedenlerinden biri olarak gösterilmektedir(Grubb ve ark., 2015; Liu ve ark., 2015). Yine bazı hastalık modellerinde izoformlarında ciddi ekspresyon artışı olabilmektedir(Qi ve ark., 2015). Yenidoğan (neonatal) sıçan ventriküllerinde belirlenen $I_{to,slow}$ fenotipleri yetişkinlerde $I_{to,fast}$ olarak belirlemektedir (Wickenden ve ark., 1997).

2.3. Kardiyak Hipertrofi

2.3.1. Hipertrofinin Tanımı ve Sınıflandırılması

Kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmesi açısından sıklıkla kullanılan bir terim olan “hipertrofi” Yunanca hyper (normalden fazlası) ve trophe (besin, beslenme) kelimelerinin birleşmesinden oluşan ve normal boyutlardaki bir organın aşırı büyümesini, genişlemesini belirtmek için kullanılan bir kelimedir. Özet olarak hipertrofi kelimesi kalbi tanımlamada kullanıldığında normal olmayan durumu belirtmek için kullanılır. Bir çocuğun yaşı ilerledikçe büyüyen kalbi de ilk bakışta hipertrofi tanımına girer ve burada kelime anlamı açısından bir boşluk yaratmış gibi görünse de bu tip morfolojik olarak olağan büyümelere ötrofi (eutrophy) denir. Bu olağan büyüme dışında gerçekleşen genişleme ve kütle artışlarına hipertrofi denir. Gelişim sürecinin neticesine göre fizyolojik ve patolojik olarak ikiye ayrılır.

Sağlıklı hipertrofinin görüldüğü pek çok durum vardır. Özellikle atletler ve hamilelerde kalp fizyolojik olarak oldukça büyür. Bu oran normal bir insana göre profesyonel bir atlette %60’lık bir artış olabilir. Öte yandan sağlıksız hipertrofi yani patolojik hipertrofi daha çok hipertansiyon, miyokardiyal enfarktüs ve kalp kası problemleri ile ortaya çıkar. Yaygın şekilde sınıflandırma hipertrofinin oluşma yoluna göre yapılır, çünkü bu yol oluşumda farklılıklara yol açmaktadır. Vazodilatasyon sonrası hacim yüklemesine bağlı olarak oluşan hipertrofilerde, ventrikül iç hacmi aşırı artış göstererek kalbi patolojiye götürür ve bu duruma eksantrik (eccentric) hipertrofi denir. Buna karşın eğer hipertrofi basınç artışına bağlı olarak gelişiyor ise buna konsentrik (concentric) hipertrofi denir.



Şekil 2.3. Kardiyak hipertrofinin fizyolojik ve patofizyolojik gelişimi (Maillet ve ark., 2013). Şeklin sol tarafında bir kalbin fizyolojik hipertrofiye giderken ne şekilde geliştiği ve fizyolojik bir hipertrofide eksentrik ve konsentrik gelişimin nasıl olduğu gösterilmiştir. Sağ kısımda ise patolojik olarak oluşan hipertrofi ile bu gelişimlerin nasıl olduğu gösterilmiştir.

2.3.2. Hipertrofinin Epidemiyolojisi

Kardiyak hipertrofinin ilk kez kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olduğu tanımlanması yaklaşık 50 yıl önce Framingham Heart Institute tarafından yapılmıştır. SVH genel nüfusta neredeyse %20 oranında görülmektedir. Bu oran siyahi, yaşlı, obez ve hipertansiyon hastalarında daha da yükselmektedir (Weber, 1988). SVH ve sistolik diastolik kan basıncı arasındaki artış ilişkisi gösterilmiş olmakla birlikte (Levy ve ark., 1988) bu durum SVH'yi tek bir nedene bağlamak için yeterli değildir. 40 yaş üstü insanlarda cinsiyet bağlı farklılıkları anlamak adına yapılan çalışmada 40-49 yaş aralığında erkeklerin neredeyse %30'u risk altındayken, kadınlarda bu oran %20'ler civarında bulunmuştur. Bunun yanında ilerleyen yaşlarda erkeklerin risk durumu sabit kalırken, kadınların neredeyse %50sinin yüksek risk grubuna girdiğini tespit

edilmiştir(Levy ve ark., 1988). SVH artık sadece bir adaptasyon olarak algılanmaktan uzak bir durumdur. Hatta miyokardiyal enfarktüs, ritim bozukluğu, kalp yetmezliği ve ani ölümler gibi durumların önemli bir risk faktörü olduğu kabul edilmektedir.

Bu alanda yakın zamanda Almanya'da gerçekleştirilmiş bir çalışmada normal popülasyondan seçilen 1678 vaka kullanılmış ve bu çalışmada SVH'nin artan morbidite ve mortalite ile birlikte bu popülasyon üzerinde de önemi göstermiştir. Bu çalışmada sol ventrikül kütle indeksi ile üriner atılım arasındaki ilişki cinsiyet, yaş, kan basıncı, vücut kitle indeksi ve diyabetin varlığı gibi faktörler göz önünde bulundurularak analiz edilmiştir. Sonuçta orta yaş grubunda erkekler ile kadınlar risk durumları birbirine yakinken, ileri yaşlarda kadınların SVH için daha fazla risk altında oldukları belirlenmiştir(Lieb ve ark., 2006).

2.3.3. Deneysel Hipertrofi Modelleri

Bir adaptasyon refleksi olarak gerçekleşen kardiyak hipertrofinin birçok nedeni vardır. Bu nedenler baz alınarak oluşturulan deney modelleri ile refleks tetiklenir ve hastalık modeli üzerindeki çalışmalara imkan tanır. Pek çok hastalık modelinde olduğu gibi ilgili genler üzerinde oluşturulan manipülasyon ile ortaya çıkan knock-out ve knock-down modeller, madde uygulamaları ile oluşturulanlar, egzersiz ve gebelik ile oluşturulan modeller, başka bir hastalık modeli üzerinden dolaylı olarak oluşturulanlar ve cerrahi girişim sonucu oluşturulanlar. Bunlardan insanlarda oluşan patolojilere en uygun şekilde gelişenleri ise cerrahi girişim ile oluşturulanlardır. Çeşitli cerrahi girişimler sonucu oluşturulabilen patolojik hipertrofi için en çok kullanılan ikisi hacim artışına dayalı hipertrofi modeli için abdominal aort fistülü ve basınç artışına dayalı hipertrofi modeli için transvers aort daraltmasıdır.

2.3.4. TAK Kaynaklı Hipertrofi de Gerçekleşen Değişimler

Transvers aort daraltması basınca dayalı kardiyak hipertrofi modelinin oluşturulmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. TAK kalpten çıkan aort damarının dallanmaya başladığı noktada sol karotid arterin hemen önünden bir aparat yardımı ile damarın daraltılması sonucu oluşur. Başlangıçta TAK kasılma kuvvetinde belirgin bir artış ile birlikte kompanse hipertrofi oluşturur. Belirli bir zaman sonra bu hemodinamik basınç artışı maladaptif olur ve kardiyak dilatasyon oluşturur. İnsanlarda gerçekleşen patolojik

durumu mimik etmek için (Rockman ve ark., 1991) uygulanan bu yöntem günümüzde son derece yaygın şekilde kullanılmaktadır. Sağ ve sol karotid arter arasından yapılan bu uygulama artan art-yük ile sol ventrikül üzerinde ciddi bir baskı oluşturur. Bunu kompanse etmek için kasılma gücünü artıran sol ventrikül zaman içinde fibril yapısının bozulması, artan kollojen miktarı ve bunlara bağımlı olarak kasılma gücünde ki azalma ile patolojiye gitmektedir(deAlmeida ve ark., 2010).

Kalpde kompanse hipertrofidan dilate kalp yetmezliğine geçişin gerçekleştiği süreçte hücrel ve moleküler değişimler artmakta ve sonunda sistolik ve/veya diyastolik fonksiyonun bozulmasıyla sonuçlanmaktadır(Kehat and Molkenin, 2010). Bununla birlikte kardiyak hipertrofide yapısal değişikliklerin yanında elektriksel aktivitenin ve iyonik dengenin bozulduğu ve genellikle elektriksel yeniden modellenme olarak adlandırılan bu süreçler dizisinin aritmiyogenezden kaynaklanan kardiyovasküler morbidite ve mortalite riskini önemli ölçüde arttırdığı iddia edilmektedir(Wang ve ark., 2001). Çalışmalar EKG ile yapılan ölçümlerde uzamış QT ve QRS durumunu patolojik hipertrofi ile ilişkilendirilmiştir(Boulaksil ve ark., 2010). Bunun yanında kardiyak hipertrofinin deneysel modellerinde tutarlı şekilde AP süresinin uzaması gözlenmiştir. Kardiyak yeniden modelleme sırasında gerçekleşen AP süresi uzaması K^+ akım yoğunluklarındaki azalma ile ilişkilendirilmiştir(Beuckelmann ve ark., 1993; Marionneau ve ark., 2008). Özellikle repolarize edici I_{to} akımındaki azalma pek çok çalışmada bu uzamadan sorumlu olarak gösterilmiştir(Kääb ve ark., 1998; Lebeche ve ark., 2006; Tomaselli and Marbán, 1999). AP süresindeki uzama ve I_{to} 'daki azalma kompanse hipertrofi modellerinde de gözlenmiştir(Bailly ve ark., 1997). Elektriksel yeniden modellemeye ilişkin tartışmalar içerisinde I_{CaL} ve NCX'in aktivasyonu ile ortaya çıkan akımlardaki (I_{NCX}) değişikliklerin AP şeklini değiştirebilmesi durumu da vardır. Bu akımlar hücre içi Ca^{2+} regülasyonunu etkileyerek kontraktil aktivitedeki anormalliklere zemin hazırlamaktadır. Hem kardiyak aksiyon potansiyelinin repolarizasyonunda, hem de hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımının tetiklenmesinde rolü olan LTCC'nin etkisine ilişkin birbirinin zıttı bulgulara literatürde rastlanmaktadır (Pitt ve ark., 2006; Wang ve ark., 2008). NCX ile ilgili birçok kalp yetmezliği ve hipertrofi modelinde ekspresyon ve fonksiyonunda artış gözlendiği söylenirken bazı modellerde azaldığı da gözlenmiştir (Antoons ve ark., 2012; Hasenfuss and Pieske, 2002). Özetle,

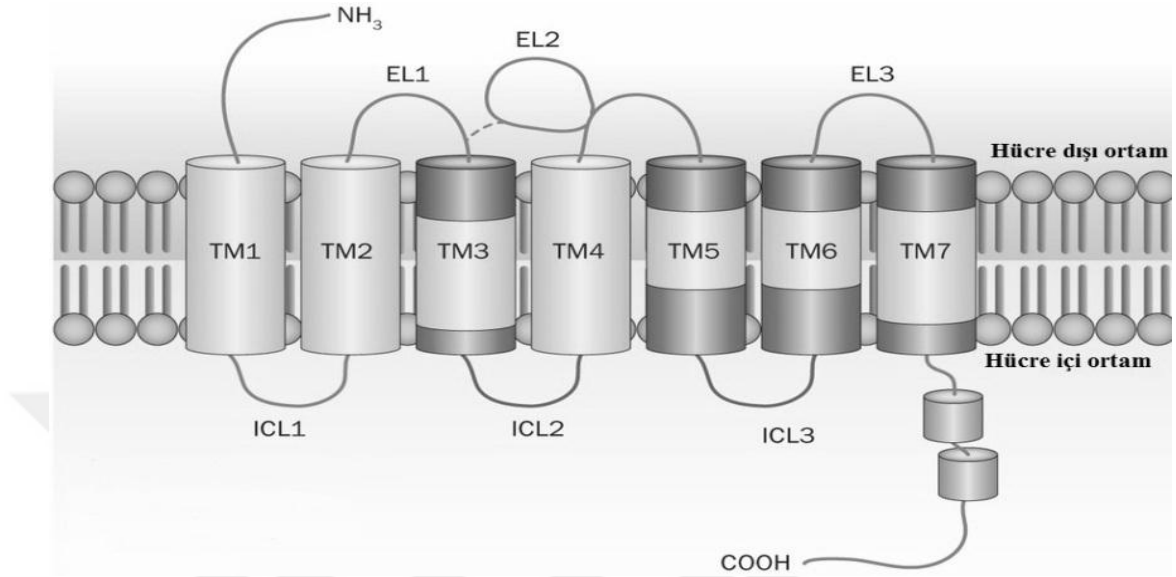
Ca^{2+} düzenleyici mekanizmalardaki bozukluklar ve hücre içi Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) seviyesindeki değişiklikler hipertrofide gözlenen önemli elektrofizyolojik anormalliklerin temelinde yatan mekanizmaları oluşturabilmektedir.

2.4. G-Proteinleri ve Genel Özellikleri

Tüm hücreler kendilerinde bulunan transmembran sinyal sistemi sayesinde hücre içi ve dışında gerçekleşen olaylardan haberdar olur, bunlara yanıt üretebilir ve diğer hücreler ile iletişim sağlayabilirler. Bu iletim sistemi iki temel bileşenden oluşmaktadır; reseptör ve efektör. Reseptör özelleşmiş bölgeleri yardımıyla mesajın algılanmasını ve çözümlenmesini sağlarken, efektör ise reseptörün yönlendirmesi ile hücre içi sinyali oluşturmaktadır. Hücre dışında bulunan sinyallerin hücre içine etkisi genellikle dört ana mekanizma üzerinden gerçekleşmektedir; enzim aktivitesine sahip reseptörler, hidrofobik moleküllerin hücre zarından difüzyonu, iyon kanalları ve G protein kenetli reseptörler.

Heptahelikal olarak adlandırılan reseptörlerden olan G protein kenetli reseptörü (GPCR) membranı yedi kez geçen alt birimi, hücre dışında bulunan N terminali ve hücre içinde bulunan C terminali ile bu aileye dâhil olmuştur (Patel, 2004). Lipitler, biyojenik aminler, peptitler, proteinler, nükleotitler gibi çeşitli uyarımlarla etkinleşen GPCR'ler, heterotrimerik G proteinlerine kenetlenerek enzim ya da iyon kanalları gibi çeşitli efektör etkinliklerini düzenlemektedir. A, B ve C olmak üzere üç aileye ayrılan GPCR'lerin 1000'den fazla üyesi olduğu bilinmektedir (Kolakowski, 1994). G proteinlerinin hücre dışında oluşan değişimleri hücre içinde bir eyleme dönüştürme işine GPCR'nin alt ünitelerindeki yönelimler karar verirler.

Hücre zarının sitoplazmik kısmında yerleşik heterotrimerik G proteinlerinin α , β ve γ olmak üzere üç alt birimi vardır. Bu proteinler küçük monomerik Guanizin Trifosfat (GTP) bağlayan proteinleri de kapsayan GTPaz üst ailesinin üyesidir (Wettschreck and Offermanns, 2005). Binden fazla hücre yüzey reseptörü ile birleşme sağlayarak enzimler ve iyon kanalları üzerinde efektör olabilen G proteinleri aracılığı ile birçok olay gerçekleşmektedir. Hücre büyümesi ve farklılaşması, hormonal değişimler, nöronal etkiler ve duyuşsal algılama gibi olaylarla ilişkisi saptanan G proteinlerinin işleyiş mekanizmaları ise oldukça karmaşıktır.



Şekil 2.4. G Protein kenetli reseptör (GPCR) (Neumann ve ark., 2014). Şekilde bir GPCR'yi oluşturan transmembran parçalar ve bunların uç kısımlarında bulunan terminal noktalar gösterilmiştir. GPCR ailesinde N-terminal hücre dışında C-terminal kısmı ise hücre içinde bulunmaktadır.

G proteinlerinin kendine özgü yapısı sayesinde sinyal sistemlerinde geniş bir çeşitlilik söz konusudur. Modüler yapısı birçok farklı mesaj için farklı mekanizma ortaya çıkarmasını sağlamaktadır. 20 α , 5 β ve 13 γ alt birimi tanımlanabilmiştir (Landry and Gies, 2002). Molekül ağırlıkları farklılık gösteren bu alt birimlerden α -alt birimi GTPaz aktivitesinden sorumlu bölgeyi ve guanin nükleotit bağlanma bölgesini içerir. Bu özellikleri ile G proteinlerinin reseptör ve efektör arasındaki etkileşimin belirleyicisi konumundadır. Nitekim bu çeşitliliğe sahip olan α -alt birimi kendi içinde dört alt gruba ayırılır; $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ ve $G\alpha_{12}$ (Landry and Gies, 2002). Bugüne kadar 16 genin ürünü olan 20 α -alt birimi tanımlanmıştır.

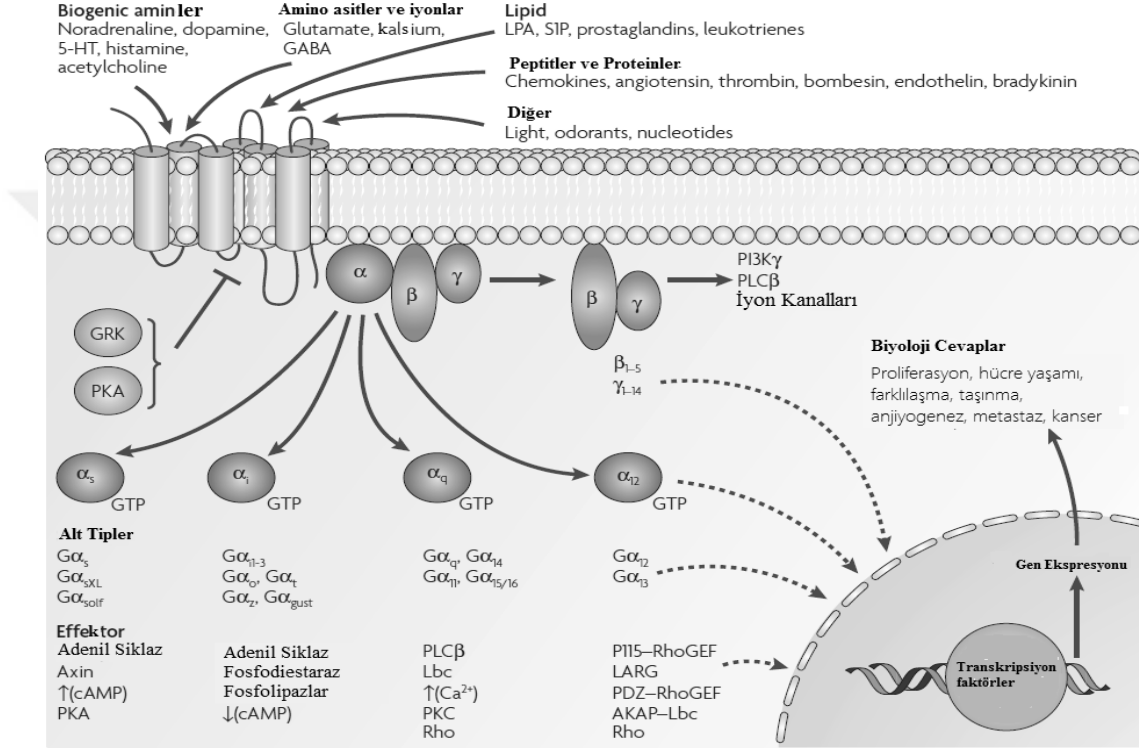
Bütün dokularda bulunması sebebiyle adenilat siklaz sistemi ve siklik guanin mono fosfat (cGMP) fosfodiesteraz yolları G protein yapılarında reseptör-efektör ilişkisini açıklamak için kullanılmıştır (Vaughan, 1998). $G\alpha_s$ ailesinin üyelerini etkinleştirerek adenilat siklazı uyararak ve cGMP sentezi artıranlar hormon ve koku reseptörleridir. Dört farklı $G\alpha_s$ polipeptidi sentezlenmesinin yanı sıra ortaya çıkarılan sekiz adenilat siklaz formunun tamamının $G\alpha_s$ ile uyarılabildiği aynı zamanda da voltaj kapılı Ca^{2+}

kanallarını uyardığı ve kardiyak Na^+ kanallarını baskıladığı anlaşılmıştır (Mattera ve ark., 1989; Schubert ve ark., 1989). $\text{G}\alpha_{i1}$, $\text{G}\alpha_{i2}$, $\text{G}\alpha_{i3}$ olmak üzere 3 tipi bulunan $\text{G}\alpha_i$ adenilat siklazın baskılanması ve siklik adenozin mono fosfat (cAMP) konsantrasyonunda azalmaya neden olmaktadır. Buldukları bölgeler ve etki ettikleri olay sebebiyle bazı diğer tipleri de bulunan $\text{G}\alpha_i$ ailesinin bazı bileşenleri arasındaki benzerlik %80'leri bulmaktadır (Stryer, 1986). Birçok nörotransmitter ve büyüme faktörünün Fosfolipaz C'yi uyararak etki gösterdiği ve Fosfolipaz C'nin diaçilgliserol gibi ikincil yolakları aktive ettiği bilinmektedir (Hepler and Gilman, 1992). Bu ikincil yolaklar üzerinde $\text{G}\alpha_q$ ailesinin üyelerinin etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Etki bölge ve görevlerine göre pek çok çeşidi bulunan $\text{G}\alpha_q$ ailesinin üyeleri arasında $\text{G}\alpha_q$ ve $\text{G}\alpha_{i1}$ arasındaki benzerlik %88 oranındadır (Hepler and Gilman, 1992). $\text{G}\alpha_{i2}$ ve $\text{G}\alpha_{i3}$ pek çok yerde bulunmasına rağmen etkileri tam çözülememiş, yalnızca Na^+/H^+ değiş-tokuşucusunu veya c-jun NH_2 -terminal kinaz efektörlerini uyardığı ve bu sinyal yolaklarını indükledikleri gösterilmiştir (Dhanasekaran and Dermott, 1996; Wettschureck and Offermanns, 2005).

G-proteinleri içerisinde bulunan bir diğer grupta küçük G proteinleridir. Rho bir küçük guanin nükleotid bağlı proteindir. GTP bağlı proteinlerin Ras ailesinde oldukları bilinen Rho 3 ana gruba ayrılır; RhoA, RhoB, RhoC. Bunun yanında Ras ailesinin başka üyeleri de tanımlanmıştır; Roc1, Roc2, Cdc42 ve TC10 (Reuther and Der, 2000). RhoA kardiyomiyositlerde sıkça gözlenen bir proteindir ve ROCK aktivasyonun öncüsü konumundadır. ROCK ailesi de kendi içinde iki gruba ayrılır ROCK1 ve ROCK2. Bu proteinler hücre morfolojisi, hücre mortalitesi, fokal adhezyon ve hafif zincir fosforilasyonu gibi durumlarda görev alırlar (Riento and Ridley, 2003). Bu proteinlerin inhibitörleri aracılığıyla yapılan deneylerde hipertansiyon, hipertansif vasküler hastalıklar ve vasküler düz kas hücrelerinin hipertrofik yanıtını indükleyen angiotensinII'ye (AngII) aracılık ettiği gösterilmiştir (Masumoto ve ark., 2001; Mukai ve ark., 2001).

Ang II gibi nörohormonal faktörler aracılığı ile aktif duruma gelen RhoA ve GATA-4'ün Gq-ROCK sinyal yolağı üzerinden hipertansiyondaki sol ventrikül hipertrofi sürecine kontraktıl fonksiyonları bozarak etki gösterdiği tespit edilmiştir (Rashid ve ark.,

2009). RhoA'nin hipertrofide aşırı eksprese olduğu fare çalışmalarında gösterilmiştir. Kardiyak hipertrofide RhoA'nın olası rolü HMG-CoA redüktaz inhibitörü ya da statinlerin kullanıldığı çalışmalarda indirek olarak gösterilmiştir(Yu ve ark., 2014).



Şekil 2.5. G Proteinler ve alt birimleri ile etki mekanizması (Dorsam and Gutkind, 2007). Şekilde G proteinlerinin alt birimleri detaylı olarak gösterilmiş ve bu alt tiplerin efektörleri listelenmiştir. Sağ alt kısımda ise bu efektörlerin aktivitesi ile ortaya çıkan biyolojik cevaplar listelenmiştir.

2.5. RhoA/ROCK Yolağı ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Üç farklı çeşidi arasında %85 oranında benzerlik bulunan Rho GTPazlar içinde RhoA, integrinler, büyüme faktörleri, adhezyon molekülleri ve hormonlar tarafından en fazla aktive edileni olduğu için en çok çalışılanıdır da. Birçok protein RhoA'nın hedef proteini olarak tanımlanmıştır. Bu hedef proteinlerden bazıları; PAK (p21-aktive kinaz) ailesi, ROCK, miyosin fosfotazlar, prin kinaz, Rhoophilin, Rhotekin, sitron, ve GDIA'dır.

GTP-bağlı küçük proteinlerden biri olan RhoA'nın ve ilişkili sinyal yolaklarının asağı kademelerdeki (downstream) en iyi tanımlanmış hedeflerinden olan ROCK ailesinin bilinen iki izoformu vardır; ROCK1 ve ROCK2. Bu izoformların insanda yaygın olarak eksprese olduğu bilinmektedir. RhoA/ROCK yolağının aktivitesi sonucu hücre morfolojisi, motilite, sekresyon, proliferasyon, gen ekspresyonu gibi çeşitli hücre fonksiyonlarının yanında, vasküler tonusun düzenlenmesi ve inflamasyon gibi etkilerin olduğu bir takım çalışmalar ile gösterilmiştir(Dong ve ark., 2010; Ren and Fang, 2005). Bunların yanında, miyokardiyal enfarktüs, hipertrofi ve diyabetik kardiyomiyopati gibi birçok kardiyovasküler hastalık modelinde hem ekspresyon hem de aktivite artışı olduğu söylenen RhoA ve ROCK'un (Dong ve ark., 2012; Guan ve ark., 2012), etkin halinin kardiyak anormalliklerin patogeneğinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Çeşitli hayvan deneyi modellerinden ve insanlardan elde edilen veriler hipertrofi ve kalp yetmezliğinde ROCK aktivitesinin belirgin şekilde arttığını, bu kinazların çeşitli inhibitörleri kullanıldığında ise hipertrofide azalma olduğunu göstermektedir (Dong ve ark., 2012).

Çeşitli nörohormonal faktörlerin aktive edebildiği RhoA/ROCK sinyal yolağının hipertrofidan kalp yetmezliğine geçiş sürecinde önemli etken olduğu düşünülmektedir. TAK yöntemiyle kalbe uygulanan akut basınç yüklemesinin RhoA ve ROCK aktivitesini arttırdığı ve artışı 30 dakikada en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir(Torsoni ve ark., 2003). Ang II ile inkübe edilen sıçanlarda RhoA/ROCK aktivasyonu ile birlikte kardiyak hipertrofi tetiklenmektedir (Hill, 2003; Reiken ve ark., 2003). Ang II'nin indüklediği sol ventrikül hipertrofisi dört haftalık Fasudil uygulaması tedavi dozuyla orantılı düzeyde azaltmakta ve oksidatif stresi de ROCK aktivitesiyle birlikte baskılamaktadır. Yine Higashi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada

hipertansif sıçanlardaki hipertrofi modelinde de ROCK inhibitörü fasudil ile RhoA/ROCK sinyal sistemi elemanlarının aktiviteleri ve NAD(P)H oksidaz ekspresyonu da azaldığı gösterilmiştir(Higashi ve ark., 2003). Tüm bu çalışmalar RhoA/ROCK sinyal yolağının aktivasyonunun kardiyak hipertrofiye bağlı yetmezliğin patogenezinde yer almakta olduğunu göstermiştir.

Diğer kalp yetmezliklerinde olduğu gibi diyabetik kalpte de artan RhoA/ROCK yolağı aktivitesi diyabetli kalbin kasılma fonksiyonlarını belirgin şekilde düzeltmektedir(Zhou ve ark., 2011). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada kalp yetmezliği olan insanlarda ROCK1, ROCK2 protein seviyelerinin ve RhoA aktivitesinin belirgin biçimde arttığı gösterilmiş, böylece ROCK aktivitesinin kalp yetmezliğinin patofizyolojisinde ve gelişiminde rolü olduğu ve risk göstergesi olarak değerlendirilebileceği iddia edilmiştir (Dong ve ark., 2010). RhoA'nın AP'nin repolarizasyonunda önemli yeri olduğu ve I_{K1} 'i aktive etmek suretiyle AP süresini uzatabileceği ve kalbin elektriksel iletimini etkileyebileceği ileri sürülmüştür(Wang ve ark., 2007).

Hücre içi pek çok yeniden modellemede etkisinden bahsedilebilen RhoA/ROCK yolağının, kardiyak hipertrofiye olan etkisi elektrokardiyografi gibi daha genel metotlarla yapılmış, kalbin elektriksel yeniden modellenmesindeki rolü ve buna yol açan iyonik mekanizmaların moleküler düzeydeki değişimleri üzerine olan etkisi yeterince araştırılmamıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen bazı bulgular şu şekildedir; uzamış QT sendromu, AP süresinin uzaması, bozulan miyofibril yapı ile birlikte kontraktıl özelliklerin kaybedilmesidir(Amano ve ark., 2010; Lin ve ark., 2007). Bu değişimler normal olarak iyonik boyutta da görülmekte ve tespit edilebilmektedir. Kontraktıl parametrelerdeki azalma Ca^{2+} akımındaki azalma, AP'deki uzama ilişkili iyonik akımlarının değişimlerinin incelenmesi sureti ile çalışmalara konu edilmiştir(Li ve ark., 2012; Phrommintikul ve ark., 2008; Surma ve ark., 2011). Gerçekleşen değişimler kaynaklı ortaya pek çok etki sayısız çalışma ile belirtilmiştir. Bu etkinin detaylandırılmış mekanizmaları ise yeni çalışmalar ile aydınlatılmayı beklemektedir.

2.6. RhoA/ROCK Yolağı İnhibitörü: Fasudil

Rho-kinazların (ROCK) küçük GTPaz ailesinden RhoA'nın ana hedefi olduğu bilinmektedir. Hücrede pek çok yapısal aktivite ile ilişkilendirilen ROCK, seçici inhibitörleri; Y27632 ve Fasudil'in keşfinden sonra ciddi bir çalışma alanı oldu ve daha detaylı şekilde incelendi (Shi and Wei, 2013). Son yıllarda çıkan çalışmalarda ROCK inhibisyonun nörolojik hastalıklar, metabolik hastalıklar ve kanser gibi pek çok hastalığın tedavisi için kullanılabileceği söylenmiştir (Amano ve ark., 2010; Hahmann and Schroeter, 2010; Zhou and Li, 2012).

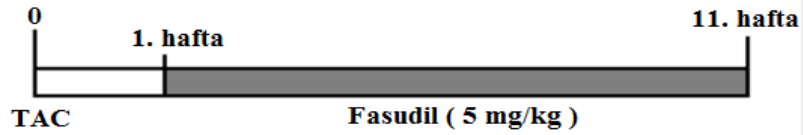
Özellikle vazokonstriktör etkisi olan hastalık modellerinin tedavisinde sıklıkla denenilen, ROCK1 ve ROCK2 ATP-bağımlı kinaz domainini hedef alan fasudil, pek çok kalp hastalığı ilişkilendirilip, çalışılmıştır(Asano ve ark., 1987). Fasudil insan üzerinde kullanılma onayı almış tek ROCK inhibitörüdür(Shibuya ve ark., 1992). Klinik uygulamalarda önemli bir durum olan, kimyasalın diğer ilaç kompleksleri ile uyumu bakımından fasudil özellikle kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde çok büyük bir başarı elde etmiştir. Bu uyumun bazı örnekleri şunlardır; nitrogliserin ile fasudil koroner spazm hastalarında katlanan etki ile vazodilatasyon sağlamıştır(Otsuka ve ark., 2008), imidapril ile fasudil unilateral üreter konstrüksiyon kaynaklı renal intersitesyal fibrosizde azalmaya neden olmuştur(Takeda ve ark., 2010), prostacyclin ile fasudil pulmoner hipertansiyonda anlamlı düzelmeye yol açmıştı(Tawara ve ark., 2007).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı bünyesindeki laboratuvarlarda gerçekleştirilen bu çalışmada 8 haftalık Wistar cinsi 60 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 09.06.2014 tarihli kararına dayanarak, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesinden temin edilen sıçanlar için gruplara ayrılma işlemi yapılmıştır. Ardından sıcaklığı 22 ± 2 °C olan ve 12 saat gün ışığı 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada her bir kafeste en fazla 4 hayvan olacak şekilde su ve yem kısıtlaması olmaksızın tutulmuşlardır.

Sıçanlar çalışmanın başında aort konstriksiyonu yapılacaklar (n=40) ve konstriksiyon yapılmadan, sadece cerrahi operasyon uygulanacak hayvanlar olmak üzere ikiye ayrıldı. Bağlama yapılmadan opere edilen ikinci grup sıçanlar SHAM grubu olarak kullanıldı. Bağlama yapılan sıçanlar ise kendi içlerinde ikiye ayrılarak tedavi uygulanmayan TAK ve fasudil uygulanan TAK (T+F) grupları oluşturuldu.



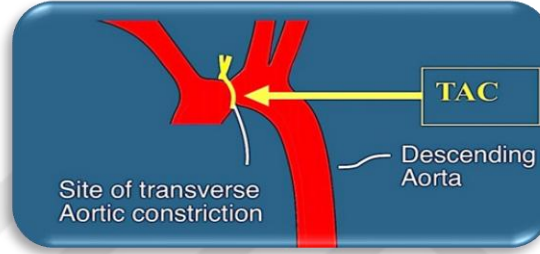
Şekil 3.1. Tedavi grubuna uygulanan fasudil gösterimi

Deneyin başlangıç aşamasında yapılan bu rastgele ayırım ile her biri 20 sıçandan oluşan 3 grup ile deneye başlanmıştır.

- SHAM grubu (n=20)
- TAK grubu (n=20)
- T+F grubu (n=20)

3.2. Transvers Aort Konstriksiyonu

Akdeniz Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Bakım ve Üretim Ünitesi Cerrahi kısmında gerçekleştirilen operasyonlarda sıçanlar izofloran kullanılarak uyulduktan sonra ventilasyon cihazına bağlanarak operasyona hazır hale getirildi. Göğüs kafeslerinin ilk üç kemiği kesilerek aort açığa çıkarıldı ve üzerine 22 G kanül konularak 5-0 iplikle bağlanmak suretiyle aort daraltıldı. Kanül çekildikten sonra göğüs kafesi hızlıca kapatılarak sıçan uyandırıldı.



Şekil 3.2. TAK operasyonunda bağlama yapılan noktanın gösterimi

Operasyonun ardından bir haftalık iyileşme sürecine bırakılan sıçanlara ilk üç gün 32 mg/kg/gün gentamisin ve 4 mg/kg/gün tramadol hidroklorür intramüsküler olarak enjekte edildi. Cerrahi girişimin üzerinden bir hafta geçmesinin ardından sıçanlara gavaj uygulamasına başlandı. 10 hafta boyunca, hafta başında yapılan kilo tartımına göre hesaplanarak, T+F grubuna fasudil, diğer iki gruba ise su verildi.

3.3. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu

Deneysel gruplarında bulunan hayvanların kalpleri anestezi altında (50 mg/kg sodyum pento barbital) hızlı bir şekilde çıkarıldıktan sonra aort kanülasyonu yapılmış Langendorff sistemine bağlanmıştır.

Daha önceki çalışmalarımızda kullandığımız enzimatik yöntem takip edilerek asılı kalpler önce içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 5,8 HEPES; 20 glukoz olan ve pH 7.2 dengesinin sağlanması için % 100 O₂ ile gazlanan, kalsiyumsuz perfüzyon solüsyonu ile 5 dakika yıkanmıştır. Arkasından, kalbin üzerinden 20-25 dakika süresince aynı solüsyon içinde hazırlanmış kollajenaz (Roche, Collagenase A type) (0,7 mg/ml) ve proteaz (0.06 mg/ml) karışımı enzim geçirilip uygun kıvama ulaşıldığında, kalp küçük bir kabın içine

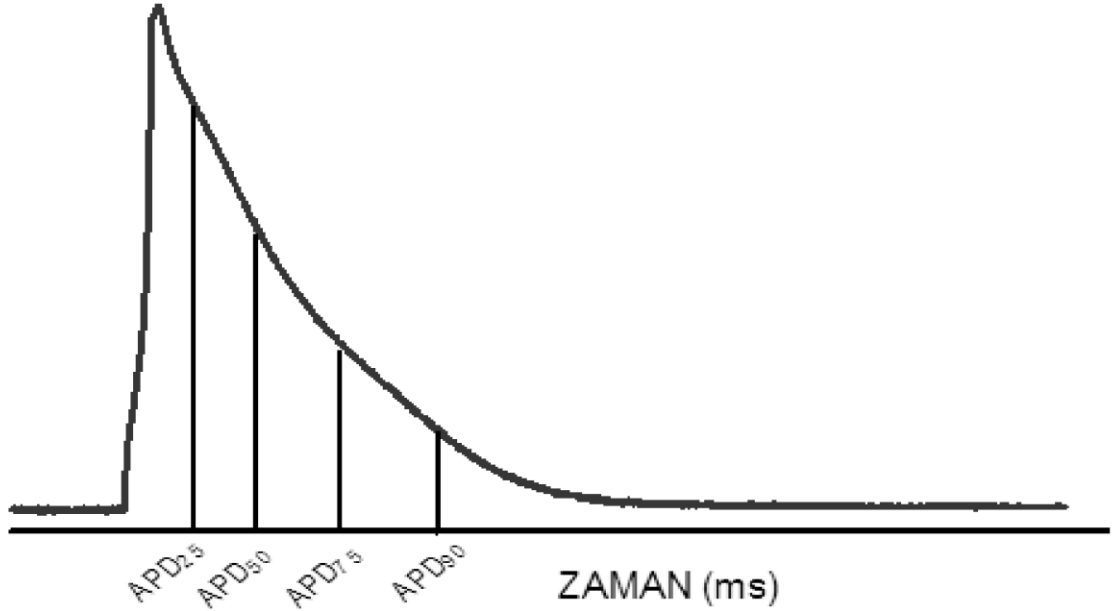
alınmış ve makasla ince bir şekilde dilimlenmiştir. Ardından ince bir filtreden geçirilen hücelere birkaç yıkama işlemi uygulanmıştır. Ortamdaki hücelerin Ca^{2+} adaptasyonu kademeli olarak sağlanmış ve tüm deneylerde sol ventrikül miyositleri kullanılmıştır. Elektrofizyolojik kayıtlar 36 ± 1 °C sıcaklığa ayarlanmış sürekli perfüze edilen hücre banyosunda alınmıştır.



Şekil 3.3. Sıçan kalbi izolasyonunun temel basamakları. Sıçanlar anestezi verilerek bayıldıktan sonra göğüs kafesi hızlı bir şekilde açılarak kalp alınmıştır. Kalp daha sonra Langendorff sistemine bağlanarak retrograd şekilde perfüze edilmiştir. Enzimatik uygulama (kollajenaz ve proteaz) sonrası kollajen doku ve hücre bağlayan yapılar parçalanarak kardiyomiyositler elde edilmiştir

3.4. Aksiyon Potansiyelinin Kaydedilmesi

Çalışmamızda sol ventrikül miyositlerinden AP kayıtları 1 Hz frekansında direnci 2-2.5 M Ω olan elektrotlar yardımıyla yapılmıştır. Pipet içi solüsyon içeriği (mM): 120 KCl; 6,8 MgCl₂; 5 Na₂ATP; 5; 0,4 Na₂GTP; 10 EGTA; 4,7 CaCl₂; 20 HEPES (pH=7,4) olacak şekilde hazırlanmıştır. Aksiyon potansiyeli için akım kenetleme konfigürasyonunda; hücre içine küçük depolarize edici pulslar enjekte edilerek hücrenin uyarılmasıyla membranda oluşan potansiyel değişimleri kaydedilmiştir. Elde edilen AP'nin repolarizasyon süresinin analizi için Şekil 3.4'te görüldüğü gibi tepeden başlayarak repolarizasyonun %25, 50, 75, 90 (APD₂₅, 50, 75, 90)'ına düşme süreleri değerlendirilmiştir.



Şekil 3.4. Sol ventrikül hücrelerden kaydedilen bir AP eğrisi üzerinde ölçülen parametreler. Şekilde AP repolarizasyonunun (tepe değerinden itibaren) %25, 50, 75 ve 90'ına düşmesi için geçen süreler gösterilmektedir.

3.5. Potasyum Akımlarının Kaydedilmesi

Bütün akımlar voltaj kenetleme yönteminin tüm-hücre konfigürasyonunda alınmıştır. Bunun için hücrenin $G\Omega$ düzeyinde direnç oluşturacak şekilde elektrot ucuna yapışması sağlandıktan sonra elektrik pulsu uygulanarak hücre zarı kırılmıştır. Kenetlemeden sonra zar potansiyeli -70 mV düzeyinde 200 ms tutulur ardından -40 mV seviyesinde 200 ms tutulur ve 3 sn'lik pulslar ile ölçüm potansiyeline getirilir. Ardından yine 200 ms -70 mV'a gelinerek kayıt sonlanır. 10 mV'luk basamaklar şeklinde sağlanan artış ile I_{to} için -50 mV'tan 70 mV'a kadar 13 defa uygulanmıştır. I_{K1} içinse -120 mV'tan 10mV'a 13 defa uygulanmıştır. Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Molecular Devices, USA) voltaj kenetleme modunda 3 kHz'lik filtreden geçirilen potasyum akımları, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme hızında pClamp 10 yazılımı (Axon Instrument, Foster C,ty CA, USA) ile kaydedilmiştir.

Kayıt için 1.5-2.5 $M\Omega$ 'luk elektrodlar kullanılırken, kenetleme sonrası giriş direncinin 4 $M\Omega$ ve altında olmasına özen gösterilmiştir. Akım kayıtları için gerekli hücre dışı ortam, solüsyonların kapiller borular aracılığıyla ve yer çekimi yardımıyla direk hücre üzerine uygulanmasını sağlamıştır. Bu akımlar için kullanılan çözeltiler banyo için (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,5 $CaCl_2$; 0,5 $MgCl_2$; 10 Glukoz; 11,8 HEPES (pH=7,35), pipet için ise (mM): 120 K-aspartat; 20 KCl; 10 NaCl; 5 MgATP; 10 K-HEPES (pH=7,2) olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca Ca^{2+} akımlarını bloke etmek için kapiller iç ortama $CdCl_2$ (250 μ M) eklenmiştir. Transient potasyum akımları, akımların tepe değerlerinden 3 sn'lik pulsun son bölümündeki akım değerleri (I_{ss}) çıkarılarak hesaplanmıştır. Daha sonra, akımlar için ölçülen tepe değerleri hücreler arası büyüklük değişiminden kaynaklanabilecek sapmaları önlemek amacıyla hücre sığasına bölünerek akım yoğunluğu cinsinden değerlendirilmiştir.

3.6. Western Blot Yöntemi ve Protein Ekspresyon Analizi

Western Blot yönteminin uygulaması için ayrılan dokular ilk olarak sıvı azot yardımı ile elle ezildiler. Bu aşamanın ardından motorlu bir bıçak yardımı ile sıvı hale gelene kadar parçalandılar. Bu işlem yapılırken Tris-HCl'nin pH'ı 7.4 olarak ayarlandı.. Hazırlanan lizatlar homojenizasyon tamponu (Tris HCl: 20 mmol/L, NaCl: 150mmol/L, KCl: 2 mmol/L, EDTA: 2mmol/L, DDT: 0,5 mmol/L, Sodyum Orthovande 1 mmol/L; NaF: 20 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, Proteaz inhibitörü: 100 mM, NP-40 Tergitol: %2, PMSF: 0,4 mmol/L ve Na

deoksikolat: %1) içerisinde deney gününe kadar -80 °C'ye ayarlanmış derin dondurucuda saklandılar.

WB için deney yapılırken en önemli aşamalardan biri olan numune içindeki protein miktarının tayini aşaması için hazırlanan tüpler içerisine toplam hacim 1 ml olacak şekilde değişken oranlarla örnek, distile su ve CPPA (commasie plus protein assay kit) eklenir. Hazırlanan tüplerden okumanın yapılacağı kuyucuklara 200 µl eklenerek 595 nm'de okuma yapılır. Oluşan standarttan yararlanılarak dokudaki protein konsantrasyonu hesaplandı.

Deney süresince kullanılacak jel yoğunluğuna hedef proteinlerin büyüklüğüne göre karar verildi ve ölçülen tüm proteinleri için %12'lik jelin uygun olduğuna karar verilerek kullanıldı. Jel hazırlanırken kullanılan stok solüsyonların bileşimi şu şekilde; %30 akrilamid + %0.8 bisakrilamidlik solüsyondan 6 ml, pH=8,8 olan 4X Tris Cl/SDS'ten 3,75 ml, bidistile-su 5,25 ml, %10'luk amonyum persulfattan 75 µl, TEMED 15 µl. Antikorların proteinlerin üç boyutlu yapısına entegre olma zorluğundan dolayı denatüre anyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS) ile bir tampon kullanılarak ve ardından bu karışımı 95-100 ° C'de 5 dakika boyunca kaynatarak uygun yapının elde edilmesine çalışıldı. 28,83 gr glycine, 6,06 gr Tris-Base, 2 gr SDS ile hazırlanan 1X tank buffer içerisinde, elektroforez cihazı (Hoefer, USA) ile yapılan voltaj uygulaması iki aşamalı olacak şekilde ayarlandı. Bu aşamalar step-1 80 V'da 30 dakika, step-2 150 V'da 150 dakika şeklinde belirlendi. Kuyucuklardan birine yerleştirilen marker takip edilerek protein bantlarının yeterince ayrıldığına karar verildikten sonra elektroforez işlemi durduruldu.

Protein bantlarının jelden membrana transferi için BioRad marka yarı ıslak transfer cihazı kullanıldı. PVDF membranlar metanol ve transfer buffer (400mL Methanol, 28,85 gr Glycine, 6,6 Tris-Base, 2 gr SDS) içerisinde ıslatıldıktan sonra negatif ve pozitif yüzey gözetilerek stuck(sünger)-membran-jel-sünger olacak yerleştirildi ve proteinlerin büyüklüklerine göre değişen sürelerle membrana transferi sağlandı. Transfer işleminin ardından %3-4 oranında yağsız süt tozu ve TTBS (Tris-Buffered Saline and Tween) buffer (10 mL %20 tween solution, 10 mL pH 7,6 2M tris, 11,68 NaCl) ile hazırlanan solüsyon ile 1 saatlik bloklama işlemi yapıldı.

Ekspresyonu incelenen her bir protein grubu için aynı jel üzerinde ki referans protein olan GAPDH proteini ile kontrol sağlandı. Proteinlere primer ve sekonder antikorlar uygulanırken

yapılan öncü deneyler ve her bir antikorun firma tarafından belirtilen oranlar göz önünde bulunduruldu. GAPDH için bütün deneylerde primer ve sekonderler 1/10000 oranında kullanılırken, diğer proteinlerin her biri için ayrıca primer ve sekonder oranları belirlendi. Daha sonra membranlar BSA (bovine albümin serum) ile hazırlanan TTBS içerisinde primer antikora oda sıcaklığında 2 saat, sekonder antikora oda sıcaklığında 1 saat maruz bırakıldılar. Primer ve sekonder antikorların uygulanması öncesinde, arasında ve ardından membranlar her seferinde çalkalanarak yıkama işlemine tabi tutuldu.

Deney prosedürünün son aşaması sekonder uygulamasının ardından yıkanan membranların ECL (Enhanced Chemiluminescence) ile karanlık bir odada maksimum 5 dakika yavaşça çalkalanması işlemidir. Bu işlemin ardından karanlık oda içerisinde 1/10 oranından hazırlanan developer, 1/5 oranında hazırlanan fiksatif kullanıldı. Görüntülemeye uygun bir kaset içerisinde membran üzerine yerleştirilen film çıkarıldıktan sonra önce developer içerisine alındı. Bantlar belirmeye başlayınca fiksatife alınan film son olarak su ile arındırıldı, kurutuldu ve Image J bilgisayar programı kullanılarak analizi yapıldı.

3.7. Kullanılan Kimyasallar

Fasudil monohydrochloride (LC Laboratories firmasından satın alınmıştır), EDTA, DTT, sodyum orthovande, NaF, proteaz inhibitörü, Na deoksilat, PMSF, metanol, etanol, developer, fiksatif, amonyum persülfat, akrilamit, bisakrilamit, SDS, CaCl₂, glukoz, tris-base, KH₂PO₄, HEPES, MgATP, NaGTP, TEMED, cadmiumchloride, izofloran, NaCl, KCl (Sigma ve Merck markalı ürünler tercih edilmiştir) ve Kollajenaz A (ROCHE firmasından alınmıştır).

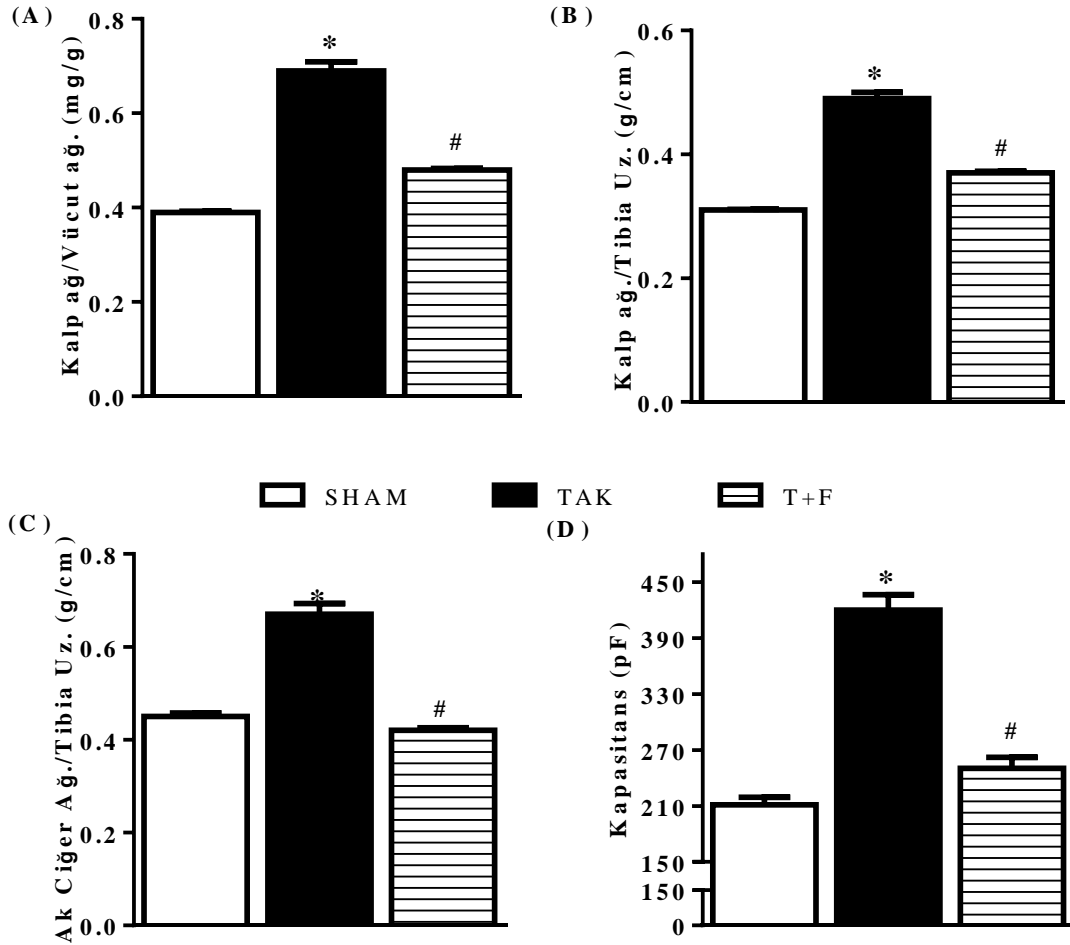
3.8. İstatistiksel Analizler

Deney sonuçlarına dair değerler \pm Sem olarak verilmiştir. Değişkenler için normallik testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uygun veriler için parametrik Tek Yön Varyans Analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey Post Hoc testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uymayan verilere ise Kruskal Wallis Varyans Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır. $p < 0.05$ anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Kardiyak Hipertrofinin Gösterge Parametreleri

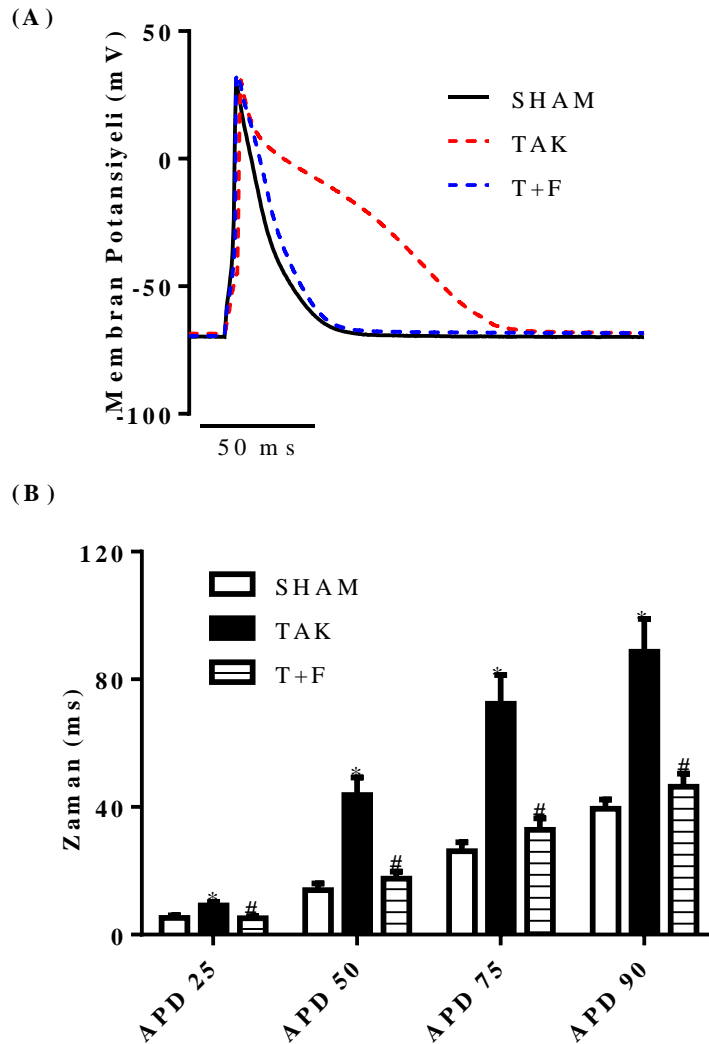
Deney prosedürü sonunda hayvanlar feda edilirken, literatürde kardiyak hipertrofinin gösterge parametreleri olarak kabul edilen fizyolojik bazı parametreler özenle ölçülmüş ve şekil 4.1.'de bar grafik olarak aktarılmıştır. 10 haftalık deney süresinin ardından kalp / vücut ağırlığı, kalp ağırlığı / tibia uzunluğu, ciğer ağırlığı / tibia uzunluğu ve kardiyomiyosit kapasitans oranı TAK grubunda SHAM grubuna göre anlamlı olarak artmış, fasudil ile tedavi gören T+F grubunda ise TAK grubuna göre anlamlı bir düzelme gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Kardiyak hipertrofinin gösterge parametreleri. A) Kalp ağırlığı / Vücut ağırlığı (n=11) B) Kalp Ağırlığı / Tibia uzunluğu (n=11) C) Ciğer Ağırlığı / Tibia uzunluğu (n=11) D) İzole hücrelerden ölçülen membran kapasitansı (n=23). *P<0,05 SHAM grubuna göre; #P<0,05 TAK grubuna göre alınmıştır.

4.2. Hipertrofik Kalplerde Fasudil Uygulamasının AP'ye Etkisi

Basınç artışına dayalı olarak gelişen kardiyak hipertrofinin gözlemlendiği kalplerin sol ventrikül hücrelerindeki APD parametreleri incelenmiştir. Bu parametreler AP'nin tepe noktasından sonra repolarizasyonun ulaştığı dört evredir. Bu evrelere ulaşma süreleri AP'nin tepe değerinden repolarizasyon fazının %25, 50, 75, 90'ına ulaşma zamanı olarak seçilmiştir. Seçilen bu süreler APD₂₅, APD₅₀, APD₇₅, APD₉₀ olarak gösterilmiştir. Kayıtların analizi yapıldığında TAK grubu miyositlerinin repolarizasyon sürelerinde SHAM grubuna göre büyük bir uzama olduğu, T+F grubunda ise bu uzamanın anlamlı düzeyde düzeldiği ve SHAM değerlerine yaklaştığı gözlemlenmiştir. (Şekil 4.2.) (Tablo 1).



Şekil 4.2. Fasudil uygulamasının AP repolarizasyon sürelerine etkisi. A) SHAM (n=32), TAK (n=31) ve T+F (n=34) grubu hayvanlarının izole kalp kasi hücrelerinden elde edilen örnek AP örnekleri. B) AP repolarizasyon sürelerinin gruplara göre değişimini göstermektedir. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. *P<0,05 SHAM grubuna göre; #P<0,05 TAK grubuna göre.)

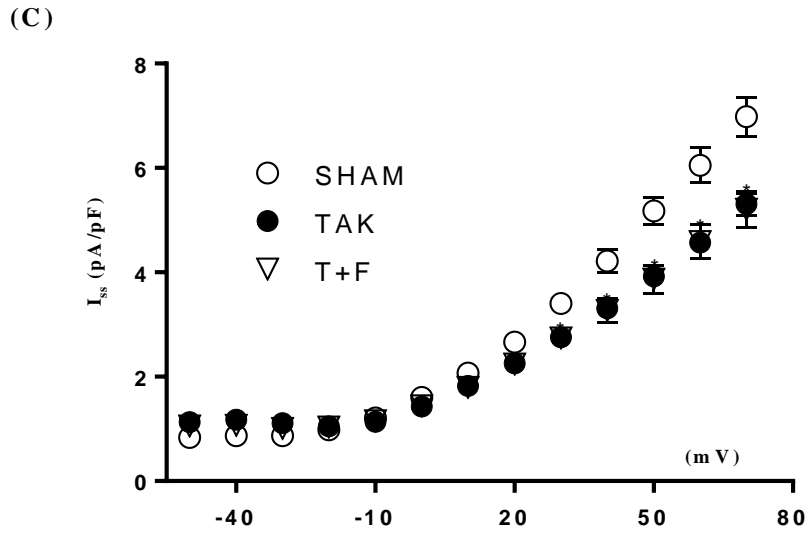
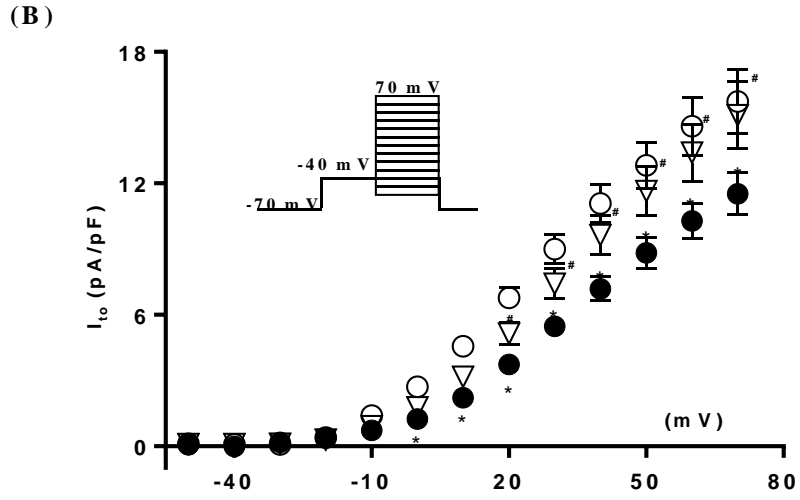
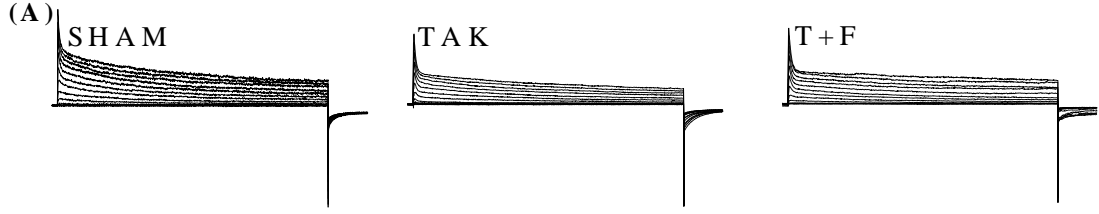
Tablo 1. AP repolarizasyon sürelerinin analiz sonuçları. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir.

	APD ₂₅ (ms)	APD ₅₀ (ms)	APD ₇₅ (ms)	APD ₉₀ (ms)
SHAM	5,21 \pm 0,79	13,95 \pm 2,09	26,19 \pm 2,79	39,46 \pm 2,90
TAK	9,18 \pm 1,05	43,74 \pm 5,50	72,34 \pm 9,05	88,68 \pm 10,28
T+F	5,11 \pm 0,66	17,50 \pm 2,30	32,89 \pm 3,52	46,36 \pm 4,11

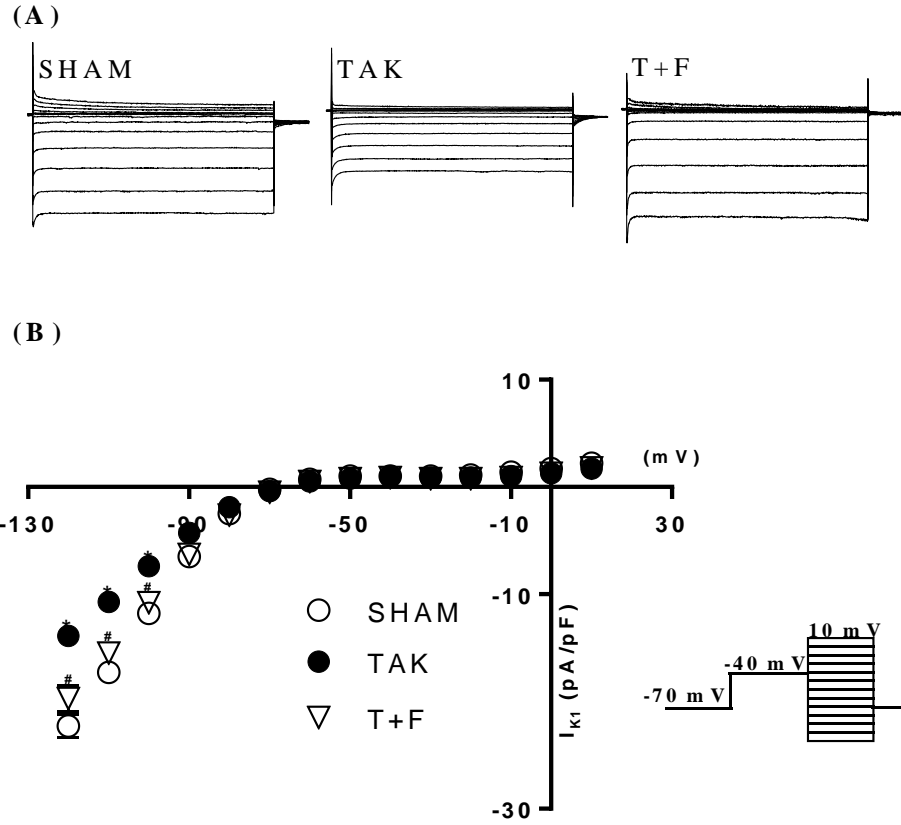
4.3. Hipertrofik Kalplerde Fasudil Uygulamasının Potasyum Akımlarına Etkisi

AP'nin repolarizasyon fazının oluşmasında önemli bir rolü olan potasyum akımları çalışmamızda da I_{to} , I_{ss} ve I_{K1} olmak üzere analiz edilmiş ve gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Bulgularımız Şekil 4.3.'te I_{to} akımının örnekleri ve pA/pF cinsinden I-V grafiği verilmiştir. Bu akımın kaydı sırasında kullanılan protokolda kuyruk akımı olarak nitelenen kısmının I_{ss} akımına tekabül ettiği bilinmektedir. Bu sebeple analiz edilen kuyruk kısmı içinde aynı şekilde pA/pF cinsinden bir I-V grafik verilmiştir. Akımlar tek tek incelendiğinde, I_{to} akım yoğunluklarının TAK grubunda anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir. Yine aynı sonuçlar ışığında fasudil uygulamasının bu akım yoğunluklarını TAK grubuna göre anlamlı şekilde artırarak kontrol seviyesine çektiğini göstermiştir. (SHAM: 15,73 \pm 1,46 pA/pF; TAK: 11,52 \pm 0,95 pA/pF; T+F: 15,11 \pm 1,52 pA/pF, +70 mV'da elde edilen değerlerdir). Aynı şekilde I_{ss} akım yoğunluğu incelendiğinde ise TAK grubunda akım yoğunluğunun anlamlı olarak küçüldüğünü ve fasudil uygulamasının herhangi bir anlamlı değişiklik yaratmadığını gördük. . (SHAM: 6,98 \pm 0,37 pA/pF; TAK: 5,31 \pm 0,21 pA/pF; T+F: 5,21 \pm 0,35 pA/pF, +70 mV'da elde edilen değerlerdir)

AP repolarizasyon süresinin belirlenmesinde oldukça önemli olan ve özellikle AP'nin son kısmında membran dinlenme potansiyelinin belirlenmesinde ciddi rol oynayan I_{K1} akımı kayıtları alınmış ve analiz edilmiştir. Şekil 4.4.'te her gruba ait örnek bir kayıt gösterildi ve ilgili grubun kapasitans değeri ile normalize edilerek bir I-V değişim eğrisi çizildi. Bu eğride ortalama \pm SEM değeri analizi yapıldığında TAK grubunda SHAM grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüştür ve T+F grubunda da TAK grubuna göre anlamlı şekilde artış gözlenmiştir. (SHAM: -22,3 \pm 1,1 pA/pF; TAK: -13,9 \pm 0,3 pA/pF; T+F: -19,7 \pm 1,2 pA/pF, -120 mV'da elde edilen değerlerdir).



Şekil 4.3. Gruplara ait örnek I_{to} örnekleri ve I-V değişim eğrileri. A) Her bir grup için -50 mV ile 70 mV arasında 10 mV'lık artışlarla elde edilen örnek bir I_{to} trasaesi B) I_{to} için pA/pF değerleri ile oluşturulmuş I-V değişim eğrisi. C) I_{ss} için pA/pF değerleri ile oluşturulmuş I-V değişim eğrisi. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir (n=23-24). Grafiklerde TAK grubunun SHAM grubundan farkı * $p < 0,05$ ve T+F grubunun TAK grubundan farkı # $p < 0,05$ ile gösterilmiştir.

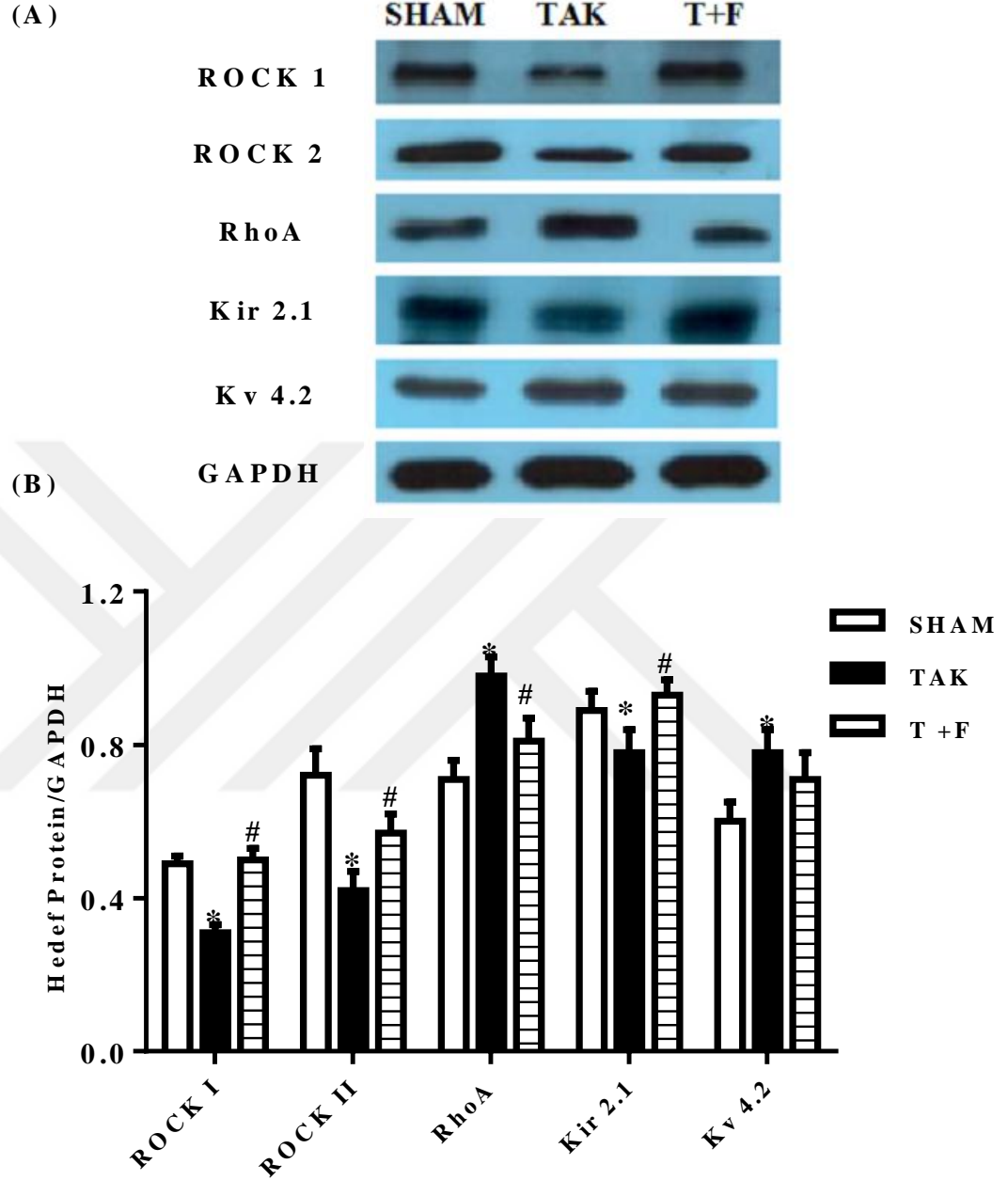


Şekil 4.4. Gruplara ait örnek I_{K1} örnekleri ve I-V değişim eğrileri. A) Her bir grup için -120 mV ile 10mV arasında 10 mV'luk artışlarla elde edilen örnek bir I_{K1} trasaesi B) Alınan kayıtların her bir hücre için kendi kapasitansına bölünerek elde edilen pA/pF değerlerinin ortalaması ile oluşturulmuş I_{K1} I-V değişim eğrisi.. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir (n=23-24). Grafiklerde TAK grubunun SHAM grubundan farkı * $p < 0,05$ ve T+F grubunun TAK grubundan farkı # $p < 0,05$ ile gösterilmiştir.

4.4 Protein Ekspresyonlarının Fasudil Uygulaması ile Değişim

Uzun bir tedavi sürecinin ardından elektrofizyolojik kayıtlar ile hücre bazında iyonik akımlardaki değişimler ve AP değişimini inceledik. Patolojik hipertrofinin oluşturduğu elektrofizyolojik değişikliklere fasudil tedavisinin etkisinin moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarmak için kanal proteinlerinin ve RhoA/ROCK yolağı elemanlarının ekspresyon değişimleri incelendi. Bu proteinler ROCK1, ROCK2 ve RhoA'dır. Bu yolak inhibisyonun ile hücre elektriksel yeniden modellenmesindeki değişimin K^+ kanal proteinlerinin değişimi aracılığıyla olabileceği bilgileri ışığında bakılan iki protein; Kir 2.1 I_{K1} akımının oluşumunu, Kv 4.2 ise I_{to} akımının oluşumunu sağlayan membran proteini olarak kabul görmektedir.

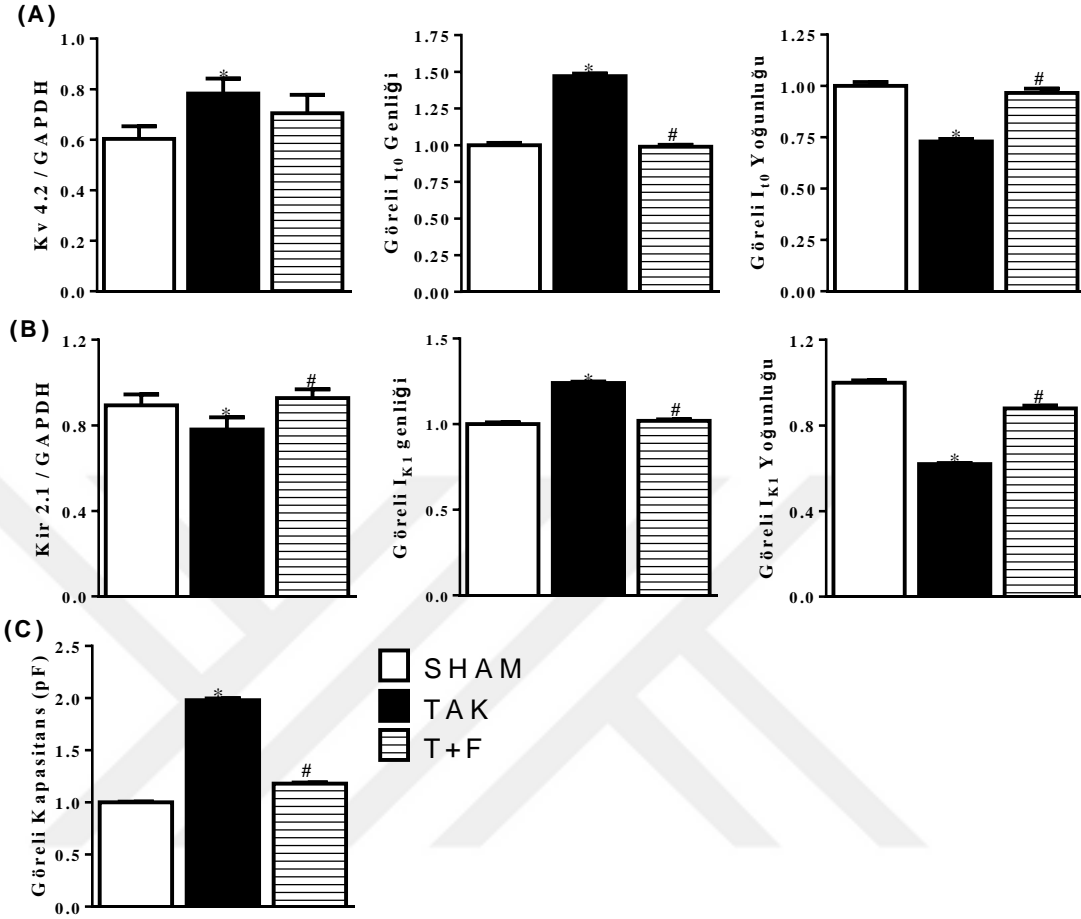
Deneyler sonucunda her bir protein için en az sekiz örneklem kullanılarak elde edilen sonuçların birer örnek bandı Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Bu sonuçları özetlemek gerekirse ROCK 1 ve ROCK 2 TAK grubunda anlamlı şekilde azalmıştır. Buna karşın aynı proteinler fasudil uygulamasının yapıldığı T+F grubunda TAK grubuna göre anlamlı artış göstermiştir. Bu proteinlerin öncüsü konumundaki RhoA ise TAK grubunda SHAM grubuna göre anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bu protein T+F grubunda ise TAK grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır. I_{to} akımından sorumlu gösterilen K^+ kanal proteini Kv 4.2 TAK grubunda anlamlı bir artış göstermiş fakat T+F grubunda TAK grubuna göre anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. I_{K1} akımından sorumlu gösterilen Kir 2.1 proteinin ekspresyon analizi yapıldığında TAK grubunda SHAM grubuna göre anlamlı bir azalma ve T+F grubunda TAK grubuna göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Hedef protein / GAPDH olacak şekilde analiz edilen bantların nümerik değerleri ile bar grafik çizilmiş ve farklar orada gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Western Blot yöntemi ile protein ekspresyonu analizi. A) Ekspresyonu incelenen proteinlerin bant görselleri. B) Hedef Protein / GAPDH oranlarının bar grafik ile gösterimi. Değerler ortalama \pm SEM şeklinde belirlendi, $n=8$ ve $*p<0,05$ SHAM grubuna göre; $\#p<0,05$ TAK grubuna göre alınmıştır.

4.5. Karşılaştırmalı Deney Sonuçları

Elde edilen çok yönlü deney sonuçlarının daha net görünmesi ve yorumlanması için birbiriyle ilişkili sonuçlar belli bir düzene göre bir araya getirildi. Aynı zamanda bu gösterimle protein ekspresyonları ile akım değerleri arasında bir ilişki kurularak, kardiyak hipertrofi sonucunda yükselen kapasitans değerlerinin sonuçlara etkisini değerlendirmek ve doğru çıkarımlar yapmak için ne kadar hayati bir önemi olduğunun anlaşılması hedeflendi. Protein ekspresyon değerleri hariç diğer değerlerin tamamı için SHAM değerleri 1 kabul edilmiş, diğer grupların değeri SHAM grubuna bölünerek değişimin direk olarak SHAM grubu değeri ile karşılaştırılabilmesi amaçlanmıştır. Bu görelî gösterim sayesinde bir grupta ortaya çıkan değişim daha dramatik şekilde gözlenebilecek ve yorumlanmasına olumlu anlamda katkı sağlayacaktır. Şekil 4.6.'da A grubu grafiklerde bu ilişki; I_{10} akım büyüklükleri, görelî sonuçlar ve protein ekspresyon seviyeleri bir arada toplanarak gösterilmiştir. Bu grup grafikler bize SHAM grubuna göre TAK grubunda bir protein ekspresyon artışı gerçekleştiğini gösterse ve bu akım büyüklüklerine de yansısız bile, kapasitans değerleri ile oranlanarak bulunan akım yoğunluğuna bakıldığında TAK grubunda SHAM grubuna göre anlamlı bir azalma, T+F grubunda da TAK grubuna göre anlamlı bir artış vardır. B grubu grafiklerde I_{K1} akım büyüklükleri, görelî sonuçlar ve protein ekspresyon seviyeleri bir arada toplanarak gösterilmiştir. Burada TAK grubunda SHAM grubuna göre Kir 2.1 proteininde ekspresyonun azalmasına rağmen akım büyüklüğünün arttığını fakat yine kapasitans ile oranlandığında bu büyümenin etkisinin yoğunluk değerine yansımadığını görüyoruz. Bir bakışta bütün verileri görelî olarak inceleme imkanı veren Şekil 4.6, hücre morfolojisindeki değişimin bir göstergesi olan kapasitansın, patolojik hipertrofiye elektriksel yeniden modellemeye etkisini net şekilde göstermektedir.



Şekil 4.6. Birbiri ile ilişkili deney sonuçlarının karşılaştırması. A) I_{to} akımından sorumlu olan membran proteinin ekspresyonunun GAPDH'e oranı ve akımın pA değeri ve pA/pF değerinin görel olarak bar grafiği. B) I_{K1} akımından sorumlu olan membran proteinin ekspresyonunun GAPDH'e oranı ve akımın pA değeri ve pA/pF değerinin görel olarak bar grafiği. C) İzole edilmiş kardiyo miyositlerin kapasitanslarının görel olarak gösterimi. TAK grubunun SHAM grubundan farkı * $p < 0,05$ ve T+F grubunun TAK grubundan farkı # $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

Yukarıda bir grafik ile gruplandırılmaya çalışılan toplu sonuçlar aşağıda da bir tablo içerisinde gösterilmiştir. Tablo verilerin daha kolay incelenmesi ve nümerik değerlerinin birbiri ile kolayca karşılaştırılması için hazırlanmıştır.

Tablo 2. Toplu deney sonuçlarının karşılaştırması

	SHAM	TAK	T+F
Kv 4.2 / GAPDH	0,60 ± 0,05	0,78 ± 0,06	0,71 ± 0,07
Görelİ I_{to} Büyüküğü	1,00	0,73 ± 0,06	0,97 ± 0,10
Görelİ I_{to} Yoğunluğu	1,00	1,47 ± 0,09	0,99 ± 0,06
Kir 2.1 / GAPDH	0,89 ± 0,05	0,78 ± 0,06	0,93 ± 0,04
Görelİ I_{K1} Büyüküğü	1,00	1,24 ± 0,04	1,02 ± 0,04
Görelİ I_{K1} Yoğunluğu	1,00	0,62 ± 0,02	0,88 ± 0,06
Görelİ Kapasitans	1,00	1,98 ± 0,08	1,18 ± 0,05

5. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü verileri gösteriyor ki giderek yükselen bir oranla kalp hastalıkları, bulaşıcı olmayan hastalıklardan kaynaklanan ölümlerde birinci sırayı almaktadır(WHO, 2012). Bu istatistiğin karşılığı olarak tüm dünyada bilim insanları kalp hastalıklarını engelleme ya da tedavi etme yöntemleri üzerinde çalışmalara yoğun bir çaba harcamaktadır. Kalp hastalıklarının içerisinde yüksek bir mortalite ve morbidite oranına sahip olan kardiyak hipertrofinin tanımlanması, önlenmesi ve tedavisi için kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır. Küçük G-proteinlerinin detaylı olarak incelenmeye başlanması ve bu proteinlerin hedeflerinin tanımlanmaya başlaması ile bu proteinlerin hedeflerinden olan RhoA ve Rho-kinazların hipertrofide etkili olabileceği fikri çeşitli deneysel modeller kullanılarak yapılan pek çok bilimsel çalışmaya da ilham kaynağı olmuştur(Miyamoto ve ark., 2010; Surma ve ark., 2011). Bu modellerin içinde bu yolağın inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda yer almaktadır(Shi and Wei, 2013).

Sol ventrikül hipertrofisi miyokardiyumun art yük artışına adaptif bir mekanizma ile cevap vermesi sonucu ortaya çıkmaktadır. SVH hipertansiyon, miyokardiyal enfarktüs ve doğuştan gelen bir takım kalp hastalıklarında görüldüğü gibi (Marionneau ve ark., 2008) gebelik süresince ve yoğun egzersiz durumunda da görülebilir (McMullen and Jennings, 2007). Fizyolojik olan SVH yüksek morbidite ve mortalite rakamları ile ilişkilendirilmemesine rağmen patolojik SVH tutarlı biçimde ventriküler AP süresinin uzamasına ve repolarizasyon sürecinin dağılımının değişmesine yol açmaktadır. Her iki değişiklik de kalpte elektriksel düzensizlik ve ölümcül aritmilerin gelişmesinde önemli rol üstlenmektedir (Nattel ve ark., 2007). Pek çok çalışma, ventriküler AP'de gerçekleşen bu değişimlerin en azından bir kısmının kaynağının K^+ kanalları aracılığıyla bir elektriksel değişim olduğunu söylemektedir (Armoundas ve ark., 2001; Nattel ve ark., 2007).

Basınç yüklemesine dayalı SVH dahil çok sayıda deneysel hipertrofi modeli kullanılarak, K^+ akımlarındaki yeniden modellenmenin altında yatan mekanizma çözülmeye çalışılmıştır (Volk ve ark., 2001; Wang ve ark., 2007). Bölgesel farklılıklara dayalı bazı sonuçlara varılsa da, moleküler ve hücre bazda az sayıda çalışma anlamlı

noktalara ulaşabilmiştir (Näbauer ve ark., 1996; Zicha ve ark., 2004). Bu bilgilerin ışığında çalışmamızda, sıçanlarda aort daraltmasına bağlı basınç yüklemesine dayalı SVH modeli oluşturularak, seçici bir RhoA/ROCK yolağı inhibitörü olan fasudilin kronik uygulamasının, patolojik hipertrofiye bağlı AP süresi uzaması ve K⁺ akımlarındaki elektriksel yeniden modellenmeyi engellemede etkili olup olmadığı deneysel metotlarla incelenmiştir.

Geniş kapsamlı çalışmamızda elde edilen ilk sonuçlar olan kalp ağırlığı/vücut ağırlığı ve kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranları bize kardiyak hipertrofinin modelimizde başarılı şekilde oluşturulduğunu göstermektedir. Bu verilerin kardiyak hipertrofi sonucunda anlamlı artış gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir(Collins ve ark., 2001; Devereux ve ark., 1986; Songstad ve ark., 2014). Literatür ile benzer şekilde 10 haftalık deney prosedürünün sonunda TAK grubunda anlamlı şekilde bir artış görüldü. Fasudil uygulamasının yapıldığı T+F grubunda ise değerlerin TAK grubundan anlamlı şekilde düşük ve SHAM grubuna oldukça yakın olduğu görüldü (Şekil 4.1). Bir elektrofizyolojik gösterge kabul edilen tüm hücre kapasitansının geçmişte yapılan çalışmalarda hipertrofi durumunda arttığı söylenmiştir (Marionneau ve ark., 2008). Bizimde çalışmamızda hücrenin yapısal olarak büyüdüğünün göstergesi kabul edilen hücre kapasitans ölçümlerimizde TAK grubunda nerdeyse iki katına varan artış olurken, T+F grubunda fasudil tedavisinin bu büyümeyi belirgin şekilde baskıladığını gözlemledik (Şekil 4.1). İlk aşamada bu sonuçlar fasudil uygulamasının hipertrofiyi önemli düzeyde engellediğini göstermektedir.

Patolojik kardiyak hipertrofi karmaşık elektrofizyolojik ve moleküler değişikliklerle ilişkilidir. Hücresel anlamda, kardiyak hipertrofinin pek çok deneysel modelinde AP süresinin uzadığı tespit edilmiştir. Bu uzama genel olarak ilgili tüm araştırmacılar tarafından bir hipertrofi belirteci olarak kabul görmüştür (Kaprielian ve ark., 1999; Kääb ve ark., 1998; Tomaselli and Marbán, 1999). Bizim deneylerimizde de TAK grubunda AP süresi anlamlı şekilde uzamış ve T+F grubunda bu sürenin azalarak SHAM grubuna ait AP sürelerine yaklaştığı gözlenmiştir(Şekil 4.2). Bu sonuçlar gösteriyor ki, hipertrofinin elektrofizyolojik göstergeleri olarak kabul edilen iki veri içinde bizim çalışmamızda başarılı bir hipertrofi modeli oluşturulmuştur. Yine uzun süreli fasudil

uygulamasının bu sonuçları SHAM seviyesine getirerek bu noktada hipertrofinin etkilerini yok ettiğini söylenebilir.

AP süresinin uzamasının altında yatan neden araştırıldığında repolarizasyon karakteristiğini önemli şekilde etkileyen Ca^{2+} dan bağımsız potasyum akımları olarak da bilinen I_{to} akımının önemi geçmiş çalışmalarda bildirilmiştir. Bunun yanında bu etkiye Kir ailesinin sorumlu olduğu I_{K1} akımlarının da dâhil olduğu kimi çalışmalarda bildirilmiştir (Bailly ve ark., 1997; Kääb ve ark., 1998; Takimoto ve ark., 1997). Bizim çalışmamızda bu akımlar iki yöntem ile incelendi. Birincisi elektrofizyolojik kayıtlar. Bu kayıtların sonuçlarına bakıldığında I_{to} ve I_{K1} akımlarının yoğunluklarının TAK grubunda azaldığını gözlemliyoruz. Bu bulgular literatür verileri ile uyumlu olup SHAM grubundan anlamlı olarak fark göstermektedir. Her iki akımın da yoğunlukları T+F grubu kayıtlarında SHAM grubuna yakın değerlere geri dönmektedir (Şekil 4.3 ve 4.4). Bu sonuçların yanı sıra dikkat çeken bir diğer nokta da; bu akımların kapasitans değerlerine normalize edilmeyen büyüklükleri incelendiğinde (Şekil 4.6) TAK grubunda I_{to} 'nun neredeyse %50, I_{K1} 'in ise %30 arttığı görülmektedir. Bu değerler fasudil uygulamasının yapıldığı T+F grubunda ise SHAM seviyelerine yaklaşmıştır. Bu akımların içinde bulunduğu elektriksel yeniden modellemeyi bu akımların oluşmasını sağlayan kanal proteinlerinin ekspresyon seviyesini incelemekten açıklamak mümkün olmadığından, bu akımlardan sorumlu olduğu kabul edilen proteinler Kv4.2 ve Kir2.1'in ekspresyonları belirlendi(Guo ve ark., 2005; Guo ve ark., 2002; Zaritsky ve ark., 2001). Bu sonuçlara bakıldığında protein ekspresyonunun Kv4.2 için TAK grubunda anlamlı şekilde arttığı fakat T+F grubunda TAK grubundan anlamlı düzeyde farklı olmadığı görülmüştür. Kir2.1 protein ekspresyonu için elde edilen sonuçlardan ise TAK grubunda anlamlı bir azalmanın olduğu, T+F grubunda ise bu azalmanın düzeldiği ve belirgin bir artmanın söz konusu olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar toplu şekilde incelendiğinde ortaya çıkan tablo bizi I_{to} ve I_{K1} akımları için benzer fakat farklı iki noktaya götürmektedir. I_{to} ile ilgili sonuçlar ışığında hücrenin deney prosedürü neticesinde kalpte oluşan hipertrofiye yanıt vermeye çalışarak Kv4.2 protein ekspresyonunu arttırdığını ve buna bağlı olarak akım büyüklüğünün de arttığını görebiliriz. Aynı zamanda bu değerlerin uzun süreli fasudil

uygulamasını ile SHAM seviyelerine dönme eğilimi gösterdiğini söyleyebiliriz. Ancak hipertrofik bir hücrede elektriksel yeniden modellenmenin önemli unsurunun akımın yoğunluğu olduğu kabul gören bir durumdur. Bu verilere bakıldığında TAK grubunda I_{to} akım yoğunluğunun anlamlı şekilde azaldığını T+F grubunda ise SHAM seviyelerine döndüğünü görüyoruz. Bu veriler ışığında I_{to} akımları için hücrenin kapasitans artışının, protein ekspresyonu ve ona bağlı akım büyüklüğü artışı ile kompanse edilemeyecek kadar büyük olduğu sonucuna varabiliriz. Buna ilaveten fasudil uygulamasının hücre kapasitansın da belirgin şekilde yarattığı değişim I_{to} akımını normal seviyeye döndürmüştür.

I_{K1} akımlarından sorumlu Kir2.1 proteininin ekspresyonunun TAK grubunda azalması, bu grubun akım büyüklüğünün artışı engelleyememiştir (Şekil 4.6). Protein ekspresyonundaki azalmaya rağmen akım büyüklüğündeki artışın mekanizmasının açıklanması yeni bir takım çalışmalara konu olabilecek bir durumdur. Akım yoğunluğuna bakıldığında yine akım büyüklüğündeki artışın kapasitans artışını kompanse etmekten çok uzak olduğunu ve kapasitansın yani hücre büyüklüğünün, bu akımın hücre elektriksel yeniden modellenmesine katkısında majör rol oynadığını göstermektedir. Sonuçlarımız göstermiştir ki bu kadar belirgin ve anlamlı farkların olduğu bir deney prosedüründe fasudil uygulaması yapılmış olan T+F grubunda bu değerlerin de SHAM grubuna yakın noktaya gelmesi, hipertrofi nedeni ile oluşan AP süresindeki değişimin düzelmesi ile doğrudan ilişkilendirilebilir.

Patolojik hipertrofinin etiyolojisinde RhoA/ROCK yolağının aktivitesindeki artışın önemli rol oynadığı ve bu yolağın inhibisyonunun önemli terapötik etkilerinin olacağı pek çok çalışmada belirtilmiştir.(Li ve ark., 2012; Nour-Eldine ve ark., 2016; Surma ve ark., 2011). Bu bağlamda bizde çalışmamızda bu yolağın proteinlerinin ekspresyonlarını belirleyerek patolojik hipertrofide değişiklik olup olmadığını ve fasudil tedavisinin olası değişikliklere etkisini inceledik (Şekil 4.5). RhoA için ekspresyon seviyesine bakıldığında TAK grubunda anlamlı bir artış olduğu fasudil tedavisinin ise bu artışı baskıladığı belirlenmiştir. Bu proteinin RhoA/ROCK yolağının ilk basamağını oluşturan protein olduğu düşünüldüğünde ROCK1&2 proteinleri için de ekspresyon miktarlarının artması beklenir. Bu proteinlerin sonuçlarına baktığımızda ise hem ROCK1 hem de

ROCK 2 miktarlarının TAK grubunda azaldığı, buna karşın T+F grubunda TAK grubuna göre artmış olduğu gözlenmiştir. Literatürde aktivasyon artışına vurgu yapılan RhoA/ROCK yolağının proteinleri ROCK1 ve ROCK2'nin protein ekspresyon seviyelerinin çalışmamızda azalmış olarak bulunması herhangi bir çelişki yaratmamaktadır. Yapılan çalışmalarda protein miktarı azalsa bile aktivasyonun artabileceği gösterilmiştir (Brown ve ark., 2006; Yanazume ve ark., 2002).

Son derece karmaşık bir yapıya sahip olan ROCK proteinlerinin aktivasyonlarını üzerlerinde bulunan Rho-bağlanma bölgesi aracılığı ile sağlayıp, alt hedeflerine C-terminalleri aracılığıyla ulaşmaktadırlar(Riento and Ridley, 2003). Yine aynı çalışmada Riento ve Ridley ROCK klevajlarının da kendi başlarına aktivite gösterebileceğini söylemişlerdir. Başka bir farmakolojik çalışmada ROCK seviyesinin TAK yapıldıktan hemen sonra arttığı ama zaman içinde azaldığı gösterilmiş, aynı çalışmada ROCK klevajlarının hücrede miyoflamentlere yakın bölgede yoğun şekilde bulunduğu tespit edilmiştir(Torsoni ve ark., 2003). Sebbagh ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, kaspaz kaynaklı ROCK 1 klevajlarının sorumlu olduğu MLC fosforilasyonun apoptotik süreçte oluşan zar baloncuklarının nedeni olduğunu ortaya koymuştur(Sebbagh ve ark., 2001). Yine bir başka çalışmada ROCK 2'nin klevajlarının ROCK 1 ile benzer şekilde 130 kDa civarı görüldüğü tespit edilmiş, ancak bu klevajların yapısının ROCK 1'den farklı olduğu ve farklı duyarlılıkları olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada ROCK 2'nin klevajlarının aktivasyonunu belirlemek için yapılan çalışmalar sonucu, ROCK 2'nde MLC fosforilasyon artışına neden olduğu ve aktivitesini artırabildiği gösterilmiştir(Sebbagh ve ark., 2005). Farklı bir çalışmada da ROCK 1 klevajlarının kaspaz-3 aracılı aktivasyonu neticesinde miyofibril artışı olduğu ve bunu kalbi patolojiye götürdüğü söylenmiştir(Chang ve ark., 2006).

Sonuç olarak tüm veriler bir süzgeçten geçirildiğinde, fizyolojik göstergelerin ortadan kalktığını gösterdiği kardiyak hipertrofi, elektrofizyolojik ve moleküler olarak incelenmiş, TAK yapılan hayvan gruplarında fasudil uygulaması ile neredeyse tüm sonuçların önemli miktarda düzeldiği gözlenmiştir. Hipertrofinin oluşmuş olması göz önünde bulundurulduğunda, literatür bize protein tayini sonuçlarımıza rağmen TAK ile birlikte ROCK aktivitesinin arttığı söyleme imkanı verebilmektedir. AP süresindeki

uzama ile kendini gösteren elektriksel yeniden modellenmede K^+ akımlarının etkin rol oynadığı, fasudil uygulaması ile ortadan kalkan değişimler neticesinde söylenebilir. Hipertrofi kaynaklı bu değişim sonucu, hücrenin kendini adapte etmesi ve bu adaptasyonun sonuçlarının fasudil uygulaması ile ortadan kalkması, hem RhoA/ROCK yolağının basınç yüklemesine dayalı patolojik hipertrofi modelinde etkili olduğunu hem de bu inhibisyonun K^+ iyon kanallarını etkilediği ve bu yolla AP süresini değiştirdiğini gösterir. İyon kanalları üzerinde bu değişimi hangi mekanizma üzerinden gerçekleştirdiği araştırılması gereken bir konu olan RhoA/ROCK yolağı inhibisyonunun, bu çalışma ile ilk defa patolojik hipertrofi modelinde K^+ kanallarına etkisi sıçanlar üzerinde incelenmiştir. Bu çalışmanın literatüre sağladığı katkı ile gelecekte RhoA/ROCK yolağı inhibisyonunun olası terapötik uygulamalarda düşünülmesi söz konusu olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, cerrahi olarak aort daraltılmasına maruz bırakılan sıçanlarda oluşan, basınç yüklemesine dayalı patolojik kardiyak hipertrofi durumunda RhoA/ROCK yolağı inhibisyonunun etkileri çeşitli yöntemlerle incelenmiştir. Bu amaçla hayvanlara 10 hafta boyunca seçici RhoA/ROCK yolağı inhibitörü olan fasudil uygulanmıştır. Bu kapsamlı çalışmanın sonuçları şu şekilde özetlenebilir;

- Yapılan operasyon neticesinde sıçan kalplerinde başarılı şekilde hipertrofi gerçekleşmiş ve bu durum fizyolojik parametreler ile gösterilmiştir.
- Kardiyak hipertrofinin gösterge parametreleri kabul edilen kalp/vücut ağırlığı ve kalp ağırlığı/tibia gibi parametrelerde fasudil uygulaması yapılan T+F grubunda ciddi düzelme gözlenmiştir.
- Hipertrofiyle ilişkili olarak AP süresinin uzaması, K^+ akımlarının baskılanması ve fasudil tedavisi ile geri döndürülmesi hipertrofide uyarılma-kasılma çiftleniminde meydana gelen elektrofizyolojik değişikliklerde RhoA/ROCK yolağının önemli rolü olduğunu göstermektedir.
- Hipertrofi nedeniyle protein ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimler ve bu değişimlerin fasudil uygulaması ile kontrol seviyelerine yaklaşması ya da dönmesi RhoA/ROCK yolağının moleküler bazda bir takım değişiklikler ile bu süreçte önemli etkisi olduğunu göstermektedir.

Özetle elde ettiğimiz bulgular, kardiyak hipertrofide uzun süreli RhoA/ROCK inhibitörü fasudil uygulamasının gerek fizyolojik parametrelerde, gerekse elektrofizyolojik ölçümler ve protein seviyelerinde belirgin bir iyileşmeye yol açtığını göstermektedir. Bu sonuçlar ışığında fasudil ve benzeri ROCK inhibitörlerinin patolojik hipertrofi de bir tedavi aracı olarak kullanılabileceği söylenebilir. Ancak bu sonuçları kuvvetli bir şekilde teyid etmek için filogenetik açıdan insana yakın özellikler taşıyan daha gelişmiş deney modellerinde benzer çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Algalarrondo V, Nattel S. 2016. Potassium Channel Remodeling in Heart Disease. *Card Electrophysiol Clin* 8(2):337-347.
- Amano M, Mukai H, Ono Y, Chihara K, Matsui T, Hamajima Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. 1996. Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* 271(5249):648-650.
- Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. 2010. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67(9):545-554.
- Antoons G, Willems R, Sipido KR. 2012. Alternative strategies in arrhythmia therapy: evaluation of Na/Ca exchange as an anti-arrhythmic target. *Pharmacol Ther* 134(1):26-42.
- Armoundas AA, Wu R, Juang G, Marbán E, Tomaselli GF. 2001. Electrical and structural remodeling of the failing ventricle. *Pharmacol Ther* 92(2-3):213-230.
- Asano T, Ikegaki I, Satoh S, Suzuki Y, Shibuya M, Takayasu M, Hidaka H. 1987. Mechanism of action of a novel antivasospasm drug, HA1077. *J Pharmacol Exp Ther* 241(3):1033-1040.
- Bailly P, Bénitah JP, Mouchonière M, Vassort G, Lorente P. 1997. Regional alteration of the transient outward current in human left ventricular septum during compensated hypertrophy. *Circulation* 96(4):1266-1274.
- Bers DM. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415(6868):198-205.
- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. 1993. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 73(2):379-385.

- Boulaksil M, Noorman M, Engelen MA, van Veen TA, Vos MA, de Bakker JM, van Rijen HV. 2010. Longitudinal arrhythmogenic remodelling in a mouse model of longstanding pressure overload. *Neth Heart J* 18(10):509-515.
- Brahmajothi MV, Campbell DL, Rasmusson RL, Morales MJ, Trimmer JS, Nerbonne JM, Strauss HC. 1999. Distinct transient outward potassium current (Ito) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 113(4):581-600.
- Brown JH, Del Re DP, Sussman MA. 2006. The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res* 98(6):730-742.
- Chang J, Xie M, Shah VR, Schneider MD, Entman ML, Wei L, Schwartz RJ. 2006. Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(39):14495-14500.
- Collins KA, Korcarz CE, Shroff SG, Bednarz JE, Fentzke RC, Lin H, Leiden JM, Lang RM. 2001. Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(5):H1954-1962.
- deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. 2010. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp*(38).
- Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N. 1986. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 57(6):450-458.
- Dhanasekaran N, Dermott JM. 1996. Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal* 8(4):235-245.
- Dong M, Liao JK, Fang F, Lee AP, Yan BP, Liu M, Yu CM. 2012. Increased Rho kinase activity in congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 14(9):965-973.

- Dong M, Yan BP, Liao JK, Lam YY, Yip GW, Yu CM. 2010. Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Discov Today* 15(15-16):622-629.
- Dorsam RT, Gutkind JS. 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7(2):79-94.
- Fabiato A, Fabiato F. 1979. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* 41:473-484.
- Grubb S, Aistrup GL, Koivumäki JT, Speerschneider T, Gottlieb LA, Mutsaers NA, Olesen SP, Calloe K, Thomsen MB. 2015. Preservation of cardiac function by prolonged action potentials in mice deficient of KChIP2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309(3):H481-489.
- Guan SJ, Ma ZH, Wu YL, Zhang JP, Liang F, Weiss JW, Guo QY, Wang JY, Ji ES, Chu L. 2012. Long-term administration of fasudil improves cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 50(6):1874-1882.
- Guo W, Jung WE, Marionneau C, Aimond F, Xu H, Yamada KA, Schwarz TL, Demolombe S, Nerbonne JM. 2005. Targeted deletion of Kv4.2 eliminates I_(to,f) and results in electrical and molecular remodeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction. *Circ Res* 97(12):1342-1350.
- Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS, Nerbonne JM. 2002. Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ Res* 90(5):586-593.
- Hahmann C, Schroeter T. 2010. Rho-kinase inhibitors as therapeutics: from pan inhibition to isoform selectivity. *Cell Mol Life Sci* 67(2):171-177.
- Hall GA. 2012. *Textbook of Medical Physiology*: ELSEVIER.
- Hasenfuss G, Pieske B. 2002. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 34(8):951-969.

- Hepler JR, Gilman AG. 1992. G proteins. *Trends Biochem Sci* 17(10):383-387.
- Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, Ichiki T, Takahashi S, Takeshita A. 2003. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res* 93(8):767-775.
- Hill JA. 2003. Electrical remodeling in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med* 13(8):316-322.
- Hoshijima M, Sah VP, Wang Y, Chien KR, Brown JH. 1998. The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho kinase. *J Biol Chem* 273(13):7725-7730.
- Irisawa H, Brown HF, Giles W. 1993. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* 73(1):197-227.
- Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri Z, Parker TG, Liu PP, Backx PH. 1999. Relationship between K⁺ channel down-regulation and [Ca²⁺]_i in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 517 (Pt 1):229-245.
- Kehat I, Molkentin JD. 2010. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* 122(25):2727-2735.
- Kolakowski LF. 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2(1):1-7.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. 1993. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362(6416):127-133.
- Kuwahara K, Saito Y, Nakagawa O, Kishimoto I, Harada M, Ogawa E, Miyamoto Y, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. 1999. The effects of the selective ROCK inhibitor, Y27632,

on ET-1-induced hypertrophic response in neonatal rat cardiac myocytes-- possible involvement of Rho/ROCK pathway in cardiac muscle cell hypertrophy. *FEBS Lett* 452(3):314-318.

Kääb S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. 1998. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 98(14):1383-1393.

Landry Y, Gies JP. 2002. Heterotrimeric G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling, a base for drug discovery. *Mini Rev Med Chem* 2(4):361-372.

Lebeche D, Kaprielian R, Hajjar R. 2006. Modulation of action potential duration on myocyte hypertrophic pathways. *J Mol Cell Cardiol* 40(5):725-735.

Lee YS, Hwang M, Song JS, Li C, Joung B, Sobie EA, Pak HN. 2016. The Contribution of Ionic Currents to Rate-Dependent Action Potential Duration and Pattern of Reentry in a Mathematical Model of Human Atrial Fibrillation. *PLoS One* 11(3):e0150779.

Levy D, Anderson KM, Savage DD, Kannel WB, Christiansen JC, Castelli WP. 1988. Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 108(1):7-13.

Li Q, Xu Y, Li X, Guo Y, Liu G. 2012. Inhibition of Rho-kinase ameliorates myocardial remodeling and fibrosis in pressure overload and myocardial infarction: role of TGF- β 1-TAK1. *Toxicol Lett* 211(2):91-97.

Lieb W, Mayer B, Stritzke J, Doering A, Hense HW, Loewel H, Erdmann J, Schunkert H. 2006. Association of low-grade urinary albumin excretion with left ventricular hypertrophy in the general population: the MONICA/KORA

- Augsburg Echocardiographic Substudy. *Nephrol Dial Transplant* 21(10):2780-2787.
- Lin G, Craig GP, Zhang L, Yuen VG, Allard M, McNeill JH, MacLeod KM. 2007. Acute inhibition of Rho-kinase improves cardiac contractile function in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Res* 75(1):51-58.
- Liu WJ, Deng JX, Wang G, Gao KP, Lin ZX, Liu SY, Wang YH, Liu J. 2015. Manipulation of KCNE2 expression modulates action potential duration and Ito and IK in rat and mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309(8):H1288-1302.
- Maillet M, van Berlo JH, Molkenin JD. 2013. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(1):38-48.
- Marionneau C, Brunet S, Flagg TP, Pilgram TK, Demolombe S, Nerbonne JM. 2008. Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K⁺ currents with left ventricular hypertrophy. *Circ Res* 102(11):1406-1415.
- Maron BJ, Roberts WC. 2007. Barry Joel Maron, MD: a conversation with the Editor. Interview by William Clifford Roberts. *Am J Cardiol* 99(9):1334-1349.
- Maron BJ, Thompson PD, Ackerman MJ, Balady G, Berger S, Cohen D, Dimeff R, Douglas PS, Glover DW, Hutter AM, Krauss MD, Maron MS, Mitten MJ, Roberts WO, Puffer JC, American Heart Association Council on Nutrition PyA, and Metabolism. 2007. Recommendations and considerations related to preparticipation screening for cardiovascular abnormalities in competitive athletes: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation. *Circulation* 115(12):1643-1455.

- Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A. 2001. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension* 38(6):1307-1310.
- Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. 1996. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 15(9):2208-2216.
- Mattera R, Graziano MP, Yatani A, Zhou Z, Graf R, Codina J, Birnbaumer L, Gilman AG, Brown AM. 1989. Splice variants of the alpha subunit of the G protein Gs activate both adenylyl cyclase and calcium channels. *Science* 243(4892):804-807.
- McMullen JR, Jennings GL. 2007. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(4):255-262.
- Miyamoto S, Del Re DP, Xiang SY, Zhao X, Florholmen G, Brown JH. 2010. Revisited and revised: is RhoA always a villain in cardiac pathophysiology? *J Cardiovasc Transl Res* 3(4):330-343.
- Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, Kaibuchi K, Takeshita A. 2001. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J* 15(6):1062-1064.
- Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. 1996. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 392(2):189-193.
- Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. 2007. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 87(2):425-456.

- Nerbonne JM. 2000. Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 525 Pt 2:285-298.
- Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D. 2001. Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circ Res* 89(11):944-956.
- Neumann E, Khawaja K, Müller-Ladner U. 2014. G protein-coupled receptors in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol* 10(7):429-436.
- Nour-Eldine W, Ghantous CM, Zibara K, Dib L, Issaa H, Itani HA, El-Zein N, Zeidan A. 2016. Adiponectin Attenuates Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Remodeling through Nitric Oxide and the RhoA/ROCK Pathway. *Front Pharmacol* 7:86.
- Nunes KP, Rigsby CS, Webb RC. 2010. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: what is the link? *Cell Mol Life Sci* 67(22):3823-3836.
- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, Steinbeck G. 1996. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 93(1):168-177.
- Otsuka T, Ibuki C, Suzuki T, Ishii K, Yoshida H, Kodani E, Kusama Y, Atarashi H, Kishida H, Takano T, Mizuno K. 2008. Administration of the Rho-kinase inhibitor, fasudil, following nitroglycerin additionally dilates the site of coronary spasm in patients with vasospastic angina. *Coron Artery Dis* 19(2):105-110.
- Patel TB. 2004. Single transmembrane spanning heterotrimeric G protein-coupled receptors and their signaling cascades. *Pharmacol Rev* 56(3):371-385.
- Phrommintikul A, Tran L, Kompa A, Wang B, Adrahtas A, Cantwell D, Kelly DJ, Krum H. 2008. Effects of a Rho kinase inhibitor on pressure overload induced cardiac hypertrophy and associated diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(4):H1804-1814.

- Pitt GS, Dun W, Boyden PA. 2006. Remodeled cardiac calcium channels. *J Mol Cell Cardiol* 41(3):373-388.
- Qi XY, Huang H, Ordog B, Luo X, Naud P, Sun Y, Wu CT, Dawson K, Tadevosyan A, Chen Y, Harada M, Dobrev D, Nattel S. 2015. Fibroblast inward-rectifier potassium current upregulation in profibrillatory atrial remodeling. *Circ Res* 116(5):836-845.
- Rashid M, Tawara S, Fukumoto Y, Seto M, Yano K, Shimokawa H. 2009. Importance of Rac1 signaling pathway inhibition in the pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Circ J* 73(2):361-370.
- Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer WJ, Marks AR. 2003. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem* 278(1):444-453.
- Ren J, Fang CX. 2005. Small guanine nucleotide-binding protein Rho and myocardial function. *Acta Pharmacol Sin* 26(3):279-285.
- Reuther GW, Der CJ. 2000. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* 12(2):157-165.
- Riento K, Ridley AJ. 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(6):446-456.
- Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross J, Chien KR. 1991. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(18):8277-8281.
- Schubert B, VanDongen AM, Kirsch GE, Brown AM. 1989. Beta-adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. *Science* 245(4917):516-519.

- Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E, Bréard J. 2005. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med* 201(3):465-471.
- Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J. 2001. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3(4):346-352.
- Shi J, Wei L. 2007. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 55(2):61-75.
- Shi J, Wei L. 2013. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology: the effect of fasudil. *J Cardiovasc Pharmacol* 62(4):341-354.
- Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, Takakura K, Nagata I, Kikuchi H, Takemae T, Hidaka H. 1992. Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *J Neurosurg* 76(4):571-577.
- Songstad NT, Johansen D, How OJ, Kaaresen PI, Ytrehus K, Acharya G. 2014. Effect of transverse aortic constriction on cardiac structure, function and gene expression in pregnant rats. *PLoS One* 9(2):e89559.
- Stryer L. 1986. Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci* 9:87-119.
- Surma M, Wei L, Shi J. 2011. Rho kinase as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Future Cardiol* 7(5):657-671.
- Takeda Y, Nishikimi T, Akimoto K, Matsuoka H, Ishimitsu T. 2010. Beneficial effects of a combination of Rho-kinase inhibitor and ACE inhibitor on tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Hypertens Res* 33(9):965-973.
- Takimoto K, Li D, Hershman KM, Li P, Jackson EK, Levitan ES. 1997. Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K⁺ channel subunit mRNAs in ventricles of renovascular hypertensive rats. *Circ Res* 81(4):533-539.

- Tawara S, Fukumoto Y, Shimokawa H. 2007. Effects of combined therapy with a Rho-kinase inhibitor and prostacyclin on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 50(2):195-200.
- Tay YL, Yi FT, Chong YM, Jamil MF, Kollert S, Adenan MI, Wahab HA, Doring F, Wischmeyer E, Tan ML. 2016. Mitragynine and its potential blocking effects on specific cardiac potassium channels. *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Tomaselli GF, Marbán E. 1999. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 42(2):270-283.
- Torsoni AS, Fonseca PM, Crosara-Alberto DP, Franchini KG. 2003. Early activation of p160ROCK by pressure overload in rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(6):C1411-1419.
- Vaughan M. 1998. Signaling by heterotrimeric G proteins minireview series. *J Biol Chem* 273(2):667-668.
- Volk T, Nguyen TH, Schultz JH, Faulhaber J, Ehmke H. 2001. Regional alterations of repolarizing K⁺ currents among the left ventricular free wall of rats with ascending aortic stenosis. *J Physiol* 530(Pt 3):443-455.
- Wang Y, Cheng J, Chen G, Rob F, Naseem RH, Nguyen L, Johnstone JL, Hill JA. 2007. Remodeling of outward K⁺ currents in pressure-overload heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18(8):869-875.
- Wang Y, Tandan S, Cheng J, Yang C, Nguyen L, Sugianto J, Johnstone JL, Sun Y, Hill JA. 2008. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent remodeling of Ca²⁺ current in pressure overload heart failure. *J Biol Chem* 283(37):25524-25532.
- Wang Z, Kutschke W, Richardson KE, Karimi M, Hill JA. 2001. Electrical remodeling in pressure-overload cardiac hypertrophy: role of calcineurin. *Circulation* 104(14):1657-1663.

- Weber JR. 1988. Left ventricular hypertrophy: its prime importance as a controllable risk factor. *Am Heart J* 116(1 Pt 2):272-279.
- Wei L. 2004. Lysophospholipid signaling in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 36(4):465-468.
- Wettschureck N, Offermanns S. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85(4):1159-1204.
- WHO. 2012. World Health Statistics 2012. Paris: World Health Organization.
- Wickenden AD, Kaprielian R, Parker TG, Jones OT, Backx PH. 1997. Effects of development and thyroid hormone on K⁺ currents and K⁺ channel gene expression in rat ventricle. *J Physiol* 504 (Pt 2):271-286.
- Xu H, Barry DM, Li H, Brunet S, Guo W, Nerbonne JM. 1999. Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 alpha subunit. *Circ Res* 85(7):623-633.
- Yanazume T, Hasegawa K, Wada H, Morimoto T, Abe M, Kawamura T, Sasayama S. 2002. Rho/ROCK pathway contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinase/GATA-4 during myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 277(10):8618-8625.
- Yu ZY, Tan JC, McMahon AC, Iismaa SE, Xiao XH, Kesteven SH, Reichelt ME, Mohl MC, Smith NJ, Fatkin D, Allen D, Head SI, Graham RM, Feneley MP. 2014. RhoA/ROCK signaling and pleiotropic α 1A-adrenergic receptor regulation of cardiac contractility. *PLoS One* 9(6):e99024.
- Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. 2001. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K(+) current (I(K1)) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 533(Pt 3):697-710.

- Zhou H, Li YJ. 2012. Rho kinase inhibitors: potential treatments for diabetes and diabetic complications. *Curr Pharm Des* 18(20):2964-2973.
- Zhou Q, Gensch C, Liao JK. 2011. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 32(3):167-173.
- Zhou Q, Kesteven S, Wu J, Aidery P, Gawaz M, Gramlich M, Feneley MP, Harvey RP. 2015. Pressure Overload by Transverse Aortic Constriction Induces Maladaptive Hypertrophy in a Titin-Truncated Mouse Model. *Biomed Res Int* 2015:163564.
- Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. 2004. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol* 561(Pt 3):735-748.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Murat Cenk	Uyruğu	T.C.
Soyadı	Çelen	Tel no	531-010-87-05
Doğum tarihi	18/12/1988	e-posta	muratcenkcelen@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	AHG Anadolu Öğretmen Lisesi	2006
Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2016

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araş. Gör.	Akdeniz Üniversitesi	2014-2016

Diller

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	73

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Hipertrofik Kalp Yetmezliği Modelinde Rho-Kinaz'ın Rolünün Elektrofizyolojik Yöntemlerle İncelenmesi	TÜBİTAK	2013-2016

Burslar-Ödüller:

- 113S296 nolu TÜBİTAK projesi bursiyer (9600 ₺)
- ISHR XXII World Congress için ISHR-ES tarafından verilen Travel Grant (**Bu tez çalışmasının datası ile kazanılmış bir ödüdür**) (1500\$)

Yayımlar ve Bildiriler:

SCI & SCI-Expanded Dergilerde Yayınlar

1. M. Kucuk, MC Celen, BE Yamasan, Y Olgar, S Ozdemir (2015). Effects of Ticagrelor on Ionic Currents and Contractility in Rat Ventricular Myocytes. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 10.1007/s10557-015-6617-2

2. Y Olgar, E Hidisoglu, MC Celen, BE Yamasan, P Yargicoglu, S Ozdemir (2015). 2.1 GHz electromagnetic field does not change contractility and intracellular Ca²⁺ transients but decreases β -adrenergic responsiveness through nitric oxide signaling in rat ventricular myocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 10.3109/09553002.2015.1068462

Bildiriler

1. Murat Cenk Çelen, Bilge Eren Yamasan, Yusuf Olğar, Semir Özdemir, Inhibition of Rho Kinase (ROCK) Restores Ionic Currents and Prevents Electrical Remodelling of Heart in Pressure Overload Induced Hypertrophy Model. *Poster Sunumu, ISHR XXII World Congress, Buenos Aires, ARJANTİN*
2. Semir Özdemir, Yusuf Olğar, Murat Cenk Çelen, Bilge Eren Yamasan, Nihal Öztürk. Effects of Rho-Kinase Inhibition on Dysregulated Intracellular Ca²⁺ of Myocytes in Pathologic Cardiac Hypertrophy. *Sözlü Bildiri, 27th Ulusal Biyofizik Kongresi, Malatya, TURKİYE*
3. Murat Cenk Çelen, Yusuf Olğar, Bilge Eren Yamasan, Semir Özdemir. Acute Effect of Rosuvastatin on Electrophysiological Parameters of Rat Cardiac Myocyte. *Poster Sunumu, The 33rd Annual Meeting of the European Section of the ISHR, University of Bordeaux, FRANSA*
4. Semir Ozdemir, Yusuf Olgar, Murat Cenk Çelen, Bilge Eren Yamasan, Nihal Ozturk. Effects of Rho kinase (ROCK) inhibition on pressure overload induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in rat. *Poster Sunumu, The 33rd Annual Meeting of the European Section of the ISHR, University of Bordeaux, FRANSA*
5. Bilge Eren Yamasan, Yusuf Olgar, Enis Hidisoglu, Murat Cenk Çelen, Piraye Yargicoglu, Semir Ozdemir. Effects of the long-term exposure to 2.1 Ghz electromagnetic fields on contractility and intracellular Ca²⁺ homeostasis in rat ventricular myocytes. *Poster Sunumu, The 33rd Annual Meeting of the European Section of the ISHR, University of Bordeaux, FRANSA*