



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**OMENTİN VE KİMERİNİN KARDİYOVASKÜLER  
FONKSİYONLARA VE GEN İFADELENMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**ÖZDEN KUTLAY**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. ZİYA KAYGISIZ**

**HAZİRAN 2016**



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**OMENTİN VE KİMERİNİN KARDİYOVASKÜLER  
FONKSİYONLARA VE GEN İFADELENMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**ÖZDEN KUTLAY**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. ZİYA KAYGISIZ**

**Proje Desteği: ESOĞÜ BAP**

**Proje kodu: 2014-366**

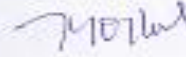


## KABUL VE ONAY SAYFASI

ÖZDEN KUTLAY'ın doktora tezi olarak hazırladığı "**Omentin ve kimerinin kardiyovasküler fonksiyonlara ve gen ifadenmesi üzerine etkisi**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih  
09/06/2016

Üye: Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK



Üye: Prof. Dr. Ziya KAYGISIZ



Üye: Prof. Dr. Kabilay UZUNER



Üye: Prof. Dr. Sema USLU



Üye: Prof. Dr. Selma KABADERE



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 45 / 06 / 2016 tarih ve 1094/6433 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ

Enstitü Müdürü

## Özet

**Amaç:** Epikardiyal yağ dokusu (EYD) kalbin kasılma aktivitesi için lokal bir enerji kaynağıdır. Omentin, yeni tanımlanan bir adipositokindir ve başlıca EYD'de eksprese edilir. Omentinin kalp üzerindeki etkileri hala bilinmemektedir. Kimerin de yeni bir kemoatraktan adipokindir. Kimerin ve onun reseptörü EYD'de belirlenmiş olmasına rağmen kardiyovasküler etkileri hala araştırılmamıştır. *PI3K gama (PI3K $\gamma$ ), PI3K alfa (PI3K $\alpha$ ), beta adrenerjik reseptör 1 ( $\beta$ 1-AR), beta adrenerjik reseptör 2 ( $\beta$ 2-AR), endotel kaynaklı nitrik oksit sentaz (eNOS), sarkolemmal L-tipi  $Ca^{+2}$  kanalı (CaV1.2), sarkoplazmik retikulum  $Ca^{+2}$ -ATPaz 2a (SERCA2a) ve fosfolamban (PLN)* kalp kasılmasını düzenlemektedirler. Bu çalışmanın amacı izole sıçan kalplerinde omentinin ve kimerinin sol ventrikülün geliştirdiği basınç (SVGB; bir kasılma indeksi), sol ventrikül basıncında artışın maksimum hızı (+dP/dt<sub>max</sub>; diğer kasılma indeksi), dakikada kalp atım sayısı, koroner akım, monofazik aksiyon potansiyeli amplitüdü (MAPamp) ve repolarizasyonun % 90'ında MAP süresi (MAP<sub>90</sub>) üzerine etkilerini çalışmaktır. Diğer bir amacımız ise omentinin ve kimerininin *PI3K $\alpha$ , PI3K $\gamma$ ,  $\beta$ 1-AR,  $\beta$ 2-AR, eNOS, CaV1.2, SERCA2a ve PLN* genlerinin ekspresyonlarına etkisini araştırmaktır.

**Yöntem:** Kalpler sodyum tiyopental anestezisi (50 mg/kg) altında izole edilip modifiye Krebs-Henseleit çözeltisi (mK-Hç) ile perfüze edildi. Stabilizasyon döneminden sonra 100, 200 ve 400 ng/ml omentin dozları ile 10, 100 ve 1000 nM kimerin dozları kalplere 30 dakika uygulandı. Bir grupta kalpler 400 ng/ml omentin uygulamasından 5 dakika önce PI3K inhibitörü olan LY294002 (10  $\mu$ M) içeren mK-Hç ile perfüze edildi. Diğer bir grupta ise kalpler 1000 nM kimerin uygulamasından 5 dakika önce nitrik oksit sentaz inhibitörü olan L-NAME (10 mM) kapsayan mK-Hç ile perfüze edildi. Ayrıca yukarıda adı geçen genlerin ekspresyon düzeyleri üzerine omentinin ve kimerinin etkileri araştırıldı. Gen ekspresyonları revers transkripsiyondan sonra gerçekleştirilen real-time polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlendi. Siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) konsantrasyonları ise ELISA tekniği kullanılarak ölçüldü.

**Bulgular:** Omentin ve kimerinin tüm dozları SGVB ve +dP/dt<sub>max</sub>'ı anlamlı ölçüde azaltırken dakikada kalp atım sayısı, MAPamp ve MAP<sub>90</sub>'ı etkilemedi. Kimerinin 1000 nM dozu ayrıca koroner akımı azalttı. LY294002 ve L-NAME sırasıyla omentinin ve kimerinin kasılma üzerindeki etkilerini antagonize etti. Omentinin 100 ng/ml dozu ve kimerinin 10 nM dozu eNOS gen ekspresyonunu ve cGMP düzeylerini değiştirmede. Omentinin ve kimerinin diğer dozları eNOS gen ekspresyonunu ve cGMP düzeylerini arttırdı. Omentinin ve kimerinin bütün dozları CaV1.2 gen ekspresyonunu belirgin şekilde azalttı. Omentinin çalışılan dozları ve kimerinin 100 ve 1000 nM

dozları *PI3K $\gamma$*  gen ekspresyonlarını anlamlı şekilde azalttı. Omentin *PLN* gen ekspresyonunu etkilemedi fakat kimerin 100 ve 1000 nM dozlarında *PLN* gen ekspresyonunu azalttı. Diğer genlerin ekspresyonları ve cAMP düzeyleri ise değişmedi.

**Sonuç:** Bulgularımıza göre izole sıçan kalplerinde akut omentin ve kimerin uygulamasının negatif inotropik etkiye neden olabileceği ve bu etkiye *PI3K $\gamma$* , *CaV1.2* ve NO sinyal yolunun aracılık edebileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Omentin, kimerin, gen ekspresyonu, izole sıçan kalbi.



## Summary

**Objective:** Epicardial adipose tissue (EAT) is the local energy source for the contractile activity of the heart. Omentin, a recently identified novel adipocytokine, is mainly expressed in EAT. Effects of omentin on the hearts are still unknown. Chemerin is also a novel chemoattractant adipokine. Although chemerin and its receptor have been detected in EAT, cardiovascular effects of chemerin have not been investigated. *PI3K gamma (PI3K $\gamma$ ), PI3K alpha (PI3K $\alpha$ ), beta adrenergic receptor-1 ( $\beta$ 1-AR), beta adrenergic receptor-2 ( $\beta$ 2-AR), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), sarcolemmal L-type Ca<sup>2+</sup> channel (CaV1.2), sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2a (SERCA2a), and phospholamban (PLN)* have been shown to regulate myocardial contractility. We aimed to study the effects of omentin and chemerin on left ventricular developed pressure (LVDP; an index of cardiac contractility), maximal rate of pressure development of left ventricle (+dP/dt<sub>max</sub>; another index of cardiac contractility), heart rate (HR), coronary flow (CF), monophasic action potential amplitude (MAPamp) and MAP duration at 90% repolarization (MAP<sub>90</sub>). We also aimed to study the effect of omentin and chemerin on *PI3K $\alpha$ , PI3K $\gamma$ ,  $\beta$ 1-AR,  $\beta$ 2-AR, eNOS, CaV1.2, SERCA2a ve PLN* gene expression.

**Method:** The hearts were isolated under sodium thiopental (50 mg/kg) anesthesia and perfused with modified Krebs-Henseleit solution (mK-Hs). After stabilization, 100, 200 and 400 ng/ml doses of omentin and 10, 100 and 1000 nM doses of chemerin were administered to the hearts for 30 minutes. In a group, the hearts were perfused with mK-Hs containing LY294002 (10  $\mu$ M), a PI3K inhibitor, 5 minutes before 400 ng/ml omentin administration. In another group, the hearts were perfused with mK-Hs containing 10 mM L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, 5 minutes before 1000 nM chemerin administration. In addition, we investigated the effects of omentin and chemerin on the expressions of genes mentioned above. Gene expressions were determined by real-time polymerase chain reaction after reverse transcription. Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) concentrations were calculated using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**Results:** All doses of omentin and chemerin significantly decreased LVDP and +dP/dt<sub>max</sub> while they had no effect on HR, MAPamp and MAP<sub>90</sub>. 1000 nM dose of chemerin also decreased CF. LY294002 and L-NAME antagonized the effects of omentin and chemerin on contractility respectively. Omentin in 100 ng/ml dose and chemerin in 10 nM dose did not affect eNOS gene expression and cGMP levels. However, other doses of omentin and chemerin increased eNOS gene expression and cGMP levels. All doses of omentin and chemerin

significantly decreased *CaV1.2* gene expressions. The doses of omentin studied and 100 and 1000 nM doses of chemerin significantly decreased *PI3K $\gamma$*  gene expressions. Omentin *PLN* gen expression did not change. However, 100 and 1000 nM doses of chemerin decreased *PLN* gen expression. The expressions of other genes and cAMP level were not significantly modified.

**Conclusion:** We suggest that acute omentin and chemerin treatment leads to a negative inotropic action with the involvement of NO pathway, *CaV1.2* and *PI3K $\gamma$*  on isolated rat heart.

**Key words:** Omentin, chemerin, gene expressions, isolated rat heart.





## İçindekiler

<b>Özet</b> .....	<b>iii</b>
<b>Summary</b> .....	<b>v</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. Yağ Dokusu</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Yağ dokusu tipleri .....	4
2.1.1.1. Kahverengi yağ dokusu .....	5
2.1.1.2. Beyaz yağ dokusu .....	5
2.1.1.2.1. Epikardiyal yağ dokusu .....	6
<b>2.2. Omentin</b> .....	<b>8</b>
2.2.1. Omentinin tanımı, yapısı ve sentezlenmesi .....	8
2.2.2. Omentinin etki mekanizması .....	10
2.2.3. Omentinin insülin direnci ve obezite ile olan ilişkisi .....	11
2.2.4. Omentinin fizyopatolojik durumlarda değişen plazma düzeyleri ..	12
2.2.5. Omentinin kardiyovasküler etkileri ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi .....	12
<b>2.3. Kimerin</b> .....	<b>14</b>
2.3.1. Kimerinin tanımı, yapısı, ekspresyonu ve konsantrasyonu .....	14
2.3.2. Kimerinin sentezi ve izoformları .....	15
2.3.2.1. Kimerin-9 .....	16
2.3.3. Kimerinin reseptörlerinin tanımı, tipleri ve ekspresyonu .....	17
2.3.3.1. Kimerin reseptörlerinin aktivasyonu ve sinyal yolları .....	18
2.3.4. Kimerinin vasküler tonus üzerine etkisi .....	18
2.3.5. Kimerinin endotel üzerine etkisi .....	18
2.3.6. Kimerinin anjiogenez üzerine etkisi .....	19
2.3.7. Kimerin ve obezite .....	19
2.3.8. Kimerin ve obeziteye eşlik eden hastalıklar .....	19
2.3.8.1. Metabolik sendrom ve tip 2 diyabet .....	19
2.3.8.2. Kimerin ve iltihap .....	20
2.3.9. Kimerin düzeyinde yükselişler .....	20
2.3.10. Kimerinin ateroskleroz gelişiminde etkisi .....	20
<b>2.4. Kalp Kasının Kasılması</b> .....	<b>21</b>
2.4.1. Kalp kasının yapısı .....	21
2.4.2. Kalp kası lifinin elektriksel özellikleri .....	22
2.4.2.1. Pacemaker potansiyeli .....	24
2.4.3. Kardiyak impulsun iletilmesi .....	25
2.4.4. Kalpte eksitasyon-kontraksiyon bağlantısı .....	26
2.4.5. Kasılma ve gevşeme sırasındaki olaylar .....	27
<b>2.5. Kardiyovasküler Parametreler</b> .....	<b>28</b>
2.5.1. Sol ventrikülün geliştirdiği basınç .....	28
2.5.2. + dP/dt <sub>max</sub> .....	29

2.5.3. Dakikada kalp atım sayısı.....	30
2.5.3.1. Sempatik ve parasempatik sinir sisteminin kalp atım sayısına etkisi .....	30
2.5.4. Koroner akım .....	31
2.5.4.1. Koroner kan akımının düzenlenmesi.....	32
2.5.4.1.1.Koroner kan akımı değerleri ve koroner kan akımının sinirsel ve metabolik düzenlenmesi .....	32
2.5.5. Monofazik Aksiyon Potansiyeli.....	33
2.5.6. Retrograd Kalp Perfüzyonu: Langendorf Tekniği ile İzole Kalp Perfüzyonu .....	34
2.5.6.1. İzole kalp modellerinde avantajlar ve sınırlandırmalar .....	35
<b>2.6. PI3K/Akt Sinyal Yolu'nun Eksitasyon ve Kontraksiyon Bağlantısının Düzenlenmesindeki Rolü.....</b>	<b>36</b>
2.6.1. PI3K/Akt Sinyal Yolu .....	36
2.6.1.1. PI3Kα'nın etkileri .....	37
2.6.1.1.1. PI3Kα kardiyomiyosit anabolizmasını ve kontraktilesini nasıl Düzenler?.....	37
2.6.1.2. PI3Kγ'nın kontraktilete üzerine etkileri .....	38
<b>2.7. Beta Adrenerjik Reseptörler .....</b>	<b>38</b>
2.7.1. β-AR'lerin tipleri ve ekspresyonları .....	39
2.7.2. β-AR'lerin hücrel yanıtı ve sinyal yolları arasındaki farklılıklar .....	40
<b>2.8. Nitrik Oksit.....</b>	<b>40</b>
2.8.1. Nitrik oksit sentaz izoformları, eNOS ekspresyonu kalpte Nitrik oksit konsantrasyonları .....	40
2.8.2. Nitrik oksitin kasılma üzerine etkileri .....	41
<b>2.9. L-Tipi Ca<sup>+2</sup> Kanalı .....</b>	<b>42</b>
2.9.1. L-tipi Ca <sup>+2</sup> kanalının yapısı ve tipleri .....	42
2.9.2. L-tipi Ca <sup>+2</sup> kanalının fonksiyonları.....	43
2.9.3. L-tipi Ca <sup>+2</sup> kanal aktivasyonunun düzenlenmesi .....	43
<b>2.10. SERCA .....</b>	<b>44</b>
2.10.1. SERCA izoformları ve SERCA izoformlarının ekspresyonları .....	44
2.10.1.1.SERCA2a'nın fonksiyonları .....	45
2.10.2. Kalp fizyolojisinde SERCA pompasının rolünü anlamak için transgenik yaklaşımlar .....	45
<b>2.11. Fosfolamban.....</b>	<b>46</b>
2.11.1. Fosfolamban tanımı ve ekspresyonları.....	46
2.12.1. Fosfolamban aktivitesinin düzenlenmesi ve fosfolambanın SERCA pompası üzerindeki etkisi .....	46
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2. Kullanılan Gereçler ve Cihazlar.....</b>	<b>49</b>
<b>3.3. İzole Perfüze Kalp Preparasyonu için Kullanılacak Olan Peptidlerin Hazırlanması .....</b>	<b>49</b>

<b>3.4. İzole Perfüze Kalp Preparasyonu .....</b>	<b>50</b>
3.4.1. Hemodinamik parametrelerin ölçülmesi .....	52
3.4.2. Çalışma protokolü .....	53
<b>3.5. ELISA Yöntemi ile cAMP ve cGMP Miktarının Belirlenmesi... ..</b>	<b>54</b>
3.5.1. Kit içeriğinin ayrıştırması .....	54
3.5.2. Standart Solüsyonunun ve Örneklerin Hazırlanması .....	54
3.5.3. Testin yapılması .....	55
<b>3.6. Hedef Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi .....</b>	<b>56</b>
3.6.1. TriPure ile total RNA izolasyonu .....	56
3.6.1.1. Total RNA konsantrasyonu ölçümü ve kalitesinin kontrolü ....	56
3.6.1.2. Agaroz jel hazırlanması ve jel elektroforezi .....	57
3.6.2. RT-PCR .....	59
3.6.2.1. Kit içeriğinin ayrıştırması .....	59
3.6.2.2. RT-PCR aşamaları .....	59
3.6.3. Real-Time QPCR (Kantitatif PCR) .....	60
3.6.3.1 Real-Time QPCR analizi .....	61
<b>3.7. İstatistiksel Analiz .....</b>	<b>63</b>
<b>4-BULGULAR .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1. Omentinin kardiyovasküler etkileri .....</b>	<b>64</b>
4.1.1. Omentin (400 ng/ml) dozunun kardiyovasküler etkilerinin LY294002 (10 µM) ile antagonize edilmesi .....	70
<b>4.2. Kimerinin kardiyovasküler etkileri .....</b>	<b>71</b>
4.2.1. Kimerin (1000nM) dozunun kardiyovasküler etkilerinin L-NAME (10 mM) ile antagonize edilmesi .....	78
<b>4.3. Omentinin gen ekspresyonları üzerindeki etkisi .....</b>	<b>80</b>
4.3.1. PI3Kα mRNA düzeyleri .....	80
4.3.2. PI3Kγ mRNA düzeyleri .....	81
4.3.3. β1-AR ve β2-AR mRNA düzeyleri .....	81
4.3.4. eNOS mRNA düzeyleri .....	83
4.3.5. CaV1.2 mRNA düzeyleri .....	83
4.3.6. SERCA2a mRNA düzeyleri .....	84
4.3.7. PLN mRNA düzeyleri .....	85
<b>4.4. Kimerinin gen ekspresyonları üzerindeki etkisi .....</b>	<b>86</b>
4.4.1. PI3Kα mRNA düzeyleri .....	86
4.4.2. PI3Kγ mRNA düzeyleri .....	87
4.4.3. β1-AR ve β2-AR mRNA düzeyleri .....	88
4.4.4. eNOS mRNA düzeyleri .....	90
4.4.5. CaV1.2 mRNA düzeyleri .....	90
4.4.6. SERCA2a mRNA düzeyleri .....	91
4.4.7. PLN mRNA düzeyleri .....	92
<b>4.5. Omentinin cAMP ve cGMP yapımı üzerindeki etkisi .....</b>	<b>93</b>
<b>4.6. Kimerinin cAMP ve cGMP yapımı üzerindeki etkisi .....</b>	<b>95</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>98</b>

<b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>103</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>104</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>125</b>



## Tablo Dizini

Tablo 3.1 Omentin ve kimerin için oluşturulan çalışma grupları .....	53
Tablo 3.2 Total RNA örneklerinin jel elektroforezi için hazırlanması .....	58
Tablo 3.3 RT-PCR için kullanılan kimyasallar ve miktarları .....	60
Tablo 3.4 QPCR için gerekli kimyasallar ve miktarları .....	60
Tablo 3.5 QPCR amplifikasyon şartları .....	61
Tablo 3.6 PCR ürünlerinin uzunluğu, primer çiftlerinin referans numaraları..	61
Tablo 4.1 Kontrol grubunda ve omentin (100, 200 ve 400 ng/ml) verilen kalplerde SVGB, +dP/dtmax ve dakikada atım sayısı ortalama değerleri.....	64
Tablo 4.2 Kontrol grubunda ve omentin (100, 200 ve 400 ng/ml) verilen kalplerde koroner akım, MAPamp ve MAP90 ortalama değerleri.....	65
Tablo 4.3 LY294002 10 µM'un yalnız başına veya 400 ng/ml omentin ile birlikte SVGB üzerine etkisi .....	70
Tablo 4.4 LY294002 10 µM'un yalnız başına veya 400 ng/ml omentin ile birlikte +dP/dtmax üzerinde etkisi .....	71
Tablo 4.5 Kontrol grubunda ve (10, 100 ve 1000 nM) kimerin verilen kalplerde SVGB, +dP/dtmax ve dakikada atım sayısı ortalama değerleri.....	72
Tablo 4.6 Kontrol grubunda ve 10, 100 ve 1000 nM kimerin verilen kalplerde koroner akım, MAPamp ve MAP90 ortalama değerleri .....	73
Tablo 4.7 L-NAME 10 mM'un yalnız başına veya 1000 nM kimerin ile birlikte SVGB üzerine etkisi .....	78
Tablo 4.8 L-NAME 10 mM'un yalnız başına veya 1000 nM kimerin ile birlikte +dP/dtmax üzerine etkisi .....	79
Tablo 4.9 L-NAME 10 mM'un yalnız başına veya 1000 nM kimerin ile birlikte koroner akım üzerine etkisi.....	79

## Şekil Dizini

Şekil 2.1 Kalpteki yağ dokusunun makroskopik görüntüsü. ....	8
Şekil 2.2 (A) İnsanda değişik organlarda omentin mRNA ekspresyonun Northern analizi (B) Omental ve abdominal subkutan depolardan alınan yağ dokusundaki omentin mRNA ekspresyonu. ....	9
Şekil 2.3 Omentin epikardiyal mRNA miktarının internal meme arteri, manubrium sterni SKYD, bacak SKYD'sundaki omentin mRNA miktarı ile kıyaslanarak yapılmış yüzde hesaplaması .....	10
Şekil 2.4 Omentin-1'in endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde iltihap ve ateroskleroza karşı anti-inflamatuar ve anti-aterojenik koruyucu fonksiyonu .....	11
Şekil 2.5 Kimerinin işlenmesi .....	16
Şekil 2.6 Kimerin-9'un amino asit dizilimi.....	17
Şekil 2.7 Kalp kası lifinin yapısı.....	22
Şekil 2.8 Kalp kası AP fazları .....	24
Şekil 2.9 Pacemaker AP .....	25
Şekil 2.10 Kalbin ileti sisteminin farklı bölgelerinden kayıt edilen AP'ler.....	26
Şekil 2.11 Eksitasyon-kontraksiyon bağlantısı.....	27
Şekil 2.12 Koroner dolaşım .....	32
Şekil 2.13 PI3K'in alt gruplarının şematize edilmesi .....	37
Şekil 2.14 $\beta$ -AR'lerin aktivasyonu ile ECC ile ilişkili hedef proteinlerin fosforilasyonu .....	39
Şekil 2.15 LTCC'nin yapısı .....	43
Şekil 3.1 Langendorf sistemi .....	51
Şekil 3.2 İzole perfüze kalp preparasyonu .....	51

Şekil 3.3 cAMP ve cGMP pleyt görüntüleri.....	55
Şekil 3.4 Spektrofotometreden alınan bir total RNA örneğinin görüntüsü.....	57
Şekil 3.5 Total RNA örneklerinin jel elektroforez görüntüleri .....	58
Şekil 3.6 Real-Time QPCR çalışmalarından alınan bir grafik örneği.....	62
Şekil 3.7 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ yöntemi ile <i>Beta Aktin</i> geninin normalizasyonu ve hedef genlerin ekspresyon seviyesinin kantitatif hesaplanması.....	63
Şekil 4.1 Omentinin SVGB üzerinde etkisi .....	66
Şekil 4.2 Omentinin +dP/dtmax üzerinde etkisi .....	67
Şekil 4.3 Omentinin kalp atım sayısı üzerinde etkisi .....	67
Şekil 4.4 Omentinin koroner akım üzerinde etkisi.....	68
Şekil 4.5 Omentinin MAPamp üzerinde etkisi .....	69
Şekil 4.6 Omentinin MAP90 üzerinde etkisi .....	69
Şekil 4.7 Kimerinin değişik dozlarının SVGB üzerinde zamana bağlı etkisi....	74
Şekil 4.8 Kimerinin +dP/dtmax üzerinde zamana bağlı etkisi .....	75
Şekil 4.9 Kimerinin kalp atım sayısı üzerinde etkisi .....	75
Şekil 4.10 Kimerinin koroner akım üzerinde etkisi .....	76
Şekil 4.11 Kimerinin MAPamp üzerinde etkisi.....	77
Şekil 4.12 Kimerinin MAP <sub>90</sub> üzerinde etkisi .....	77
Şekil 4.13 Omentin verilen kalplerde <i>PI3Ka</i> mRNA değerlerinde değişimler.....	80
Şekil 4.14 Omentin verilen kalplerde <i>PI3Ky</i> mRNA değerlerinde değişimler..	81
Şekil 4.15 Omentin verilen kalplerde <i>β1-AR</i> mRNA değerlerinde değişimler...	82

Şekil 4.16 Omentin verilen kalplerde $\beta 2$ -AR mRNA değerlerinde değişimler.....	82
Şekil 4.17 Omentin verilen kalplerde eNOS mRNA değerlerinde değişimler..	83
Şekil 4.18 Omentin verilen kalplerde CaV1.2 mRNA değerlerinde değişimler.....	84
Şekil 4.19 Omentin verilen kalplerde SERCA2a mRNA değerlerinde değişimler	85
Şekil 4.20 Omentin verilen kalplerde PLN mRNA değerlerinde değişimler. ..	86
Şekil 4.21 Kimerin verilen kalplerde PI3K $\alpha$ mRNA değerlerinde değişimler..	87
Şekil 4.22 Kimerin verilen kalplerde PI3K $\gamma$ mRNA değerlerinde değişimler..	88
Şekil 4.23 Kimerin verilen kalplerde $\beta 1$ -AR mRNA değerlerinde değişimler..	89
Şekil 4.24 Kimerin verilen kalplerde $\beta 2$ -AR mRNA değerlerinde değişimler..	89
Şekil 4.25 Kimerin verilen kalplerde eNOS mRNA değerlerinde değişimler...90	
Şekil 4.26 Kimerin verilen kalplerde CaV1.2 mRNA değerlerinde değişimler.....	91
Şekil 4.27 Kimerin verilen kalplerde SERCA2a mRNA değerlerinde değişimler	92
Şekil 4.28 Kimerin verilen kalplerde PLN mRNA değerlerinde değişimler.....	93
Şekil 4.29 Omentin verilen kalplerde cAMP miktarında değişimler..	94
Şekil 4.30 Omentin verilen kalplerde cGMP miktarında değişimler. ....	95
Şekil 4.31 Kimerin verilen kalplerde cAMP miktarında değişimler.....	96
Şekil 4.32 Kimerin verilen kalplerde cGMP miktarında değişimler..	97



## Simge ve Kısaltmalar Dizini

AS	Adenil siklaz
ADP	Adenozin difosfat
Akt	Serin ve treonin amino asitlerine özgü protein kinaz
AMPK	Adenozin monofosfat protein kinaz
AP	Aksiyon potansiyeli
ATP	Adenozin trifosfat
A-V	Atriyovenriküler düğüm
$\beta$ 1-AR	Beta adrenerjik reseptör 1
$\beta$ 2-AR	Beta adrenerjik reseptör 2
BYD	Beyaz yağ doku
$Ca^{+2}$	Kalsiyum
CaMKII	$Ca^{+2}$ bağımlı protein kinaz
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CaV1.2	Sarkolemmal L-tipi $Ca^{+2}$ kanalı (L-tipi alfa 1C )
CCRL 2	Kemokin CC motif reseptör-like 2
cDNA	Komplementar DNA
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
$Cl^-$	Klor
CMKLR1	Kemokin benzeri reseptör1
COX-2	Siklooksijenaz-2
CT	Eşik siklusu
ECC	Eksitasyon-kontraksiyon bağlantısı
ELISA	Enzim-linked immun sorbent assay
eNOS	Endotel kaynaklı nitrik oksit sentaz
ERK/NF- $\kappa$ B	Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz/nükleer transkripsiyon faktör kappas $\beta$
EYD	Epikardiyal yağ dokusu
Gi	G inhibitör
GPCR	G proteinine bağlı reseptör
GPR1	G proteine bağlı reseptör 1
$G_s$	Uyarıcı G proteini
ICAM-1	İntrasellüler adezyon molekül
IP3	İnositol 3,4,5-trifosfat
İMA	İnternal mamalik arter
iNOS/NOS2	İndüklenebilen nitrik oksit sentaz
JNK	c-Jun $NH_2$ -terminal kinaz
$K^+$	Potasyum
KYD	Kahverengi yağ dokusu
LA	Sol anterior
LAD	Sol anterior descending arter

LDL	Düşük-dansiteli lipoprotein
L-NAME	L-Nitro-Arjinin Metil Ester
LTCC	L-tipi kalsiyum kanalı
LV	Sol ventrikül
MAP	Monofazik aksiyon potansiyeli
MAP <sub>90</sub>	Repolarizasyonun % 90'ında MAP süresi
MAPamp	Monofazik aksiyon potansiyeli amplitüdü
MAPK	Mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz
mK-Hç	Modifiye Krebs-Henseleit çözeltisi
Na <sup>+</sup>	Sodyum
NFW	Nükleaz içermeyen distile su
nNOS/NOS1	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
PDE	Fosfodiesterazlar
PDK1	Fosfoinosit-bağımlı kinaz-1
PI3K	Fosfoinositid 3-kinaz
PI3K $\alpha$	PI3K alfa
PI3K $\gamma$	PI3K gama
PIP2	Fosfotidilinositol 4,5-bifosfat
PKA	Protein kinaz A
PKB	Protein kinaz B
PLN	Fosfolamban
PR3	Proteinaz 3
PYD	Perivasküler yağ dokusu
QPCR	Kantitatif PCR
RA	Sağ anterior
RARRES2	Retinoik asit reseptör responder 2
RCA	Sağ koroner arter
RT	Revers transkriptaz
RTK	Reseptör tirozin kinaz
RT-PCR	Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
RV	Sağ ventrikül
S-A	Sinoatriyal düğüm
SERCA2a	Sarkoplazmik-endoplazmik retikulum Ca <sup>+2</sup> -ATPaz 2a
SKYD	Subkutan yağ dokusu
SR	Sarkoplazmik retikulum
SVGB	Sol ventrikülün geliştirdiği basınç
TIG2	Tazarotene indükleyen gen 2
TNF $\alpha$	Tümör Nekroz Faktör Alfa
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekül-1
VYD	Visseral yağ dokusu

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda yağ dokusunun değişik hormonları, büyüme faktörlerini ve sitokinleri salgılamasından dolayı endokrin bir doku olması üzerinde durulmaktadır (Poulos, Hausman, D.B. & Hausman G.J., 2010; Coelho, Oliveira & Fernandes, 2013). Şimdiye kadar yağ dokusundan altı yüzden fazla proteinin salgılandığı bildirilmiştir. Adipokinler ya da adipositokinler olarak isimlendirilmiş olan bu proteinler endokrin, otokrin ve parakrin etkilerinden dolayı değişik biyolojik süreçler ile ilişkilendirilmiştir (Komolka, Albrecht, Wimmers, Michal & Maak, 2014). Visseral yağın kalp etrafında depolanan özel bir şekli olan epikardiyal yağ dokusu da, çok sayıda adipositokin yapma ve salgılama yeteneğine sahiptir (Sengül & Özveren, 2013).

Omentin omental yağ dokusunda yapılan üç yüz on üç amino asitten oluşmuş bir adipositokindir (Schaffler vd., 2005). Her ne kadar omentin reseptörleri tanımlanmamışsa da (Yamawaki, Tsubaki, Mukohda, Okada & Hara, 2010), omentin proteininin insanlarda omental yağ doku dışında EYD'de de bulunduğu gösterilmiştir (Fain vd., 2008). Omentin, serin ve treonin amino asitlerine özgü protein kinaz (Akt) /protein kinaz B'yi (PKB) aktive ederek adipositlerde insülin aracılığı ile glukoz alımını kolaylaştırır (Schaffler vd., 2005). Omentin endotel hücrelerinde eNOS fosforilasyonunu arttırarak (Yamawaki vd., 2010; Yamawaki vd., 2011b; Maruyama vd., 2012) vasküler iltihabı azaltıcı bir adipokin olarak rol oynar (Ohashi, Shibata, Murohara, Ouchi & 2014). Bu yüzden omentin anti-inflamatuar etkisi ile obezite ile ilişkili metabolik ve kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu olabilir (Tan, Zheng & Tang, 2015). Ayrıca omentin NO yapımı ile oksidatif stresi ve iltihabı baskılayarak anti-aterojenik (aterosklerozu önleyici) etki de gösterir (Tan vd., 2015).

Omentin sıçan izole kan damarlarında vazodilatör etki yaparak (Yamawaki vd., 2010), agonistlerin neden olduğu akut kan basıncı artmalarını NO yolu ile inhibe eder (Kazama, Okada, Hara & Yamawaki, 2013). Ayrıca Akt/eNOS sinyal yolunu aktive ederek, kan akımını ve kapiller yoğunluğu da arttırır (Maruyama vd., 2012). Kronik omentin uygulamasının sıçanlarda monokrotalin ile oluşturulmuş pulmoner arteriyal hipertansiyonu engellediği gösterilmiştir (Kazama, Okada & Yamawaki, 2014). Omentin akut iskemi hasarı oluşturulan sıçan kalplerinde Akt'a bağlı hücre içi sinyal mekanizmalarıyla kalp kası hücrelerinde apoptozisi baskılayarak iskeminin oluşturduğu hasarı iyileştirir (Kataoka vd., 2014). Bundan başka miyokardiyal hipertrofide de patolojik süreci düzeltir (Matsuo vd., 2014). Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda omentin iyi adipositokinlerden birisi olarak görülmektedir. Omentinin gelecekte kardiyovasküler hastalıklar

için bir potansiyel belirteç olabileceği gibi terapötik hedef olarak da kullanılabileceği öngörülmektedir (Yamawaki, 2011a).

Kimerin de inaktif formu toplam yüz altmış üç amino asit olan bir adipositokin olarak bilinir (Ferland & Watts, 2015). Kimerin reseptörleri ile kimerinin kendisi adipoz dokuda ve EYD'de varlığı gösterilmiştir (Mattu & Randeve, 2013). Kimerin de omentin gibi PI3K/Akt/eNOS hücre içi sinyal yolu ile NO üretimini uyarabilmektedir (Josette, Azadeh, Carla, Peter, Jeffrey & 2012). Kimerin anti-inflamatuar etkisini NO sentezine yol açarak ortaya çıkartmaktadır (Yamawaki, Kameshima, Usui, Okada & Hara, 2012). Kimerin ayrıca endoteli sağlam damarlarda fenilefrin ve endotelin-1'in kontraktıl yanıtını arttırır (Lobato vd., 2012). Şimdiye kadar, kardiyovasküler hastalıklara eşlik eden obezitede, iltihapta, metabolik sendromda ve diyabette kimerinin etkileri çalışılmıştır (Ferland & Watts, 2015; Bozaoglu vd., 2007; Chakaroun vd., 2012). Serum kimerin düzeyi vücut kitle indeksi, kan basıncı, serum lipid düzeyi, insülin ve kolesterol gibi obezite ile ilişkili pek çok parametre ile paralel artış göstermektedir (Bozaoglu vd., 2007; Chakaroun vd., 2012). Egzersize bağlı kilo kaybı veya kalori alımının azaltılması ile serumdaki kimerin seviyesi azalır (Chakaroun vd., 2012).

İnsan ve diğer birçok memeli türünün kalbinde yüksek oranda bulunan  $\beta$ -AR'ler katekolaminlerin pozitif inotropik ve kronotropik etkilerine aracılık etmektedir (Brodde & Michel, 1999; Madamanchi, 2007). Omentin ve kimerin kalp kasılması ve dakikada atım sayısı üzerinde etki gösterebilir ve bu olası etkiye  $\beta$ -AR'ler aracılık edebilir. Genel olarak  $\beta$ 1-2-AR'lerin uyarılması ile uyarıcı G proteini ( $G_s$ ) ve buna bağlı olarak adenil siklaz (AS) enziminin aktivasyonu sonucu hücre içi cAMP düzeyinin arttığı bilinmektedir. cAMP, protein kinaz A'yı (PKA) aktive ederek hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeylerini kontrol eden proteinlerin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Sarkolemmadaki CaV1.2 bu proteinlerden biridir ve bu kanal fosforilasyonu sonucunda açılarak hücreye  $Ca^{+2}$  girişine izin verir (George & Pitt, 2006). Böylece kalbin kasılması artar. Kalbin gevşemesi sırasında sitozoldeki serbest  $Ca^{+2}$ , SERCA2a aracılığıyla aktif transport ile SR'a geri alınır. SERCA2a aktivitesi PLN proteini tarafından düzenlenmektedir. PLN'nin PKA tarafından fosforilasyonu SR'ye  $Ca^{+2}$  geri alımını artırır ve kalp kası gevşer (Machackova, Barta & Dhalla, 2005).

Omentin ve kimerin için ortak bir hücre içi sinyal yolu olan PI3K/Akt hücre yaşamını, hücre çoğalmasını arttırdığı gibi hücre içi  $Ca^{+2}$  düzenlenmesinde rol oynar (Kerfant vd., 2005; Kerfant, Rose, Sun & Back, 2006). PI3K/Akt sinyal yolunun bir alt birimi olan PI3K $\alpha$ , kalp kası hücrelerinde  $Ca^{+2}$  akımını değiştirerek kasılmayı arttırır (Ghigo, Morello, Perino, Damilano & Hirsch, 2011). PI3K $\gamma$  ise hücre içi cAMP miktarını azaltarak kontraktılitenin düzenlenmesinde işe karışır (Alloatti vd., 2005). Omentin ve kimerin PI3K/Akt sinyal yolu üzerinden Akt'ı fosforile ederek

NO'yu arttırır (Maruyama vd., 2012; Kataoka vd., 2014; Josette vd., 2012). NO da kalp kasılmasını etkiler (Massion, Feron, Dessy & Balligand, 2003; Seddon, Shah & Casadei, 2007; Van de Sandt vd., 2013). Bu nedenle PI3K/Akt/eNOS sinyal yolu kalp kasılmasının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Kerfant vd., 2005; Kerfant vd., 2006).

Omentinin ve kimerinin obezite, iltihap, metabolik sendrom ve diyabet ile ilişkilendirildiği ve bu durumların da kardiyovasküler hastalıklara eşlik ettiği bilinmektedir (Tan vd., 2015; Ferland & Watts, 2015; Bozaoglu vd., 2007; Chakaroun vd., 2012). Bu nedenle omentinin ve kimerinin kardiyovasküler fonksiyonları etkileyebileceği öngörülebilir. Buna karşılık omentinin ve kimerinin izole sıçan kalplerinde kalbin kasılma kuvveti üzerine etkisi ile *PI3K $\alpha$* , *PI3K $\gamma$* ,  *$\beta$ 1-AR*,  *$\beta$ 2-AR*, *eNOS*, *CaV1.2*, *SERCA2a*, *PLN* gen ekspresyonlarına etkisi çalışılmamıştır. Bu yüzden bu çalışmanın amacı; omentin ve kimerinin SVGB, +dP/dt<sub>max</sub>, dakikada kalp atım sayısı, koroner akım ve MAP üzerine olan etkisini ortaya çıkarmaktır. Ayrıca bu etkilerde görev aldığı düşünülen *PI3K $\alpha$* , *PI3K $\gamma$* ,  *$\beta$ 1-AR*,  *$\beta$ 2-AR*, *eNOS*, *CaV1.2*, *SERCA2a*, *PLN* genleri ile ilişkisi olabilecek hücre içi sinyal yollarını belirleyebilmektir. Bu amaçla izole sıçan kalplerinde omentinin ve kimerinin SVGB, +dP/dt<sub>max</sub>, dakikada kalp atım sayısı, koroner akım, MAPamp ve MAP<sub>90</sub> üzerindeki etkileri ve kalp dokusundan da *PI3K $\alpha$* , *PI3K $\gamma$* ,  *$\beta$ 1-AR*,  *$\beta$ 2-AR*, *eNOS*, *CaV1.2*, *SERCA2a* ve *PLN* genlerinin ekspresyonlarına etkisi araştırıldı. Bir PI3K inhibitörü olan LY294002 ile omentinin etkileri ve bir NO sentaz inhibitörü olan L-NAME ile kimerinin etkileri antagonize edilerek omentin ve kimerinin kalbin kasılma kuvveti ile ilişkili olabilecek hücre içi sinyal yolunun ortaya konulması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Yağ Dokusu

Yağ dokusu; preadipositler, adipositler, immün hücreleri (makrofojlar, lenfositler ve monositler), düz kas hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar ve kök hücre gibi değişik hücre tiplerinin bulunduğu sinir sistemine bağlı bir yağ dokusudur (Hyvönen & Spalding, 2014; Poulos vd., 2010; Gimeno & Klamann, 2005). Yetmiş kg ağırlığındaki bir erkekte ortalama olarak onbeş kg yağ dokusu var olup, bu da toplam vücut kitlesinin % 21'ini oluşturmaktadır. Bu oran kadınlarda, yaşlılarda ve aşırı kilolu kişilerde daha fazladır (Alexopoulos, Katrakis & Raggi, 2014).

Yağ dokusu; vücudu destekleyen, ısı yalıtımı ve enerji sağlayan bir dokudur (Poulos vd., 2010). Son on yıldır yağ doku değişik hormonları, büyüme faktörlerini, matriks proteinlerini, enzimleri, sitokinleri ve diğer faktörleri salgılayan bir endokrin doku olarak kabul edilmektedir. Ayrıca yağ dokusu birçok hormon ve sitokini sentezleme ve salgılama fonksiyonunun yanı sıra, hücre zarında ve sitoplazmasında birçok hormon ve sitokin için reseptörleri de bulundurmaktadır (Poulos vd., 2010; Coelho, vd., 2013). Yağ dokusunun temel hücresi olan adipositler adipokin veya adipositokin olarak isimlendirilen adiponektin, leptin, resistin, apelin, kimerin, omentin, nesfatin ve vaspin gibi değişik faktörleri kana salgırlar (Northcott, Yeganeh, Taylor, Zahradka & Wigle, 2012; Mattu & Randeve, 2013). Adipositlerden salınan adiponektin, leptin, visfatin gibi peptitler adipokin olarak isimlendirilir. Stromal vasküler hücrelerden salınan makrofaj inflamatuvar protein, tümör nekroz faktör alfa (TNF $\alpha$ ) ve interlökin 1 $\beta$ -6-8-10 gibi peptitler ise sitokin olarak adlandırılırlar. Apelin, resistin gibi peptitler, hem adipositlerden hem de stromal vasküler hücrelerden salgılandığı için adipokinler yada adipositokinler diye adlandırılabilir (Mattu & Randeve, 2013). Şimdiye kadar yağ dokusundan altı yüzden fazla proteinin salgılandığı bildirilmiştir. Bu proteinler endokrin, otokrin ve parakrin etkilerinden dolayı değişik biyolojik süreçler ile ilişkilendirilmiştir (Komolka vd., 2014). Bu yüzden yağ dokusu metabolizma ve vasküler fonksiyonları etkileyen bir dokudur (Golia vd., 2014).

#### 2.1.1. Yağ dokusu tipleri

Yağ dokusu morfolojisine ve fizyolojisine göre beyaz yağ dokusu (BYD) ve kahverengi yağ dokusu (KYD) olarak ikiye ayrılır (Poulos vd., 2010; Cherian, Lopaschuk & Carvalho, 2012). Her ikisininin de farklı fizyolojik rolleri vardır.

### **2.1.1.1. Kahverengi yağ dokusu**

Kahverengi yağ dokusu daha çok kış uykusuna yatan memelilerde, göçmen kuşlarda ve kemirgenlerde bulunur. Daha az miktarda yenidoğanda ve genç erişkinde vardır (Alexopoulos vd., 2014). Kahverengi yağ dokusu insanlarda klavikular, supraklavikular ve subskapular gibi bölgelerde dağılmış olarak bulunur.

Kahverengi yağ dokusunun adipositlerinin ortalama yarıçapı BYD'nin adipositlerinininkinden daha küçüktür. Kahverengi yağ dokusundaki adipositlerin değişik büyüklüklerde sitoplazmik lipid damlacıkları ve çok sayıda mitokondrileri vardır. Kahverengi yağ dokusu mitokondrileri aracılığıyla yağ asitlerinin oksidasyonu ile ısı üretimi için özelleşmiştir ve soğuğa maruz kaldığında ısı üretiminden sorumludur (Coelho vd., 2013; Poulos vd., 2010; Alexopoulos vd., 2014).

### **2.1.1.2. Beyaz yağ dokusu**

İnsanlarda yağ dokusunun büyük çoğunluğu BYD tipindedir (Alexopoulos vd., 2014). Beyaz yağ dokusu karın boşluğunda iç organların çevresindeki visseral yağ dokusu (VYD) ve subkutan yağ dokusu (SKYD) olmak üzere iki tiptir (Bjorndal, Burri, Staalesen, Skorve & Berge, 2011). Beyaz yağ dokusunun büyük bir kısmı deri altında SKYD olarak bulunur. Beyaz yağ dokusu sadece sıcaktan ve soğuktan izolasyonu sağlamakla kalmaz aynı zamanda iç organların etrafında bir tür koruyucu dolgu oluşturur (Alexopoulos vd., 2014). İnsanlarda değişik iç organları çevreleyen VYD omental veya mezenterik olabilir. Mezenterik yağ deposu bağırsağa bağlı iken omental yağ deposu mide ve dalağı örterek karın bölgesinin ventraline uzanır (Bjorndal vd., 2011).

Visseral yağ dokusu yaklaşık olarak total vücut yağının % 10'u kadardır ve insülin direnci, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde yüksek risk oluşturur (Molica, Morel, Kwak, Jeanrenaud & Steffens, 2015). Halbuki SKYD total vücut yağının % 85'ini oluşturur ve kardiyovasküler hastalıklarla ilgili patolojilerin oluşumu ile orta derecede ilişkilidir (Molica vd., 2015). Bununla birlikte SKYD, VYD'den daha az aktiftir (Cherian vd., 2012).

Beyaz yağ dokusu hücrelerinin, sitoplazmalarındaki lipid damlacıkları KYD'ye göre daha geniş ve büyüktür. Bu lipid damlacıklarında trigliserid ve kolesterol depo edilir (Eto vd., 2009). Beyaz yağ dokusunun besin alımı, enerji dengesinin düzenlenmesi, insülin aktivasyonu, lipid ve glukoz metabolizması, anjiyogenez, kan basıncının düzenlenmesi, pıhtılaşma ve immün sistem üzerine önemli fizyolojik fonksiyonları vardır (Hauner, 2005).

### **2.1.1.2.1. Epikardiyal yağ dokusu**

Visseral yağın kalbin etrafında depolanmasıyla oluşan epikardiyal yağın çok sayıda adipositokin üretme ve salgılama yeteneği sayesinde önemli bir kardiyovasküler risk belirteci olduğu düşünülmektedir. Epikardiyal yağın metabolik ve fizyolojik önemi hakkında kanıtlar artmıştır. Epikardiyal yağ kalınlığı ve hacimi ile obezite, hipertansiyon, ateroskleroz, diyabet ve metabolik sendrom arasında kuvvetli bir ilişki vardır (Sengul & Ozveren, 2013). Kalpteki yağ birikimi anatomik konumuna göre şöyle sınıflandırılabilir:

- 1)İntramiyokardiyal yağ, miyokardın kendi içindedir.
- 2)Epikardiyal yağ doku, miyokard ve perikard arasında yer almaktadır, doğrudan koroner arterler ile temas halindedir.
- 3)Perikardiyal yağ doku, visseral ve paryetal perikard arasında alır.
- 4)Parakardiyal yağ doku, perikard dışında bulunan intratorasik yağdır (Lee, Després & Koh, 2013; Sacks & Fain 2007; Payne, Kohr & Tune, 2012, Şekil 2.1).

Epikardiyal yağ dokusu sıklıkla her iki ventrikülün atrioventriküler ve interventriküler septum seviyelerinde yer alır ve apekse doğru ilerler (Iacobellis & Bianco, 2011a; Iacobellis, Malavazos & Corsi, 2011b). Normal fizyolojik koşullar altında EYD ortalama 50 g ağırlığındadır (Lin vd., 2013). Genellikle sağ ve sol ventrikül çevresinde biriken EYD eşit miktardadır. Ancak, sağ ventrikül kasının gram ağırlığı başına düşen epikardiyal yağ dokusu miktarı sol ventrikül için hesaplanandan üç kat daha fazladır (Ouwens, Sell, Greulich & Eckel, 2010). Epikardiyal yağ dokusunun hacimi fizyolojik ve patolojik şartlara bağlı olarak değişebilmektedir. Koroner arter hastalığı ve atriyal fibrilasyonlu hastalarda EYD'nin miktarı artarken kalp yetmezliği olan hastalarda azalmaktadır (Lin vd., 2013).

Epikardiyal yağ dokusu embriyolojik köken bakımından omental ve mezenterik yağ dokusu ile aynı kökenden gelmektedir (Fain, Sacks, Bahouth, Tichansky, Madan & Cheema, 2010). Epikardiyal yağ dokusu ve hemen altında yer alan miyokardiyum aynı koroner damarlar ile beslenir ve iki doku arasında fasiya benzeri bir yapı da bulunmaz (Iacobellis & Bianco, 2011a; Iacobellis vd., 2011b; Ouwens vd., 2010). Epikardiyal yağ dokusunun miyokardiyum ile aynı kan dolaşımına sahip olması dikkat çekicidir (Fain vd., 2010). Böylece EYD potansiyel parakrin ve vazokrin etkilerle miyokardiyum ile etkileşim halindedir (Fang, Chen & Wang, 2014). Epikardiyal yağ dokusunun salgıladığı adipokin ve sitokinlerle miyokardiyumu dolayısıyla kardiyak kontraktileti etkilemesi mümkündür.

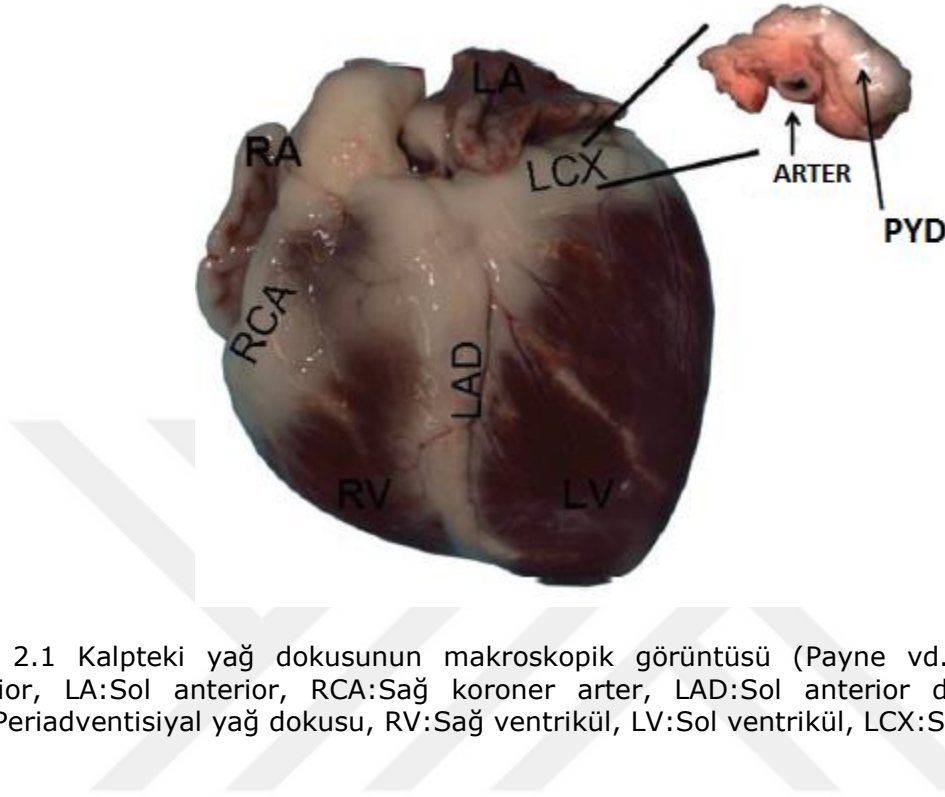
Epikardiyal yağ dokusunu diğerlerinden ayıran önemli bir özelliği adiponektin, leptin, omentin, kimerin ve visfatin gibi adipokinleri



salgılamasıdır (Fain vd., 2008; Roh vd., 2007; Josette vd., 2012). Epikardiyal yağ dokusu salgıladığı değişik adipositokinlerle kalp kasını ve koroner damarları hipotermiden korumaktadır (Iacobellis vd., 2011b; Ouwens vd., 2010). Aynı zamanda yine salınan bu çeşitli faktörler aracılığı ile miyokart ile damarlarının enerji ve kalsiyum düzenlenmesi yapılmaktadır (Iacobellis & Bianco, 2011a; Iacobellis vd., 2011b; Ouwens vd., 2010).

Şekil 2.1’de gösterildiği gibi EYD’nin bir parçası olan koroner perivasküler yağ dokusu, koroner arterleri çevreleyen yağ dokusu veya perivasküler yağ dokusu (PYD) olarak tanımlanır (Verhagen & Visseren, 2011). Perivasküler yağ dokusu vasküler gerginlik ve ısı yalıtımını destekleyici rol oynar. Bundan başka EYD yaygın olarak endokrin ve parakrin etkilerle fizyolojik koşullarda vasküler tonüsü korur ve obezite ile ilişkili ateroskleroz sürecine katkıda bulunabilir (Falk, Thim & Kristensen, 2009; Lau, Dhillon, Yan, Szmítko & Verma, 2005). Damar duvarından PYD’yi ayıran hiçbir fasiya olmadığı gibi, adipositler adventisyanın dışından EYD’ye sızabilirler.

Normal olarak epikardiyal ve perikardiyal yağ dokusu kalbin kasılma aktivitesi için lokal enerji kaynağıdır. Ayrıca artan epikardiyal ve perikardiyal yağ dokusu obezite ile ilişkili kardiyak bozukluklar için önemli bir risk faktörüdür (Iozzo, 2011). Sağlıklı bireylerde kalbin etrafındaki intraperikardiyal ve ekstraperikardiyal yağ dokusunun ortalama 100-400 g olduğu saptanmıştır. Tip 2 diyabet hastalarında bu miktar 800-900 g’ye yükselmektedir. Epikardiyal yağ dokusunun artışı düşük ejeksiyon fraksiyonu ve düşük kalp debisi ile ilişkilidir. Total epikardiyal yağ hacimi fizyolojik ve patolojik koşullara göre değişebilmektedir (Fang vd., 2014). Hipertrofi sırasında PYD ve kalp kitlesi artış göstermektedir. Atriyal fibrilasyon ve koroner arter hastalıklarında epikardiyal yağ dokusunun hacimi artarken, kalp yetmezliğinde azalmaktadır (Fang vd., 2014).



Şekil 2.1 Kalpteki yağ dokusunun makroskopik görüntüsü (Payne vd., 2012) RA:Sağ anterior, LA:Sol anterior, RCA:Sağ koroner arter, LAD:Sol anterior descending arter, PYD:Periadventisiyal yağ dokusu, RV:Sağ ventrikül, LV:Sol ventrikül, LCX:Sol sirkümfleks.

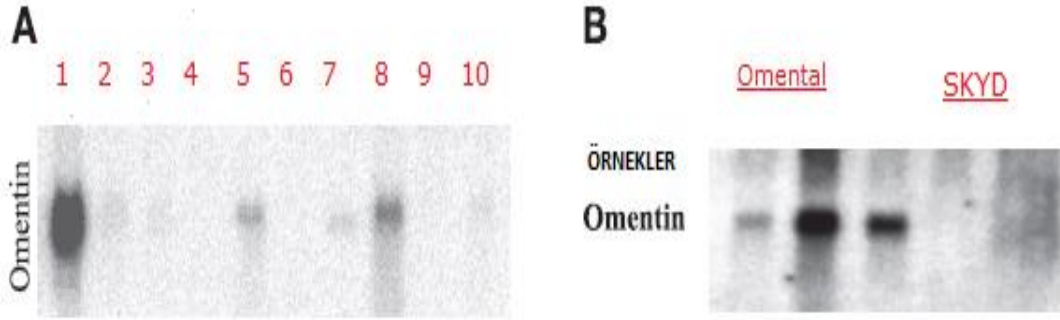
## 2.2. Omentin

### 2.2.1. Omentinin tanımı, yapısı ve sentezlenmesi

İlk defa barsakta Paneth hücrelerinde omentinin düşük düzeydeki sekresyonu belirlendikten sonra omentin, intelektin (Tsuji vd., 2001) ya da intestinal laktoferrin reseptör (Suzuki, Shin & Lonnerdal, 2001) olarak isimlendirilmiştir. Omentin endotel hücrelerinde de saptanarak endotel kaynaklı laktin olarak da adlandırılmıştır (Lee vd., 2001). 2005 yılında Shaffler ve arkadaşları (Schaffler vd., 2005), omentin ile intelektin proteinlerinin amino asit sırasının % 100 benzer olduğunu göstermişlerdir. 2006 yılında omentin, yağ dokusuna özgü sekretuar protein olarak tanımlanmıştır (Yang vd., 2006). Omentin üç yüz on üç amino asit içeren hidrofilik bir protein olup, 35 kDa molekül ağırlığındadır (Schaffler vd., 2005). Omentin proteininin kodlanmasından sorumlu olarak *omentin-1* ve *omentin-2* olmak üzere iki tane gen tanımlanmıştır. Her iki gen de 1q21.3 kromozomu üzerinde yer almaktadır ve kromozomal bölgeleri birbirine komşudur. Omentin-1 izoformunun insan plazmasında baskın olduğu gösterilmiştir (Auguet vd., 2011, Schaffler vd., 2005). Omentin-2, omentin-1'in homoloğu olup omentin-1 ile amino asit dizilişi yönünden % 83 oranında homoloji gösterir (Havel, 2004).

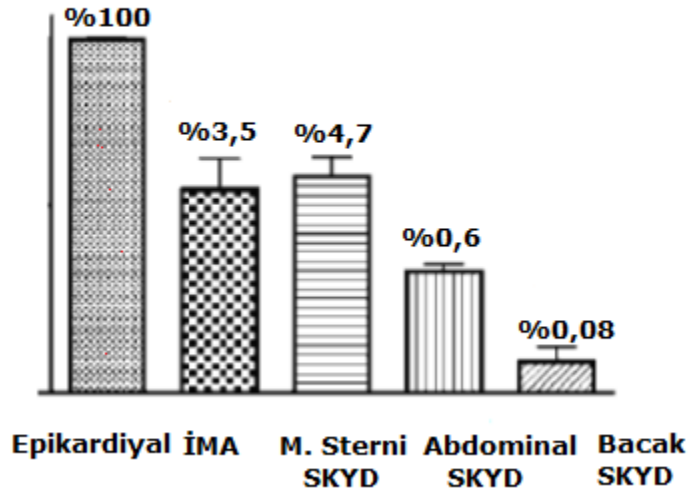
Omentin, SKYD ile kıyaslandığında daha çok VYD'nin omental yağ hücrelerinin stromal vasküler hücrelerinden sentezlenir (Yang vd., 2006; Fain vd., 2008). Ayrıca omentin endotel hücreleri, EYD, timus, kolon, ovaryum, akciğerler ve plesanta gibi organlarda da sentez edilmektedir (Yang vd., 2006; Schaffler vd., 2005) (Şekil 2.2.A, 2.2.B). Omentinin plazma konsantrasyonu 100 ng – 1 µg/ml arasında değişmekte olup, yarılanma ömrü otuz saattir (Josette vd., 2012).

Epikardiyal yağ dokusu omentinin yüksek miktarda sentezlendiği omental adipoz doku ile aynı embriyolojik kökenden gelmektedir. Fain ve arkadaşları (Fain vd., 2008) 2008 yılında cerrahi girişimle hastalardan aldıkları EYD ile SKYD örneklerinden omentin mRNA miktarını karşılaştırmışlar ve EYD'den sentezlenen omentin mRNA miktarını internal meme arterinden, manubrium sterniden alınan SKYD, abdomen ve bacadan alınan SKYD'ye göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu araştırmacılar omentinin koroner vasküler fonksiyonlar üzerine etkisi olabileceğini belirtmişlerdir (Şekil 2.3).



Şekil 2.2.A İnsanda değişik organlarda omentin mRNA ekspresyonunun northern analizi. 1:Omental Yağ Doku 2:Kas 3:Böbrek 4:Karaciğer 5:Akciğer 6: Beyin 7:Kalp 8:Barsak 9:Pankreas 10:Mide. Şekil 2.2.B Omental ve abdominal subkutan depolardan alınan yağ dokusundaki omentin mRNA ekspresyonu (Yang vd., 2006).

### Omentin mRNA düzeyi



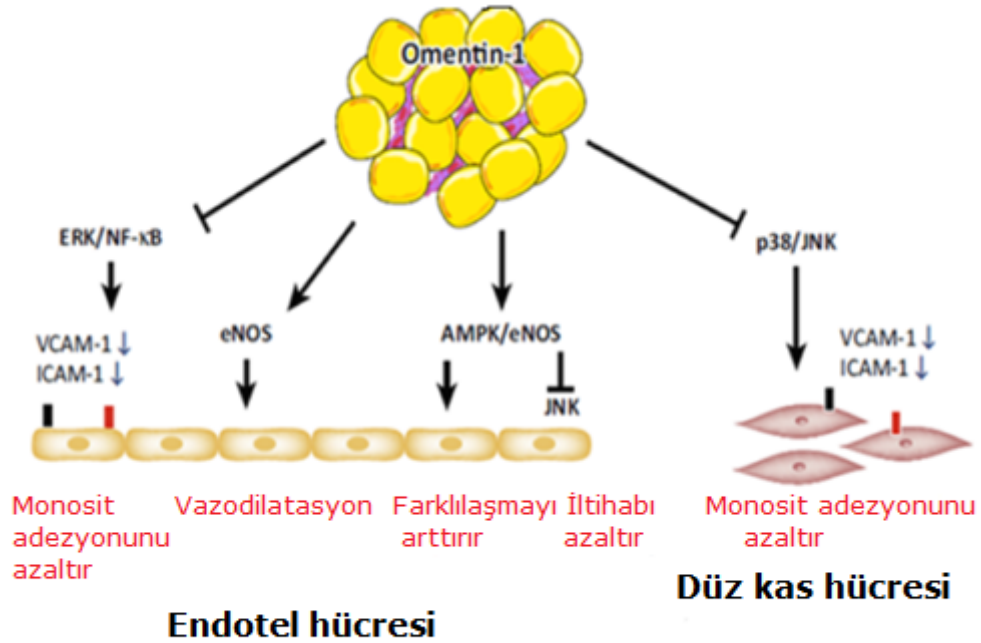
Şekil 2.3 Omentin epikardiyal mRNA miktarının internal meme arteri (İMA), manubrium sterni SKYD (M. Sterni SKYD), abdominal SKYD, bacak SKYD'sundaki omentin mRNA miktarı ile kıyaslanarak yapılmış yüzde hesaplaması (Fain vd., 2008).

### 2.2.2. Omentinin etki mekanizması

Omentin Akt/PKB'yi aktive ederek adipositlerde insülin aracılığı ile glukoz alımını kolaylaştırır (Schaffler vd., 2005). Son verilere göre omentin laktoferrine bağlanarak 5'adenozin monofosfat protein kinaz (5'AMPK) ve Akt'ı aktive eder ve çeşitli hücre tiplerinde geniş bir etkiyle sonuçlanır (Suzuki vd., 2001; Yang vd., 2006; Maruyama vd., 2012). Omentin-1, Akt sinyal yolu üzerinden eNOS fosforilasyonu ile NO oluşumunu artırır ve izole kan damarlarında vazodilatasyona neden olur (Yamawaki vd., 2010, Şekil 2.4). Omentin-1, AMPK/eNOS'a bağlı mekanizma ile endotel hücre farklılaşmasının artırılmasına ve endotel hücre apoptozisinin azaltılmasına öncülük eder (Maruyama vd., 2012, Şekil 2.4). Omentin-1'in endotel hücre kültürlerinde AMPK/eNOS sinyal yolu ile iltihap yanıtlarını baskıladığı gösterilmiştir (Yamawaki vd., 2011b, Şekil 2.4).

İnsan göbük veni endotel hücrelerine omentin-1 proteininin uygulanması TNF- $\alpha$  ile uyarılmış monosit adezyonunu yani onların birbirine yapışarak kümeleşmesini engeller. Omentin TNF- $\alpha$  ile aktive edilmiş endotel hücrelerinde, ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz/nükleer transkripsiyon faktör kapp $\beta$  (ERK/NF-K $\beta$ ) sinyal yolunu baskılayarak vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1) ve hücre içi adezyon molekül-1 (ICAM-1)

ekspresyonunu inhibe eder. Böylece monosit adezyonunu baskılar. Aynı zamanda vasküler endotel hücrelerinde cGMP düzeyini arttırarak ve TNF $\alpha$ 'nın indüklediği siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu engelleyerek omentinin anti-inflamatuvar etkisinin olabileceği bildirilmiştir (Zhong, Li, Liu, Tan & Shang, 2012, Şekil 2.4). Bundan başka omentin-1 vasküler düz kas hücrelerinde TNF- $\alpha$  ile uyarılan monosit adezyonunu da baskılar (Kazama, vd., 2012, Şekil 2.4). Omentin, p38 ve c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinaz (JNK) hücre içi sinyal yolunu baskılayarak vasküler düz kas hücrelerinde VCAM-1 ekspresyonunu engeller. Bu yüzden omentin-1 vasküler iltihabı azaltıcı bir adipokin olarak rol oynar (Ohashi vd., 2014, Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Omentin-1'in endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde iltihap ve aterosklerozaya karşı anti-inflamatuvar ve anti-aterojenik koruyucu fonksiyonu (Ohashi vd., 2014).

### 2.2.3. Omentinin insülin direnci ve obezite ile olan ilişkisi

Omental yağ doku kaynaklı olan omentinin insülin duyarlılığı üzerine birden fazla etkisi bulunmaktadır (Tan vd., 2015; Fain vd., 2008). Yağ dokusundan salınan omentin ve mRNA düzeyleri obezite ve tip 2 diyabet hastalarında azalmaktadır (de Souza Batista vd., 2007; Zhong vd., 2011). Düşük kalorili diyet ile oluşturulan kilo kaybından sonra dolaşımdaki omentin düzeyi ve insülin duyarlılığı artmaktadır (Moreno-Navarrete vd., 2010). Aynı sonuçlar aerobik egzersiz ve metformin uygulamalarında da görülmektedir (V. De Clercq, Enn, Yeganeh, Taylor & Zahradka, 2013). Tip 2 diyabetes

mellitus, visseral obezite ve kardiyovasküler komplikasyonlarla ilişkili bir hastalık olan polikistik over sendromunda azalmış omentin düzeyi, insülin direnci ile ilişkilidir (Tan vd., 2008) ve metformin uygulamasının ardından omentin düzeyi artmaktadır. İnsülin fetal yağ dokusunda ve iskelet kasında glukoz alımını arttırabilir. Glukoz alımının artması da fetal büyüme için gereklidir. Bu yüzden omentin fetal büyümede rol oynayabilir (Briana vd., 2010).

#### **2.2.4. Omentinin fizyopatolojik durumlarda değişen plazma düzeyleri**

Kronik iltihaplı barsak hastalıklarından birisi olan kron hastalığında, omental dokudaki omentin düzeyi azalmıştır (Schaffler vd., 2005). Romatoid artiritte sinoviyal sıvıdaki omentin miktarı sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında düşük olduğu saptanmış, omentinin dejeneratif osteoartritte muhtemel belirteç olabileceğine işaret edilmiştir (Xu, Zhu, Wang L., Wang D.F. & Jiang, 2012). Astımlı hastalarla yapılan bir çalışmada, solunum yollarındaki epitel hücrelerindeki omentin gen ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (Kuperman vd., 2005). Sigara içenlerde görülen düşük omentin düzeyleri şüpheli infeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir (Xue vd., 2012). Psöriyazisde omentin düzeyi azalmış olmakla birlikte psöriatrik artiritte artmıştır (Xue vd., 2012). Omentin ile ilgili kanser çalışmaları sınırlı olmakla birlikte malignant plevral mezotelyoma, ovaryum karsinoma, hepatosellüler karsinoma, kolon ve gastrik kanserlerde omentin gen ekspresyonu artmıştır (Zheng vd., 2012).

#### **2.2.5. Omentinin kardiyovasküler etkileri ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi**

Omentinin endotel ile ilgili fonksiyonu Yamawaki ve arkadaşlarının (Yamawaki vd., 2010) deneysel çalışmalarıyla açıklanmıştır. Yamawaki ve arkadaşları izole sıçan aortasında ve mezenterik arterde noradrenalin ile indüklenen kontraksiyon yanıtlarını omentin ile inhibe etmişlerdir. Ayrıca omentin uygulanmasının ardından endotelden salınan NO'ya bağlı olarak damar gevşemesi saptamışlardır. Ayrıca omentinin izole sıçan damarlarındaki NO üzerinden bu vazodilatör etkisini NO sentaz inhibitörü olan nitro-L-arjinin metil ester ile baskılamışlardır.

Ateroskleroza ve dolayısıyla koroner arter hastalığına bir iltihap sürecinin eşlik ettiği bilinmektedir. Omentinin en azından eNOS sentezini uyararak ateroskleroza önlediği düşünülmektedir. Çünkü NO üretimi oksidatif stres ve iltihabı baskılamaktadır. Omentinin vasküler endotele bağlı gelişen iltihap üzerine etkileri ile arteriyal kalsifikasyonun gelişmesini önleyerek de ateroskleroza önlediği düşünülmektedir (Tan, vd., 2015). Omentinin EYD'den

yüksek derecede eksprese olmasından dolayı sadece koroner ateroskleroz hastalığında değil ayrıca obezite ile ilişkili kardiovasküler hastalıklarda örneğin hipertansiyonda da koruyucu rolü olabilir (Mattu & Randeve, 2013). Nitekim Kazama ve arkadaşları (Kazama vd., 2013) sıçanlarda omentinin NO salınımını uyararak akut dönemde oluşturulan hipertansiyonu düşürdüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmadan sonra yine Kazama ve arkadaşları (Kazama vd., 2014) sıçanlarda monokrotalin ile indüklenen pulmoner hipertansiyondaki anormal kontraksiyonları kronik omentin uygulaması ile baskılamışlardır.

Maruyama ve arkadaşları (Maruyama vd., 2012) ise omentinin Akt/eNOS sinyal yolunu aktive ederek endotel hücre fonksiyonunu, kan akımını ve kapiller yoğunluğunu arttırdığını saptamışlar ve iskemide koruyucu rolünün olabileceğini önermişlerdir. Matsuo ve arkadaşları (Matsuo vd., 2014) da omentinin kalpteki AMPK sinyal yolunu aktive ederek miyokardiyal hipertrofide patolojik süreci düzelttiğini dolayısıyla kardiyak hipertrofinin tedavisinde hedef molekül olarak öne çıkabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bazı çalışmalarda serum omentin düzeyinin akut koroner sendrom veya stabil anjina pektoris hastalarında kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (Zhong vd., 2011). Kadoglou ve arkadaşları (Kadoglou vd., 2014), akut miyokard infarktüsünde serum omentin düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre düşük olduğunu bulmuşlardır.

Plazma omentin düzeyleri, yavaş koroner akım sendromu olan hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha düşük bulunmuştur. Buna göre omentin yavaş koroner akım sendromunun patojenezisinde rol oynayabilir (Ucgun, Basar, Memisogullari, Demirin, Türker & Aslantaş, 2014). Ayrıca koroner arter hastalığı olan hastalarda omentin genindeki Val/Val polimorfizmin kontrollere göre yüksek bulunmuş, Val/Val genotipinin koroner arter hastalığının oluşmasında risk faktörü olabileceği üzerinde düşünülmüştür (Yoruk vd., 2014).

Serum omentin düzeyleri tip 2 diyabetes mellitus ve iskemik kalp hastalığı olan hastalarda sağlıklı kontrollere göre daha düşük bulunmuştur (El-Mesallamy, El-Derany & Hamdy, 2011). Kataoka ve arkadaşları (Kataoka vd., 2014) akut iskemi hasarı oluşturulan sıçan kalplerinde omentinin AMPK ve Akt'a bağlı hücre içi sinyal mekanizmalarıyla kalp kası hücrelerinde apoptozisi baskılayarak iskeminin oluşturduğu hasarı iyileştirdiğini göstermişlerdir.

Son olarak Narumi ve arkadaşları (Narumi vd., 2014) ise azalmış serum omentin-1 düzeylerinin kalp yetmezliği olan hastalarda kötü kardiyak prognozun ortaya çıkması ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Serum

omentin-1 düzeyini kalp yetmezliği olan hastaların risk sınıflandırılmasında yeni bir prognostik belirteç olarak önermişlerdir (Narumi vd., 2014). Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda omentin iyi adipokinlerden birisi olarak görülmekte gelecekte kardiyovasküler hastalıklar için potansiyel belirteç olabileceği gibi terapötik hedef olarak da öngörülmektedir (Yamawaki vd., 2011a).

## **2.3. Kimerin**

### **2.3.1. Kimerinin tanımı, yapısı, ekspresyonu ve konsantrasyonu**

Kimerin 2007 yılında keşfedilmiş, yüz otuz yedi amino asiti olan yeni bir adipositokindir. Yirmi amino asitten oluşan N-terminal hidrofobik uç, 6 amino asitten oluşan C-terminal uç ve bu ikisi arasında bulunan yüz otuz yedi amino asitten oluşan sistatin kıvrımı içeren merkezi bir kısımdan oluşur. Kimerin toplam yüz altmış üç amino asit içeren inaktif form olan prokimerinden sentezlenir. İnsan ve sıçan kimerin proteinlerinin amino asit dizilimi % 80 homoloji göstermektedir (Ferland & Watts, 2015). Kimerin başlangıçta, G proteinine bağlı reseptör (GPCR) ve kemokin benzeri reseptör 1 (CMKLR1) eksprese eden makrofajlarda ve dentritik hücrelerde kemotaktik peptid olarak keşfedilmiştir (Wittamer vd., 2003). Ayrıca kimerin proteini, tazarotene indükleyen gen 2 (TIG2) veya retinoik asit reseptör responder 2 (RARRES2) isimleriyle yeni bir kemoatraktan adipokin olarak da tanıtılmıştır (Roh vd., 2007).

Kimerin, plesanta karaciğer ve BYD'de yüksek düzeyde eksprese olurken KYD, akciğer, kalp, ovaryum, böbrek, iskelet kası ve pankreas gibi organlarda daha az eksprese olmaktadır. Bundan dolayı dolaşımdaki kimerin miktarının büyük bir çoğunluğunu BYD'den sentezlenen kimerin oluşturmaktadır (Rourke, Dranse & Sinal, 2013; Bozaoglu vd., 2007; Goralski vd., 2007). Kimerin ve reseptörünün mRNA'sı farelerde hemen hemen tüm dokularda ve organlarda bulunur ancak adipoz dokudaki miktarı çok daha yüksektir (Roh vd., 2007).

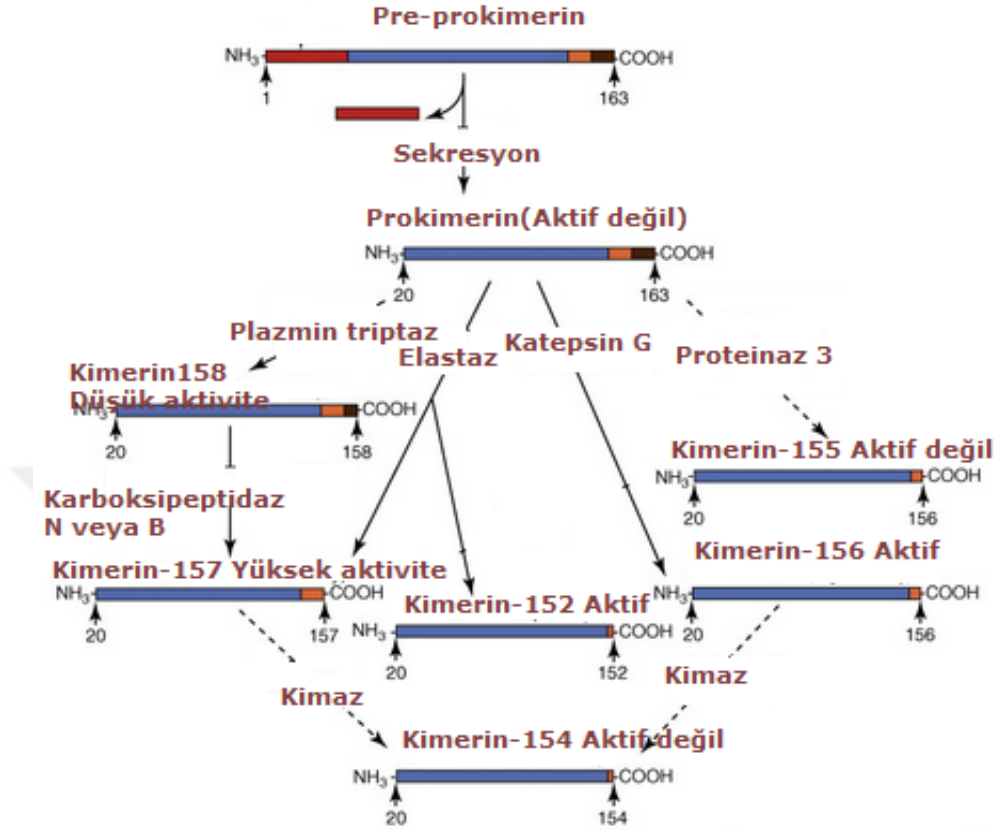
Sağlıklı popülasyonda dolaşımdaki total kimerin konsantrasyonu hem plazmada hem de serumda 90-200 ng/ml arasında değişmektedir. Genellikle dolaşımdaki total kimerin miktarı kadınlarda erkeklerden yaşıllarda ise genç erişkinden daha yüksektir (Rourke vd., 2013). Bununla birlikte bazı çalışmalarda kimerin konsantrasyonunun adiponektin ve leptin proteinindeki gibi cinsiyete bağlı değişmediği, erkek ve kadındaki miktarının bireylerin sağlıklı ya da tip 2 diyabet olup olmamasına göre değiştii belirtilmiştir (Weigert vd., 2010).



### **2.3.2. Kimerinin sentezi ve izoformları**

Kimerin 18 kDa uzunluğunda inaktif bir pro-protein olan prokimerin olarak salınır. On sekiz kDa'luk inaktif formu, C-terminal ucun proteolitik bölünmesiyle 16 kDa olan aktif formuna hızlıca dönüşebilir. Dolaşımdaki kimerinin çoğu nispeten inaktif prokimerin formundadır ancak kısmen fonksiyon göstermeleri için inaktif prokimerinin proteolitik süreci gerekmektedir (Ferland & Watts, 2015).

Prokimerin salgılandıktan sonra değişik organlarda ve hücre popülasyonlarında bulunan çeşitli ekstrasellüler proteazlar ve fibronolitik reaksiyonlar ile işlenir. Aktif nötrofillerden salınan nötrofil elastaz, mast hücrelerinden salınan triptaz, plazmin, katepsin G ve faktör XII a prokimerinin C-terminal ucundan 5-10 amino asiti ayırır. Böylece prokimerin plazma, serum ve hemofiltratta bulunan aktif kimerine dönüştürülür (Du & Leung, 2009a; Du vd., 2009b; Wittamer vd., 2003). Bu enzimler prokimerini C terminalinin değişik bölgelerinden bölerek uzunlukları ve biyolojik etkileri değişik olan biyoaktif izoformlar oluşturur. Örneğin 6 amino asit çıkartılarak, kimerin-157 oluşturulur ve bu form prokimerinden yaklaşık olarak yüz kat daha fazla aktiftir (Wittamer vd., 2003). Kimerin-156 daha düşük aktivite gösterirken, kimerin-155 ve kimerin-158'in aktivitesi azdır. Kimerin-154 ve kimerin-152 ise aktif değildir (Wittamer vd., 2003). Kimerinin çok basamaklı işlenmesi, kimerinin lokal veya sistemik aktivasyonu kadar inaktivasyonuna da olanak sağlar (Yamaguchi'den aktaran Rourke vd., 2013). Elastaz, plazmin triptaz ve katepsin G ile kimerinin farklı izoformları oluşturulabilir. Örneğin karboksipeptidaz B ve N düşük aktivitedeki kimerin izoformlarını kısmen işleyerek daha aktif formlara çevirirler (Du & Leung, 2009a; Du vd., 2009b). Proteinaz 3 (PR3) ve kimazlar ise pro veya biyoaktif kimerini inaktif formlara çevirebilirler (Guillabert'den aktaran Rourke vd., 2013). Kimerinin aktif formuna dönüştürülmesi şekil 2.5'de gösterilmiştir. İnsan kanında kimerin-155-157-158, abdominal asitte kimerin-157, sinoviyal sıvıda kimerin-158, serebrospinal sıvıda kimerin-158 ve hemofiltratta kimerin-154 gibi değişik organlarda farklı işlevlere sahip değişik kimerin izoformları bulunmaktadır (Wittamer ve Zhao'den aktaran Rourke vd., 2013).



Şekil 2.5 Kimerinin işlenmesi (Ernst & Sinal, 2010).

### 2.3.2.1. Kimerin-9

Bu çalışmamızda kullanılan kimerin formu 149-YFPGQFAFS-157 (kimerin-9)'dur. Bu nedenle kimerin-9 hakkında aşağıdaki bilgiler verilmiştir. 149-YFPGQFAFS-157 işlenmiş kimerinin C terminal ucuna karşılık gelmektedir ve özellikle kimerin reseptörlerinden kimerin 23 için güçlü bir agonisttir (Wittamer vd., 2004). Kimerin-9 insan ve sıçanlarda yüksek biyolojik aktivite gösteren sentetik proteindir. Karboksipeptidaz B ve N kimerin 163'ü C terminal ucundan bölerek 157 amino asitlik kimerin-9'a çevirebilme yeteneğine sahiptir (Ferland & Watts, 2015). Bu peptidin N terminal ucundan uzatılması aktivitesini arttırmaz. C terminal ucu kimerin proteinin aktivitesi için çok kritik olup, ucuna bir amino asit eklenmesi ya da iki amino asit çıkarılması potansiyel aktivitesini değiştirmektedir (Wittamer vd., 2004). Şekil 2.6'da kimerin-9'un işlenmesi anlatılmıştır.

mrlliplalwlgavvgvaELTEAQRRLQVALEEFHKHPPVQW 45  
 AFQETSVESAVDTPFPAGIFVRLFEFKLQQTSCRKRDWKKPECKVR 90  
 PNGRKRKCLACIKLGSEDKVLGRLVHCPIETQVLREAEEHQETQC 145  
 LRVQRAGEDPHSFYFPGQFAFSkalprs 163  
 kimerin-9 ↑ ayrılma bölgesi

Şekil 2.6 Kimerin-9'un amino asit dizilimi, sol üst köşede altı çizili koyu yazılmış yirmi amino asitlik kısım sinyal peptidi kimerin hücreden çıkmadan önce ayrılmaktadır. Sağ alt tarafta koyu ve italik yazılan altı amino asitlik bölge ise ekstrasellüler olarak C terminal ucundan ayrılmaktadır. Proteinin kritik bölgesi olan YFPGQFAFS amino asitleri ise kimerin-9 izoformunu oluşturmaktadır (Wittamer vd., 2004).

### 2.3.3. Kimerinin reseptörlerinin tanımı, tipleri ve ekspresyonu

İlk defa 2003 yılında kimerin reseptörü dentritik hücrelerde ve makrofajlarda tanımlanmış olup kimerin reseptör 23 ya da kemoatraktan benzeri reseptör 1 olarak adlandırılmıştır (Wittamer vd., 2003). Kimerinin ayrıca G proteine bağlı reseptör 1'i (GPR1) de aktive ettiği gösterilmiştir. G proteine bağlı reseptör yapısal olarak CMKLR1 ile ilişkilidir. G proteine bağlı reseptörün memelilerde fonksiyonu çok az bilinmektedir ve kimerinin GPR1'i aktive etme afinitesi CMKLR1 ile benzerdir (Barnea 'den aktaran Rourke vd., 2013). Kimerinin GPR1 üzerinden sinyal iletim yolu hakkında bilgi azdır ve bugüne kadar kimerinin bilinen biyolojik etkileri CMKLR1 aktivasyonuna atfedilmiştir. Kemokin benzeri reseptör 1 ve GPR1'den başka kimerinin üçüncü bir reseptörü kemokin CC motif reseptör-like 2 (CCRL2)'dir. Kemokin CC motif reseptör-like 2'ye bağlanan kimerin hücre içine alınmaz (Zabel'den aktaran Rourke vd., 2013). Üç kimerin reseptörü hem birbirine benzer hem de değişik doku dağılımına sahiptir. Kemokin benzeri reseptör 1'in yüksek düzeyde lökositlerde özellikle makrofajlarda ve dentritik hücrelerde, adipoz dokuda, kemikte, akciğerde, beyinde, kalpte ve plesantada ekspresyonu vardır (Wittamer vd., 2003). Kemokin benzeri reseptör 1'e benzer şekilde GPR1 ise yağ dokusunda eksprese edilmekle birlikte santral sinir sisteminde, iskelet kasında ve lökositlerde de eksprese edilir (Regard'dan aktaran Rourke vd., 2013). Kemokin CC motif reseptör-like 2 ise yaygın bir şekilde yağ dokusunda bulunmakla birlikte ayrıca akciğer, kalp, dalak ve lökositlerde de bulunmuştur (Zabel'den aktaran Rourke vd., 2013). Reseptör lokalizasyonun

çeşitliliği kimerinin biyoaktif ve biyolojik fonksiyonları için katkı sağlamaktadır (Wittamer vd., 2003).

### **2.3.3.1. Kimerin reseptörlerinin aktivasyonu ve sinyal yolları**

Kemokin benzeri reseptör 1 ve GPR1 reseptörlerinin aktivasyonu ve sinyal iletim yolu hakkında bilgi azdır. Bununla birlikte kimerinin CMKLR1 reseptörünü aktive ederek hücre içi kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) salımını uyardığı ve heterotrimerik inhibitör G proteinine (Gi) bağlanarak cAMP'yi azalttığı gösterilmiştir (Wittamer vd., 2003). Kimerin bundan başka ERK-1/2 fosforilasyonunu ve intrasellüler  $Ca^{+2}$  salımını arttırarak hücre göçünü de arttırır (Wittamer vd., 2003). Bununla birlikte insan adiposit hücrelerinde ve endotel hücrelerinde kimerinin düşük dozda uygulanmasının ERK-1/2 fosforilasyonuna neden olduğu fakat yüksek dozlarda bu etkiyi göstermediği bulunmuştur (Goralski vd., 2007). Kimerinin ayrıca p38, mitojen aktive eden protein kinazı (MAPK), Akt fosforilasyonunu ve PI3K'ı aktive ettiği de gösterilmiştir (Rourke vd., 2013). Kimerin, CMKLR1 reseptörü aracılığı ile adipogenezisi ve adiposit metabolizmasına katılan adiponektin leptin gibi proteinlerinin gen ekspresyonlarını düzenler (Goralski vd., 2007). Kimerin PI3K/Akt ve MAPK yolu ile anjiogenez ve hücre yaşamında da işe karışır (Kaur'dan aktaran Rourke vd., 2013).

### **2.3.4. Kimerinin vasküler tonus üzerine etkisi**

Kimerinin endotelde ve kas hücrelerinde belirlenmesiyle, damar üzerindeki etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda kimerin, endotelin-1 ve fenilefrini indükleyerek, hem endotelde hem de damar düz kasında etki gösterip, damar üzerinde direkt kontraktıl cevap oluşturabilmektedir. Kimerinin, endoteli sağlam damarlarda 1 saat gibi kısa süreli uygulanması ile endotelin-1 ve  $\alpha 1$ -adrenerjik agonisti olan fenilefrini indükleyerek vazokonstriksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Kimerinin etkisi uygulama süresine bağımlı olarak ortaya çıkmaktadır. En güçlü vazokonstriktör etki ise endoteli çıkarılmış aortta izlenmiştir (Lobato vd., 2012).

### **2.3.5. Kimerinin endotel üzerine etkisi**

Kimerin, vasküler endotel hücrelerinde, iltihap oluşmasına katkıda bulunur (Yamawaki vd., 2012). Değişik araştırmalarda kimerinin vasküler endotel hücrelerinde iltihap etkisinin yanısıra anti-inflamatuar etkisinin de olduğu gösterilmiştir. Anti-inflamatuar mekanizmanın daha çok

PI3K/Akt/eNOS yoluna bağılı olarak geliştiği açıklanmıştır (Yamawaki vd., 2012). Kimerin, hücre içi  $Ca^{+2}$  salınmasını uyarmakta ve cAMP birikimini inhibe etmektedir. Hücre içi  $Ca^{+2}$  yükselince kalmoduline bağlanır ve  $Ca^{+2}$  kalmodulin kompleksi endoteldeki NO sentazı aktive ederek, NO oluşumuna neden olabilir. Bu da endotel hücre fonksiyonlarında bir seri hücresel ve moleküler olayların başlamasını sağlayabilir (Roh vd., 2007). İn vitro çalışmalar kimerinin endotel hücre çoğalmasına, göçüne ve tp oluşumuna katkısı olduğunu göstermiştir (Kaur, Adya, Tan, Chen & Randeve, 2010, Bozaoglu vd., 2010).

### **2.3.6. Kimerinin anjiogenez üzerine etkisi**

Anjiogenez yeni kan damarı oluşumu olup, bazı anjiogenik faktörler tarafından düzenlenir. Araştırmalar kimerinin insan umbilikal veninde endotel hücrelerinde anjiogenezisi düzenlediğini göstermiştir (Kaur vd., 2010, Bozaoglu vd., 2010). Kimerinin anjiogenik sinyal yollarını aktive ettiği, insan endotel hücrelerinde hücre çoğalması ile hücre gn uyardığı ve kapiller tp oluşumunu desteklediği gösterilmiştir (Rourke vd., 2013). Kaur ve arkadaşlarının (Kaur vd., 2010) yaptığı çalışmada kimerinin, insan endotel hücrelerinde fonksiyonel olarak anjiogenezini indüklediği, hücre gn ilerlettiği ve anjiogenik sinyaller oluşturduğu tespit edilmiştir. Kimerin bu etkilerini doz ve süre bağımlı yapmaktadır. Yine Bozaoğlu ve arkadaşlarının (Bozaoglu vd., 2010) yaptığı in vitro çalışmalarda kimerinin önemli lde kılcal damar yapılarının oluşumunu, toplam tübül uzunluğunu ve hücre çoğalmasını arttırdığı izlenmiştir.

### **2.3.7. Kimerin ve obezite**

lmcl obez hastalarda dolaşımdaki kimerin konsantrasyonu yüksek bulunmuştur (Sell'den aktaran Rourke vd., 2013). Serum kimerin düzeyi vücut kitle indeksi, kan basıncı, serum lipid düzeyi, insülin ve kolesterol gibi obezite ile ilişkili pek çok parametre ile paralel artış göstermektedir (Bozaoglu vd., 2007; Chakaroun vd., 2012). Egzersize bağlı kilo kaybı veya kalori alımının azaltılması serumdaki kimerin seviyesini azaltır (Chakaroun vd., 2012). Kimerin, anjiogenezis ve vaskülarizasyonu arttırarak adipoz dokunun genişlemesine katkıda bulunur (Ernst vd., 2012).

### **2.3.8. Kimerin ve obeziteye eşlik eden hastalıklar**

#### **2.3.8.1. Metabolik sendrom ve tip 2 diyabet**

Kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diyabet ve yüksek kan basıncı obeziteye eşlik eden hastalıklar içerisindedir. Bunlar metabolik sendrom için

risk oluşturur. Dolaşımdaki kimerinin artması metabolik sendrom için önemli bir risk faktörü olarak önerilmektedir (Chu vd., 2012). Metabolik sendromlu hastalarda kandaki adipoz doku kaynaklı kimerin düzeyinin kontrollere göre kıyaslandığında önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (Yan vd., 2012). İnsüline direncin geliştiği obez bireylerde veya tip 2 diyabette adipoz doku kaynaklı artmış kimerin konsantrasyonları bulunmaktadır (Rourke vd., 2013).

### **2.3.8.2. Kimerin ve iltihap**

Kimerin iltihaba yanıt olarak üretilir, iltihap aracılarının sekresyonunu ve ekspresyonunu değiştirir böylece iltihap yanıtına katkıda bulunur. Wittamer ve arkadaşları (Wittamer vd., 2003) artritli hastaların sinoviyal sıvısında kimerin konsantrasyonunu yüksek bulmuşlar ve kimerinin iltihap ile ilişkili olabileceğine dikkat çekmişlerdir. Artmış plazma kimerin düzeyinin, hem romatoid artrit hastalığının skorlanmasında hem de romatoid artrit hastalığında belirteç olarak kullanılabilmesi öngörülmüştür. İltihap belirteçlerinden olan C-reaktif protein, interlökin-6 ve TNF- $\alpha$  ile dolaşımdaki kimerin düzeyi arasında güçlü bir korelasyon vardır (Rourke vd., 2013). Bundan başka aktif doku hasarı ve iltihapta nötrofillerden salınan proteazlar kimerin aktivitesinin artmasına katkıda bulunabilirler (Zabel & Wittamer'den aktaran Rourke vd., 2013).

### **2.3.9. Kimerin düzeyinde yükselişler**

Kron hastalığında, ülseratif kolitte (Weigert'den aktaran Rourke vd., 2013), kronik böbrek hastalığında (Pfau'den aktaran Rourke vd., 2013), kronik pankreatitte (Adrych'den aktaran Rourke vd., 2013), pre-eklemlerde (Stepan'dan aktaran Rourke vd., 2013), polikistik over sendromunda (Tan vd., 2008) ve karaciğer hastalıklarında (Yılmaz'dan aktaran Rourke vd., 2013) serumdaki kimerin düzeyi önemli derecede artmıştır. Ayrıca romatoid artrit, osteoartrit, psöriatik artritte sinoviyal sıvıdaki kimerin konsantrasyonu iki kat artmıştır (Huang & Wittamer'den aktaran Rourke vd., 2013).

### **2.3.10. Kimerinin ateroskleroz gelişiminde etkisi**

Aortik ve koroner aterosklerozu olan kırk bir olgunun otopsilerinin değerlendirilmesinde ateroskleroz düzeyi ile periaortik ve perikoronar yağ dokudaki kimerin ekspresyonu arasında korelasyon bulunmuştur (Spiroglou, Kostopoulos, Varakis & Papadaki, 2010). Hah ve arkadaşları (Hah vd., 2011) yaptıkları bir çalışmada çoklu stenotik koroner damarları olan bireylerde, tek stenotik koroner arteri olan bireylere göre daha yüksek serum kimerin düzeyleri saptamışlardır. Dolayısıyla koroner arter stenozlu hastaların kimerin

ekspresyonlarıyla koroner arter hastalığının derecesi ve kardiyometabolik risk faktörleri arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Kimerin ile ateroskleroz gelişimi arasındaki muhtemel mekanizmaları sıralarsak birinci olarak aterosklerotik lezyonlarda kimerin birikimi ile immün hücreler o alana çekilip damar duvarının yeniden şekillenmesine katkı sağlayabilir. İkinci olarak adipositlerde ve iskelet kasında glukoz alımının ve insülin duyarlılığının bozulması ile aterosklerozisin gelişimine katkıda bulunabilir. Son olarak kimerin daha önce de belirtildiği gibi PI3K/Akt/eNOS sinyal yolu ile vasküler endotel hücrelerinde NO oluşumunu arttırabilir. Böylece iltihap durumunu etkileyebilir (Rhee, 2011). Koroner arter hastalığı tanısı almış hastaların EYD örneklerinde de kimerin mRNA'sı ve protein miktarı da kontrollere göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Gao vd., 2011).

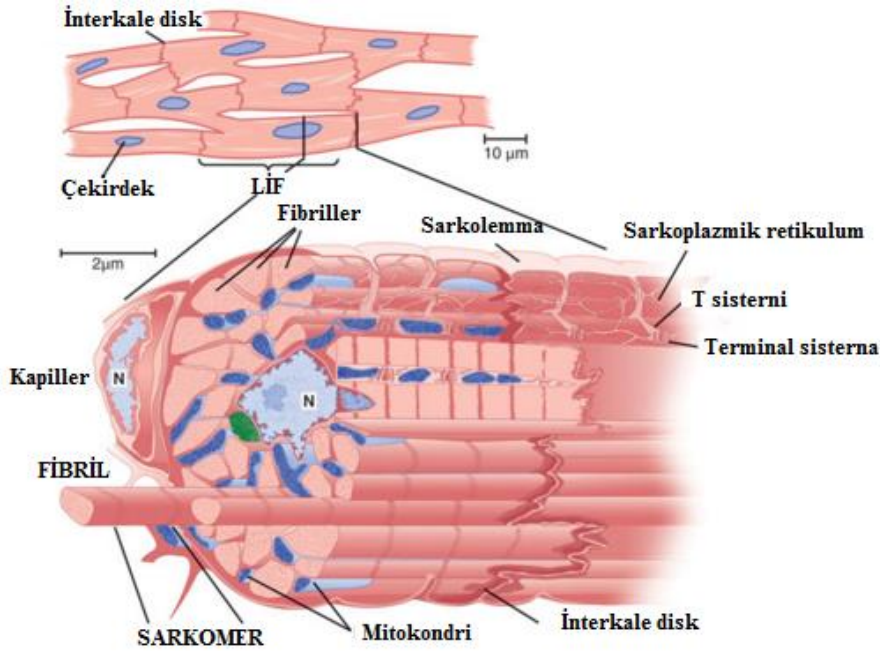
## **2.4. Kalp Kasının Kasılması**

### **2.4.1. Kalp kasının yapısı**

Kalp kası hücrelerinin zarına sarkolemma denir. Kalp kası hücrelerinde bol miktarda mitokondri bulunur ve hücrelerinin orta kısımlarında sadece bir çekirdek vardır (Şekil 2.7). Kalp kası liflerinin kendiliğinden uyarılma özelliğine sahip olması ve lif boylarının kısa olması önemli bir özelliğidir (Pinnell, Turner & Howell, 2007; Barrett, 2010; Guyton & Hall, 2001). İskelet kaslarında olduğu gibi kalp kası da kasılabilen proteinleri yani aktin filamentleri, miyozin filamentleri, troponin ve tropomiyozin içerir (Pinnell vd., 2007). İskelet kası gibi kalp kası da ışık mikroskopunda çizgili özellik göstermesine rağmen iskelet kasından farklıdır (Barrett, 2010; Guyton & Hall, 2001).

Şekil 2.7'de gösterildiği gibi kalp kası hücrelerinin seri halde bağlanmasıyla kalp kası lifleri oluşur. Bir kalp kası lifinin diğer kalp kası lifine bitiştiği yerde her iki lifin zarları kaynaşır ve interkale diskler oluşur. Bunlar kalp kası liflerinde enine olarak yer alır (Sarantitis, Papanastasopoulos, Manousi, Baikoussis & Apostolakis, 2012). İnterkale diskler, kalp kasının çizgili yapısında daima Z çizgileri hizasında bulunur. Kalp kası hücre zarları interkale disklerde birbirleriyle kaynaşarak gap junction denilen bağlantıları oluşturur. Bu bağlantılar 6 adet konneksin adı verilen protein moleküllerinin birleşmesiyle oluşturdukları por ile iyonların serbestçe diffüze olmalarına izin verir. Dolayısıyla iyonlar ve aksiyon potansiyelleri (AP) gap junctionlardan kolayca geçerek bir kalp kası hücresinden bir sonrakine hızlıca iletilir. Böylece tek bir kalp kası hücresi için geçerli olan hep ya da hiç yasası tüm kalp kitlesi için geçerli olmakta ve kalbe fonksiyonel sinsityum özelliğini kazandırmaktadır (Sarantitis vd., 2012; Barrett, 2010; Guyton & Hall, 2001).

Kalp kası liflerindeki sisternalar iskelet kasına göre daha az gelişmiştir. Sisternaların yeterli  $Ca^{+2}$  depo edememesinden dolayı kasılma için ekstrasellüler  $Ca^{+2}$ 'a gerek vardır. İskelet kasında iki T tübül bulunmasına karşın kalp kasında bir T tübül sistemi bulunmaktadır. Bununla birlikte iskelet kası ile karşılaştırdığımızda kalp kasında T tübüllerinin çapı 5 kat, hacimi ise 25 kat iskelet kasından daha büyüktür. Ayrıca kalp kasında T tübül sistemi, iskelet kasında olduğu gibi A-I kavşağı yerine Z çizgileri hizasına yerleşiktir (Guyton & Hall 2001). Her kas lifi birkaç yüz ile birkaç bin miyofibril içerir. Her bir miyofibrilde ise bin beş yüz kadar miyozin üç bin kadar da aktin filamentleri bulunmaktadır. Aktin ve miyozin filamentlerinin birbirinin içine geçmesiyle açık ve koyu renkli bantlar oluşur. I bandı sadece aktin filamentleri içerir ve açık renklidir. A bandı ise miyozin filamentleri ile aktin filamentlerinin uçlarını içerir ve koyu renklidir. Miyofibrilin iki Z çizgisi arasında kalan bölümü olan sarkomer miyofibrillerin kasılabilir en küçük birimidir (Pinnell vd., 2007, Sarantitis vd., 2012).



Şekil 2.7 Kalp kası lifinin yapısı (Sarantitis vd., 2012).

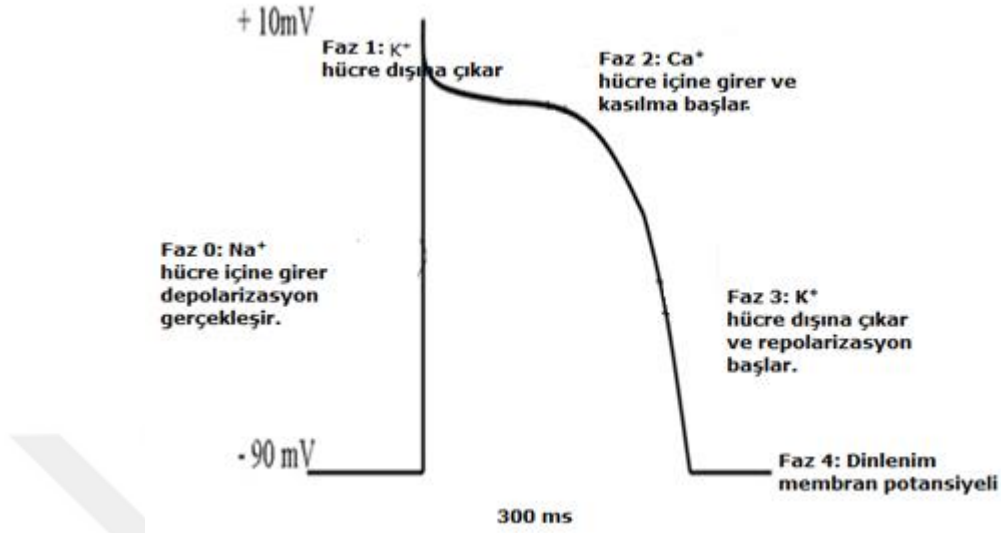
#### 2.4.2. Kalp kası lifinin elektriksel özellikleri

Kalp hücrelerinin AP'leri, iskelet kası ve sinir hücrelerinden değişiktir (Pinnel vd., 2007). İskelet kası ve sinir hücrelerinde görülen sivri AP'lerine karşılık, kalp kasında platolu AP görülür (Barrett, 2010; Guyton & Hall,



2001). Bununla birlikte kalp hücrelerinin kendi arasında da AP'ler açısından farklılıklar vardır (Augustus 2009; Barrett, 2010). AP kalp kası liflerinde kasılmayı başlatarak kalbin bir pompa gibi çalışmasını sağlamaktadır (Nerbonne & Kass, 2005; Barrett, 2010). Sinoatriyal (S-A) düğüm ve atriyoventriküler (A-V) düğüm liflerinde dinlenme membran potansiyeli -55 ile -65 mV iken (Augustus, 2009), ventrikül kasında -90 mV'dur (Augustus 2009; Pinnel vd., 2007). Kalp kası hücre zarında depolarizasyonla birlikte bu zar potansiyeli -90 mV'dan, +10 mV'a kadar yükselebilmektedir (Pinnel vd., 2007). Memeli kalbinde depolarizasyon hemen hemen 2 ms sürerken plato fazı ve repolarizasyon fazı 200-300 ms sürer (Barrett, 2010) ve böylece kalpteki AP yaklaşık olarak 300 ms'de tamamlanır (Pinnel vd., 2007).

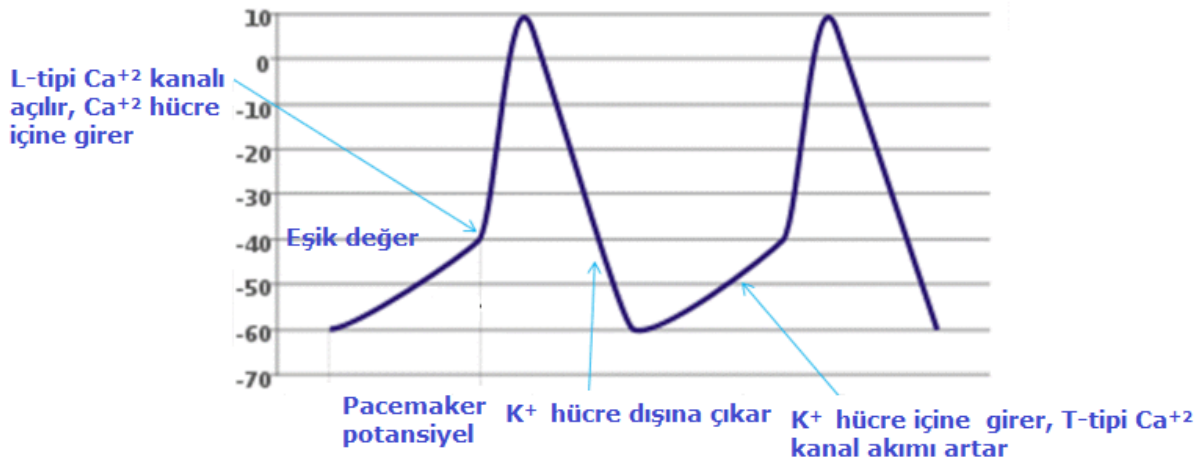
Kalp kası hücrelerinin AP'si 5 faza bölünebilir. Şekil 2.8'de ventrikül kası hücrelerinde AP'nin 5 fazı ve temel olarak her fazdan sorumlu olan akımlar görülmektedir. Bu fazlardan faz 0, AP'nin başlangıçtaki hızlı depolarizasyon ve aşma fazı, faz 1 erken repolarizasyon fazı, faz 2 plato fazı, faz 3 final repolarizasyon fazı ve faz 4 dinlenme potansiyeli fazıdır (Pinnel vd., 2007; Augustus 2009; Nerbonne & Kass, 2005). Faz 0 hızlı sodyum ( $\text{Na}^+$ ) kanallarının açılması ile  $\text{Na}^+$ 'nın hücre içine doğru akımına bağlı olarak gelişir (Pinnel vd., 2007). Faz 1  $\text{Na}^+$  kanallarının kapanması ve hızla açılan bir tip potasyum ( $\text{K}^+$ ) kanalıyla,  $\text{K}^+$ 'nın geçici bir süre hücre dışı akımına bağlı olarak ortaya çıkar (Pinnel vd., 2007; Augustus 2009; Nerbonne & Kass, 2005). Faz 2 L-tipi  $\text{Ca}^{+2}$  kanallarından hücre içine doğru  $\text{Ca}^{+2}$  girişi ile ortaya çıkar. (Pinnel vd., 2007; Nerbonne & Kass, 2005). Ayrıca  $\text{Ca}^{+2}$  dışında  $\text{Na}^+$  iyonları da bu kanallardan hücre içine girebildiği için bu kanallara  $\text{Ca}^{+2}$ - $\text{Na}^+$  kanalları da denir (Pinnel vd., 2007). Faz 3'de  $\text{Ca}^{+2}$ - $\text{Na}^+$  kanalları kapanarak  $\text{Ca}^{+2}$  ile  $\text{Na}^+$  iyonlarının hücre içine girişinin durmasıyla,  $\text{K}^+$  geçirgenliği çok hızlı bir şekilde artar. Voltaj kapılı  $\text{K}^+$  kanallarından hücre dışına  $\text{K}^+$ 'nın net akışı bu fazı ortaya çıkarır (Pinnel vd., 2007; Augustus 2009). Faz 4'de AP dinlenme membran potansiyeline döner (Pinnel vd., 2007; Augustus 2009; Nerbonne & Kass, 2005).



Şekil 2.8 Kalp kası AP fazları (Pinnel vd., 2007).

#### 2.4.2.1. Pacemaker potansiyeli

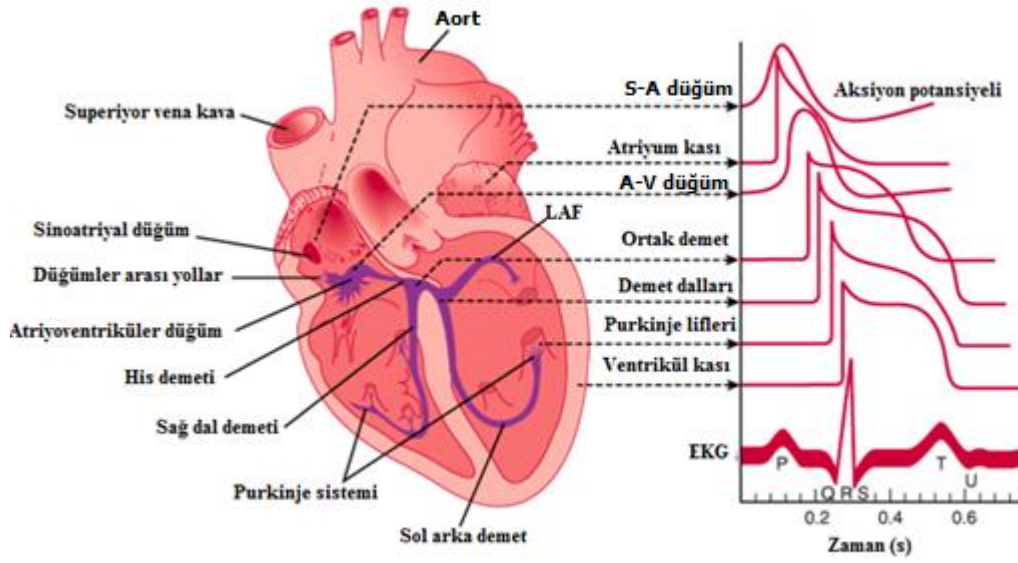
S-A düğüm, A-V düğüm, His demeti ve Purkinje lifleri kendiliğinden uyarı çıkarabilmelerinden dolayı pacemaker aktivitesi gösterirler. Bu hücreler sabit bir dinlenme zar potansiyeline sahip değildirler ve pacemaker potansiyelleri oluştururlar (Pinnell vd., 2007). Pacemaker hücrelerinin zar potansiyeli her implustan sonra ateşleme düzeyine azalır. Dinlenme potansiyelinden ateşleme düzeyine doğru bu azalmaya pacemaker potansiyeli denir. Pacemaker potansiyelinin ilk kısmı zarın K<sup>+</sup> geçirgenliğindeki azalma oluşturur. Bu durum hücre dışına K<sup>+</sup> akımını azaltır. Bundan sonra T-tipi kalsiyum kanalları açılır ve hücre içine T-tipi kalsiyum kanal akımı artar böylece pacemaker potansiyeli tamamlanır. Pacemaker potansiyelinin sonunda -40 mV olan eşik değer düzeyine ulaşılır. Bu noktada L-tipi kalsiyum kanallarından hücre içine Ca<sup>+2</sup> akımı artar ve bu da AP'nin yükselme fazını oluşturur. Bundan sonra hücre dışına doğru K<sup>+</sup> akımı AP'nin repolarizasyon fazını ortaya çıkarır (Barrett, 2010; Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Pacemaker potansiyeli  
([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pacemaker\\_potential\\_annotated.gif](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pacemaker_potential_annotated.gif)).

### 2.4.3. Kardiyak impulsun iletilmesi

Şekil 2.10'da görüldüğü gibi kalpte S-A düğümünden çıkan AP'ler ön, orta ve arka internodal yollarla yaklaşık 0.03 saniyede A-V düğümüne ulaşır. A-V düğümünde 0.13 saniye fizyolojik bir gecikmeye uğrayarak ventriküllerin sistol öncesinde yeterli miktarda dolmasına imkan verir. Böylece S-A düğümünden çıkan bir uyarının A-V demete ulaşmaya kadar için yaklaşık 0.16 saniye geçer. A-V düğümündeki gecikmeyi sempatik uyarı azaltır, parasempatik uyarı artırır (Gerard & Derrickson, 2014; Darcy, 2004; Guyton & Hall, 2001; Barrett, 2010). A-V düğüm, A-V demet ya da His demeti adı verilen özel bir miyokard dokusu ile devam eder ve interventriküler septumun içerisinden geçerek iki dala ayrılır. Sağ dal sağ ventrikülde, sol dal sol ventrikülde ilerleyerek apekse ve oradan da kalbin endokardına doğru yönelir. His demeti verdikleri küçük dallarla miyokard içinde yayılırlar. Purkinje lifleri olarak adlandırılan bu dallar, iletinin ventriküller içerisinde hızlı yayılmasını ve aynı anda kasılmasını sağlar. AV demete giren uyarıların Purkinje liflerinin uçlarına ulaşmaya kadar geçen zaman yaklaşık 0.03 saniyedir (Shaffer vd., 2014; Darcy, 2004; Guyton & Hall, 2001; Barrett, 2010).

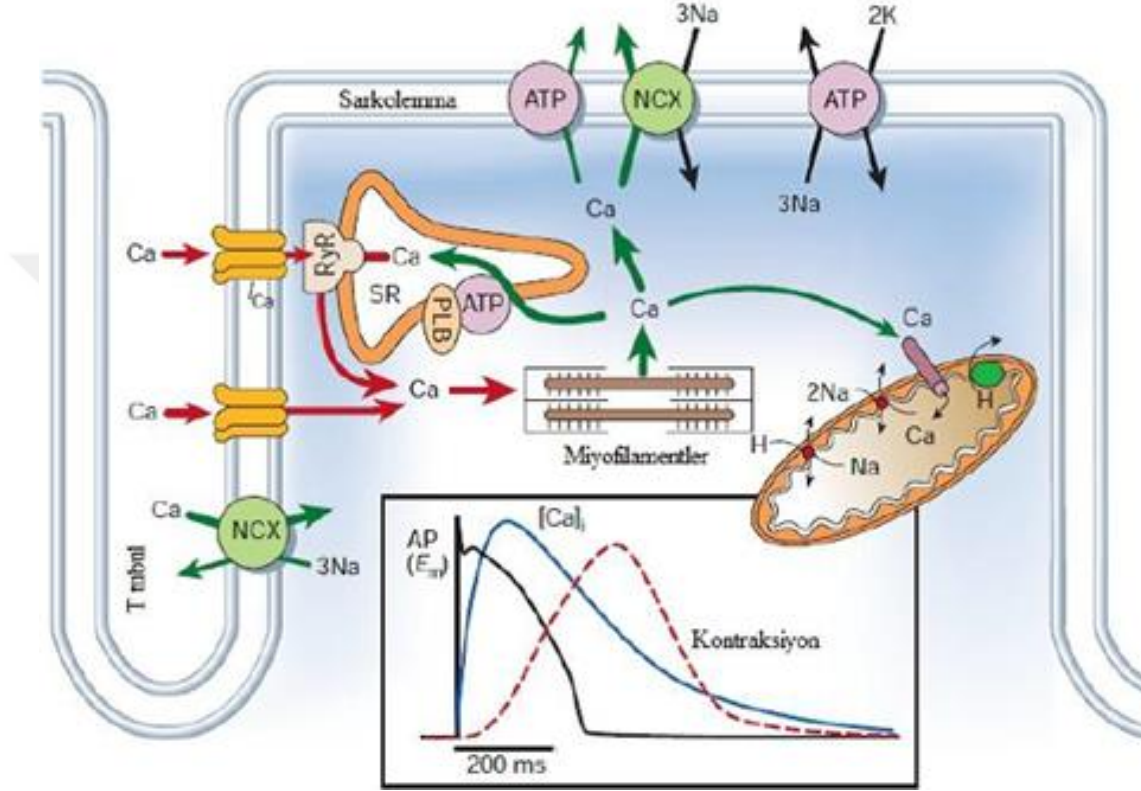


Şekil 2.10 Kalbin ileti sisteminin farklı bölgelerinden kayıt edilen AP'ler (Barrett, 2010).

#### 2.4.4. Kalpte eksitasyon-kontraksiyon bağlantısı

Eksitasyon-kontraksiyon bağlantısı (ECC) AP'nin mekaniksel cevaba çevrilmesiyle oluşan fizyolojik süreci ifade eder (Sandow, 1952). Kalbin pompalama işlevini yerine getirmesi sarkolemanın elektriksel olarak uyarılmasıyla başlayıp kalp kası liflerinin kasılmasıyla son bulan olaylar zinciri ile gerçekleşmektedir (Katz, 2006). Eksitasyon-kontraksiyon bağlantısı, AP'nin sarkolemayı depolarize ettiği zaman başlar (Katz, 2006). AP kontraksiyonun başlaması için gereklidir (McDowell, McCall, Matter, Estridge & Vlahos, 2004). AP'nin yayılmasıyla  $Ca^{+2}$  iyonları L-tipi kalsiyum kanallarından kalp kası hücrelerinin sitoplazmasına geçer. İntrasellüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu sarkoplazmik retikulumun (SR) zarındaki ryanodin reseptörleri tarafından algılanır ve SR depolarından sitozole daha fazla  $Ca^{+2}$  salınmasını tetikler (Bers, 2002, Şekil 2.11). Fabiato (Fabiato, 1985), kalp kası hücreleri üzerine  $Ca^{+2}$  içeren solüsyonların uygulanmasıyla intrasellüler depolardan  $Ca^{+2}$  salınımının tetiklendiğini göstermiştir. Kalpte, ryanodin reseptörleri etrafındaki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun artışıyla, SR depolarından  $Ca^{+2}$  salınımının tetiklenmesiyle oluşan bu fenomen kalsiyumla indüklenen kalsiyum salınımı olarak bilinmektedir (Ferrier & Howlett, 2001). Pek çok çalışma L-tipi kalsiyum kanallarından  $Ca^{+2}$  akışının kalsiyumla indüklenen

kalsiyum salınımı fenomeninde önemli olduğunu desteklemektedir (Ferrier & Howlett, 2001).



Şekil 2.11 Eksitasyon-kontraksiyon bağlantısı (Bers, 2002). ATP; Adenozin trifosfat, NCX;  $\text{Na}^+$ -  $\text{Ca}^{2+}$  değiştiricisi, RyR; Rıyanodin, PLB, Fosfolamban, SR; Sarkoplazmik retikulum AP; Aksiyon potansiyeli

#### 2.4.5. Kasılma ve gevşeme sırasındaki olaylar

Dinlenim halindeki kalp kası lifinde troponin I, aktin filamentine sıkıca bağlanarak onu inhibe eder. Ayrıca troponin-tropomiyozin kompleksi de aktin filamentlerinin etkin yerlerini örtmüştür. Miyozin filamentinin baş kısmında bir aktine bağlanma bölgesi ve bunun arkasında da bir ATP bağlanma yeri olduğu bilinmektedir (Barrett, 2010). Kasılma başlamadan önce, ATP çapraz köprü başlarına bağlanır ve miyozin başındaki ATPaz aktivitesi ile hemen yıkılarak adenozin difosfat (ADP) ve inorganik fosfat (Pi) oluşur. Bu durumda miyozin başları aktin filamentlerine doğru uzanmış fakat henüz aktine

bağlanmamıştır. Hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun hızla 10-yüz kat artması kasılmayı başlatır (Katz, 2006). Sitoplazmadaki serbest  $Ca^{+2}$ 'nin troponin C'ye bağlanmasıyla troponin I ile aktin arasındaki bağlantı zayıflarken, tropomyozin lateral olarak yer değiştirir. Böylece aktin filamentleri üzerindeki aktif bölgeler açılır ve miyozin başları buraya bağlanır. Bu durumda miyozin başından Pi salınır. Miyozin başı çapraz köprü koluna doğru eğilir, bu aktin filamentini çekmek için güç darbesi sağlar. Bunun olması için gerekli enerji yıkılan ATP'den elde edilir. Güç darbesi miyozin başlarının aktin filamentlerini sarkomerin merkezine doğru çekmesine neden olur ve kas kasılması ortaya çıkar (Bers, 2002; Barrett, 2010). Kasılma sonunda ADP, miyozin filamentinin baş kısmından ayrılarak miyozin başına yeni bir ATP bağlanır. ATP'nin bağlanması miyozin başının aktin filamentinden ayrılmasını sağlar (Boron & Boulpaep, 2012). Gevşeme hücre içindeki  $Ca^{+2}$ 'nin  $Ca^{+2}$ -ATPaz ve  $Ca^{+2}$ -ATPaz'a göre ikinci derecede önemli olan  $Na^{+}$ - $Ca^{+2}$  değiştiricisi ile dışarı atılmasıyla başlar. SR'daki SERCA ile ve mitokondriyal alımı ile ortamdaki  $Ca^{+2}$  uzaklaştırılır (McDowell vd., 2004; Şekil 2.11). Sıçanlarda  $Ca^{+2}$ 'nin geri alınımının % 92'sinin SERCA aracılığıyla gerçekleştirildiği gösterilmiştir (Khavandi vd., 2009).

## **2.5. Kardiyovasküler Parametreler**

### **2.5.1. Sol ventrikülün geliştirdiği basınç**

Sol ventrikülün geliştirdiği basınç, sol ventrikül performansını değerlendirmek için kullanılmakta ve mmHg cinsinden belirtilmektedir. Sol ventrikülün geliştirdiği basınç sol ventrikül sistolik basıncı ile sol ventrikül diyastol sonu basınç arasındaki farktır (Abel, 2004). Bu nedenle SVGB'yi anlayabilmek için sol ventrikül sistolik fonksiyonlarının incelenmesi gerekmektedir.

Sol ventrikülün sistolik fonksiyonları kalp performansının önemli bir belirleyicisidir. Sol ventrikül sistolik fonksiyonları da ön yük, ard yük ve kalbin kasılma kuvveti tarafından belirlenmektedir. Bu üç faktör organların değişen gereksinimlerine göre dokuların ihtiyacı olan perfüzyonu sağlar (Katz, 2002; Günal & Bilgiç, 1997; Solaro, 2011). Önyük, kalbe dönen kan miktarı yani diyastol sonu hacimidir (Katz, 2002; Solaro, 2011). Sol ventrikül için ön yük, sol ventrikülün diyastol sonu basıncı olarak belirtilebilir. Ön yükteki artışlar, miyofibrillerin kısalma miktarını ve hızını arttırarak kalbin kasılma gücünü arttırır (Günal & Bilgiç, 1997). Ön yük ile kalp kası kuvveti arasındaki ilişki Frank-Starling yasası ile düzenlenir. Kalbe venöz dönüş arttığında, ventrikülün dolma basıncı ve atım volumünün artarak kalbin gösterdiği uyum sağlama yeteneğine Frank-Starling yasası adı verilir. Bu yasa temel olarak ventriküllere ulaşan kan miktarı ne kadar fazlaysa, kasılma kuvvetinin ve dolayısı ile atım haciminin de o kadar büyük olacağı anlamına

gelir. Ancak bu kasılma kuvveti bir fizyolojik sınıra kadar devam eder ve bir süre sonra kalp kası lifleri daha fazla gerildiği halde kasılma kuvveti azalmaya başlar. Frank-Starling eğrileri bugün kalbin performansının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Katz, 2002; Guyton & Hall, 2001; Katzung, 2004). Kalbin sistolu sırasında kanın aortaya atılması için aşılması gereken basınç ard yükü tanımlamaktadır (Katz, 2002; Solaro, 2011). Ard yük kalp kasılmasına karşı olan dirençtir (Solaro, 2011; Günel & Bilgiç, 1997).

Otonom sinir sistemi kontraktiletiyi etkileyen en önemli faktördür. Parasempatik sinir liflerinden salınan asetilkolin, muskarinik reseptörler aracılığı ile kalp üzerinde negatif inotropik ve kronotropik etkiler gösterir. Halbuki sempatik sinir uçlarından noradrenalin salınımı başlıca  $\beta 1$ -AR'lerin aktivasyonu ile kalpte pozitif inotropik ve kronotropik etkiler oluşturur (Güler, 1997). Kontraktilete kalbin sistolu sırasında hücre içindeki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu ile bağlantılıdır. Çünkü hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı kasılma kuvvetini arttırmaktadır. Kalbin kasılma kuvveti katekolaminler tarafından artırılır bu etkiye  $\beta 1$ -AR'ler ve cAMP işe karışır. cAMP SR'a  $Ca^{+2}$  aktif transportunu artırır. Bu şekilde kalbin gevşemesini artırır ve sistolu kısaltır. Bu olay dakikada kalp atım sayısı arttığı zaman kalbin diyastolde yeterince kanla dolmasını sağlar (Barrett, 2010; Ikannikov & Yelle, 2011; Güler, 1997). Hücre içi pH'ı, iyonların konsantrasyonu, NO düzeyleri ve onun metabolitleri miyokardiyal kontraktiletiyi etkilemektedir. Farmakolojik ajanlar örneğin dijitaler pozitif inotropik etkiye neden olur (Solaro, 2011). Kalbin kontraktilesinin değerlendirilmesinde bir belirteç olarak klinikte en sık ejeksiyon fraksiyonu kullanılır. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu, diyastol sonunda sol ventrikülden toplanan kan haciminin ne kadarının fırlatıldığını veya kalbin her kasılmasında sol ventrikülden ne kadar kan pompalandığını ifade eder. Buna göre ejeksiyon fraksiyonu atım haciminin diyastol sonu hacime oranının yüzde olarak ifadesidir (Schiller, 2003). Normal şartlar altında ejeksiyon fraksiyonu % 60'dır (Guyton & Hall, 2001).

### **2.5.2. + $dP/dt_{max}$**

Fizyolojik araştırmalarda ve klinik uygulamalarda sol ventrikül performansının değerlendirilmesi önemlidir (Blaudszun, Licker & Morel, 2013). Kalp kasının kasılma kapasitesi kasılma sırasında maksimal kuvvet gelişimi tarafından belirlenir. Ventrikülün geliştirdiği maksimal basınç ( $dP_{max}$ ), genellikle izovolumetrik sol ventrikül preparasyonlarında kalp kasılmasının bir belirteci olarak kullanılmaktadır ve ventriküllerde maksimal basınç ile oluşturulan ventrikül duvarının maksimal gerimini ifade etmektedir (Murad & Tucci, 1999).

$+dP/dt_{max}$ , ventrikül basıncında artışın maksimum hızı olup kontraktilitedeki akut değişikliklerin iyi bir göstergesidir.  $+dP/dt_{max}$ , sol ventrikül basınç dalgasının türevi alınarak bulunur. Normalde  $+dP/dt_{max}$  izometrik kasılma fazının sonunda aort kapağı açılmadan hemen önce olduğundan aortik basıncıdaki değişimlerden çok fazla etkilenmez. Aortik basıncın çok düşük olduğu durumlarda  $+dP/dt_{max}$  aort kapağının açılmasından sonra oluşabilir. Bu durumda ventrikülün geliştirdiği daha az bir basınçla aort kapağı açılır ve bu yüzden ventrikülün yüksek bir basınç oluşturması için yeterince zaman yoktur. Böylece kasılmada bir değişiklik olmaz fakat  $+dP/dt_{max}$  değerinde azalma görülür (Hamlin & del Rio, 2012). Bu gibi durumların dışında  $+dP/dt_{max}$ , ön yüke oldukça duyarlıdır ve ard yükten bağımsızdır. Daha çok ön yük ile ilgili çalışmalarda kasılmanın bir indeksi olarak kullanılabilir (Blaudszun vd., 2012).

### **2.5.3. Dakikada kalp atım sayısı**

S-A düğümün her uyarısında kalbin depolarizasyonu ve repolarizasyonu sağlanır. S-A düğümü normalde dakikada 70-80 AP oluşturacak şekilde ateşleme yaparak kalbin ileti sisteminin diğer kısımlarındaki deşarjları engeller. Kalbin ileti sistemindeki diğer merkezler daha düşük uyarı frekansına sahip olduklarından kendilerine ait uyarıyı çıkaramadan S-A düğümünden gelen yeni bir uyarı ile yeniden depolarize olurlar. Böylece A-V düğüm ve Purkinje sistemi, S-A düğümünden gelen uyarıların etkisinde kalarak kendileri uyarı doğuramazlar. Bundan dolayı normal olarak kalbin pacemakerı S-A düğümdür. A-V düğüm ise, normalde dakikada 40-60 uyarı ile S-A düğümün zedelenmesi ya da blokajı gibi durumlarda bir pacemaker olarak görev yapar (Shaffer, McCraty & Zerr, 2014).

Kalp atım sayısı, kalbin 1 dakika içindeki sistol sayısını belirttiği gibi aynı zamanda S-A düğümünden çıkan uyarı sayısına eşittir. Sağlıklı bireylerde dinlenme halinde dakikada 72 atım ortalama kalp atım sayısı olarak kabul edilmektedir. Ancak bu değer kişiden kişiye değişiklik gösterdiği gibi aynı kişide farklı zamanlarda da değişiklik gösterebilir. Dinlenme durumunda kalp atım sayısı yaş, cinsiyet, egzersiz, vücut pozisyonu ve vücut sıcaklığı gibi bazı faktörlerden etkilenmektedir (McCardle, Katch & Kach, 1991).

#### **2.5.3.1. Sempatik ve parasempatik sinir sisteminin kalp atım sayısına etkisi**

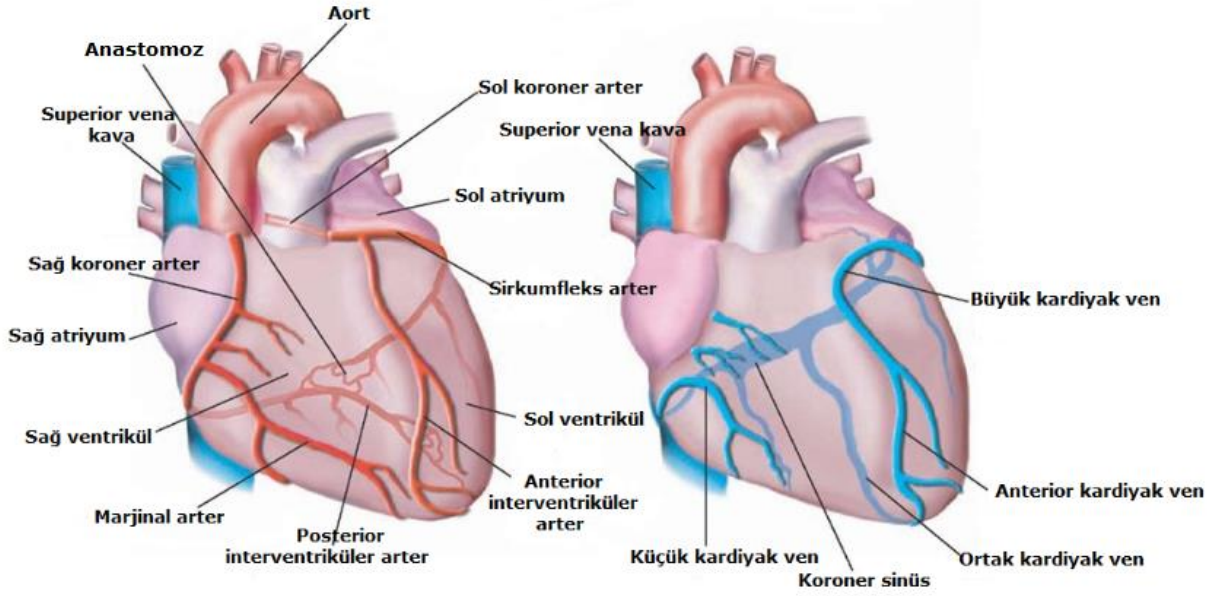
Parasempatik sinirlerin uyarılması ile salınan asetilkolin, G proteini aracılığıyla muskarinik reseptörler üzerinden kalp kası hücre zarında  $K^+$  geçirgenliğini artırır. Bunun sonucunda kalp kası hücresi  $K^+$  kaybı nedeni ile



daha az uyarılabilir duruma gelir ve böylece S-A düğümün deşarjları azalır. Parasempatik sistem ayrıca AV demette de uyarılabilmeyi azaltarak uyarının atriyaumlardan ventriküllere geçişini geciktirir. Böylece dakikada kalp atım sayısı azalır. Aksine sempatik sistem kalp atım sayısı üzerinde zıt etkiler oluşturur. Sempatik sistem S-A düğüm deşarjlarını hızlandırır, kalbin tüm bölümlerinin ileti hızını ve uyarılabilmesini artırır. Sempatik sinir sistemi bu etkilerini, noradrenalinin  $\beta$ 1-AR'ne bağlanması ve kalp kası hücre zarlarının  $Na^+$ ya ve  $Ca^{+2}$ ya geçirgenliğini arttırması ile yapar (Guyton & Hall, 2001; Barrett, 2010).

#### **2.5.4. Koroner akım**

Aort kapağının 1 cm'den daha az bir yüksekliğinde bulunan koroner ostioadan çıkan sağ ve sol koroner arterler ve bunların dalları tarafından miyokardiyal kanlanma sağlanmaktadır. Sol koroner arter sol atriyoventriküler oluk boyunca sirkumfleks ve sol anterior dessending arter dallarına bölünür. Sirkumfleks arter, atriyoventriküler oluk boyunca seyrederken sol atriyum, sol ventrikül ve S-A düğümün % 40'ına dallar verir. Sol anterior dessending arter ise anterior interventriküler oluk boyunca seyrederek iki ventrikülü ve interventriküler septumu kanlandırır. Sağ koroner arter sağ atriyoventriküler olukda seyreder ve seyri boyunca sağ atriyum, sağ ventrikül ve S-A düğümün % 60'nı kanlandıran değişik dallar verir. Sağ ve sol koroner sistem kollateral damarlar ve onların terminal dallarının anastamozu ile birbirine bağlanır (Green & Hutton, 1999; Darcy, 2004). Sol ventrikül ve septumun venöz drenajının büyük kısmı koroner sinüs aracılığıyla sağ atriyuma geri döner. Koroner sinüs büyük kardiyak venin devamı olup, küçük ve orta boylu venlerden kan alır. Geri kalan kan ise anterior kardiyak ven aracılığıyla sağ atriyuma boşalır uzaklaştırır (Green & Hutton, 1999; Şekil 2.12).



Şekil 2.12 Koroner dolaşım (<http://what-when-how.com/paramedic-care/principles-of-electrocardiography-clinical-essentials-paramedic-care-part-2/>)

#### **2.5.4.1. Koroner kan akımının düzenlenmesi**

Koroner kan akımının düzenlenmesi sinirsel ve metabolik olmak üzere iki değişik mekanizma ile sağlanmaktadır. Sinirsel düzenlenme otonom sinir sisteminin koroner damarlar üzerine direkt yada dolaylı etkileriyle yapılmaktadır. Metabolik yada kimyasal düzenlenme ise dokuda azalan koroner akım miktarına yanıt olarak serbestleşen lokal metabolik araçlar ile olmaktadır (*Morton & Michael, 2006*).

##### **2.5.4.1.1. Koroner kan akımı değerleri ve koroner kan akımının sinirsel ve metabolik düzenlenmesi**

Dinlenim halinde koroner kan akımı 100 gram kalp dokusunda dakikada 60-80 ml'dir (Green & Hutton, 1999; Darcy, 2004). Kalbin kasılma gücünde artış koroner kan akımını arttırırken, aksine kasılma gücünün azalması koroner kan akımını azaltır. Koroner kan akımı kalp kasının ihtiyacı olan oksijen tüketimi ile orantılı olarak değişmektedir. Şöyle ki, kalbin oksijen ihtiyacının artması halinde oksijen gereksinimini karşılamamanın tek yolu koroner kan akımını arttırmaktır (*Morton & Michael, 2006; Chilian, 1997*). Örneğin egzersiz sırasında koroner kan akımı 4-5 kat artarak 100 gram kalp

dokusunda dakikada 400 ml'ye kadar çıkabilmektedir (Green & Hutton, 1999; Darcy, 2004).

Sinirsel düzenlemede asetilkolin koroner damarlarda az miktarda vazodilatasyona yol açabilir. Adrenalin ve noradrenalin damar duvarındaki  $\alpha$  reseptörleri ile vazokonstriksiyon,  $\beta_2$  reseptörleri ile vazodilatasyon yapar. Bununla birlikte sempatik uyarı koroner damarlarda hafif daralma oluştursa da, sempatik uyarının koroner damarlar üzerinde vazodilatatör etkisi daha güçlüdür (Morton & Michael, 2006).

Koroner kan akımının metabolik kontrolünde otopregülasyon mekanizması devreye girer. Herhangi bir nedenle koroner perfüzyon basıncı azalırsa ilgili bölgedeki damarlar vazodilatatör maddeleri serbestletir bunun sonucunda arteriyoller genişler ve azalmış koroner akımı artarak normale döner. Koroner kan akımında azalma nedeni ile adenozin konsantrasyonu artar. Adenozin konsantrasyonundaki artış vazodilatasyona ve koroner kan akımı artışına yol açar. Laktik asit, karbondioksit,  $K^+$  ve histamin gibi dokudaki diğer metabolik ürünler, koroner kan akımı arttıkça ya da azaldıkça konsantrasyonlarını değiştirerek koroner arterlerin tonusunu etkiler. Otopregülasyona miyojenik mekanizma da katılmaktadır. Eğer doku metabolizması sabitse, arteriyel kan basıncındaki değişimler koroner kan akımının sabit devam ettirilmesi için damar yatağında direnç değişikliklerine neden olur. Kanın damar duvarına uyguladığı basınca karşılık damar düz kası kasılarak artan kan akımını normale çevirir (Green & Hutton, 1999; Darcy, 2004; Guyton & Hall, 2001; Barrett, 2010; Chilian, 1997).

### **2.5.5. Monofazik Aksiyon Potansiyeli**

Monofazik aksiyon potansiyeli kaydı için cam bir mikroelektrod kalp kasi lifinin içine ve bir referans elektrod lifin dışına konur (Franz, 1994). Kontak elektrod yöntemi ile MAP kaydında ise 1-2 mm çapındaki ekstraselüler elektrodlar yardımı ile AP endokard veya epikarddan kaydedilebilir. Bu yüzden transmembran potansiyel ölçümünde kullanılan yöntem in vitro preparasyonlarla sınırlıdır (Franz, 1999). Halbuki kontak elektrod yöntemi ile MAP kaydı in situ çalışan kalpte endokardiyumdan epikardiyuma kadar ölçülebilir (Yang, 2010). Bu şekilde MAP tekniği özellikle klinik uygulamalarda kalbin lokal elektrofizyoloji çalışmalarında uygundur (Franz, 1999). Bu teknik klinik ve deneysel kardiyolojide araştırmalar için kullanışlı bir yöntemdir (Yang, 2010).

Monofazik aksiyon potansiyeli tekniği ilk defa 1883 yılında Sanderson ve Page'in kurbağa kalbinde yaptığı çalışmalarla başladı. Bir elektrod kalbin sağlam yüzeyine, diğeri ise zedelenmiş bölgesine yerleştirilerek MAP

kaydedildi (Yang, 2010). Daha sonra unipolar kayıt yöntemi kullanılarak ekstrasellüler MAP kaydedildi (Franz, 1999). Travmatik olmayan ilk MAP kaydı ise 1934 yılında Jochim ve arkadaşları tarafından geliştirildi. 1986 yılında Franz ve arkadaşları, Jochim ve ekibinin çalışmalarını temel alarak miyokardiyum ile basit bir şekilde temas halinde olan bir elektrodla endokard veya epikarda karşı bir basınç uyguladılar. Böylece stabil ve yüksek kaliteli MAP kayıtlarını elde ederek kontakt elektrot yöntemini tanıttılar (Yang, 2010). Franz ve arkadaşlarının kullandığı kontakt elektrod yöntemi hem basit hem de klinik açıdan güvenli bulunmuştur. Yöntemin uygulanması sırasında kalpte hasar olmadığı için bu yöntemle alınan MAP kayıtları sabit olup aynı bölgeden MAP'ın izlenmesine uzun bir süre olanak sağlar (Franz, Swerdlow, Liem & Schaefer, 1988).

Kontakt elektrot yöntemiyle ölçülen MAPamp'ü 5-50 mV değerleri arasında değişmekte olup 81 mV'a kadar çıkabilir. Bu değişkenlik elektrotun temas basıncı ya da doku tipinden ileri gelir (Franz, 1999). MAPamp'ü ekstrasellüler dirence göre değişir. Örneğin kalp yüzeyinin kuru olması durumunda ekstrasellüler direnç artar ve MAPamp'ü daha büyük olur. Kalp yüzeyi bir elektrolit solüsyonu ile ıslatılarak ekstrasellüler direnç azalır MAPamp'ü azalır (Antzelevitch & Moe, 1981). Ayrıca MAP elektrodu ile kalp arasındaki temas basıncı arttığında da MAPamp'ü artar. Bu basınç azaldığında MAPamp'ü azalır. Bununla birlikte MAP elektrodunun altındaki kalp duvarının kalınlığı ve hücrelerin hacimi de MAPamp'ünü etkiler. Büyük kalplerden özellikle ventrikülden kayıt edilen MAP, küçük kalplerden ve atriyumdan kayıt edilen MAP'a göre daha büyük amplitüde sahiptir (Franz, 1999). Monofazik aksiyon potansiyeli uzun bir süre tek bir bölgeden kayıt edilirse MAPamp'ü azalır (Moore & Franz, 2007).

Monofazik aksiyon potansiyeli süresi AP'nin repolarizasyon fazı hakkında bilgi verir (Olejnickova, Novakova & Provaznik, 2015) ve kalp kalp atım sayısı ile negatif ilişkilidir (Wang, Chen, Liu, Xiao & Wang, 2014). MAP yöntemi kullanılarak aritmilere eşlik eden uzun QT sendromu belirlenebilir. Akut iskemi reperfüzyonda oluşan ventriküler aritmilerin saptanmasında da MAP yöntemi kullanılabilir. Monofazik aksiyon potansiyeli tekniği ilaçların AP üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılan en sık yöntemlerden birisi olmuştur (Yang, 2010).

### **2.5.6. Retrograd Kalp Perfüzyonu: Langendorf Tekniği ile İzole Kalp Perfüzyonu**

1895 yılında Oskar Langendorff memeli kalbinde çıkan aortu kanüle ederek aorta sabit bir hidrostatik basınç uygulamış ve retrograd perfüzyon kavramını tanıtmıştır. Bu çalışmalarla izole kalp perfüzyon yönteminde önemli

bir atılımı gerçekleştirmiştir (Liao, Podesser & Lim, 2012). İzole kalp perfüzyon yönteminde, retrograd yani vücuttakine ters perfüzyon ile aort kapakları kapanır. Böylece perfüzyon koroner ostia'ya şant edilerek koroner dolaşıma geçer. Venöz dönüş sağ atriyum içindeki koroner sinüs aracılığı ile boşaltılırken, sağ ventrikülde toplanan perfüzyon ise pulmoner arterin kesilmesi ile kalpten drene edilmektedir. Bundan sonra kalp fonksiyonları ve kasılmalar kayıt edilmektedir (Liao vd., 2012). Retrograd perfüzyon tekniği kalp fizyolojisi ve biyolojisindeki araştırma çalışmalarında köklü değişikliklere neden olmuştur (Skrzypiec Spring, Grotthus, Szlag & Schulz, 2007). 1904 yılında Gottlieb ve Magnus sol ventrikül içerisine içi sıvı dolu küçük bir balon yerleştirip kasılmaları kayıt ederek Langendorf yöntemini modifiye etmişlerdir (Lim, Venetucci & Eisner, 2012). 1939 yılında Katz ve arkadaşları ise kalpleri sabit akımda perfüzyon ederek perfüzyon basıncındaki değişiklikleri ölçmüşlerdir (Liao vd., 2012).

### **2.5.6.1. İzole kalp modellerinde avantajlar ve sınırlandırmalar**

İzole kalp yöntemi özellikle küçük memelilerde tekrarlanabilirliğinin yüksek, çalışılabilmesinin hızlı ve maliyetinin düşük olması nedeni ile önem taşımaktadır. İzole kalp yöntemi biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik ve farmakolojik parametrelerin ölçülmesinde kullanılabilir. Bu yöntem ayrıca iskeminin oluşturulmasına ve çok sayıda biyolojik parametrenin değerlendirilmesine izin verir (Sutherland & Hearse, 1999). Kalplerde aritmilerin ve ektopik odakların değerlendirilmesi açısından da bu yöntem kardiyovasküler ve farmakolojik araştırmalarda kullanılmaktadır (Olejnickova vd., 2015; Liao vd., 2012).

DeneySEL çalışmalarını yaparken öncelikle sempato-adrenerjik aktivasyonun istenmeyen etkilerinden kaçınılması ve hayvanın stresten korunması gereklidir. ATP depoları solunumun durmasından 10-30 saniye sonra boşalmaktadır. Bu yüzden kalp hızlı bir şekilde çıkarılmalı ve dokudaki ATP kaybından kaçınılmalıdır (Döring, 1990). ATP'nin aşırı boşalması izole kalplerde elektriksel ve mekaniksel parametreleri olumsuz etkilemektedir (Skrzypiec-Spring vd., 2007). Bundan başka uzun süreli çalışmalarda proteinden arındırılmış solüsyonlar kullanılması gerektiği bildirilmiştir. Aksi takdirde doku ödeminin gelişmesi kronotropik ve kontraktıl fonksiyonların bozulmasına neden olacaktır (Olejnickov vd., 2015).

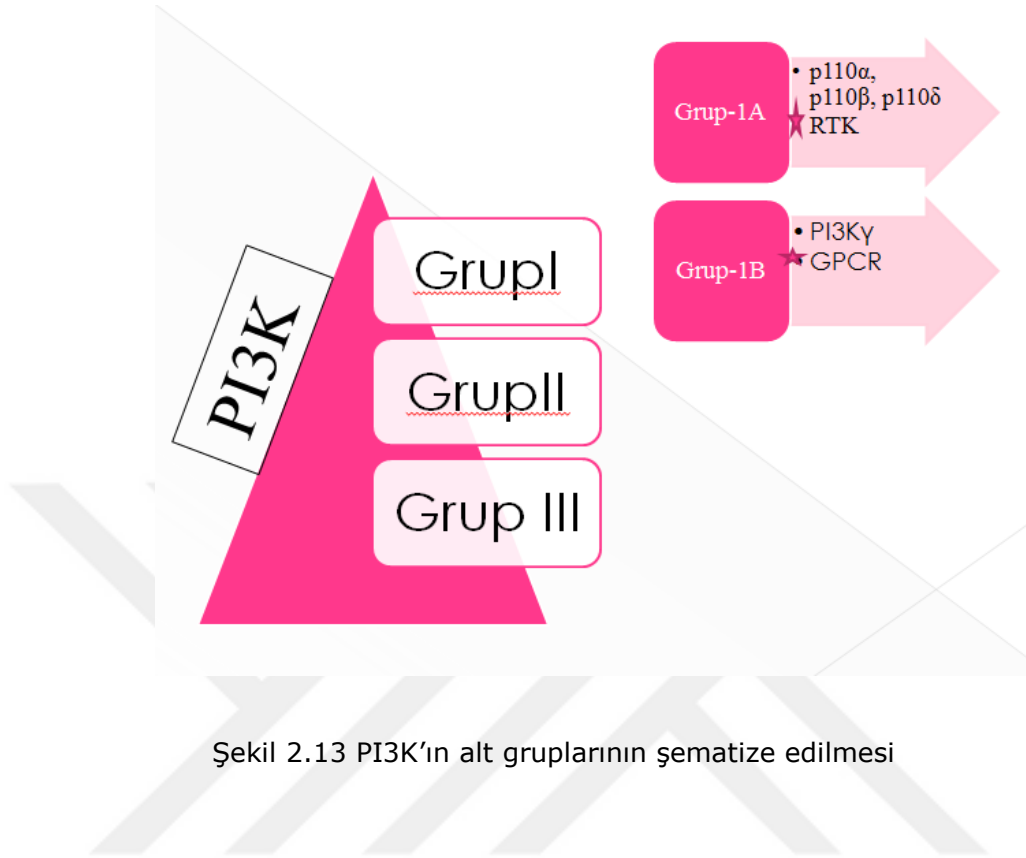
## 2.6. PI3K/Akt Sinyal Yolu'nun Eksitasyon ve Kontraksiyon Bağlantısının Düzenlenmesindeki Rolü

### 2.6.1. PI3K/Akt Sinyal Yolu

Fosfoinositid 3-kinazların (PI3K) aktivasyonu hücre yaşamını, hücre çoğalmasını, hücre hareketliliğini, hücre göçünü ve salgısını arttırdığı gibi hücre iskeleti ve  $Ca^{+2}$  sinyali gibi pek çok fizyolojik süreçleri de düzenler (Kerfant vd., 2005; Kerfant, vd., 2006). Fosfoinositid 3-kinazların aktivasyonu genellikle bir büyüme faktörü olan ligandın reseptör tirozin kinazlara (RTK) bağlanması ile olur. Uyarılmamış hücrelerde PI3K heterodimerinde yer alan p85 düzenleyici alt birimi p110 katalitik alt birimine bağlıdır. Böylece katalitik alt birimin aktivasyonu engellenmiş olur. Reseptör tirozin kinazların aktivasyonu ile fosforile tirozinler p85 düzenleyici alt birim için bağlanma bölgeleri oluşturur. Bu bağlanma p85'in p110 üzerindeki inhibitör etkisini sonlandırır. Böylece p110 katalitik alt birimi serbest kalır ve PI3K'nın aktivasyonunu başlatır. Aktive olan PI3K, fosfotidilinositol 4,5-bifosfatın (PIP2) inositol 3,4,5-trifosfata (IP3) dönüşümünü sağlar. İnositol 3,4,5-trifosfata, Akt ve fosfoinosit-bağımlı kinaz-1 (PDK1) gibi proteinlerin hem birikimine hem de aktivasyonuna yol açar (Bader, Kang, Zhao & Vogt, 2005; Pawson & Nash, 2000). Aktive olan Akt, NO yapımı ve  $Ca^{+2}$  akışı, metabolizma, protein sentezi, apoptozis, hücre çoğalması ve yaşamını kontrol eder (Ghigo vd., 2011).

Fosfoinositid 3-kinazları kodlayan genler I, II ve III olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Sınıf I PI3K kalpte eksprese edilir ve PIP2'yi IP3'e çevirir (Kerfant vd., 2005, Kerfant vd., 2006). P110 katalitik alt birim ve sınıf I PI3K heterodimerik şekildedir. Sınıf I, PI3K'nın  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  olarak isimlendirilmiş dört değişik grubu vardır (Ghigo vd., 2011). PI3K $\alpha$  ve PI3K $\gamma$  sırasıyla PI3K'nın IA ve IB'nin alt grupları olup, her iki izoform kalp kası hücrelerinde eksprese edilir. Grup IA'nın aktivasyonu genelde RTK ile gerçekleşirken, grup IB'nin ise G proteine bağlı reseptörler (GPCR) aracılığı ile olmaktadır (Kerfant vd., 2006, Şekil 2.13).

Sınıf I, PI3K kalpte ve damarlarda iltihap olaylarının yanı sıra kalp kası hücrelerinin kasılması ve kalpte hipertrofi gibi kritik kalp fonksiyonlarının düzenlenmesinde anahtar rolü oynar (Ghigo vd., 2011).



Şekil 2.13 PI3K'in alt gruplarının şematize edilmesi

### 2.6.1.1. PI3K $\alpha$ 'nın etkileri

PI3K $\alpha$  kalbin fizyolojik büyümesinde, PI3K $\gamma$  ise cAMP metabolizmasının değişikliğe uğratılmasındaki yeteneğinden dolayı kalp kasılmasının önemli bir düzenleyicisi olarak ortaya çıkmıştır (Kerfant vd., 2006).

#### 2.6.1.1.1. PI3K $\alpha$ kardiyomiyosit anabolizmasını ve kontraktilitesini nasıl düzenler?

PI3K $\alpha$ , yalnızca RTK'lar ile aktive edilir. PI3K $\alpha$ 'nın aşırı ekspresyonu kalpte hipertrofinin yanısıra kalp ve vücut ağırlığında artma ile sonuçlanır (Ghigo vd., 2011). PI3K $\alpha$  aslında kalp büyümesi ve fizyolojik hipertrofinin düzenlenmesinde rol alır (Ghigo vd., 2011). Ayrıca fetal gelişimde PI3K $\alpha$ 'nın aktivasyonu kalp kası hücrelerinin büyümesi için gereklidir (Yano vd., 2008). PI3K $\alpha$ 'nın kaybında, dilate kardiyomiyopati, miyokard infarktüsü ve kronik adrenerjik stimülasyon gibi patolojik olaylar ile kalpteki basınç yükünün artması çok daha fazla tehlikeli olmaktadır (Ghigo vd., 2011). PI3K $\alpha$  anabolik ve kardiyoprotektif etkilerinin yanı sıra ayrıca kardiyak kontraktilitenin pozitif düzenlenmesine de katılmaktadır. Yetişkin farelerde PI3K $\alpha$ 'nın artmış ekspresyonu kalp kasında in vitro kontraktiliteyi arttırmaktadır (Yano vd., 2008). Diğer bir deyişle PI3K $\alpha$  (-/-) genotipindeki farelerde bazal kalp kası

kasılmasında hafifçe azalma görülmektedir. Yabani tipi fareler ile karşılaştırıldığında, *PI3Ka* geni çıkarılmış farelerde L-tipi  $Ca^{+2}$  kanal akımının azaldığı belirlenmiştir (Sun vd., 2006). Genetik bulguların dışında izole kalp kası hücrelerinde, *PI3Ka* inhibitörleri L-tipi  $Ca^{+2}$  kanal akımını ve kontraktiliteyi düşürmüştür (Sun vd., 2006). *PI3Ka* kalp kası hücrelerinde  $Ca^{+2}$  akımını arttırarak kalpte pozitif inotropik etkiler göstermektedir (Ghigo vd., 2011).

### **2.6.1.2. *PI3Ky*'nin kontraktilite üzerine etkileri**

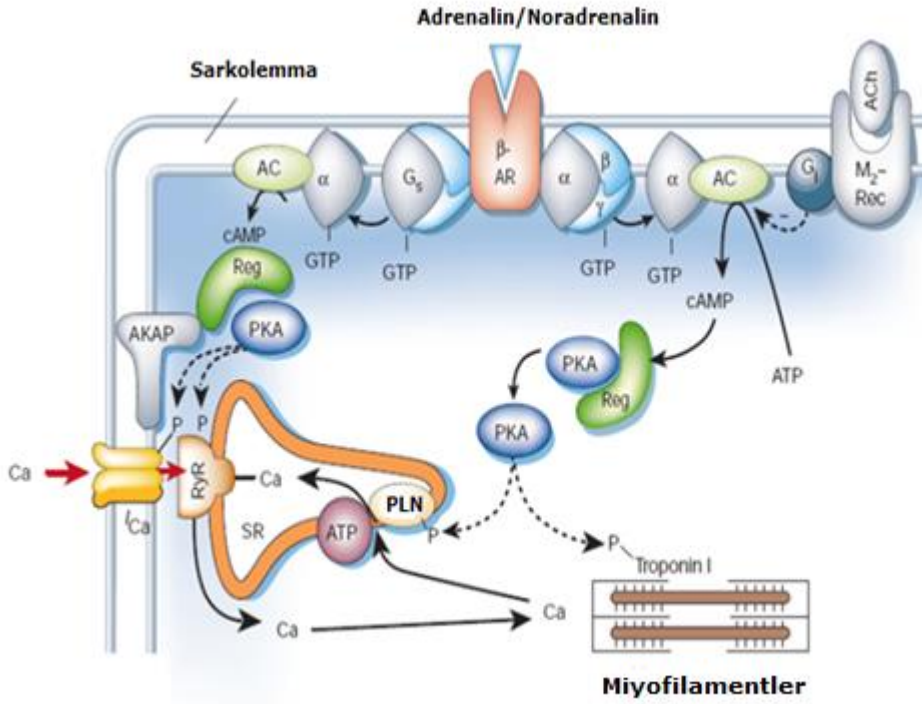
Crackower ve arkadaşları (Crackower vd., 2002), *PI3Ky* (-/-) genotipindeki farelerde, hücre içi bazal cAMP düzeyinin arttığını, kalp fonksiyonunun geliştiğini ve kalp kası hücrelerinin kasılmasının arttığını göstermişlerdir (Crackower vd., 2002). *PI3Ky* (-/-) genotipindeki farelerde sürekli cAMP artışıyla ortaya çıkan PLN fosforilasyonu kalpte artan kontraktilite ve gevşeme ile yakından bağlantılıdır. Bu verilere göre *PI3Ky* cAMP düzeyini negatif yönde düzenlemektedir. *PI3Ky* (-/-) farelerde SERCA2a ve PLN ekspresyon düzeyi değişmeden PLN fosforilasyonu artmıştır ve artmış cAMP düzeyi ile birlikte L-tipi  $Ca^{+2}$  kanal akımında % 20 yükselme görülmüştür (Kerfant vd., 2006). Özet olarak, *PI3Ky* kaybı SR'dan  $Ca^{+2}$  salınmasının yükselmesine ve kontraktilite artışına neden olmaktadır. Kasılmadaki artma cAMP-PKA artışı, SR'daki artmış PLN fosforilasyonu ve cAMP'nin hidrolizinden sorumlu olan enzimler olan fosfodiesterazların azalması ile gerçekleşmektedir (Kerfant vd., 2005). *PI3Ky* eksikliği olan farelerde dakikada kalp atım sayısı ve ortalama kan basıncı normal olmasına rağmen ekokardiyografi ile değerlendirildiğinde kalp fonksiyonlarının yabani tiplere göre arttığı bulunmuştur (Alloatti vd., 2005).

## **2.7. Beta Adrenerjik Reseptörler**

$\beta$ -AR'ler, G proteinlerine bağlı reseptörler olarak bilinir. G proteinlerinin amino asit sırasına ve fonksiyonuna göre  $G_a$ ,  $G_{a_s}$ ,  $G_{a_i}$ ,  $G_{a_q}$  ve  $G_{a_{12}}$  olmak üzere değişik grupları vardır (Madamanchi, 2007). GPCR'ler transmembran  $\alpha$ -heliks yapısında olup hücre dışı amino terminali ve hücre içi karboksil terminali ile hücre zarını yedi defa kateder. Sempatik stimülasyon ile kalpteki  $\beta$ -AR'nin aktivasyonu kontraksiyonu arttırır ve gevşemeyi hızlandırır (Bers, 2002). Reseptöre ligandın bağlanması ve heterotrimerik G-proteinleri ile eşleşmesinden sonra GPCR'de biçimsel bir değişiklik olur ve G-proteine bağlı GDP'nin yerini GTP alır. Bundan sonra G proteinin  $\alpha$  alt birimi  $\beta$  ve  $\gamma$  alt birimlerinden ayrılır ve hücre zarında AS enzime bağlanır. Bunun sonucunda AS aktive olur ve cAMP yapımı artar. cAMP artışı ile PKA aktive edilir. Böylece eksitasyon-kontraksiyon ile ilişkili değişik proteinler fosforile edilir. Protein kinaz A, sarkolemmal düzeyde LTCC'yi fosforile ederken, SR



düzeyinde ise PLN'yi fosforile eder. L-tipi  $Ca^{+2}$  kanalı ve ryanodin fosforilasyonuna bağlı  $Ca^{+2}$  girişi ve salınımı kasılma ile sonuçlanır. Ayrıca fosforile PKA, troponin I ve miyozin bağlayan protein C'yi de fosforile eder. Şekil 2.14'de görüldüğü gibi PKA'nın gevşeme üzerine etkisi sırasıyla PLN ve troponin I fosforilasyonu, SR'ye  $Ca^{+2}$ 'nin hızlıca alınması ve miyofilamentlerdeki troponin C'ye bağlı olan  $Ca^{+2}$ 'nin ayrılması ile gerçekleşir (Bers, 2002).



Şekil 2.14  $\beta$ -AR'lerin aktivasyonu ile ECC ile ilişkili hedef proteinlerin fosforilasyonu (Bers, 2002). AKAP; A kinaz anchoring protein, Reg; regülatör; Ach; Asetilkolin.

### 2.7.1. $\beta$ -AR'lerin tipleri ve ekspresyonları

$\beta$ -AR'lerin  $\beta$ 1-AR,  $\beta$ 2-AR,  $\beta$ 3-AR ve  $\beta$ 4-AR olmak üzere dört alt grubu bulunmaktadır.  $\beta$ 1-AR primer olarak kalpte eksprese edilir ve kalpte bulunan  $\beta$ -AR'lerin % 75-80'ini oluşturur.  $\beta$ 2-AR, kalpteki  $\beta$ -AR'lerin % 20-25'ini oluşturur ve ayrıca akciğerlerde, böbrekte ve kan damarlarında da bulunur.  $\beta$ 3-AR'ler ise daha çok yağ dokusunda bulunup minimal olarak kalpte eksprese edilmektedirler.  $\beta$ 4-AR'ler,  $\beta$ 1-AR'lere göre daha düşük afinite

gösterip genetik ve farmakolojik yönden net olarak tanımlanamamışlardır (Madamanchi, 2007).

### **2.7.2. $\beta$ -AR'lerin hücre sel yanıtları ve sinyal yolları arasındaki farklılıklar**

Adrenalin ve noradrenalin tüm  $\beta$ -AR'lerin primer agonisti olarak fonksiyon yapmaktadır. Halbuki son verilere göre  $\beta$ -AR'lerin hücre sel yanıtları ve sinyal yolları arasında önemli farklılıklar vardır. Öncelikle  $\beta$ 2-AR, G proteinlerinden Gs proteine ek olarak Gi ile de bağlanabilir. Halbuki  $\beta$ 1-AR'ler, sadece Gs'ye bağlanabilir ve hücre içi cAMP düzeyinin arttırılmasından sorumlu asıl izoformlardır (Alloatti vd., 2005; Ghigo vd., 2011). Kalp fizyopatolojisinde  $\beta$ -AR'ler kalpteki kontraktileti öncelikle Gs-AS ekseninin aktivasyonu ile kontrol ederler. Fakat  $\beta$ 2 ve  $\beta$ 3 izoformları, ayrıca inhibitör protein Gi'ye de bağlanarak PI3K aktivasyonunu düzenler. Fizyolojik şartlarda miyokardiyumdaki  $\beta$ -AR'lerin stimülasyonu başlıca PI3K $\beta$  veya PI3K $\gamma$ 'yı aktive eder. PI3K $\beta$  veya PI3K $\gamma$  aktivasyonu Akt fosforilasyonu için gereklidir (Ghigo vd., 2011).

## **2.8. Nitrik Oksit**

### **2.8.1. Nitrik oksit sentaz izoformları, eNOS ekspresyonu ve kalpte nitrik oksit konsantrasyonları**

Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile oksijen varlığında L-arjinin'den NO ve L-sitrullin oluşur. Nitrik oksit sentazın katalizlediği bu reaksiyonda, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat substrat olarak flavin adenin dinükleotid, flavin mononükleotid ve tetrahidrobiopterin kofaktör olarak kullanılır. Nitrik oksit sentaz enziminin nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS veya NOS1), iltihaba neden olan araçlarla uyarılan indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS veya NOS2) ve endotel kaynaklı nitrik oksit sentaz (eNOS veya NOS3) olmak üzere üç değişik izoformu bulunmaktadır (Lim, Venetucci & Eisner, 2007). eNOS ve nNOS  $Ca^{+2}$ 'ya bağımlı olarak oluştururken, iNOS sitokinlerin uyarılması sonucu  $Ca^{+2}$ 'dan bağımsız olarak sentezlenir (Tamargo, Caballero, Gómez & Delpón, 2010; Lim, vd., 2007).

eNOS daha çok kalp kası hücrelerinde eksprese edilir ve plazmalemmanın invaginasyonlarında kaveol olarak isimlendirilen bölgelerde lokalize olur (Lim, vd., 2007). eNOS ekspresyonu kalpte sol ventrikülün apeksinde, ventriküler epikardiyumda, sağ atriyum ve S-A düğümde göze

çarpmaktadır. Koroner damarlar geniş arterlere göre on beş kat daha fazla eNOS mRNA'sı içermektedir (Massion vd., 2003).

Tavşanların kalbinde NO düzeyleri diyastol sırasında endokardiyumda 2.7  $\mu\text{M}$ , miyokardiyumda 0.93  $\mu\text{M}$  ve sistol esnasında ise bu değerler 0.67  $\mu\text{M}$  ile 0.26  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Sıçan kalplerinde ise bu oranın % 15 daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Tamargo vd., 2010).

### **2.8.2. Nitrik oksitin kasılma üzerine etkileri**

Normal koşullar altında NO'nun başlıca etkisi hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$ 'yı azaltarak kasılma, hücre çoğalması ve hücre büyümesi gibi hücresel fonksiyonları inhibe etmektir. Sağlam arterlerin düz kas hücrelerinde NO ile hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonunun azaltılması hemen gevşeme ile sonuçlanır.

Nitrik oksit damar düz kas hücrelerinde ve kalp kası hücrelerinde cGMP bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla gevşemeye neden olur. cGMP bağımlı yolda NO solubul guanil siklaza bağlanarak, cGMP düzeylerini artırır. Bu artış ile cGMP bağımlı protein kinaz G aktive edilir. Protein kinaz G kontraktıl proteinlerinden troponin I'nın fosforilasyonunu ve iyon kanallarından LTCC'lerin ekspresyon düzeyini azaltarak kasılmanın negatif yönde düzenlenmesinde işe karışır. NO ayrıca düz kas hücrelerinde ve kalp kası hücrelerinde cGMP'den bağımsız mekanizma ile SERCA'nın direkt fosforilasyonuna katılmakta ve kalp fonksiyonlarını düzenlemektedir (Tong, Evangelista & Cohen, 2010; Tamargo vd., 2010). Özellikle strese bağlı NO sentezinin uyarılması ile kalp kası hücrelerinde eNOS artışı ryanodin kapılarını açabilir. İmmünofloresans çalışmaları eNOS proteinin % 63'nün direkt olarak ryanodin reseptör ile ilişkili olduğunu ve fonksiyonel olarak birbirini etkilediğini ortaya koymuştur (Martinez-Moreno vd., 2005). Bu durum hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  amplitüdünü ve kasılma kuvvetini artırırken, kalp kası hücrelerindeki kasılmayı sürekli kılar. (Petroff vd., 2001).

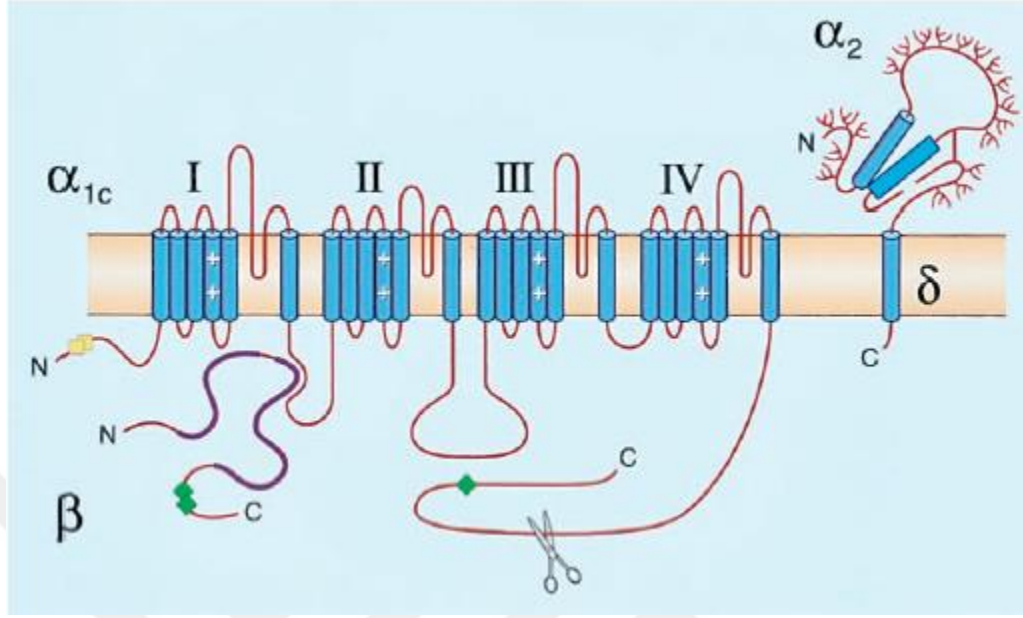
Nitrik oksitin konsantrasyonuna ve uyarılmasına bağlı olarak hem pozitif hem de negatif inotropik etkilerinin olduğu bifazik etkiler gösterdiği konusunda fikir birliğine varılmıştır (Korzick, 2003). Ayrıca endokarda üretilen NO parakrin etki ile kalp kası hücrelerinde gevşeme ile sol ventrikül dolumunu sağlamaktadır. Çalışan kalpte NO salınımı koroner perfüzyonun maksimal duruma getirilmesini sağlar (Acierno vd., 2008). Bu mekanizmalar kalbin yükünün azaltılması, kalbin dolumunun arttırılması ve kalbin aşırı sempatik uyarılarının istenmeyen etkilerinden korunması açısından yararlıdır (Acierno vd., 2008).

## 2.9. L-Tipi $Ca^{+2}$ Kanalı

### 2.9.1. L-tipi $Ca^{+2}$ kanallarının yapısı ve tipleri

L-tipi  $Ca^{+2}$  kanalları vücutta pek çok hücrede bulunan protein kompleksidir (Kamp & Hell, 2000). L-tipi  $Ca^{+2}$  kanallarının  $CaV1.1$ 'den  $CaV1.4$ 'e kadar numaralandırılan dört değişik tipi vardır. Her bir LTCC,  $\alpha1.1$ 'den- $1.4$ 'e kadar numaralandırılmış dört değişik  $\alpha1$  alt birimi içerirken,  $\beta$  ve  $\alpha2\delta$  yardımcı alt üniteleriyle multimerik protein yapısındadır (Harvey & Hell, 2013). Kanal kompleksinin fonksiyonel yapısının temeli  $\alpha1$  alt birimidir (Kamp & Hell, 2000).  $\alpha1$  alt birimi iyon iletili por olup LTCC'nin tipini belirler.  $\alpha1$  alt ünitesi, dört değişik homolog bölge (I-IV) bulundurmaktadır. Bu bölgelerin her biri altı tane transmembran segmenti (S1-S6) içermektedir (Harvey & Hell, 2013). S5. ve S6. segmentler arasında P ilmeği por olarak şekillenmiştir ve kanalın açıklığını oluşturmaktadır (Kamp & Hell, 2000).  $\beta$  yardımcı alt birimi kanalın sitozolik yüzünde yer alır. Voltaja bağlı aktivasyon ve inaktivasyondan etkilenir ve kanal kompleksinin ekspresyonunu yönetir.  $\alpha2$  alt ünitesi ekstrasellüler  $\delta$  alt ünitesi ise tek bir transmembran segment ile kısa bir intrasellüler ve ekstrasellüler segment içerir.  $\beta$  alt ünitesi gibi  $\alpha2\delta$  alt ünitesi de kanal kapısını etkileyerek kanal kompleksinin ekspresyonunu yönetir (Harvey & Hell, 2013, Şekil 2.15).

Kalpde bulunan voltaja bağlı kalsiyum kanalları elektrofizyolojik, farmakolojik özelliklerine ve  $\alpha1$  alt birimine göre  $CaV1.1-1.4$  (LTCC),  $CaV2.1$  (P/Q-tip) ,  $CaV2.2$  (N-tip),  $CaV2.3$  (R-tip),  $CaV3.1-3.3$  (T-tip) gibi değişik şekillerde isimlendirilen alt grupları bulunmaktadır (Hofmann, Flockerzi, Kahl & Wegener, 2014). L-tipi  $Ca^{+2}$  kanalları içerisinde  $CaV1.2$  ventriküler miyositlerde dominant olarak eksprese edilmektedir.  $CaV1.2$  ve  $CaV1.3$ 'ün kalpte S-A ve A-V düğüm hücrelerinde ve atriyum hücrelerinde ekspresyonu vardır (Harvey & Hell, 2013).



Şekil 2.15 LTCC'nin yapısı (Kamp & Hell, 2000).

### 2.9.2. L-tipi $Ca^{+2}$ kanalının fonksiyonları

L-tipi  $Ca^{+2}$  kanalları,  $Ca^{+2}$ 'nin kalp kası hücrelerine girişinde, ECC'de ve kalpte AP'nin süresinde rol oynayan kanallardır. Hücreye  $Ca^{+2}$  girişinin tetiklenmesi ile SR'dan  $Ca^{+2}$  hücre içine salınır ve miyofilamentlerin aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu fizyolojik sürecin önemli bir kısmı CaV1.2 (L tipi alfa 1C) kanal aktivasyonuna bağlıdır (Kamp & Hell, 2000; Harvey & Hell, 2013; Hofmann vd., 2014). CaV1.2, kalpteki AP'nin plato fazı süresince zar depolarizasyonunun devam ettirilmesinden sorumludur. CaV1.2'nin inaktivasyonu ile repolarizasyona izin verilir ve böylece depolarizasyon sonlandırılır. Ayrıca ECC'de CaV1.2 kanal aracılığı ile kalp kası hücrelerine doğru olan  $Ca^{+2}$  akışı, ryanodin reseptörlerinden  $Ca^{+2}$  salınımını tetikler. Böylece kasılmayı başlatır (Harvey & Hell, 2013). Kalpteki LTCC'lerin miktarında ya da fonksiyonunda oluşan bozukluklar atriyal fibrilasyon, kalp yetmezliği ve iskemik kalp hastalıkları olmak üzere değişik kardiyovasküler hastalıklara neden olur (Kamp & Hell, 2000).

### 2.9.3. L-tipi $Ca^{+2}$ kanal aktivasyonunun düzenlenmesi

Hem  $\beta_1$  hem de  $\beta_2$ -AR'ler cAMP yapımını uyararak ventrikül kalp kası hücrelerinde sarkolemmal LTCC aktivitesini arttırmaları (Bers, 2002). Bu durum sempatik stimülasyon ile kalp kası hücrelerinde kasılma ve gevşeme artışına katkıda bulunur (Harvey & Hell, 2013). Memeli kalp dokusundaki

fosfodiesteraz (PDE) ailesinden PDE2, PDE3 ve PDE4 izoformları kalp kası hücrelerinde cAMP sinyalini sınırlandırır. cAMP'nin PDE'ler ile hidroliz edilmesi LTCC aktivitesinin düzenlenmesinde kritik rol oynar (Mika, Leroy, Vandecasteele & Fischmeister, 2012).  $\beta$ 2-AR'lerin uyarılması ile Gi protein aracılıklı olarak aktive olan PI3K $\gamma$ , PDE aktivitesini stimüle eder. Böylece PDE aktivasyonu ile gerçekleşen cAMP hidrolizi ile LTCC'nin PKA tarafından fosforilasyonu engellenir ve LTCC'nin fonksiyonları sınırlandırılır (Ghigo vd., 2011; Harvey & Hell, 2013). cAMP/PKA sinyal yolu LTCC aktivasyonunu düzenler (Kamp & Hell, 2000). L-tipi Ca<sup>+2</sup> kanallarının  $\alpha$ <sub>1</sub>1.2 ve  $\beta$  alt birimlerinin PKA ile fosforile edildiği gösterilmiştir. Bu bölgelerin fosforile edilmesi LTCC'nin kanal aktivasyonunu kolaylaştırır (Harvey & Hell, 2013).

## 2.10. SERCA

Hücre içi Ca<sup>+2</sup>'nin esas kısmı SR'de bulunur. SERCA tarafından aracılık edilen Ca<sup>+2</sup> geri alımı intrasellüler Ca<sup>+2</sup>'nin SR'de tutulmasında anahtar rol oynar. Ayrıca hücre içi Ca<sup>+2</sup>'nin yüksek konsantrasyonlarında ortaya çıkan kasılmalar sırasında SERCA ile Ca<sup>+2</sup>'nin SR depolarına geri alınımının hızlandırılması düz kas, iskelet ve kalp kasında gevşemeye aracılık eder. Buna ek olarak endotel hücreleri gibi kontraktıl olmayan hücrelerde ise SERCA hücre büyümesi, apoptozis ve hücre göçü gibi pek çok hücre sel süreci düzenler (Tong vd., 2010).

### 2.10.1. SERCA izoformları ve SERCA izoformlarının ekspresyonları

SERCA üç genin ürünü olarak hücrelerin endoplazmik retikulumunda veya SR'de eksprese edilen zar proteinidir (Tong vd., 2010) ve SERCA'nın moleküler ağırlığı 97-115 kDa'dır. SERCA'nın 1, 2 ve 3 ana izoformları ve alt birimleri ile birlikte en az on izoformu tanımlanmıştır (Periasamy & Kalyanasundaram, 2007). Bunlardan SERCA2, filogenetik olarak tüm izoformların en eskisi olup ayrıca dominant bir izoformdur. Bugüne kadar SERCA2 için sadece C terminal ucu farklı olan SERCA2a, SERCA2b ve SERCA2c olmak üzere üç farklı transkript tanımlanmıştır.

SERCA2a en çok kalp kasında ve yavaş kasılan iskelet kasında eksprese edilir (Kranias & Hajjar, 2012). SERCA2a ekspresyon düzeylerinde ventrikül ile atriyum arasında farklılıklar vardır. SERCA2a protein düzeyi ventriküle oranla atriyumda yaklaşık iki kat daha yüksektir. Ventriküle kıyasla atriyumda daha kısa kasılma süresi atriyumdaki daha yüksek SERCA2a düzeylerini açıklayabilir (Minajeva vd., 1997). SERCA2a ekspresyon düzeyleri yaşlanma ile de değişmektedir. Yaşlanmış hayvan modellerinde ve yaşlı insan kalplerinde hem SERCA2a düzeyinde hem de aktivitesinde azalma bildirilmiştir (Jiang, Moffat & Narayanan, 1993). Yaşlı sıçan kalplerinde,

SERCA düzeylerinde ve aktivitesinde görülen bu azalma uzamış kasılma zamanı ve bozulmuş kalp fonksiyonu ile ilişkili bulunmuştur (Cain vd., 1998). SERCA2b yetişkin düz kasında ve kas olmayan dokularda bulunur. SERCA2c ise kalp kasında, epitel, mezenşimal ve hematopoetik hücreler gibi kas olmayan hücrelerde bulunur (Kranias & Hajjar, 2012).

#### **2.10.1.1. SERCA2a'nın fonksiyonları**

SERCA2a kalp kasılmasında önemli bir rol oynar. SERCA2a, SR içine  $Ca^{+2}$ 'yi taşır, sitozolik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu, SR  $Ca^{+2}$  yükünü, kalbin kasılma ve gevşeme hızını düzenler. İnsan ve tavşanlarda SERCA2a, sitoplazmik  $Ca^{+2}$ 'nin geri pompalanması işleminin % 70'inden, farelerde ve sıçanlarda ise % 90'ından sorumludur (Bers, 2002). SERCA2a kalpte hem sitozolik  $Ca^{+2}$ 'nin uzaklaştırılmasında hem de  $Ca^{+2}$ 'nin SR'a pompalanmasında önemli olmasından dolayı kalbin gevşeme ve kasılmasında temel belirleyicidir (Kranias & Hajjar, 2012; Park & Oh, 2013).

#### **2.10.2. Kalp fizyolojisinde SERCA pompasının rolünü anlamak için transgenik yaklaşımlar**

Artmış SERCA düzeylerinin kalp üzerine etkilerini anlamak için transgenik hayvan modelleri geliştirilmiştir. SERCA2a'nın 1.2 veya 1.5 kat daha fazla eksprese olduğu transgenik farelerde SR'ye  $Ca^{+2}$  transportunun arttığı ve kalbin kasılma ve gevşemesinin arttığı ortaya konulmuştur (Vetter vd., 2002). Genetiği değiştirilmiş hayvan çalışmalarında SERCA pompasının  $Ca^{+2}$  homeostasisi ve kalp fizyolojisi üzerindeki rolü tanımlanmıştır. Her iki allelin olmaması durumunda yani SERCA2a (-/-) genotipindeki fareler, gelişim sırasında erkenden ölürlür. Heterozigot olan SERCA2a (-/+) genotipindeki farelerde ise SERCA2a protein düzeyinde % 35 oranında azalma görülmektedir. SERCA2a allellerinin bir kopyasının kaybı kalp kasılması ve SR'ye  $Ca^{+2}$  transportunun azalması ile sonuçlanmıştır. Bu farelerde hücre içinde  $Ca^{+2}$  homeostasisinin bozulması ve kalp kasılmasının azalması SERCA2a geninin her iki kopyasının gerekli olduğuna işaret etmektedir (Periasamy vd., 1999). Kalp kası hücrelerinde SERCA2a geninin çıkartılması kalpteki sistolik ve diyastolik fonksiyonlarda ciddi azalmalara neden olmuştur. Genin çıkarılıp alınmasını takiben 8 hafta sonra yüksek ölüm oranları gözlenmiştir (Kranias & Hajjar, 2012).

## 2.11. Fosfolamban

### 2.11.1. Fosfolamban tanımı ve ekspresyonları

Fosfolamban bir SERCA inhibitörüdür. Elli iki amino asitten oluşmuş bir fosfoprotein olup primer yapısı türler arasında yüksek oranda korunmuştur. Fosfolamban kalpte düz kas ile yavaş kasılan iskelet kasına göre daha yüksek düzeylerde eksprese edilmektedir (MacLennan & Kranias, 2003). Fosfolamban kalpte hem atriyumda hem de ventrikülde eksprese edilir, ventrikül ile karşılaştırıldığında atriyumda daha düşük seviyelerdedir (Zhong, Reiser & Matlib, 2003).

### 2.12.1. Fosfolamban aktivitesinin düzenlenmesi ve Fosfolambanın SERCA pompası üzerindeki etkisi

Fosfolamban ekspresyon düzeyinde veya PLN fosforilasyon durumunda artma ya da azalma SR'ye  $Ca^{+2}$ 'nin geri alınma fonksiyonunu ve kontraktiletiyi doğrudan etkileyebilir (Zhong vd., 2003). Fosfolamban, kalpte  $\beta$ -adrenerjik yanıtların esas aracısıdır (MacLennan & Kranias, 2003). Fosfolamban geni çıkarılmış farelerin kalp kası hücrelerinde  $\beta$ -adrenerjik agonist stimülasyonu ile oluşturulan yanıtların büyük ölçüde azaldığı görülmüştür. Dolayısıyla kalpte  $\beta$ -adrenerjik agonistlerin oluşturacağı yanıtta PLN önemli bir proteindir (Kranias & Hajjar, 2012).

Fosfolamban tarafından sırasıyla serin 16 ve treonin 17'nin fosforilasyonu ile düzenlenir. Protein fosfataz 1 enzimi ise defosforilasyon işlemi katalize eder (Park & Oh, 2013). Fosfolambanın PKA ve CaMKII tarafından sırasıyla serin 16 ve treonin 17'deki fosforilasyonu SERCA aktivitesini artırır (MacLennan & Kranias, 2003). Fosfolamban monomerik ve pentamerik pozisyonlar arasındadır. Fosforile olduğu zaman pentamer pozisyonundadır ve kendisi aktif değildir. Çünkü SERCA2a üzerindeki inhibisyonu ortadan kalkmıştır (Park & Oh, 2013). Fosfolamban fosforile olduğunda SERCA aktif duruma geçer (Voss, Jones & Thomas, 1994). Fosfolamban defosforile olduğunda yani monomer pozisyonunda SERCA2a'ya bağlanarak onun aktivitesini baskılar (Park & Oh, 2013). SERCA aktif olduğunda  $Ca^{+2}$  taşınmasını 4 kat veya daha fazla artırır (MacLennan & Kranias, 2003).

Fosfolambanın SERCA2a aktivitesi üzerine inhibitör etkisi ilk defa transgenik fare modelleri ile ortaya çıkarılmıştır (Limas vd., 1987). Bu çalışmalarda PLN'nin  $Ca^{+2}$ 'nin geri alınma maksimum hızını etkilemeden SERCA'nın  $Ca^{+2}$ 'ya olan afinitesini etkileyerek SERCA aktivitesini düzenlediği öne sürülmüştür (Haghighi vd., 2003; Haghighi vd., 2006). Kalpteki PLN'nin



aşırı ekspresyonu SR'ye  $Ca^{+2}$  alımını inhibe eder, kasılma parametrelerini ve bazal sistolik fonksiyonları azaltır (Limas vd., 1987). Aksine *PLN* geni çıkarılmış farelerde kalbin kasılma kuvvetinde artma bulunmuştur (Vangheluwe vd., 2006).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 20.03.2014 tarih ve 385 karar numarası ile onaylı etik kurul kararı doğrultusunda deneysel çalışmalar yapıldı. Çalışmamızda 250-350 g ağırlığında Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Standard yemle beslenmiş olan sıçanlar 20-25°C sıcaklıkta, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık döngüsüne maruz bırakıldı.

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1.NaCl (Carlo Erba, Fransa)
- 2.KCl (Sigma-Aldrich, ABD)
- 3.CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, ABD)
- 4.MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Sisco Research Laboratories, Hindistan)
- 5.KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Almanya)
- 6.NaHCO<sub>3</sub> (Sisco Research Laboratories, Hindistan)
- 7.Glukoz (Sigma-Aldrich, ABD)
- 8.MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (E.Merck, Almanya)
- 9.NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (E.Merck, Almanya)
- 10.Heparin (Koçak firma, Tekirdağ)
- 11.Sodyum pentotal (Ulagay ilaç sanayi, İstanbul)
- 12.Serum fizyolojik (Osel ilaç sanayi, İstanbul)
- 13.RNA Later (QIAGEN, Almanya)
- 14.Total RNA izolasyonu için TriPure (Roche Life Science, Almanya)
- 15.İsopropanol (Sigma-Aldrich, ABD)
- 16.%75'lik alkol (Sigma-Aldrich, ABD)
- 17.Ribonükleaz(RNase)dan arındırılmış distile su (Techno lab., Türkiye)
- 18.TAE (Tris, Asetik Asit, Etilen Diamin Tetra Asetik Asit, Lonza, Belçika)
- 19.Edityum bromür (Sigma, ABD)
- 20.6X jel yükleme tamponu (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- 21.1kilobazlık moleküler ağırlık işaretleyici (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- 22.PBS (Fosfat ile tamponlanmış tuz solüsyonu)
- 23.cDNA sentez kiti (Roche, Almanya)
- 24.Rat cAMP (YH Biosearch, Çin) ELISA kiti ve rat cGMP (YH Biosearch, Çin) ELISA kiti
- 25.Kimerin peptidi (Anaspec, ABD)
- 26.Omentin peptidi (Prospec, ABD)
- 27.LY294002 (Sigma-Aldrich, ABD)
- 28.L-NAME (Sigma-Aldrich, ABD)

### 3.2. Kullanılan Gereçler ve Cihazlar

- 1.Hassas terazi (Model Mark 500, Monza, İtalya)
- 2.Veri toplama ve analiz sistemi (Isoheart Software, Almanya)
- 3.Basınç transduseri (Isotec, Hugo SachsElektronik, March-Hugstetten, Almanya)
- 4.MAP elektrodu (March-Hugstetten Almanya)
- 5.İstatistik programı (Versiyon 13.0, SPSS; Sikago, ABD)
- 6.Homojenizatör (Roche, İsviçre)
- 7.Tek kullanımlık pudrasız laboratuvar eldiveni (Skintex)
- 8.0.1-2 µl, 2-20 µl, 20-100 µl ve 200-1000 µl kapasiteli otomatik pipetler (Gilson, Fransa)
- 9.Steril, RNase'dan arındırılmış pipet uçları (Axygen, Avusturya)
- 10.1.5 ml hacimli plastik tüpler (Eppendorf, İngiltere)
- 11.Plastik tüpleri yerleştirmek için spor
- 12.Seramid kaplı yeşil boncuklar (Roche, Almanya)
- 13.PCR tüplerinin üzerine konulup çalışılacağı soğutucu bloklar
- 14.Kuru blok ısıtma termostatı (Biosan, BIO-TDB-120, Avrupa)
- 15.Soğutmalı mikrosantrifüj (Sigma, Almanya)
- 16.Vortex (Heidolph, Almanya)
- 17.Spektrofotometre (Nanodrop 1000, Almanya)
- 18.UV Transüliminatör(Gene Genius, İngiltere)
- 19.Jel elektroforez sistemi (Clever Scientific Ltd., İngiltere)
- 20.Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- 21.Light Cyclers 480/I (Roche, İsviçre)
- 22.Tam otomatik ELISA cihazı (Awareness, ABD)
- 23.Termal Cyclers (Applied, Singapur)
- 24.-80°C derin dondurucu (Panasonic, Avrupa)
- 25.-20°C buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

### 3.3. İzole Perfüze Kalp Preparasyonu için Kullanılacak Olan Peptidlerin Hazırlanması

Omentin : (1-298 )

(H-MWSTDEANTY FKEWTCSSSP SLPRSCKEIK DECPSAFDGL YFLRTENGVI  
YQTFCDMTSG GGGWTLVASV HENDMRGKCT VGDRWSSQQG SKAVYPEGDG  
NWANYNTFGS AEAATSDDYK NPGYYDIQAK DLGIWHVPNK SPMQHWRNSS  
LLRYRTDTGF LQTLGHNLFY IYQKYPVKYG EGKCWTDNGP VIPVYDFGD  
AQKTASYSP YGQREFTAGF VQFRVFNNER AANALCAGMR VTGCNTEHHC  
IGGGGYFPEA SPQQCGDFSG FDWSGYGTHV GYSSSREITE AAVLLFYR-OH)  
(Prospec, ABD).

Kimerin-9 : (149-157)

(H- YFPGQFAFS -OH) (Anaspec, ABD).

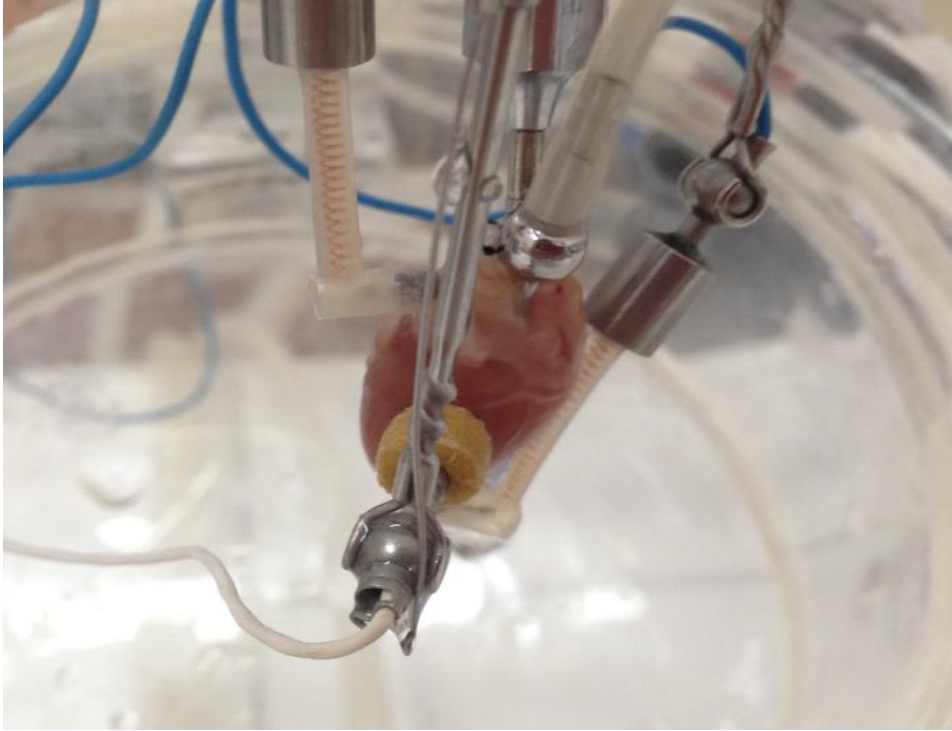
Omentin ve kimerin peptidi distile su ile çözümlenerek ana stok elde edildi. Ana stoklardan sulandırılarak hazırlanan ara stoklar 1 ml'lik enjektörlere alınarak -20°C'de saklandı.

### **3.4. İzole Perfüze Kalp Preparasyonu**

Kalp izolasyonu öncesi kan pıhtılaşmasını önlemek için deney hayvanına 1000 IU heparin intraperitoneal yoldan enjekte edildi. Heparin verildikten 30 dakika sonra sodyum tiyopental (50 mg/kg) anestezisi uygulandı. Anestezi altındaki hayvan, kalbin çıkarılması için sırtüstü yatırıldı. Hayvan sürekli olarak izlendi. Bir dişli penset ile arka ayaklara ağırlı uyarıcı uygulandı ve bu uyarana yanıt alınmadığında cerrahi işlemlere başlandı. Kalbin izolasyonu için transabdominal kesi ile önce batın daha sonra diyafragma açıldı. Her iki tarafta kostalar sagittal olarak kesilerek toraks ön duvarı kaldırıldı. Çıkan aort ve diğer damarlar kesilerek kalp hızla çıkarıldı ve hemen buz gibi soğuk modifiye mK-Hç içine konuldu. Kalbin atması soğuk mK-Hç'nin içerisinde durduruldu, böylelikle kalp perfüzyon öncesi iskeminin etkilerine karşı korunmuş oldu. Kalplerin izolasyonu ile buz gibi soğuk mK-Hç içine atılması arasında geçen sürede kalbin birkaç defadan daha fazla atmamasına özen gösterildi. Kalbin çevresindeki dokular çıkarıldıktan sonra kalp aort damarından Langendorf sisteminin (Şekil 3.1) paslanmaz çelikten yapılmış kanülüne ameliyat ipliği ile bağlandı (Şekil 3.2). Bundan sonra mK-Hç ile retrograd perfüzyon hemen başlatıldı. Ventriküllerdeki koroner drenajı kolaylaştırmak için pulmoner arter kesildi ve mK-Hç'nin sıcaklığı bir sirkülatörlü sıcak su banyosu kullanılarak 37°C de sabit tutuldu. Perfüzyon çözeltisi % 95 oksijen ve % 5 karbondioksit gaz karışımı ile devamlı olarak gazlandırıldı. Perfüzyon solüsyonu olarak günlük olarak hazırlanan ve aşağıda bileşimi verilmiş olan mK-Hç (mM/L): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25 ve glukoz 11 kullanıldı. Bu solüsyonun pH'sı 7.3-7.5 arasında devam ettirildi ve kalpler sabit basınç altında (60 mmHg) perfüze edildi.



Şekil 3.1 Langendorf sistemi



Şekil 3.2 İzole perfüze kalp preparasyonu

Ventriküllerdeki koroner drenajı kolaylaştırmak için pulmoner arter kesildi. Kalpler Langendorf tekniğine göre mK-Hç ile retrograd olarak perfüze edildi. Perfüzyon sıvısı bir ısı sarmalı aracılığıyla sıcaklığı 37°C de sabit tutularak, % 95 oksijen ve % 5 karbondioksit gazı ile gazlandırıldı. Perfüzyon solüsyonu olarak günlük olarak hazırlanan aşağıda bileşimi verilmiş olan mK-Hç (mM/L): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25 ve glukoz 11 kullanıldı. Bu solüsyonun pH'sı 7.3-7.5 arasında ve sıcaklığı 37°C ta devam ettirildi. Kalpler sabit basınç altında (60 mmHg) perfüze edildi.

### **3.4.1. Hemodinamik parametrelerin ölçülmesi**

Kalplerin kasılma kuvveti He ve Downey (He, Downey, 1998) tarafından tanımlanan balon yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntemde göre içi serum fizyolojik ile doldurulmuş bir lateks balon bir basınç transduserine (Isotec, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Almanya) bağlandıktan sonra mitral kapaktan sol ventrikül içine konuldu ve diyastolik balon basıncı bir cam şırınga kullanılarak 8 mmHg'ye getirilerek bu değerde tutuldu. Sol ventriküldeki sistolik basıncın tepe değeri ve diyastol sonu basıncı ölçüldü. Bundan sonra sol ventrikülün geliştirdiği basınç (SVGB), sistolik ve diyastolik basınçlar arasındaki fark olarak bulundu ve bu basınç kasılma kuvveti olarak kabul edildi. Ayrıca sistolik basınç bir software tarafından (Isoheart Software, Version 1.5, Microsoft Windows NT/2000/XP, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Almanya) işleme uğratarak sol ventrikül basıncında artışın maksimum hızı (+dP/dt<sub>max</sub>) belirlendi. Bu parametre diğer kasılma kuvveti indeksi olarak kabul edildi. Dakikada kalp atım sayısı sol ventrikül basınç sinyalinden hesaplandı. Koroner vasküler tonusun bir indeksi olan koroner akım bir dakika süre içinde kalbi terkeden mK-Hç bir mezürde toplanarak ölçüldü. Koroner akım hariç olmak üzere tüm hemodinamik parametreler veri toplama ve analiz sistemi tarafından (Isoheart Software, Almanya) belirlendi. MAPamp ve MAP<sub>90</sub> bir MAP elektrodu (Ag/AgCl) kullanılarak kaydedildi. Bu elektrod sol ventrikülün epikardiyumuna yönlendirildi ve epikardiyum ile MAP elektrodu arasında sabit bir temas basıncı devam ettirildi. Omentin ve kimerin verilmeden önce kalpler 30 dakika dengelendi. SVGB'nin 60 mmHg'nin, +dP/dt<sub>max</sub>'in 2800 mmHg<sup>-1</sup>'in, kalp atım sayısının 200 atım/dakika'nın üzerinde olması ve normal sinüs ritminin devam etmesi kalbin dengelendiğini gösteren kriterler olarak kabul edildi. Bu kriterlere uymayan kalpler çalışmaya alınmadı.

### 3.4.2. Çalışma protokolü

Omentin ve kimerin verilmeden hemen önce ölçülen değerler kontrol ölçümleri olarak kabul edildi. Kontrol ölçümleri kaydedildikten sonra omentin (100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml) ve kimerin (10 nM, 100 nM, 1000 nM) rezervuardaki mK-Hç'e eklenip kalpler bu mK-Hç ile 30 dakika perfüze edildi. Kontrol grubu kalpler ise kalpler dengelendikten sonra herhangi bir peptid verilmeden 30 dakika boyunca mK-Hç ile perfüze edildi. Her bir doz farklı bir kalp grubuna verildi. Her bir grupta SGVB,  $+dP/dt_{max}$ , dakikada kalp atım sayısı, koroner akım, MAPamp ve MAP<sub>90</sub> kaydedildi. Ayrıca omentin+ LY294002 (PI3K inhibitörü) ve kimerin+ L-NAME (L-Nitro-Arjinin Metil Ester) grupları oluşturularak, omentin ve kimerinin kardiyovasküler parametreler üzerindeki etkilerinin antagonize edilip edilmediği araştırıldı. Çalışmamızda yer alan gruplar Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı 7'dir.

Tablo 3.1 Omentin ve kimerin için oluşturulan çalışma grupları

Gruplar	Doz
Kontrol	----
Omentin	100 ng/ml
Omentin	200 ng/ml
Omentin	400 ng/ml
Omentin + LY294002	400 ng/ml + 10 µM
Kimerin	10 nM
Kimerin	100 nM
Kimerin	1000 nM
Kimerin 2. dakikada dokusu alınanlar	1000 nM
Kimerin + L-NAME	1000 nM + 10nM

Çalışmanın sonunda kalp, sağ ve sol ventrikül olarak ayrıldı. Sol ventrikül, ELISA (Enzim-linked immun sorbent assay) ve mRNA çalışmaları için 2 eşit parçaya bölündü. Elde edilen dokular ELISA çalışması için 2 ml'lik

plastik tüplere konularak moleküler çalışmalar yapılncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklandı (Panasonic, Avrupa). Gen ekspresyonu için sol ventrikülden alınan üçüncü parça, doku haciminin beş katı kadar hacimde RNA'yı stabilize eden bir kimyasal olan RNA Later (QIAGEN, Almanya) içerisine konularak bir gün  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi, ertesi gün tüpteki RNA Later boşaltılarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'ye diğer örneklerin yanına kaldırıldı.

### **3.5. ELISA Yöntemi ile cAMP ve cGMP Miktarının Belirlenmesi**

2ml'lik plastik tüplere konularak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan doku örneklerinden ELISA yöntemiyle cAMP ve cGMP miktarı ölçüldü. Çalışmada rat cAMP (YH Biosearch, Çin) ve rat cGMP (YH Biosearch, Çin) kiti kullanıldı ve miktar tayini üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

#### **3.5.1. Kit içeriğinin ayrıntısı**

1. Her birinde 8 kuyucuk bulunan 12 adet bölünebilen mikro kuyucuk stribine sahip toplam 96 kuyucuklu pleyt. Pleytteki her bir kuyucuğun yüzeyi cAMP/cGMP'ye karşı oluşturulmuş sıçan kökenli monoklonal antikorlarla kaplanmıştır.
2. Standard solüsyon (320 pmol/ml)
3. Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) ve Streptomisin-HRP
4. Stop solüsyon
5. Kromojen reagent A
6. Kromojen reagent B
7. Yıkama solüsyonları
8. Biotin ile işaretlenmiş anti cAMP/anti cGMP antikorları

#### **3.5.2. Standart Solüsyonunun ve Örneklerin Hazırlanması**

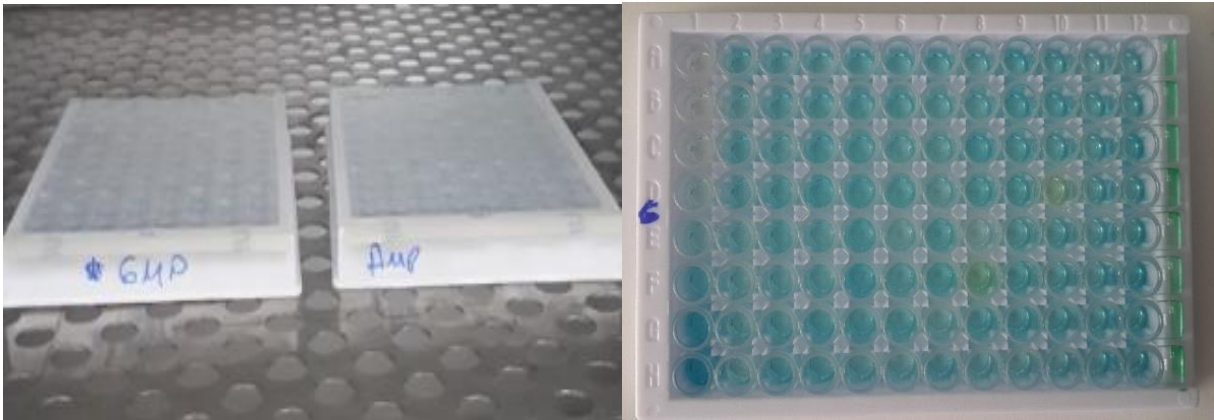
Çalışmadan 30 dakika önce tüm reaktifler, mikro kuyucuklu pleyt ve çalışma zamanına kadar 2 ml'lik plastik tüplerde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan doku örnekleri oda sıcaklığına ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ) getirildi. Kitin içerisinde bulunan orijinal standartların konsantrasyonları 1:1 oranında yine kit içerisinde bulunan standart dilüsyonlar ile beş kez tekrar edilerek seyreltildi. Böylece konsantrasyonu 160 pmol/ml'den 10 pmol/ml'ye düşürüldü. Oda sıcaklığında çözdürülen çalışılacak doku örneklerinden eşit miktarlarda yaklaşık 50-100 mg alınıp içinde PBS (pH 7.4) bulunan plastik tüplere konulup homojenizatör ile parçalandı. Homojenize olan bu doku, yaklaşık 20 dakika santrifüjde



(2000-3000 rpm) çevrilerek, süpernatantı dikkatlice toplanarak test için kullanıldı.

### 3.5.3. Testin yapılması

1. Pleyttteki birinci kuyucuk negatif kontrol kuyucuğu (blank kuyu) ikinci kuyucuk pozitif kontrol kuyucuğu (standart solüsyon kuyucuğu) ve diğer kuyucuklar örnekler için (örnek kuyucuğu) hazırlandı.
2. Negatif kontrol kuyucuğuna örnek konulmadan sadece biotin ile işaretli anti cAMP/anti cGMP antikor ve streptevadin-HRP konuldu. Pozitif kontrol kuyusuna 50 µl standart ve 50 µl streptomisin-HRP eklendi. Standart solüsyon biotinli antikor içermesinden dolayı cAMP/cGMP antikor konulmadı. Örnekler için 10 µl cAMP/cGMP antikor, 50 µl streptevadin-HRP konularak karıştırıcıda nazikçe sallanarak 37°C de 1 saat inkübe edildi.
3. Kuyucuklarda inkübe edilmiş içerik atık kabına boşaltıldı. Ardından pleyttteki kuyucuklar her seferinde 350 µl yıkama solüsyonu kullanılarak 5 kez yıkandı.
4. Her kuyucuğa 50 µl substrat-kromojen solüsyonu A ve B eklenerek on dakika 37°C'de ve karanlıkta ikinci kez inkübe edildi.
5. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve pleytin kenarına hafifçe tıklatılıp dikkatlice karıştırıldı. Bu arada şekil 3.3'de görüldüğü gibi maviden yeşile doğru renk değişimi gözlemlendi.
6. Pleyttteki her bir kuyucukta oluşan renk değişimi 450 nanometre (nm) dalga boyunda fotometrik olarak bir ELISA okuyucu cihazında ölçüldü. Standart konsantrasyonlara ve ona karşılık gelen optik dansite (OD) değerlerine göre standart eğrinin lineer regresyon denklemi hesaplandı. Her örneğin OD değerine karşılık gelen örnek konsantrasyonu ölçüldü. Sonuçlar üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirildi.



Şekil 3.3 cAMP ve cGMP pleyt görüntüleri

## **3.6. Hedef Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**

### **3.6.1. TriPure ile total RNA izolasyonu**

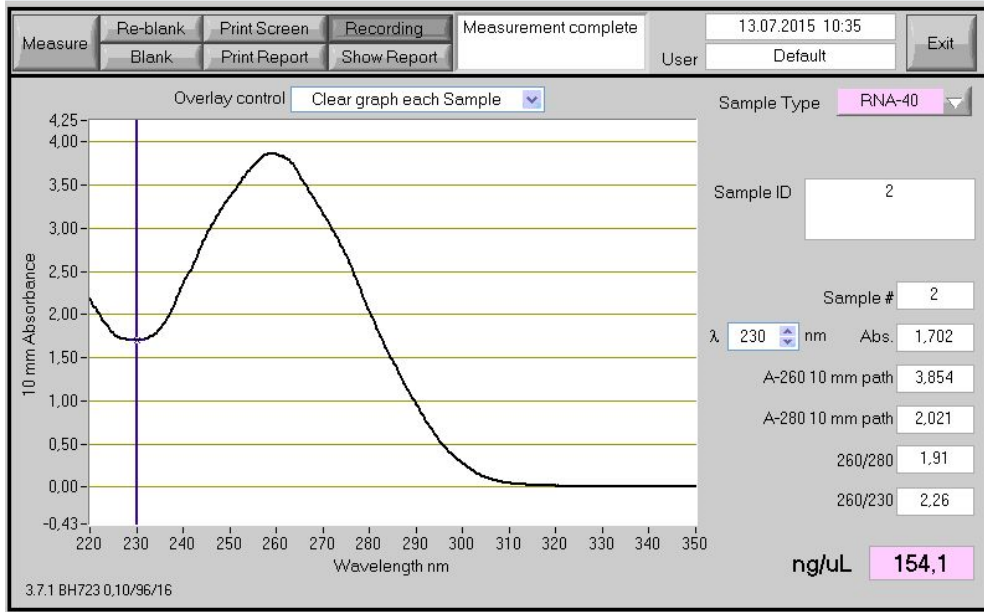
Hedeflenen genlerin ekspresyon düzeylerinin tespit edilebilmesi için öncelikle doku örneklerinden TriPure ile total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için aşağıdaki basamaklar takip edildi.

1. Sıçan kalbi doku örnekleri,  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkartıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika çözünmesi beklendi.
2. Dokular, seramid kaplı yeşil boncukların bulunduğu özel tüplere aktarıldı ve 100 mg doku için 1 ml TriPure eklenerek bir homojenizatör cihazında (Roche, İsviçre) 6500 rpm'de 50 saniye homojenize edildi.
3. Homojenize edilen dokular başka bir tüpe aktarılarak üzerine 200  $\mu\text{l}$  kloroform eklendi ve vortekslendi.
4. 12000 rpm  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüj edilerek, üç faz oluşturuldu. En üstteki aköz faz total RNA'yı, ara faz DNA'yı alttaki faz ise proteinlerin bulunduğu tabakayı oluşturmaktadır.
5. En üstteki aköz faz dikkatlice başka bir tüpe aktarılıp üzerine çöktürmek amaçlı 500  $\mu\text{l}$  isopropanol konulup alt üst edildi.
6. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi ve 12000 rpm  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrasında tübün dibine çöken RNA peleti cam kalemiyle çizilerek aksi yönden süpernatantı döküldü.
8. Yıkama amaçlı peletin üzerine  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de soğutulmuş %75'lik etanolden 1 ml eklendi ve vorteks yapılarak peletin tamamen çözünmesi sağlandı.
9. 12000 rpm'de ve  $+4^{\circ}\text{C}$  de 5 dakika santrifüj edilerek, süpernatantı atıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika pelet kurutularak etanolden kurtarıldı.
10. Peletin büyüklüğüne göre 10-20  $\mu\text{l}$  nükleaz içermeyen distile su (NFW) konuldu, parmak ucu ile tüpteki peletin üzerine tıkatılarak çözülmesi sağlandı.  $55^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika ısı şoku uygulandı. Isı şokundan sonra total RNA örneklerinin konsantrasyon ölçümüne geçildi.

#### **3.6.1.1. Total RNA konsantrasyonu ölçümü ve kalitesinin kontrolü**

Elde edilen total RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometre (Nanodrop 1000, Almanya) ile belirlendi. RNA bütünlüğü ise jel elektroforezi ile değerlendirildi. Total RNA örneklerinin her birinden 1.5  $\mu\text{l}$  kullanılarak ikişer kez spektrofotometrede 230, 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülerek konsantrasyon değerleri belirlendi.

1. Nükleik asitler 260 nm'de maksimal ışık absorpsansı vermektedir. 260 nm'de ölçülen RNA'nın 1 OD'si 40 µg / ml'ye eşittir. Tüm örneklerin konsantrasyonları 1 µg'a eşitlendi.
2. Proteinler, özellikle aromatik amino asitler 280 nm dalga boyunda güçlü absorpsans verirler. Çalışmada protein kirliliğini değerlendirmek için A260/A280 oranı dikkate alındı. OD değerlerinin 2'ye yakın olması RNA'nın saflığını göstermektedir. 1.8 ve üzerinde olan örnekler saf kabul edilip ileri basamaklarda kullanıldı.
3. Saf RNA'nın absorpsans piki 260 nm dalga boyunda ve tek bir piktir. 270 nm'ye kayan RNA absorpsans piki fenol kontaminasyonunu, dalga boyunun 230 nm'ye kayması ise guanidin isotiosiyanat kontaminasyonunu işaret etmektedir. Dolayısıyla 260 nm dalga boyunda absorpsans veren RNA örnekleri çalışmaya dahil edildi. Diğer taraftan A260/A230 oranına göre 1.5 ve üzerinde olan örnekler saf kabul edilip ileri basamaklarda kullanıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Spektrofotometreden alınan bir total RNA örneğinin görüntüsü.

### 3.6.1.2. Agaroz jel hazırlanması ve jel elektroforezi

Elde edilen total RNA örneklerinin RNA bütünlüğü jel elektroforezi uygulanarak, örneğe ait 28S:18S oranı dikkate alınarak değerlendirildi. Bunun için % 1.5'lik agaroz jel hazırlandı. Jelin hazırlanması sırasında 1X konsantrasyonunda, elektroforez sırasında da 0.5X konsantrasyonunda TAE kullanıldı. Bantların net olarak görülebilmesi için en az 1 µg total RNA örneği

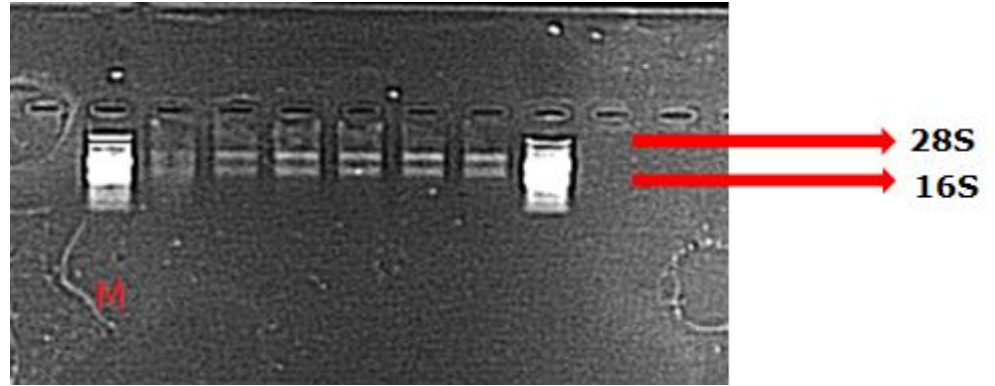
jele yüklendi. Total RNA örnekleri jele yüklenirken Tablo 3.2'deki gibi hazırlandı.

Tablo 3.2 Total RNA örneklerinin jel elektroforezi için hazırlanması

Karışım	Miktar
Total RNA	1 µg
6X Yükleme tamponu	2 µl
NFW	*
Toplam	20 µl

\*Jele yüklenecek her bir örneğin eşit konsantrasyonda (1 µg) yüklenmesi için her örnekten kaç µl alınması gerektiği hesaplandı, daha sonra karışım hacmi NFW ile 20 µl'ye tamamlandı.

Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan örnekler jele yüklendikten sonra 100 Volt'da 30 dakika süre ile elektroforezde yürütülmüştür. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra yürütülen jel UV transilluminatör (Gene Genius, İngiltere) altında görüntülenerek bantlar değerlendirildi. 28S ve 18S rRNA bantlarının görülmesiyle total RNA'da hasarlanma olmadığı kabul edildi. Sıçanlarda 28S rRNA 4729 baz, 18S rRNA ise 1869 baz uzunluğundadır. Bu durumda 28S rRNA bandına elektroforez esnasında daha fazla boya bağlanacağı için daha yoğun ışığa verir. Sıçanlarda 28S/18S oranının 2.5 olması RNA kalitesinin uygun olduğunu göstermektedir. İntakt bantlarının görüldüğü örnekler şekil 3.5'de gösterilmiştir. Uygun örnekler çalışmanın sonraki basamaklarında kullanılırken, bu bantların görülmediği örnekler ise homojenizasyon aşamasından itibaren tekrar edildi.



Şekil 3.5 Total RNA örneklerinin jel elektroforez görüntüleri, M: Moleküler ağırlık işaretleyici.

### **3.6.2. RT-PCR (Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu)**

RT-PCR için kullanılacak olan cDNA sentez kiti (Roche, Almanya) üretici firmadan alındıktan sonra kullanılıncaya kadar bir derin dondurucuda (Arçelik, Türkiye) -20°C'de saklandı.

#### **3.6.2.1. Kit içeriğinin ayrıntısı**

- a) Ters Transkriptaz (Transcriptor Reverse Transcriptase, 200 u/μl, 120 μl)
- b) Ribonükleaz İnhibitör (Protector RNase İnhibitor, 40 u/μl, 50 μl)
- c) Reaksiyon Tamponu (5X Reaction Buffer, 1 ml)
- d) 10 mM dNTP Karışımı (dGTP, dATP, dTTP, dCTP, 200 μl, 10mM)
- e) Başlatıcı Primer (Random Hexamer Primer, 600 μg/μl, 200 μl)
- f) Poli A kuyruğuna spesifik primer (Oligo (dT) primer 50 μM, 100 μl)
- g) DTT (Dithiothreitol, 0.1M, 1ml)
- h) Nükleazdan arındırılmış su (1.25 ml)

#### **3.6.2.2. RT-PCR aşamaları**

Total RNA izolasyonu tamamlanan örnekler, ilk basamakta random primer ile eklenerek ayrılan mRNA'dan revers transkriptaz (RT) enzimi ile komplementar DNA (cDNA) iplikçikleri elde edildi. Ölçülen total RNA konsantrasyonlarından yola çıkılarak, RT-PCR reaksiyonuna her bir örneğin eşit konsantrasyonda (500 ng) girmesi için her örnekten kaç μl alınması gerektiği hesaplandı. Bundan sonra random primerlerden 2 μl, total RNA örneklerinden ise 500 ng olacak şekilde reaksiyon hacimi NFW ile 11.4 μl'ye tamamlandı. Random primerler ile total RNA örnekleri pipetlenerek hazırlanan karışım, 65°C'de 10 dakika termal cyclerda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hızlıca buz üzerine alındı. Ayrı bir tüpte aşağıda belirtilen protokole göre hazırlanan başka bir karışım tüm örnekler 8.6 μl eklenerek pipetlendi (Tablo 3.3). Hazırlanan örnekler termal cyclera tekrar yerleştirildikten sonra 55°C'de 30 dakika ve 85°C'de 5 dakika (enzim inaktivasyonu) ile RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3 RT-PCR için kullanılan kimyasallar ve miktarları

Karışım	Miktar ( $\mu$ l)
Buffer 5X	4
RT	1.1
Rnase inhibitör	0.5
Deoxinükleotid mix	2
DTT	1
Toplam	8.6

### 3.6.3. Real-Time QPCR (Kantitatif PCR)

Total RNA'daki mRNA ekspresyon düzeylerini kantitatif olarak ölçmek için birkaç yöntem kullanılabilir. Bizim çalışmamızda kullandığımız yöntem; RT-PCR ile elde edilen cDNA örneklerinden istenilen DNA dizisinin PCR ile çoğaltılabildiği QPCR yöntemidir. İlgilenilen gene özel olarak hazırlanmış single assay primerleri ve içinde Taq DNA polimeraz enziminin yer aldığı PCR karışımı (probe master mix) varlığında (Tablo 3.4) cDNA iplikçikleri çoğaltılarak (Tablo 3.5), Light Cycler 480/I (Roche, İsviçre) cihazında Real-Time QPCR yöntemi gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullanılan primer çiftleri ile elde edilen PCR ürünlerinin baz çifti (bç) uzunlukları ve referans numaraları Tablo 3.6 de gösterilmiştir. Real-Time QPCR sonucunda elde edilen verilerin daha doğru ve güvenilir bir şekilde yorumlanabilmesi için her bir örnek ikili setler halinde çalışıldı ve iki değer ortalama o örneğe ait olan veri olarak alındı.

Tablo 3.4 QPCR için gerekli kimyasallar ve miktarları

Karışım	Miktar ( $\mu$ l)
Real Time Single Assay Primer	1
Probe Master mix	10
cDNA	5
NFW*	4
Toplam	20

\*QPCR için gereken total RNA konsantrasyonu 500 ng'dır. RT-PCR reaksiyonu sonunda elde edilen cDNA konsantrasyonu ise 25 ng/ $\mu$ l'dir. Reaksiyona 500ng RNA ile başlandı ve reaksiyon sonundaki toplam hacim 20  $\mu$ l'ye tamamlandı. QPCR için gereken konsantrasyona ulaşabilmek için, elde edilen cDNA 5 kat oranında seyreltilerek, cDNA konsantrasyonu 5 ng/ $\mu$ l'ye düşürüldü. QPCR'a girecek 5  $\mu$ l cDNA 1/5 oranında seyreltilmiş cDNA'dan alındı.

Tablo 3.5 QPCR amplifikasyon şartları

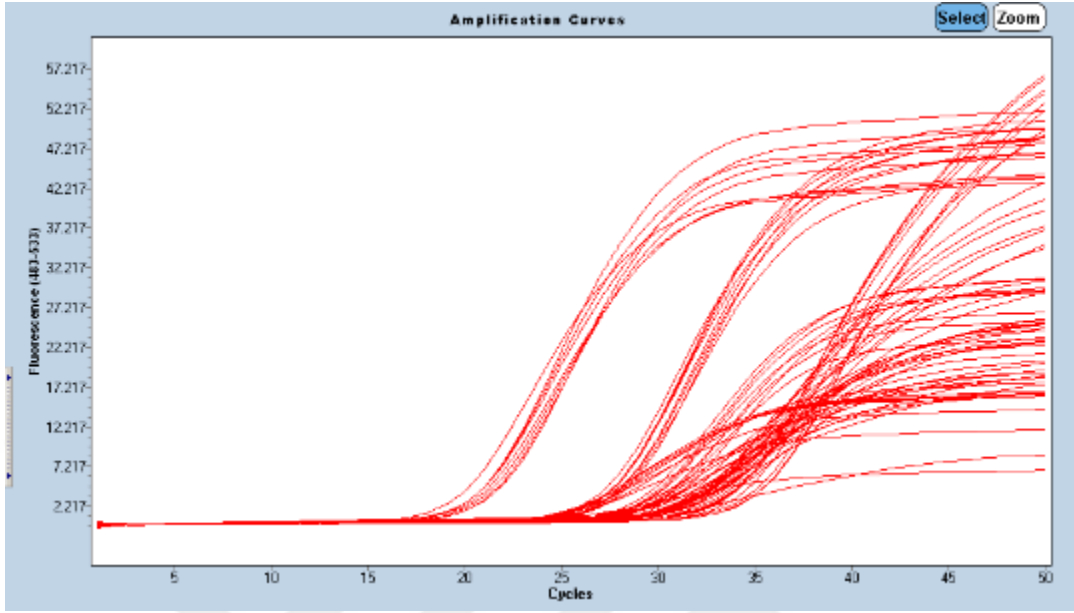
Basamak	Isı/Zaman	Döngü
Ön Denatürasyon	95°C 10 dakika	Polimeraz Aktivasyonu
Quantifikasyon	95°C 10 sn Denatürasyon	50 döngü
	60°C 30 sn Bağlanma	
	72°C 1 sn Uzama	
Melting		Erime eğrisi
Soğutma	40°C 30 sn	

Tablo 3.6 PCR ürünlerinin uzunluğu ve primer çiftlerinin referans numaraları

Gen ismi	PCR uzunluğu	Referans numarası
<i>PI3K <math>\alpha</math></i>	68 bç	NM_013005.1
<i>PI3K<math>\gamma</math></i>	96 bç	NM_022213.1
<i>B1-AR</i>	80 bç	NM_012701.1
<i><math>\beta</math>2-AR</i>	68 bç	NM_012492.2
<i>eNOS</i>	60 bç	NM_021838.2
<i>CaV1.2</i>	73 bç	NM_012517.2
<i>SERCA2a</i>	78 bç	NM_001110823.2
<i>PLN</i>	68 bç	NM_022707.2
<i>Beta Aktin</i>	79 bç	NM_031144.3

### 3.6.3.1 Real-Time QPCR analizi

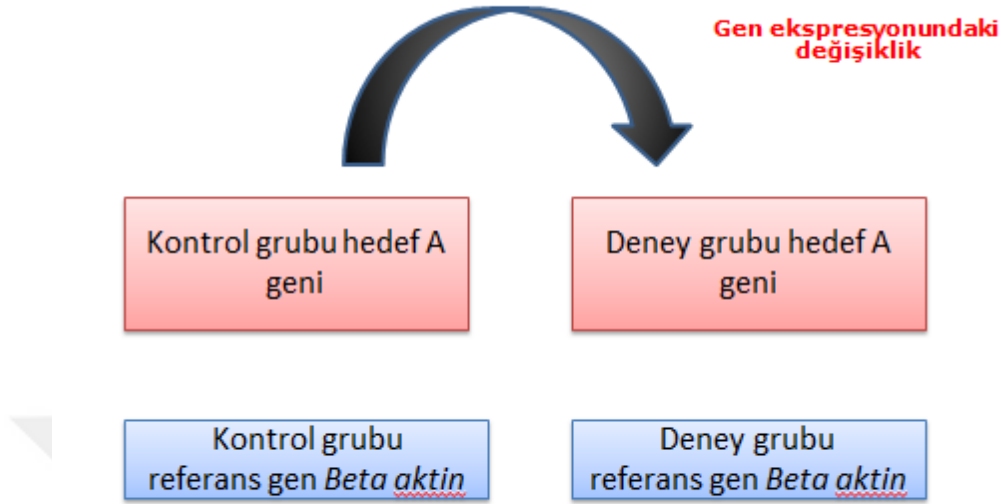
Hem genomik DNA'ya hem de transkribe cDNA'ya bağlanabilen hibrid prob veya hidroliz prob ile PCR sırasında oluşan ürün miktarı izlenebilir. Bu çalışmada reaksiyon sırasında oluşan cDNA miktarını belirlemek için kullanılan cDNA'ya hibridize olan taqman probun oluşturduğu floresanstaki değişiklikten yararlanıldı. Bunun için her reaksiyon için eşik siklusu (cycle threshold, CT) değeri belirlendi. CT değeri, floresans sinyal olarak belirlenen eşik değerine her bir PCR ürününün kaçınıcı siklusta ulaşabildiğini göstermektedir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Real-Time QPCR çalışmalarından alınan bir grafik örneği. Yatay ekseninde siklus sayısı, dikey ekseninde ise floresans miktarı grafiğe geçirildi.

Realtime PCR çalışmaları için relatif quantifikasyon kullanıldığından bu yana matematiksel bir metod olan standart curve ve bizim kullandığımız  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  metodu yaygın olarak kullanılmaktadır (Yuan, Reed, Chen & Stewart, 2006). Örnekler real time cihazına yüklendikten sonra PCR dataları Real Time 480/I software programı kullanılarak toplandı. Hedef genlerdeki mRNA değişikliklerinin belirlenmesi için referans gen olarak kullanılan *Beta Aktin* geninin normalizasyonundan sonra Real Time 480/I software programı (Roche, İsviçre) kullanılarak Şekil 3.7'de gösterildiği gibi  $\Delta\Delta Ct$  ve  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  değerleri hesaplandı (Fleige & Pfaffl, 2006).





Şekil 3.7  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  yöntemi ile *Beta Aktin* geninin normalizasyonu ve hedef genlerin ekspresyon seviyesinin kantitatif hesaplanması

$$\Delta Ct = Ct(\text{Deney grubu hedef A Geni}) - (\text{Deney Grubu Referans gen } \textit{Beta Aktin})$$

$$\Delta Ct = Ct(\text{Kontrol Grubu hedef A Geni}) - (\text{Kontrol Grubu Referans gen } \textit{Beta Aktin})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Deney Grubu}) - \Delta Ct(\text{Kontrol Grubu})$$

$$\text{Hedef A geninin ekspresyon seviyesi} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

### 3.7. İstatistiksel Analiz

Langendorf ve gen ekspresyon ile ilgili çalışmalarının istatistiksel analizi SPSS (Versiyon 16.0, SPSS, Sikago, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için Liliefor'in düzeltmesi ile Kolmogrov-Smirnow ve Shapiro testleri kullanıldı. Değerlerin normal dağılımı görüldükten sonra tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırmalar testi uygulandı. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi ve  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4-BULGULAR

### 4.1. Omentinin kardiyovasküler etkileri

Kontrol grubu ve omentin verilen kalplerde dengeleme döneminden sonra 30 dakikalık izleme sürecinin 0. 5. 10. 20. 30. dakikalarında kayıt edilen SVGB,  $+dP/dt_{max}$  ve dakikada kalp atım sayısı ortalama değerleri Tablo 4.1'de, koroner akım, MAPamp'ü ve MAP<sub>90</sub> ortalama değerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Kontrol grubunda ve omentin (100, 200 ve 400 ng/ml) verilen kalplerde SVGB,  $+dP/dt_{max}$  ve dakikada atım sayısı ortalama değerleri (n=7).

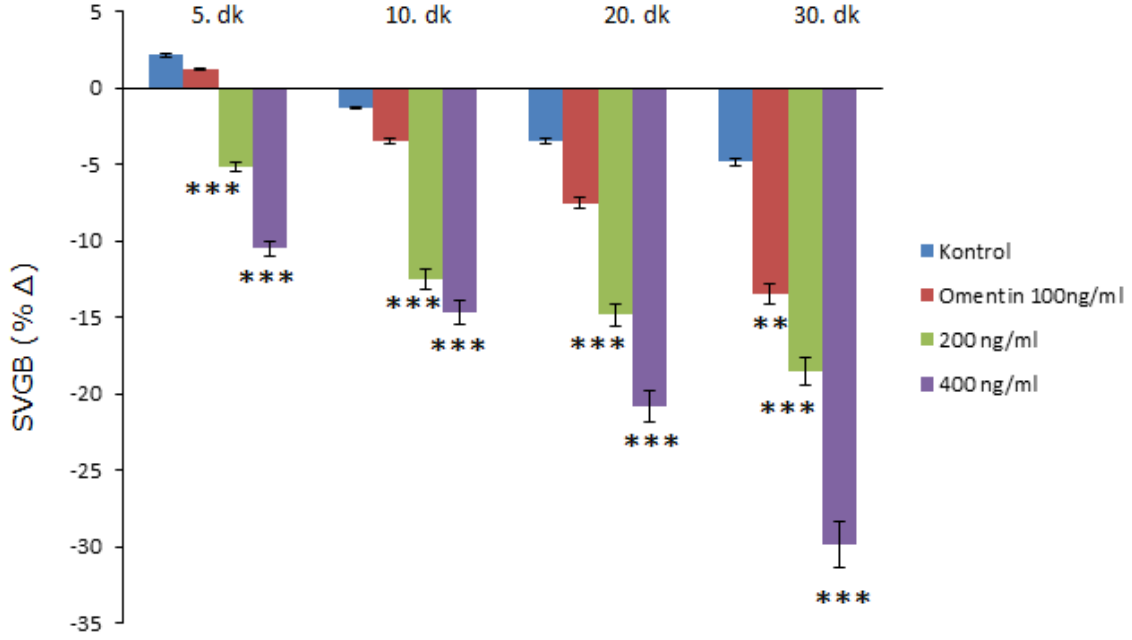
SVGB (mmHg)					
	0. Dakika	5. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	142 $\pm$ 8.2	145.16 $\pm$ 6.56	140.16 $\pm$ 6.04	137.16 $\pm$ 9.11	135.16 $\pm$ 9.68
100 ng/ml	141.5 $\pm$ 7.66	142.83 $\pm$ 7.44	136.33 $\pm$ 7.49	127 $\pm$ 8.83	117.16 $\pm$ 7.4
200 ng/ml	135 $\pm$ 8.33	128 $\pm$ 6.35	118.16 $\pm$ 8.18	115 $\pm$ 6.81	110 $\pm$ 8.15
400 ng/ml	133.83 $\pm$ 8.84	119.83 $\pm$ 7.06	114.33 $\pm$ 5.83	106 $\pm$ 6.75	93.83 $\pm$ 7.7
$+dP/dt_{max}$ (mmHg <sup>s<sup>-1</sup>)</sup>					
	0. Dakika	5. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	5095.83 $\pm$ 364.8	5215.3 $\pm$ 345.75	5047.1 $\pm$ 287	4946 $\pm$ 467.5	4823.5 $\pm$ 550
100 ng/ml	5264.33 $\pm$ 573.2	5403.2 $\pm$ 545.76	5139 $\pm$ 339.97	4943 $\pm$ 433.5	4672.16 $\pm$ 4.27
200 ng/ml	4595 $\pm$ 222.8	4482 $\pm$ 316.23	4151.5 $\pm$ 234.79	4054.16 $\pm$ 216.4	3903.83 $\pm$ 255
400 ng/ml	5078.83 $\pm$ 309.1	4653.83 $\pm$ 419.9	4415.1 $\pm$ 279.18	4028.66 $\pm$ 241.1	3637.5 $\pm$ 275
Dakikada atım sayısı (atım/dakika)					
	0. Dakika	5. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	272.33 $\pm$ 13.78	266.3 $\pm$ 12.7	265.1 $\pm$ 12.3	263.8 $\pm$ 14.04	261.3 $\pm$ 11
100 ng/ml	282.33 $\pm$ 18.22	275 $\pm$ 18.3	273.1 $\pm$ 15.4	269.8 $\pm$ 13.67	271 $\pm$ 14.6
200 ng/ml	303.33 $\pm$ 20.46	299.6 $\pm$ 16.5	296.5 $\pm$ 12.9	293 $\pm$ 14.68	293 $\pm$ 17.9
400 ng/ml	301 $\pm$ 16.1	297 $\pm$ 14.4	294.8 $\pm$ 17	291 $\pm$ 18.4	289.6 $\pm$ 16.7

Tablo 4.2 Kontrol grubunda ve omentin (100, 200 ve 400 ng/ml) verilen kalplerde koroner akım, MAPamp ve MAP<sub>90</sub> ortalama değerleri (n=7).

Koroner akım ml/dakika					
	0. Dakika	5. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	14.66 ± 0.8	14.16 ± 0.83	14 ± 0.93	13.66 ± 0.92	13.5 ± 0.84
100 ng/ml	16.3 ± 0.61	16 ± 0.73	15.83 ± 0.7	15.5 ± 0.85	15.33 ± 0.88
200 ng/ml	16 ± 0.89	15.6 ± 0.76	15.33 ± 0.66	15.16 ± 1.16	15 ± 1.5
400 ng/ml	14.83 ± 0.91	14.5 ± 0.72	14.3 ± 0.8	14 ± 0.86	13.66 ± 0.76
MAPamp (mV)					
	0. Dakika	5. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	8.59 ± 0.85	7.73 ± 0.78	5.97 ± 0.59	5.12 ± 0.44	4.69 ± 0.48
100 ng/ml	8.68 ± 1.06	7.47 ± 0.75	6.58 ± 0.63	5.83 ± 0.6	5.16 ± 0.43
200 ng/ml	7.02 ± 0.88	6.08 ± 0.55	5.18 ± 0.51	4.26 ± 0.46	3.51 ± 0.32
400 ng/ml	8.65 ± 1	7.57 ± 0.62	6.45 ± 0.42	5.47 ± 0.47	4.98 ± 0.48
MAP <sub>90</sub> (ms)					
	0. Dakika	2. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	222.66 ± 14.35	219.83 ± 13.3	231 ± 13.88	233.16 ± 16.16	241.83 ± 18.3
100 ng/ml	214.5 ± 16.72	217 ± 14.76	222.16 ± 15.23	224.66 ± 13.42	228.8 ± 14.7
200 ng/ml	202.16 ± 11.65	205.16 ± 11.5	208.5 ± 10.44	210.83 ± 10.25	215.16 ± 15.1
400 ng/ml	204.2 ± 15.68	206.5 ± 12.7	211 ± 12.89	212.33 ± 13.18	218.33 ± 13.9

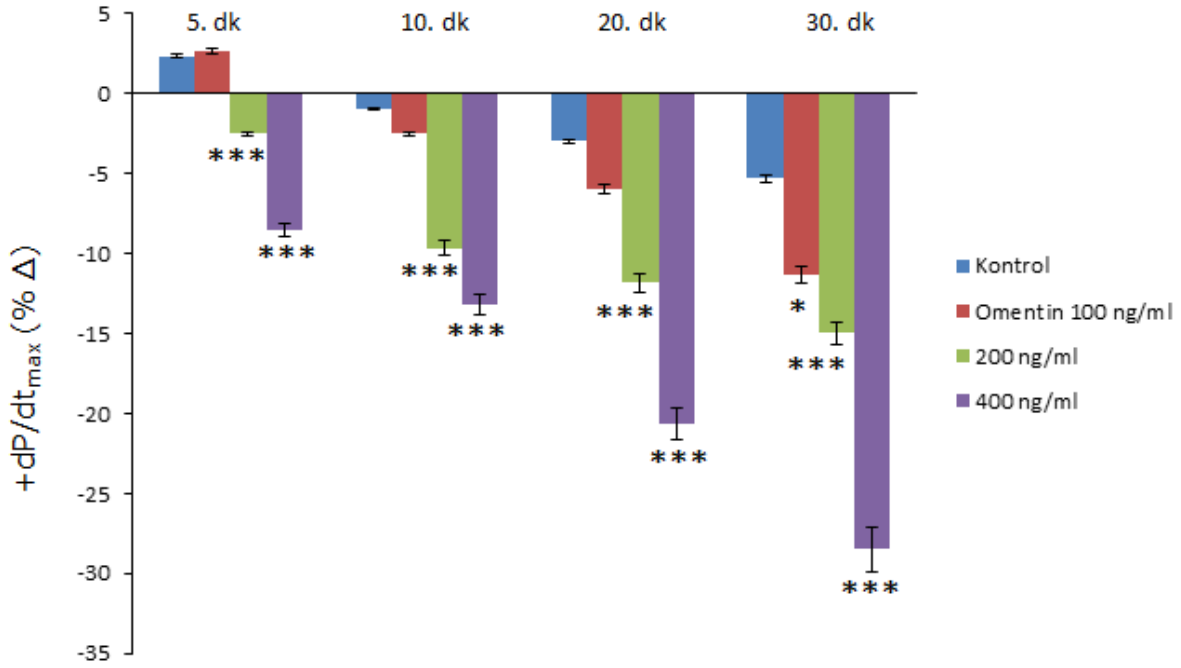
Kontrol grubunda dengeleme döneminden sonra 5., 10., 20. ve 30. dakikalarda ölçülen tüm parametrelerin değerlerinin, dengeleme periyodunun bitiminde (0. dakika) ölçülen değerlere göre % değişimi (% Δ değerleri) hesaplanmıştır. Dengeleme döneminden sonra omentin verilmesinin ardından 5., 10., 20. ve 30. dakikalarında ölçülen tüm parametrelerin değerlerinin de dengeleme döneminin bitiminde bu peptid verilmeden önceki (0. dakika) değerlerine göre % değişimi (% Δ değerleri) hesaplanmıştır. Omentin dozlarının verilmesinden sonra 5., 10., 20. ve 30. dakikalardaki % Δ

değerleri kontrol grubunun 2., 10., 20. ve 30. dakikalardaki %  $\Delta$  değerleri ile karşılaştırılmıştır. Sol ventrikülün geliştirdiği basınç, omentinin 100 ng/ml dozunda 30. dakikada  $p < 0.01$  düzeyinde, 200 ve 400 ng/ml dozlarında ise 5., 10., 20. ve 30. dakikalarda  $p < 0.001$  düzeyinde anlamlı şekilde azalmıştır. Maksimal azalmalar 30. dakikada bulunmuştur (Şekil 4.1).



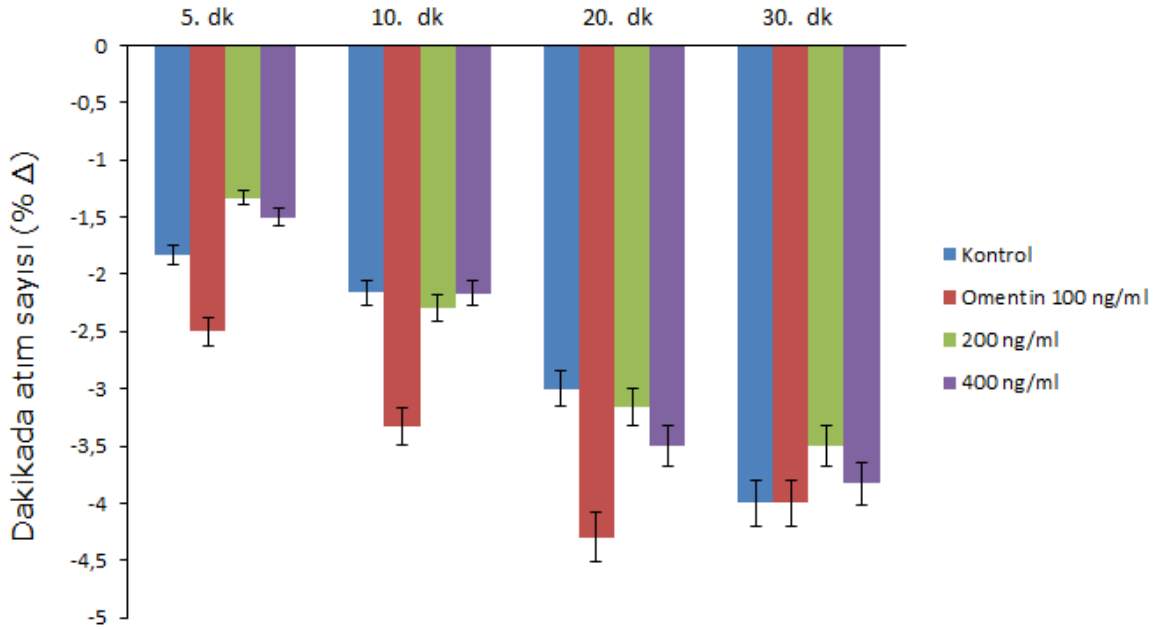
Şekil 4.1 Omentinin SVGB üzerinde etkisi. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , kontrolden anlamlı farklı (n=7).

Şekil 4.2'de gösterildiği gibi  $+dP/dt_{max}$  değerleri omentinin 100 ng/ml dozunda 30. dakikada  $p < 0.05$  düzeyinde, 200 ve 400 ng/ml dozlarında ise 5., 10., 20. ve 30. dakikalarda  $p < 0.001$  düzeyinde anlamlı şekilde azalmıştır. Bu peptidin bütün dozlarında  $+dP/dt_{max}$  değerlerindeki maksimal azalmalar 30. dakikada görülmüştür.



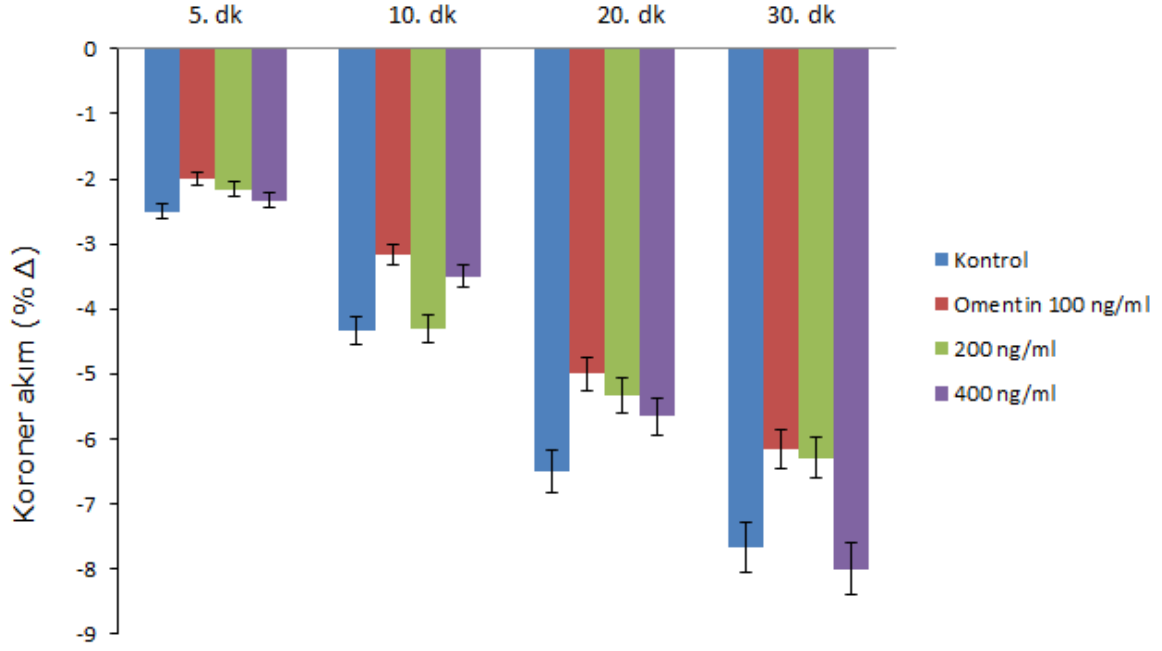
Şekil 4.2 Omentinin +dP/dt<sub>max</sub> üzerinde etkisi. \*p<0.05, \*\*\* p<0.001, kontrolden anlamlı farklı (n=7).

Omentinin 100, 200 ve 400 ng/ml dozları 5., 10., 20. ve 30. dakikalarda kalp atım sayısında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.3).

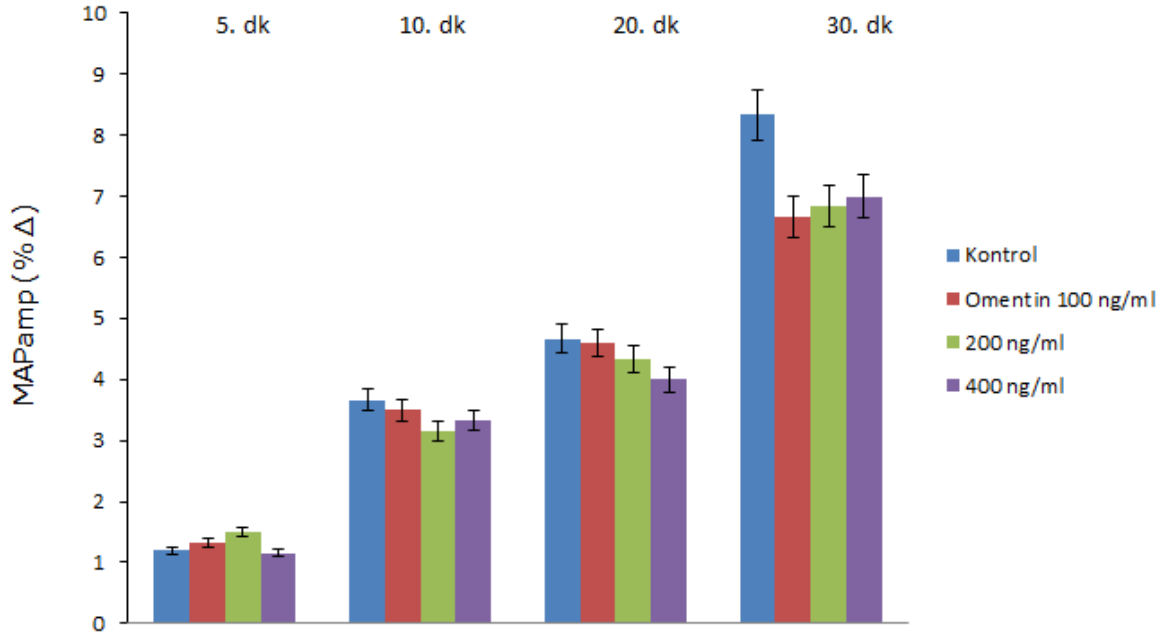


Şekil 4.3 Omentinin kalp atım sayısı üzerinde etkisi (n=7).

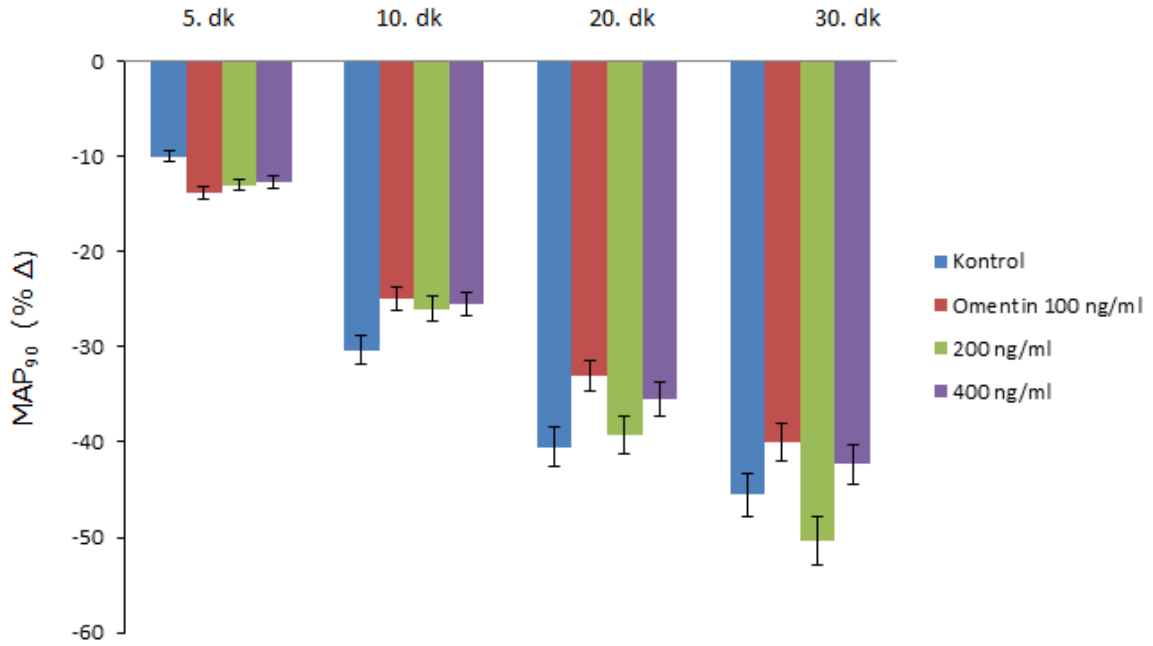
Omentinin çalıştığımız bütün dozları kalplere verildikten sonra 5., 10., 20. ve 30. dakikalarda koroner akım, MAPamp ve MAP<sub>90</sub> değerlerini de değiştirmemiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).



Şekil 4.4 Omentinin koroner akım üzerinde etkisi (n=7).



Şekil 4.5 Omentinin MAPamp üzerinde etkisi (n=7).



Şekil 4.6 Omentinin MAP90 üzerinde etkisi (n=7).

#### 4.1.1. Omentin (400 ng/ml) dozunun kardiyovasküler etkilerinin LY294002 (10 µM) ile antagonize edilmesi

Kontrol değerlerle karşılaştırıldığında LY294002 (10 µM) tek başına 5. dakikada SVGB ve  $+dP/dt_{max}$  değerlerinde anlamlı azalmaya neden olmuştur ( $p<0.001$ , Tablo 4.3 ve 4.4). Aynı dozdaki LY294002 ile 400 ng/ml omentin kalplere birlikte verildiğinde, LY294002 gözlem periyodunun 5. dakikasında 400 ng/ml omentinin SVGB ve  $+dP/dt_{max}$  üzerindeki etkilerini ortadan kaldırmıştır ( $p<0.001$ ; 400 ng/ml omentine karşı 10 µM LY294002 + 400 ng/ml omentin, Tablo 4.3 ve 4.4).

Tablo 4.3 LY294002 10 µM'un yalnız başına veya 400 ng/ml omentin ile birlikte SVGB üzerine etkisi (n=7).

SGVB			
	(% Δ)	mmHg	mmHg
	5. Dakika	0. Dakika	5. Dakika
Kontrol	2.16 ± 0.47	142 ± 8.2	145.16 ± 6.56
LY294002 10 µM	-5.16 ± 0.7 <sup>a</sup>	142.3 ± 9.03	134.83 ± 7.62
LY294002 10 µM +Omentin 400 ng/ml	-5 ± 0.57 <sup>b</sup>	133.66 ± 9.93	127 ± 8.7
Omentin 400 ng/ml	-10.5 ± 0.76	133.83 ± 8.84	119.83 ± 7.06

- değerler azalmayı gösterir, a;  $p<0.001$  kontrolden anlamlı farklı, b;  $p<0.001$  omentin (400 ng/ml)den anlamlı farklı.



Tablo 4.4 LY294002 10  $\mu\text{M}$ 'un yalnız başına veya 400 ng/ml omentin ile birlikte  $+dP/dt_{\text{max}}$  üzerinde etkisi (n=7).

$+dP/dt_{\text{max}}$			
	(% $\Delta$ )	(mmHg <sup>s<sup>-1</sup>)</sup>	(mmHg <sup>s<sup>-1</sup>)</sup>
	5. Dakika	0. Dakika	5. Dakika
Kontrol	2.33 $\pm$ 0.42	5095.83 $\pm$ 364.8	5215.33 $\pm$ 345.75
LY294002 10 $\mu\text{M}$	-3 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	5250.66 $\pm$ 517.69	5095.66 $\pm$ 495.62
LY294002 10 $\mu\text{M}$ + Omentin 400 ng/ml	-3.5 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	5085.83 $\pm$ 464.94	4911.3 $\pm$ 438.42
Omentin 400 ng/ml	- 8.5 $\pm$ 0.67	5078.83 $\pm$ 309.1	4653.83 $\pm$ 419.99

- değerler azalmayı gösterir, a;  $p < 0.001$  kontrolden anlamlı farklı, b;  $p < 0.001$  omentin 400 ng/ml' den anlamlı farklı.

## 4.2. Kimerinin kardiyovasküler etkileri

Kontrol grubu ile kimerin verilen gruplarda dengeleme döneminden sonra 30 dakikalık izleme periyodunun 0., 2., 10., 20., 30. dakikalarında kayıt edilen SVGB,  $+dP/dt_{\text{max}}$  ve dakikada kalp atım sayısı ortalama değerleri Tablo 4.5'de, koroner akım, MAPamp'ü ve MAP<sub>90</sub> ortalama değerleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.5 Kontrol grubunda ve (10, 100 ve 1000 nM) kimerin verilen kalplerde SVGB, +dP/dt<sub>max</sub> ve dakikada atım sayısı ortalama değerleri (n=7).

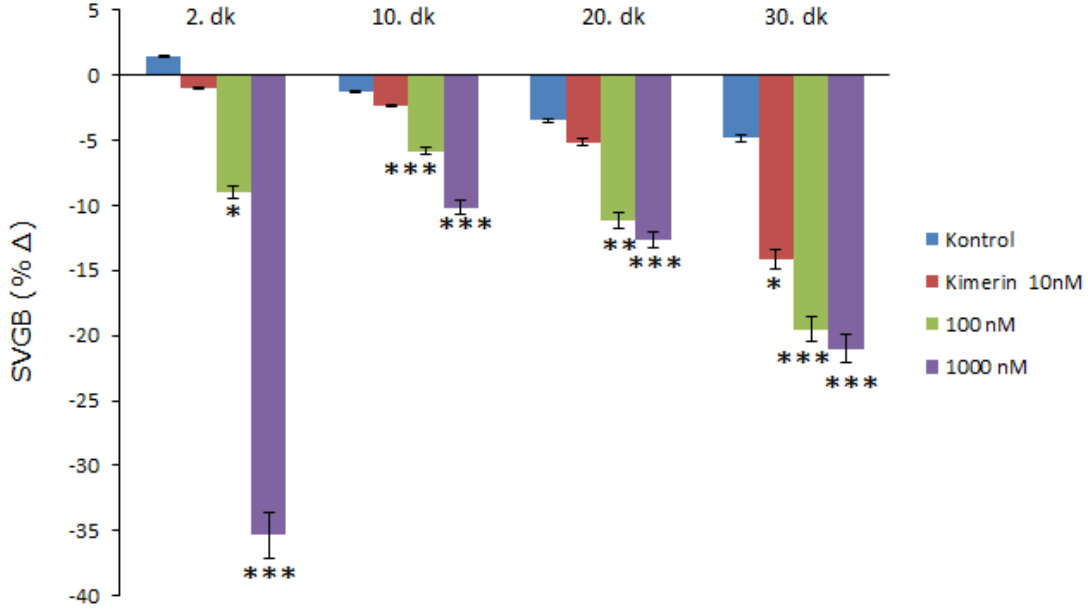
SVGB (mmHg)					
	0. Dakika	2. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	142 ± 8.2	144 ± 6.24	140.16 ± 6.04	137.16 ± 9.11	135.16 ± 9.68
10 nM	117.83 ± 4.95	116.66 ± 5.04	115 ± 5.29	112 ± 6.42	100.83 ± 5.68
100 nM	131.16 ± 7.85	117.5 ± 3.94	123.5 ± 5.23	114.33 ± 3.89	105.83 ± 4.98
1000 nM	137.83 ± 5.86	89.66 ± 8.57	123.83 ± 7.26	123.16 ± 8.57	109.5 ± 4.77
+dP/dt <sub>max</sub> (mmHg <sup>s<sup>-1</sup>)</sup>					
	0. Dakika	2. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	5095.83 ± 364.8	5223.8 ± 351.15	5047.2 ± 287	4946 ± 467.6	4823.5 ± 550.51
10 nM	4267.66 ± 193.3	4202.5 ± 3 56.3	4191 ± 371.2	4025.16 ± 282.2	3755 ± 294.62
100 nM	4992 ± 418.4	4552.5 ± 202.16	4681.6 ± 250.04	4460.33 ± 144.5	4201.5 ± 201.6
1000 nM	4719 ± 369.9	3251.8 ± 310.1	4235.66 ± 352	4187.16 ± 337.5	3870 ± 247.33
Dakikada atım sayısı (atım/dakika)					
	0. Dakika	2. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	272.33 ± 13.78	266.83 ± 12.88	265.66 ± 12.46	264.16 ± 14.18	261.83 ± 11.94
10 nM	291.16 ± 9.75	285 ± 13.51	255.5 ± 15.92	282.5 ± 21.26	275.66 ± 10.18
100 nM	277.33 ± 17.24	271.66 ± 21.29	270.16 ± 17.31	265.33 ± 14.08	265.8 ± 14.2
1000 nM	293.33 ± 10.95	286.5 ± 16.03	2 86.3 ± 11.97	285.5 ± 13.33	281.3 ± 12.3

Tablo 4.6 Kontrol grubunda ve 10, 100 ve 1000 nM kimerin verilen kalplerde koroner akım, MAPamp ve MAP90 ortalama değerleri (n=7).

Koroner akım ml/dakika					
	0. Dakika	2. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	14.66 ± 0.8	14.33 ± 0.66	14 ± 0.93	13.66 ± 0.92	13.5 ± 0.84
10 nM	14.6 ± 0.95	-14.3 ± 1.03	14.16 ± 1.07	13.6 ± 1.14	13.66 ± 1.05
100 nM	16 ± 0.57	-15.3 ± 0.84	15.16 ± 0.83	15 ± 1	14.83 ± 0.91
1000 nM	16.16 ± 0.54	11.16 ± 0.83	14.66 ± 1.08	15.16 ± 1.01	15.33 ± 0.98
MAPamp (mV)					
	0. Dakika	2. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	8.59 ± 0.85	7.7 ± 0.77	5.97 ± 0.59	5.12 ± 0.44	4.69 ± 0.48
10 nM	9.15 ± 0.65	8.29 ± 0.53	7.11 ± 0.51	6.15 ± 0.49	5.82 ± 0.36
100 nM	9.7 ± 0.62	8.38 ± 0.76	7.4 ± 0.76	5.39 ± 0.39	4.87 ± 0.4
1000 nM	10.02 ± 0.52	8.94 ± 0.68	6.85 ± 0.72	5.52 ± 0.4	5.31 ± 0.5
MAP <sub>90</sub> (ms)					
	0. Dakika	2. Dakika	10. Dakika	20. Dakika	30. Dakika
Kontrol	222.66 ± 14.35	224.83 ± 12.44	231 ± 13.88	233.16 ± 16.16	241.18 ± 18.3
10 nM	208 ± 10.06	210.16 ± 9.77	213.3 ± 6.32	218 ± 8.5	220.83 ± 8.4
100 nM	233.83 ± 13.7	237.5 ± 13.82	242.3 ± 14.19	245.16 ± 11.18	253.66 ± 17
1000 nM	212 ± 6.17	215.5 ± 6.84	218.33 ± 5.91	220 ± 8.09	226.16 ± 10.2

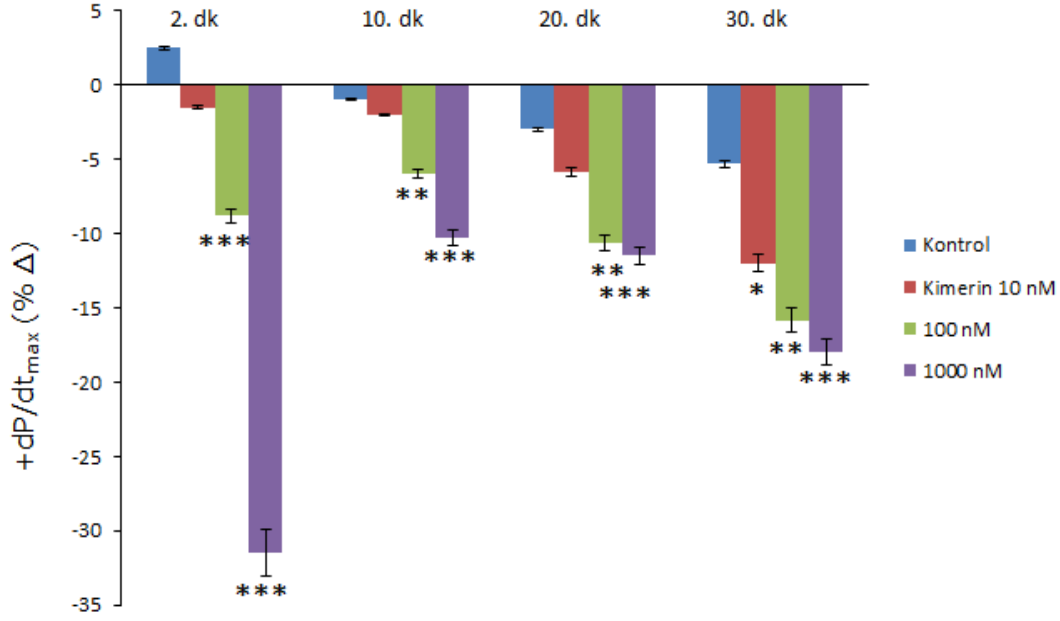
Kontrol grubunda dengeleme döneminden sonra 5., 10., 20. ve 30. dakikalarda ölçülen tüm parametrelerin değerlerinin, dengeleme periyodunun bitiminde (0. dakika) ölçülen değerlere göre % değişimi (% Δ değerleri) hesaplanmıştır. Dengeleme döneminden sonra kimerin verilmesinin ardından 5., 10., 20. ve 30. dakikalarında ölçülen tüm parametrelerin değerlerinin de dengeleme döneminin bitiminde bu peptid verilmeden önceki (0. dakika) değerlerine göre % değişimi (% Δ değerleri) hesaplanmıştır. Kimerin dozlarının verilmesinden sonra 5., 10., 20. ve 30. dakikalardaki % Δ

değerleri kontrol grubunun 2., 10., 20. ve 30. dakikalardaki %  $\Delta$  değerleri ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında kimerinin 10 nM dozu, SVGB değerini 30. dakikada anlamlı olarak azaltmıştır ( $p < 0.05$ ). Kimerinin 100 ve 1000 nM dozları ise izleme sürecinin 2., 10., 20. ve 30. dakikalarında ölçülen SVGB değerlerinde anlamlı azalmalara neden olmuştur ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$ ). Ayrıca SVGB değerleri, 30 dakikalık izleme süreci sırasında kontrol değerlerinin altında kalmıştır (Şekil 4.7).



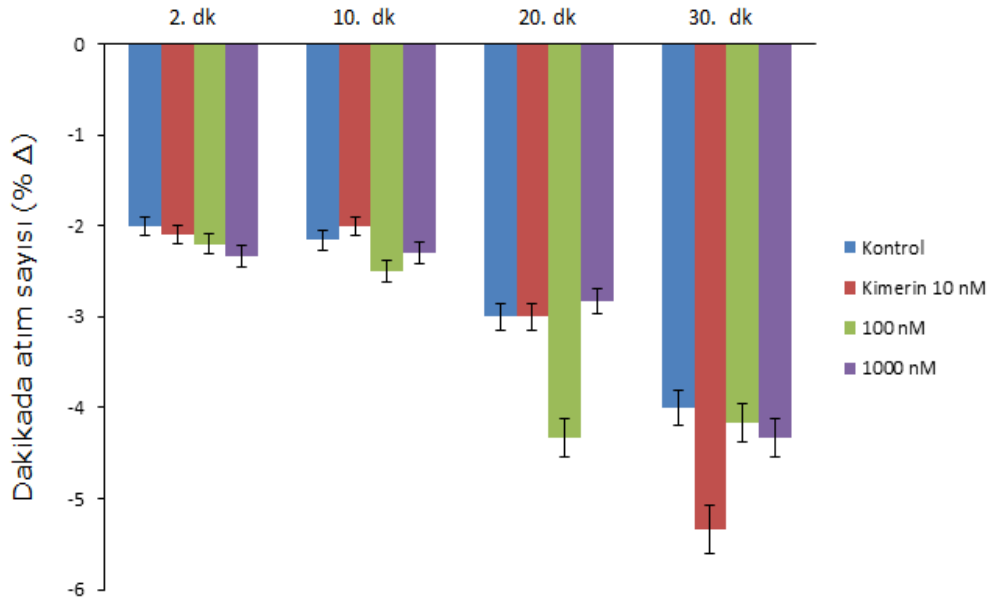
Şekil 4.7 Kimerinin değişik dozlarının SVGB üzerinde zamana bağlı etkisi -değerler azalmayı gösterir, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  ve \*\*\*  $p < 0.001$  kontrolden anlamlı farklı ( $n=7$ ).

Şekil 4.8'de görüldüğü gibi kalplere 10 nM kimerin verilmesinden sonra 30. dakikada  $+dP/dt_{max}$  anlamlı bir azalma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Bu peptidin 100 ve 1000 nM dozları 2., 10., 20. ve 30. dakikalarda  $+dP/dt_{max}$  değerlerini, kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır ( $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$ ).  $+dP/dt_{max}$  değerleri, SVGB değerleri gibi 30 dakikalık izleme süresince kontrol değerlerinin altında kalmıştır (Şekil 4.8).



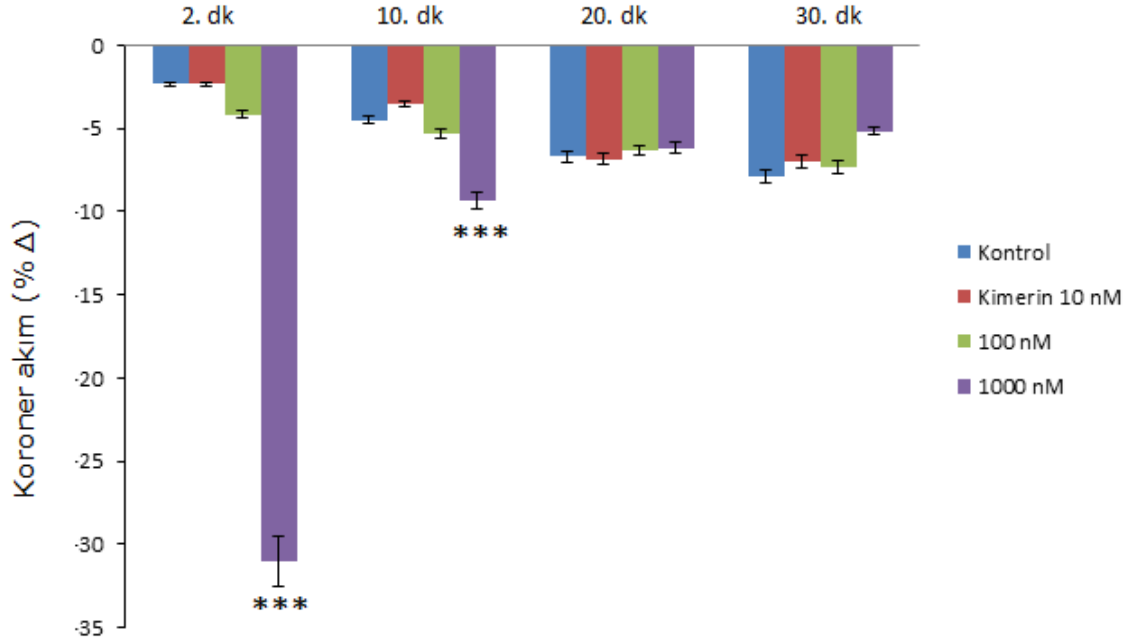
Şekil 4.8 Kimerinin  $+dP/dt_{max}$  üzerinde zamana bağlı etkisi (n=7) -değerler azalmayı gösterir, \* p<0.05, \*\* p<0.01 ve \*\*\* p<0.001 kontrolden anlamlı farklı.

Kimerinin 10, 100 ve 1000 nM dozları dakikada kalp atım sayısını değiştirmemiştir (Şekil 4.9).



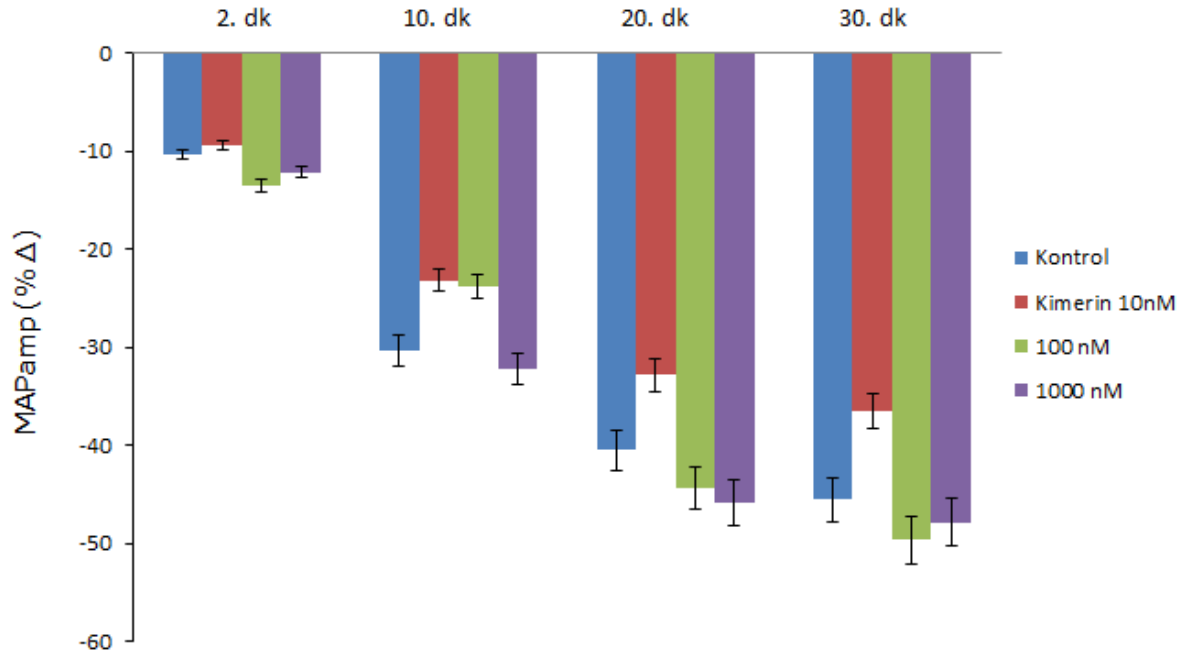
Şekil 4.9 Kimerinin kalp atım sayısı üzerinde etkisi (n=7).

Kimerinin 10 ve 100 nM dozları koroner akımı etkilememiştir. Buna karşılık kimerin 1000 nM dozu 2. ve 10. dakikalarda koroner akımı anlamlı olarak azaltmıştır ( $p < 0.001$ , Şekil 4.10).

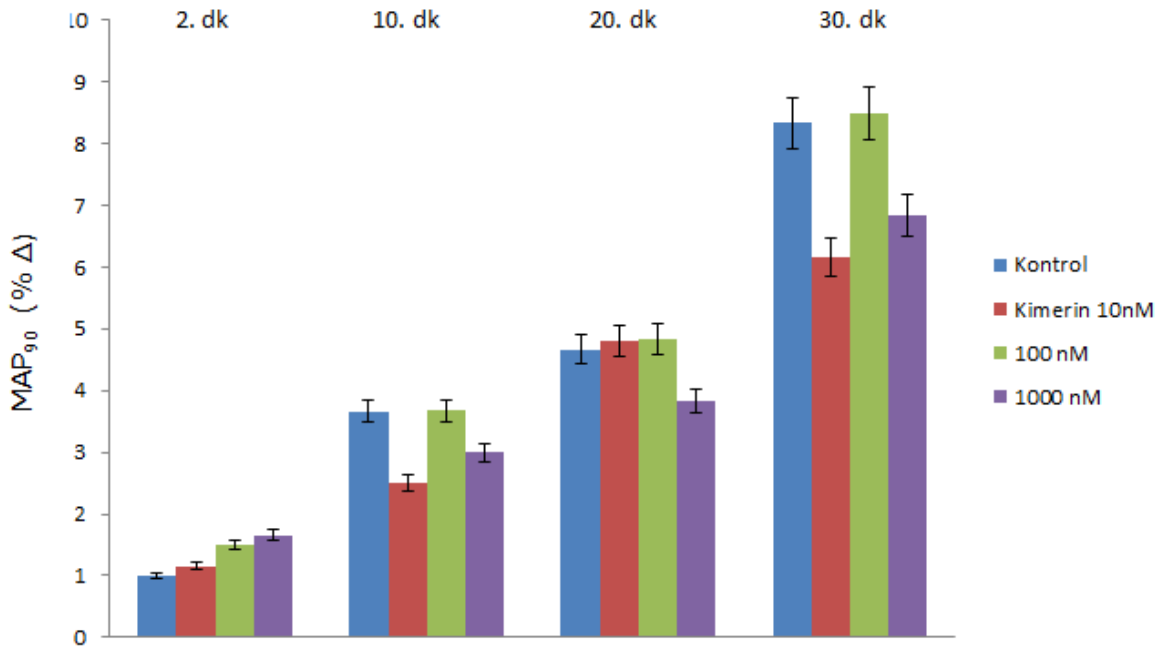


Şekil 4.10 Kimerinin koroner akım üzerinde etkisi (n=7) - değerler azalmayı gösterir, \*\*\*  $p < 0.001$  kontrolden anlamlı farklı.

Kimerinin çalıştığımız dozları 2., 10., 20. ve 30. dakikalarda MAPamp'ü üzerinde etkisi olmamıştır (Şekil 4.11). Ayrıca 10, 100 ve 1000 nM kimerinin 2., 10., 20. ve 30. dakikasında ölçülen MAP<sub>90</sub> değerlerinde de kontrollere göre anlamlı değişme bulunamamıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.11 Kimerinin MAPamp üzerinde etkisi (n=7).



Şekil 4.12 Kimerinin MAP<sub>90</sub> üzerinde etkisi (n=7).

#### 4.2.1. Kimerin (1000nM) dozunun kardiyovasküler etkilerinin L-NAME (10 mM) ile antagonize edilmesi

Kontrol değerlerle karşılaştırıldığında L-NAME (10 mM) tek başına 2. dakikada SVGB,  $+dP/dt_{max}$  ve koroner akım değerlerinde anlamlı azalmaya neden olmuştur ( $p<0.001$ , Tablo 4.7, 4.8 ve 4.9 ). Aynı dozdaki L-NAME ile 1000 nM kimerin kalplere birlikte verildiğinde L-NAME gözlem periyodunun 2. dakikasında 1000 nM kimerinin SVGB,  $+dP/dt_{max}$  ve koroner akım üzerindeki etkilerini ortadan kaldırmıştır ( $p<0.001$ ; 1000 nM kimerine karşı 10 mM L-NAME+1000 nM kimerin, Tablo 4.7, 4.8 ve 4.9).

Tablo 4.7 L-NAME 10 mM'un yalnız başına veya 1000 nM kimerin ile birlikte SVGB üzerine etkisi (n=7).

SVGB			
	( $\Delta\%$ )	mmHg	mmHg
	2. Dakika	0. Dakika	2. Dakika
Kontrol	$1.5 \pm 0.42$	$142 \pm 8.2$	$144 \pm 6.24$
L-NAME 10 mM	$-7.5 \pm 0.67^a$	$124.5 \pm 7.93$	$115.16 \pm 7.55$
L-NAME 10 mM +Kimerin 1000 nM	$-4 \pm 0.57^b$	$106.83 \pm 11.24$	$102.66 \pm 11$
Kimerin 1000 nM	$-35.33 \pm 4.08$	$137.83 \pm 5.86$	$89.66 \pm 8.57$

- değerler azalmayı gösterir, a;  $p<0.001$  kontrolden anlamlı farklı, b;  $p<0.001$  kimerin 1000 nM'den anlamlı farklı.



Tablo 4.8 L-NAME 10 mM'un yalnız başına veya 1000 nM kimerin ile birlikte +dP/dt<sub>max</sub> üzerine etkisi (n=7).

+dP/dt <sub>max</sub>			
	(% Δ)	mmHg <sup>s<sup>-1</sup></sup>	mmHg <sup>s<sup>-1</sup></sup>
	2. Dakika	0. Dakika	2. Dakika
Kontrol	2.5 ± 0.42	5095.83 ± 364.8	5223.83 ± 351.19
L-NAME 10 mM	-13.66 ± 1.54 <sup>a</sup>	4510 ± 335.11	3894.33 ± 314.44
L-NAME 10 mM + Kimerin 100 nM	-5 ± 0.63 <sup>b</sup>	3761 ± 361.57	3582 ± 333.84
Kimerin 1000 nM	-31.33 ± 2.55	4719 ± 369.94	3251.83 ± 310.1

- değerler azalmayı gösterir, a; p<0.001 kontrolden anlamlı farklı, b; p<0.001 kimerin 1000 nM'den anlamlı farklı.

Tablo 4.9 L-NAME 10 mM'un yalnız başına veya 1000 nM kimerin ile birlikte koroner akım üzerine etkisi (n=7).

Koroner akım			
	(%Δ)	ml/dakika	ml/dakika
	2. Dakika	0. Dakika	2. Dakika
Kontrol	-2.33 ± 0.33	14.66 ± 0.8	14.33 ± 0.66
L-NAME 10 mM	-1.16 ± 0.3 <sup>a</sup>	14.83 ± 1.25	14.66 ± 1.08
L-NAME 10 mM + Kimerin 1000 nM	-10.33 ± 0.92 <sup>b</sup>	13.33 ± 1.42	12 ± 1.06
Kimerin 1000 nM	-31 ± 2.79	16.16 ± 0.54	11.16 ± 0.83

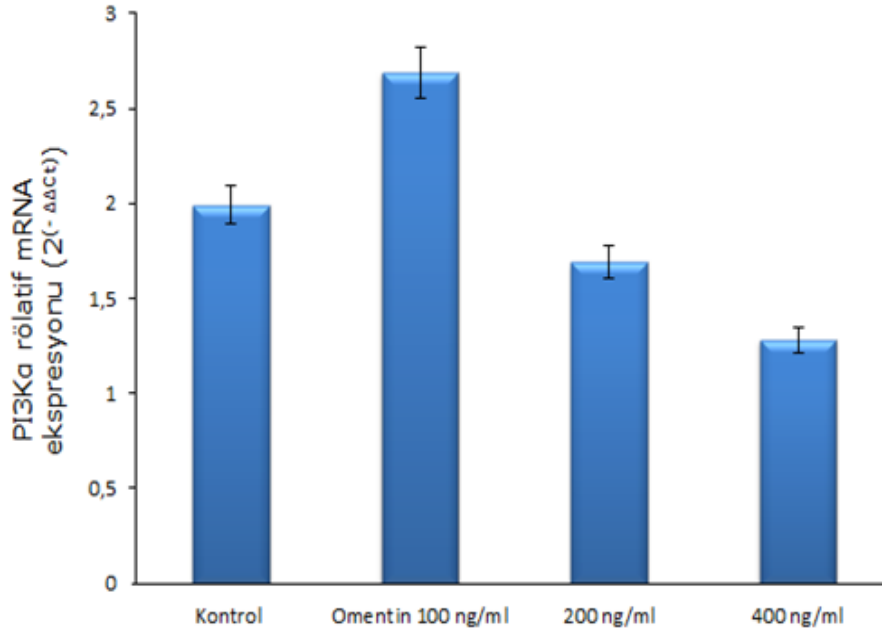
- değerler azalmayı gösterir, a; p<0.001 kontrolden anlamlı farklı, b; p<0.001 kimerin 1000 nM'den anlamlı farklı.

### 4.3. Omentinin gen ekspresyonları üzerindeki etkisi

Değerler *Beta Aktin* genine göre normalize edilmiş ve kontrol grubundaki değerlere göre ifade edilmiştir. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterilmiştir. Doku örnekleri 30. dakikanın sonunda alınmıştır. Her gruptaki örnek sayısı 7'dir.

#### 4.3.1. *PI3Ka* mRNA düzeyleri

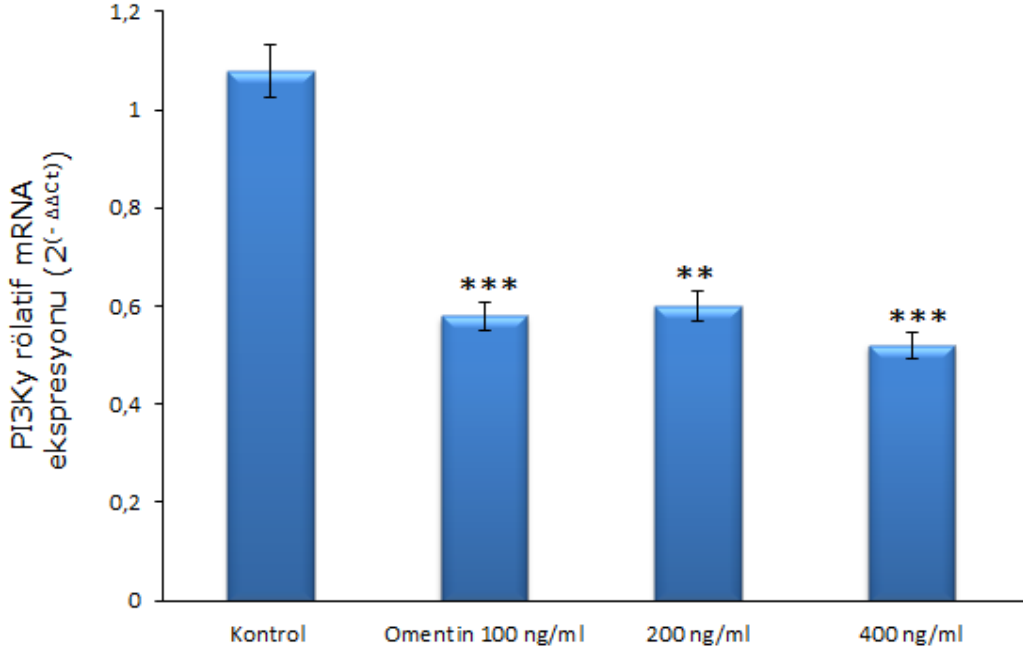
*PI3Ka* mRNA düzeyleri omentinin tüm dozlarında istatistiksel düzeyde anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.13). Omentinin 100 ng/ml dozunda *PI3Ka* mRNA düzeyleri artma eğilimi göstermiş fakat bu artma istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır. Omentinin diğer dozlarında *PI3Ka* mRNA düzeylerinin azalma eğiliminde olduğu görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Omentin verilen kalplerde *PI3Ka* mRNA değerlerinde değişimler.

### 4.3.2. *PI3Ky mRNA düzeyleri*

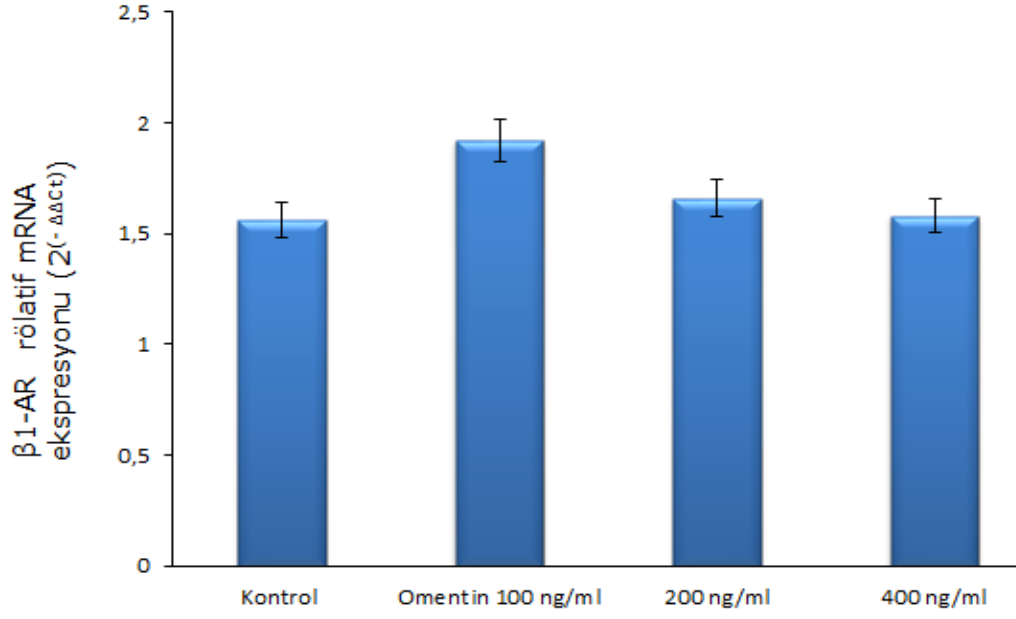
Şekil 4.14'de görüldüğü gibi omentinin çalışılan bütün dozlarında *PI3Ky* mRNA düzeylerinde kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).



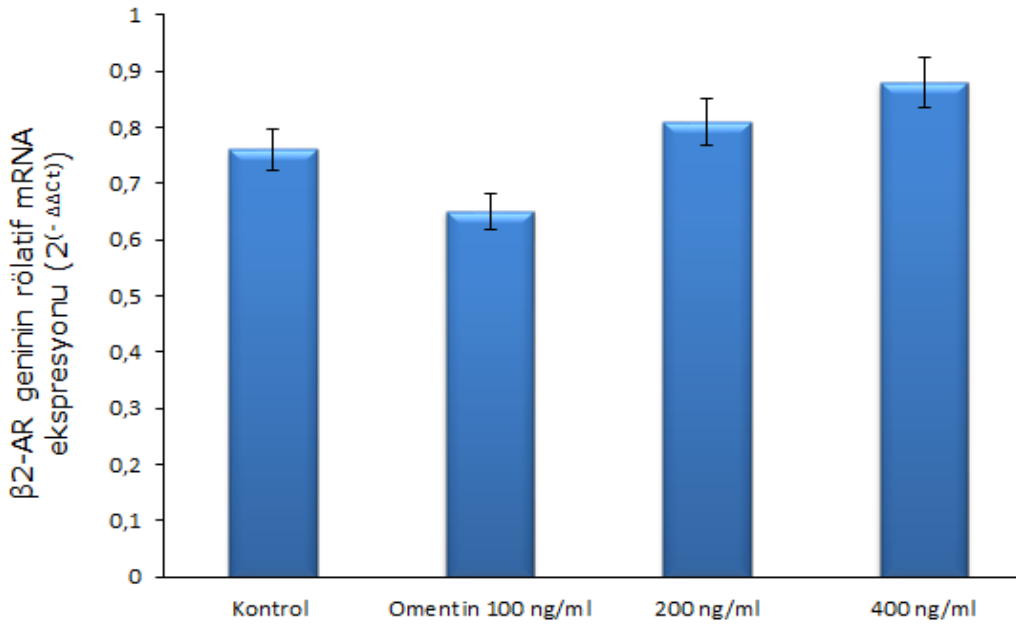
Şekil 4.14 Omentin verilen kalplerde *PI3Ky* mRNA değerlerinde değişimler. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  kontrolden anlamlı farklı.

### 4.3.3. $\beta 1$ -AR ve $\beta 2$ -AR mRNA düzeyleri

Çalışmamızda omentin 100, 200, 400 ng/ml dozlarının kalplere verilmesinin sonucunda  $\beta 1$ -AR ve  $\beta 2$ -AR mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). Omentin dozlarının  $\beta 1$ -AR üzerindeki etkisi şekil 4.15'de,  $\beta 2$ -AR geni üzerindeki etkisi 4.16'da gösterilmiştir.



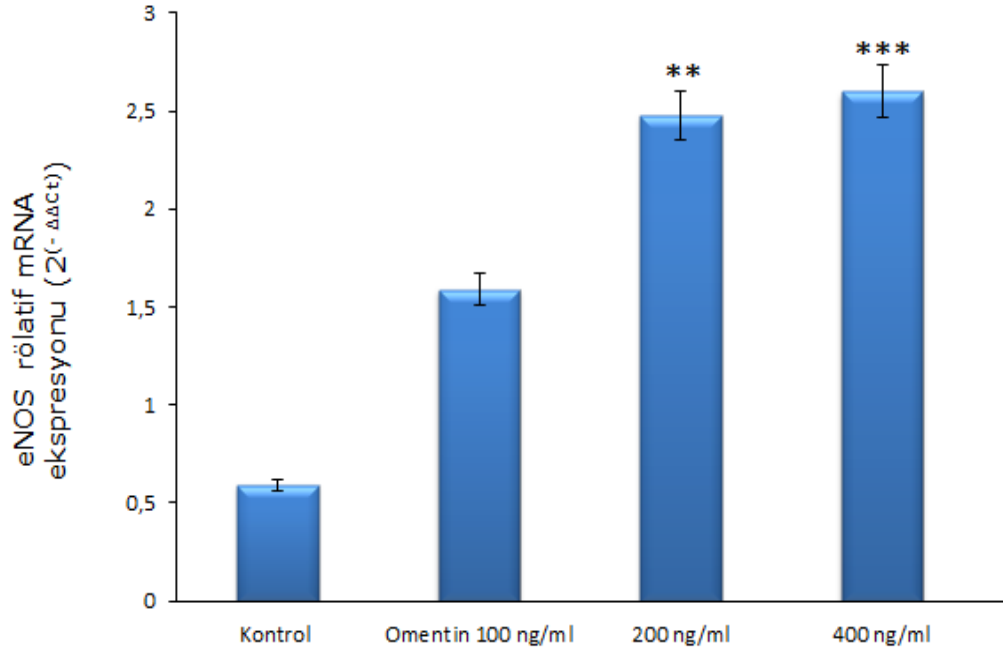
Şekil 4.15 Omentin verilen kalplerde  $\beta 1$ -AR mRNA değerlerinde değişimler.



Şekil 4.16 Omentin verilen kalplerde  $\beta 2$ -AR mRNA değerlerinde değişimler.

#### 4.3.4. eNOS mRNA düzeyleri

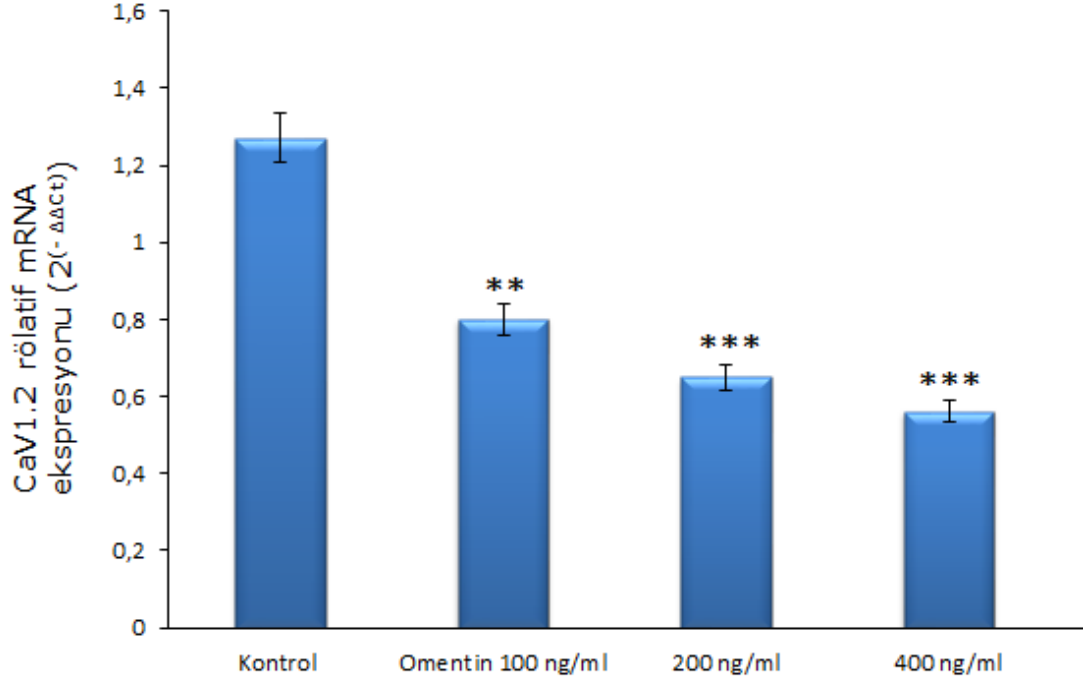
Şekil 4.17 görüldüğü gibi 100 ng/ml omentin, eNOS mRNA düzeyinde anlamlı bir artmaya neden olmamıştır. Buna karşılık 200 ve 400 ng/ml dozlarında omentin verilen kalplerde, eNOS mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Omentinin 400 ng/ml doz grubunda saptanan bu artışın, 200 ve 100 ng/ml doz gruplarına göre istatistiksel açıdan daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.17 Omentin verilen kalplerde eNOS mRNA değerlerinde değişimler. \*\* p<0.01 ve \*\*\* p<0.001 kontrolden anlamlı farklı.

#### 4.3.5. CaV1.2 mRNA düzeyleri

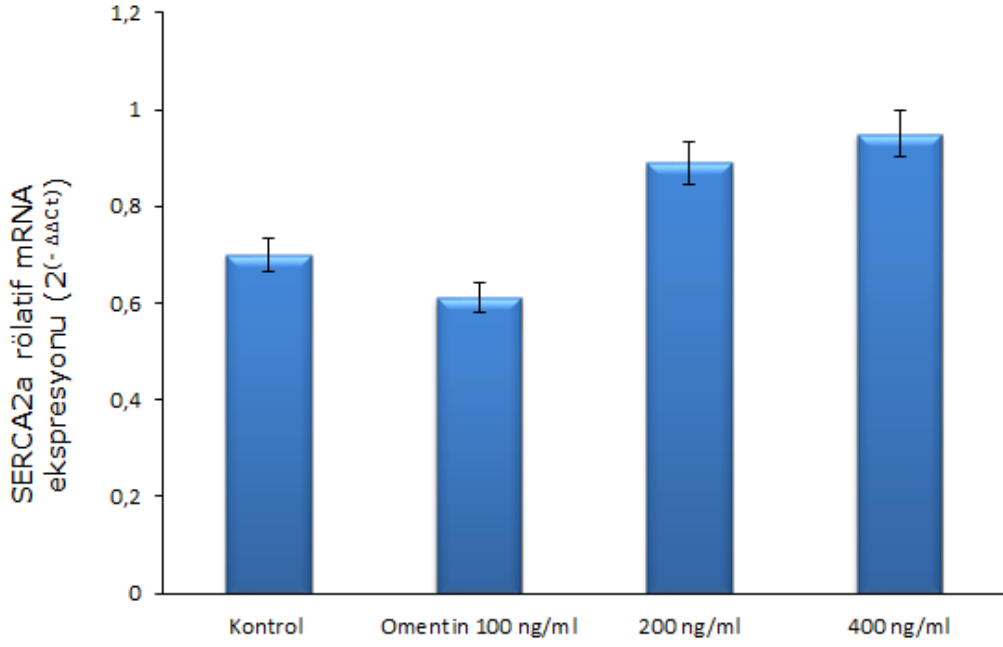
CaV1.2 geninin mRNA düzeyleri, omentin verilen kalplerde anlamlı olarak azalmıştır (p<0.01, p<0.001, Şekil 4.18). 200 ve 400 ng/ml doz grubunda, CaV1.2 mRNA miktarındaki azalmanın istatistiksel açıdan anlamlılığı 100 ng/ml dozundakinden daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Omentin verilen kalplerde *CaV1.2* mRNA değerlerinde değişimler. \*\*  $p < 0.01$  ve \*\*\*  $p < 0.001$  kontrolden anlamlı farklı.

#### 4.3.6. *SERCA2a* mRNA düzeyleri

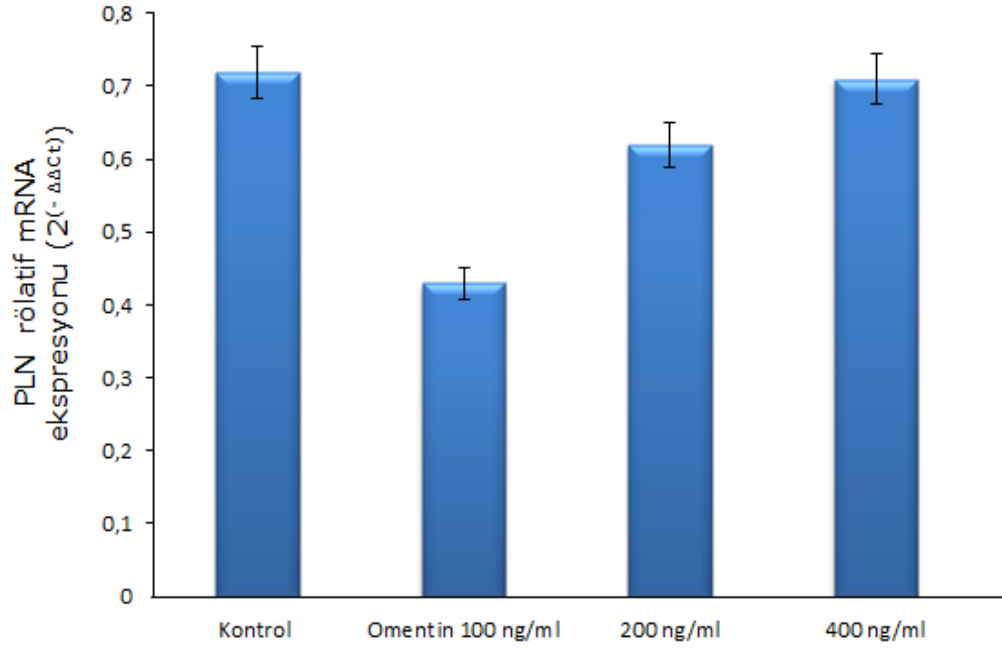
Şekil 4.19'da görüldüğü gibi omentin doz gruplarının *SERCA2a* mRNA düzeyleri kontrolden anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. 100 ng/ml omentin verilen grupta *SERCA2a* mRNA düzeyi kontrole göre bir azalma eğilimi gösterirken, 200 ve 400 ng/ml omentin verilen gruplarda artma eğilimi göstermiştir. Ancak *SERCA2a* mRNA düzeylerinde bu değişiklikler istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır.



Şekil 4.19 Omentin verilen kalplerde *SERCA2a* mRNA değerlerinde değişimler.

#### 4.3.7. *PLN* mRNA düzeyleri

Omentinin çalıştığımız tüm dozları *PLN* mRNA düzeylerini etkilememiştir. Omentinin tüm dozları kalplere uygulandığında kontrol değerlerine göre *PLN* mRNA miktarlarında azalma eğilimi görülmekle beraber bu azalmalar istatistiksel açıdan anlamlılığa ulaşmamıştır. Ayrıca omentinin uygulanan dozları kendi içerisinde birbirleriyle kıyaslandığında, 100 ng/ml'den 400 ng/ml dozuna doğru doza bağlı bir artma eğilimi görülmektedir. Buna rağmen tüm omentin grupları *PLN* mRNA düzeyleri açısından kontrol değerlerinin altında kalmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 Omentin verilen kalplerde *PLN* mRNA değerlerinde değişimler.

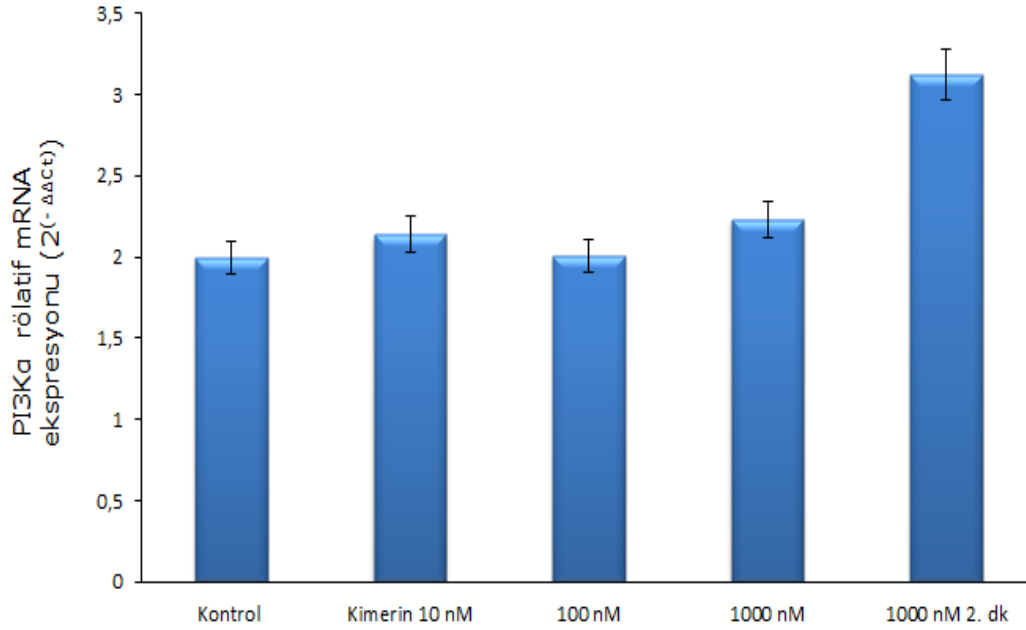
#### 4.4. Kimerinin gen ekspresyonları üzerindeki etkisi

Değerler *Beta Aktin* genine göre normalize edilmiş ve kontrol grubundaki değerlere göre ifade edilmiştir. Kimerin 1000 nM 2. dk grubundaki doku örnekleri 2. dakikada diğer gruplarda ise 30. dakikanın sonunda alınmıştır. Her gruptaki örnek sayısı 7'dir.

##### 4.4.1. *PI3Ka* mRNA düzeyleri

Şekil 4.21'de görüldüğü gibi kimerin verilen gruplarda *PI3Ka* mRNA düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında omentin gruplarında olduğu gibi istatistiksel düzeyde anlamlı değişiklik göstermemiştir.

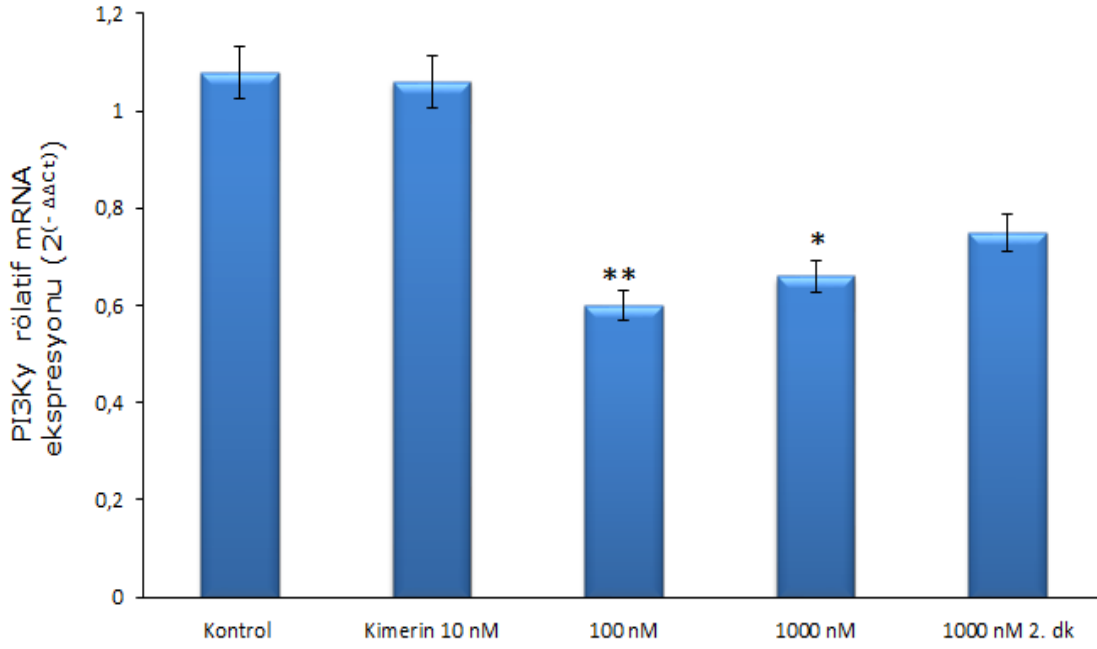




Şekil 4.21 Kimerin verilen kalplerde *PI3Ka* mRNA değerlerinde değişimler.

#### 4.4.2. *PI3Ky* mRNA düzeyleri

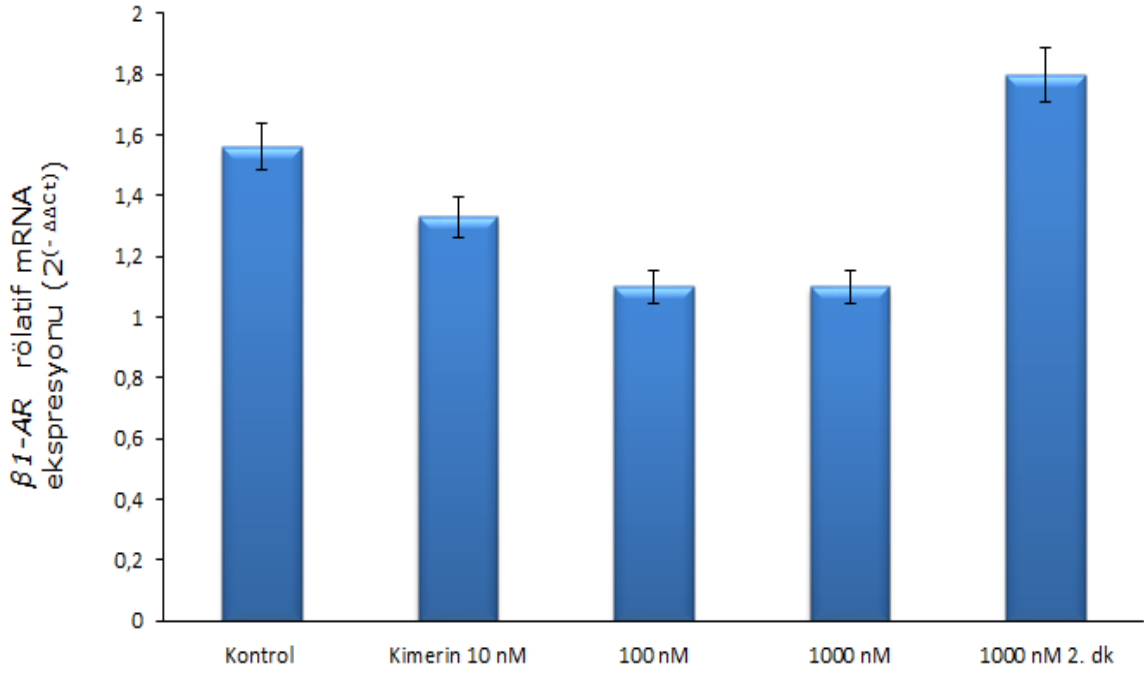
Kimerin 100 ve 1000 nM verilen gruplarda *PI3Ky* mRNA miktarlarında kontrollere göre istatistiksel düzeyde anlamlı bir azalma görülmüştür ( $p < 0.01$  ve  $p < 0.05$ ). Buna karşılık kimerin 10 nM verilen grupta *PI3Ky* mRNA miktarının kontrol değerlerine çok yakın olması nedeni ile istatistiksel açıdan kontrolden farklı bulunamamıştır. Kimerin 1000 nM verilen ve 2. dakikada dokusu alınan kalplerde *PI3Ky* mRNA miktarı kontrol değerlerinin altında olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.22).



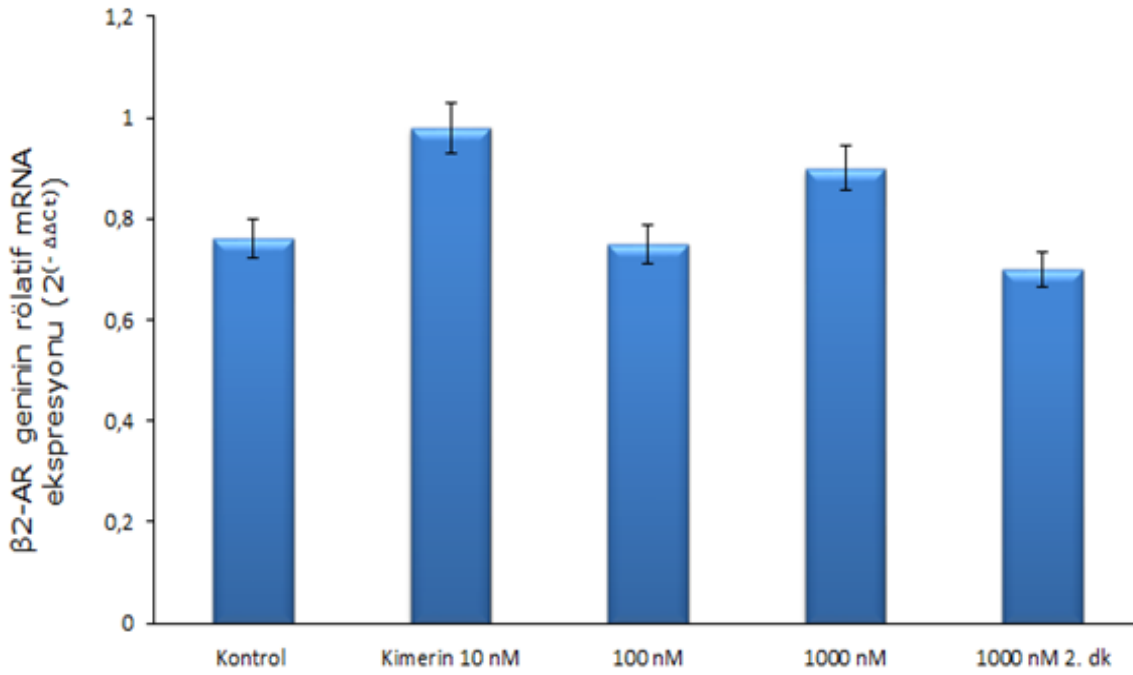
Şekil 4.22 Kimerin verilen kalplerde *PI3Ky* mRNA değerlerinde değişimler. \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  kontrolden anlamlı farklı.

#### 4.4.3. $\beta 1$ -AR ve $\beta 2$ -AR mRNA düzeyleri

Çalışmamızda kimerin 10, 100 ve 1000 nM dozlarının kalplere verilmesinin sonucunda  $\beta 1$ -AR ve  $\beta 2$ -AR mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). Kimerin dozlarının  $\beta 1$ -AR geni üzerindeki etkisi şekil 4.23'de,  $\beta 2$ -AR geni üzerindeki etkisi şekil 4.24'de gösterilmiştir. Şekil 4.23'de görüldüğü gibi kimerin 1000 nM verilip 2.dk da dokusu alınan grupta  $\beta 1$ -AR mRNA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol değerlerinin üstüne çıktığı görülmektedir.



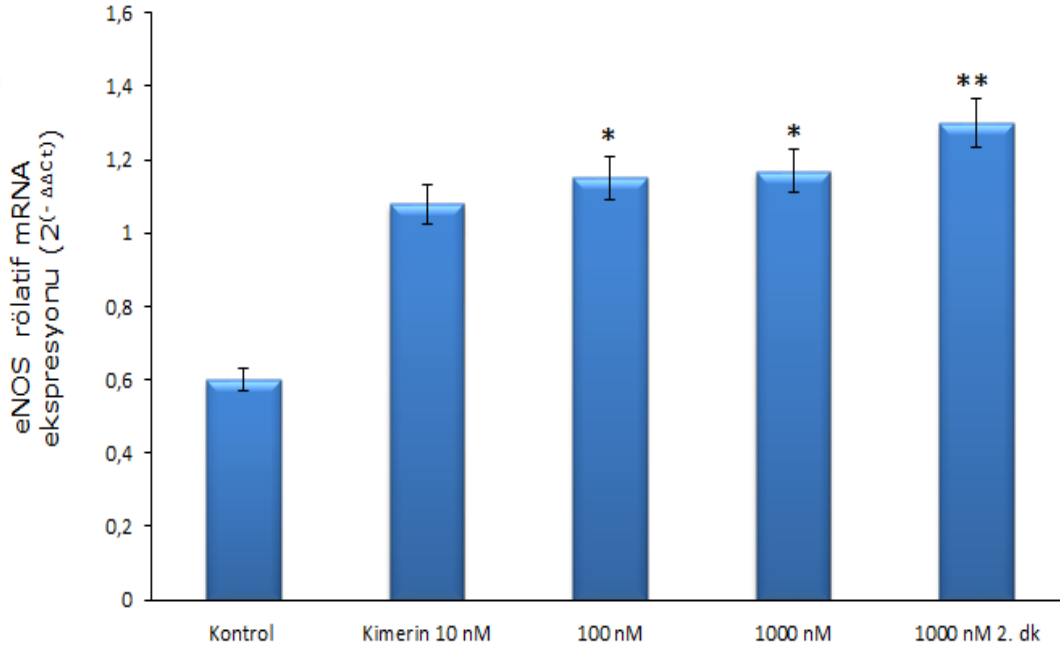
Şekil 4.23 Kimerin verilen kalplerde  $\beta 1$ -AR mRNA değerlerinde değişimler.



Şekil 4.24 Kimerin verilen kalplerde  $\beta 2$ -AR mRNA değerlerinde değişimler.

#### 4.4.4. eNOS mRNA düzeyleri

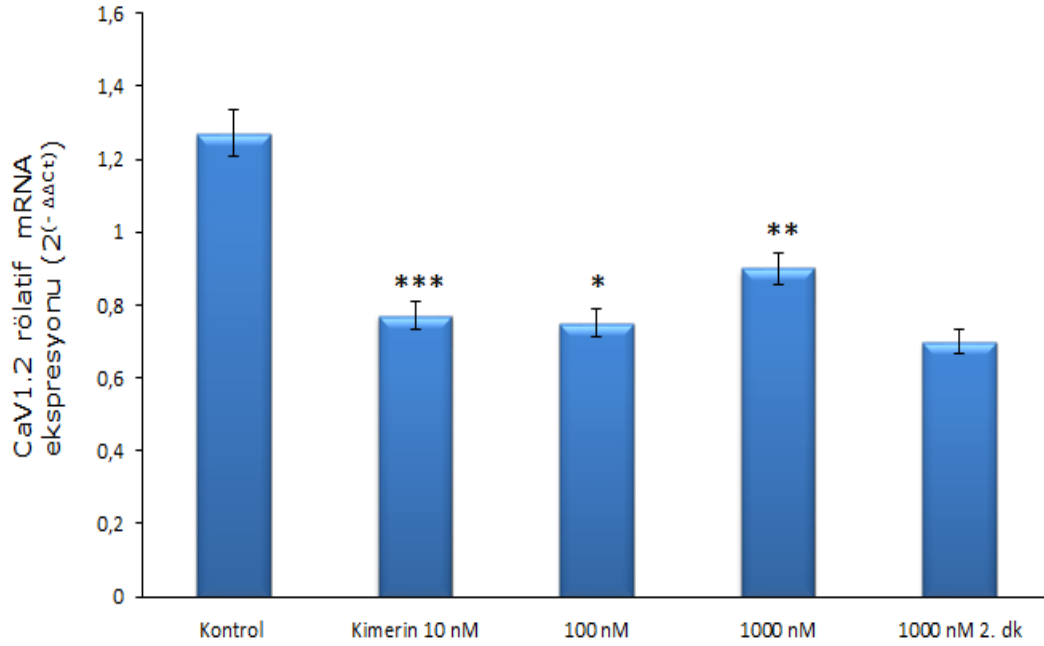
Şekil 4.25’de görüldüğü gibi kimerin 10 nM doz grubu hariç olmak üzere diğer kimerin gruplarında kalplerdeki eNOS mRNA düzeyleri kontrole göre anlamlı artış göstermiştir. 100, 1000 nM kimerin gruplarının ve 1000 nM 2. dakikada dokusu alınan kimerin grubunun eNOS mRNA miktarları kontrol değerlerinin üstüne çıkmış olup  $p<0.05$  ve  $p<0.01$  istatistiksel düzeyinde anlamlı bir artış bulunmuştur.



Şekil 4.25 Kimerin verilen kalplerde eNOS mRNA değerlerinde değişimler. \*  $p<0.05$  ve \*\*  $p<0.01$  kontrolden anlamlı farklı.

#### 4.4.5. CaV1.2 mRNA düzeyleri

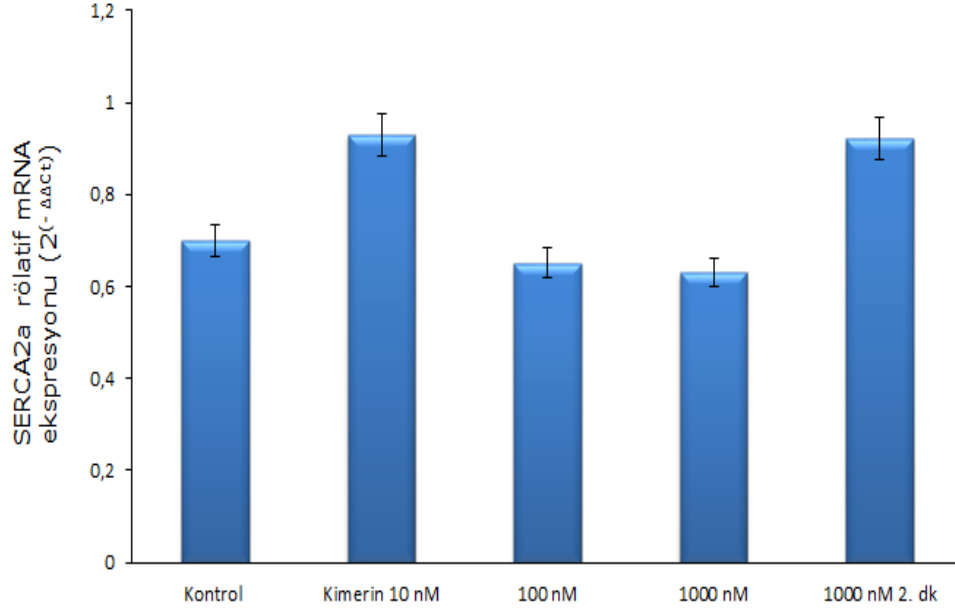
Omentin gruplarında olduğu gibi CaV1.2 geninin mRNA düzeyleri kimerin verilen kalplerde de anlamlı olarak azalmıştır. Kimerin (10, 100 ve 1000 nM) verilen kalplerde CaV1.2 mRNA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır ( $p<0.001$ ,  $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ). Bununla birlikte kimerin 1000 nM verilip 2. dakikada dokusu alınan kalplerde, CaV1.2 geni mRNA miktarlarının kontrol grubuna göre azalan değerlerde olmasına rağmen istatistiksel açıdan fark bulunamamıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 Kimerin verilen kalplerde CaV1.2 mRNA değerlerinde değişimler. \* p<0.05, \*\* p<0.01 ve \*\*\* p<0.001 kontrolden anlamlı farklı.

#### 4.4.6. SERCA2a mRNA düzeyleri

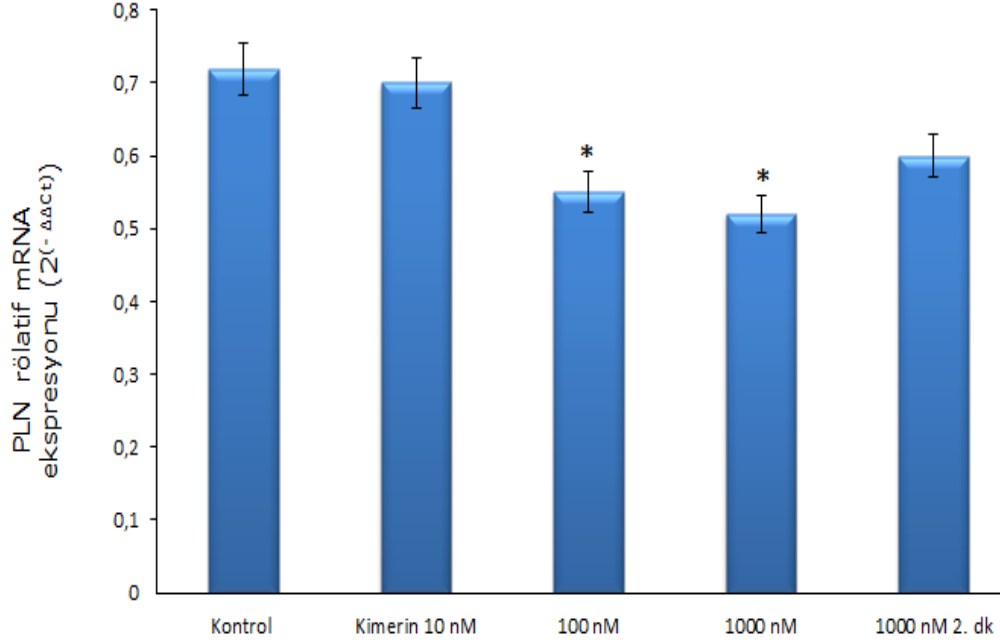
Şekil 4.27’de görüldüğü gibi kimerin verilen grupların verdikleri yanıtlar arasında SERCA2a mRNA düzeyleri açısından istatistiksel olarak bir değişme saptanamamıştır.



Şekil 4.27 Kimerin verilen kalplerde *SERCA2a* mRNA değerlerinde değişimler.

#### 4.4.7. *PLN* mRNA düzeyleri

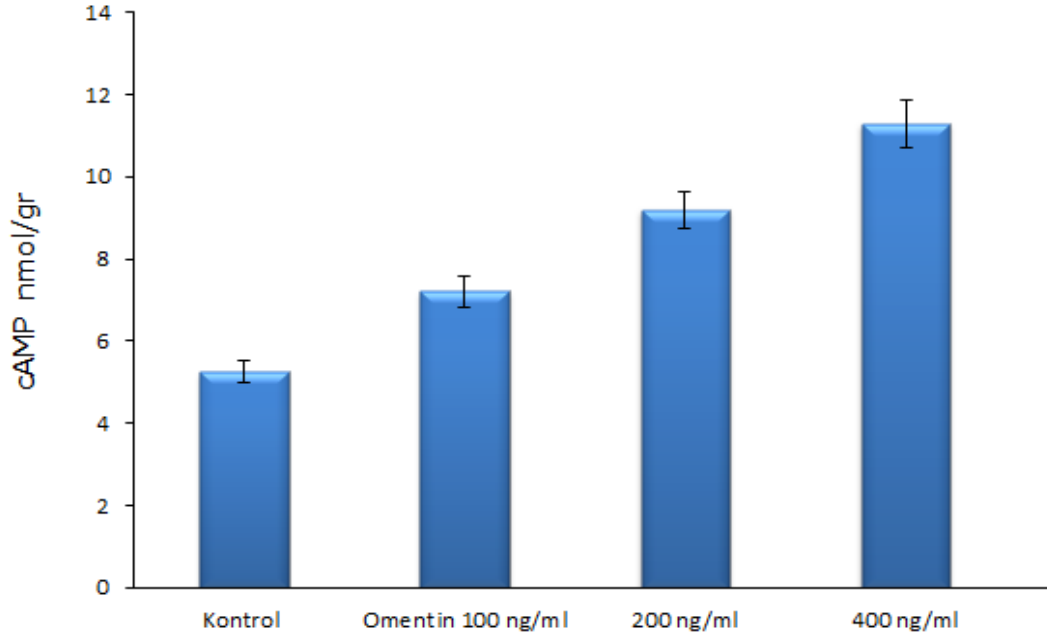
Kalplere 100 ve 1000 nM kimerin verilmesinin ardından 30 dakikalık gözlem periyodunun bitiminde alınan doku örneklerinden çalışılan *PLN* mRNA miktarı kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak küçük fakat anlamlı bir azalma ile kontrol değerlerinin altına inmiştir ( $p < 0.05$ ). 10 ve 1000 nM 2. dakika kimerin gruplarında anlamlı değişiklik bulunmamıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 Kimerin verilen kalplerde *PLN* mRNA değerlerinde değişimler. \*  $p < 0.05$  kontrolden anlamlı farklı.

#### 4.5. Omentinin cAMP ve cGMP yapımı üzerindeki etkisi

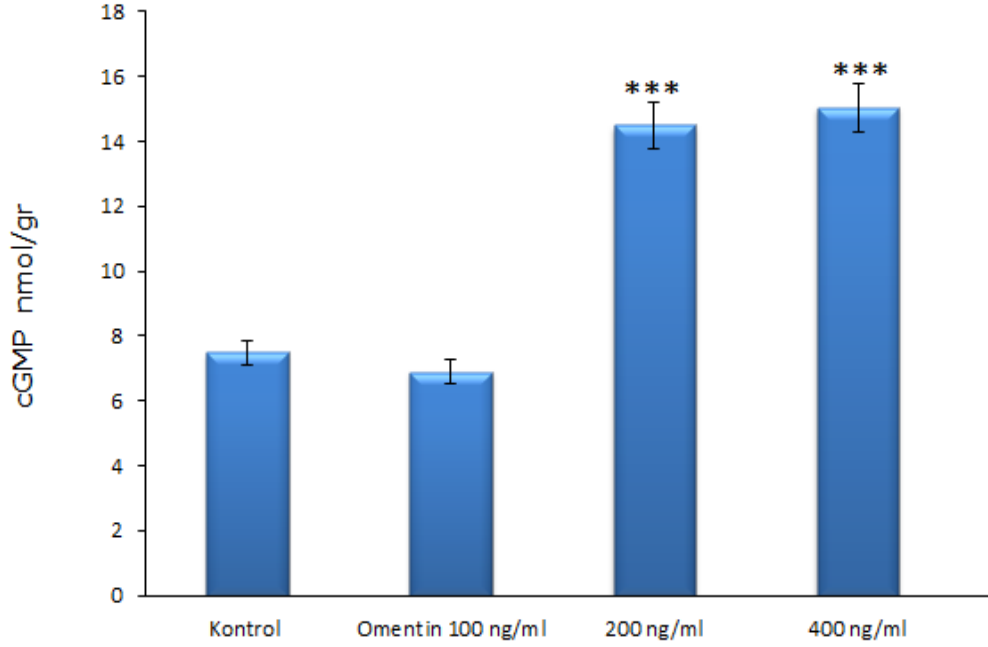
Omentin verilen kalplerden alınan doku örneklerinden ELISA tekniği ile ölçülen cAMP miktarlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bununla birlikte en yüksek omentin dozunda istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da, cAMP miktarlarının kontrol grubuna göre yaklaşık iki kat kadar arttığı bulunmuştur (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 Omentin verilen kalplerde cAMP miktarında değişimler. Değerler nmol/gr olarak ifade edilmiş, kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı 7'dir.

Omentinin 100 ng/ml dozunda cGMP miktarı kontrol gruba göre anlamlı değişiklik göstermemiştir. Halbuki 200 ve 400 ng/ml dozlarında omentin verilen kalplerde, cGMP miktarlarının kontrol değerine göre ileri düzeyde anlamlı olarak ( $p < 0.001$ ) arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.30).

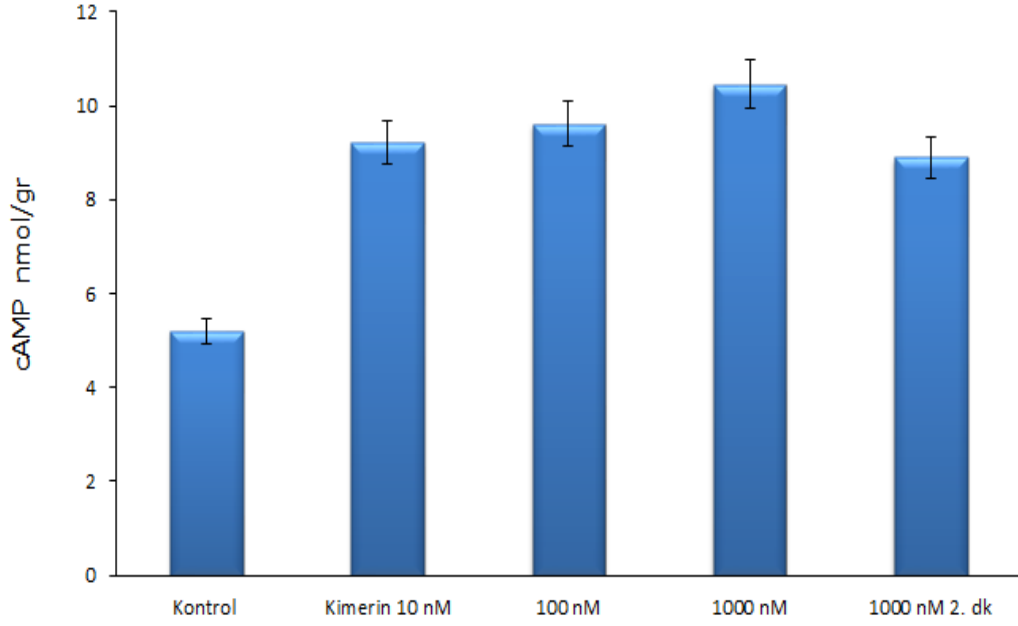




Şekil 4.30 Omentin verilen kalplerde cGMP miktarında değişimler. Değerler nmol/gr olarak ifade edilmiş, kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı 7'dir. \*\*\* p<0.001 kontrolden anlamlı farklı.

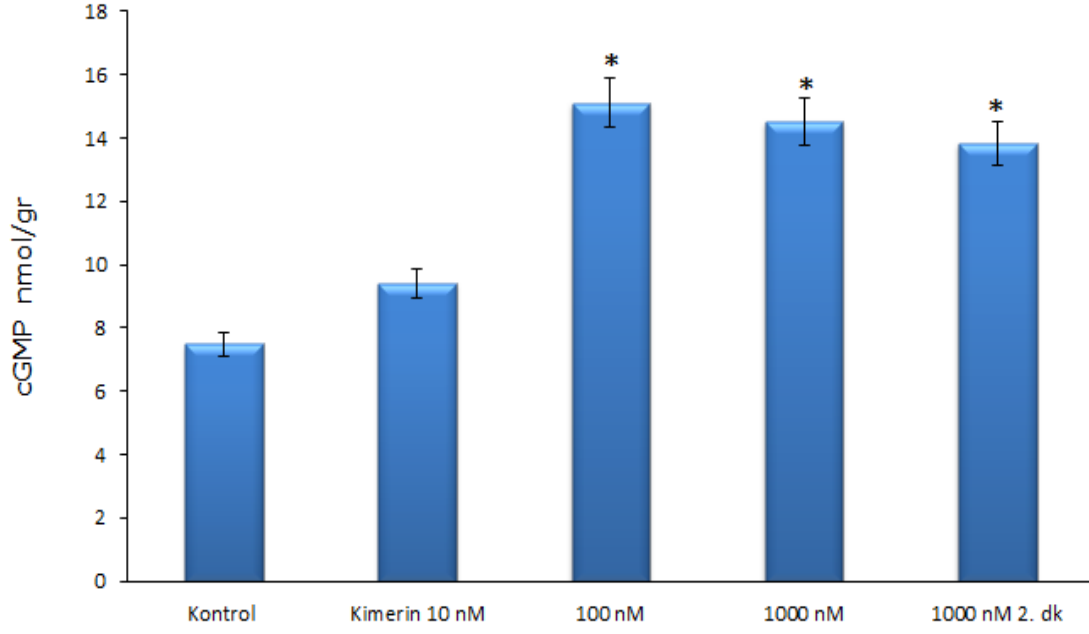
#### 4.6. Kimerinin cAMP ve cGMP yapımı üzerindeki etkisi

Kontrol grubundaki değerler ile karşılaştırıldığında, kimerin verilen kalplerden alınan doku örneklerinden ölçülen cAMP miktarlarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ancak omentin gruplarına benzer şekilde istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da, kontrol grubuna göre cAMP miktarlarının yaklaşık iki kat kadar arttığı bulunmuştur (Şekil 4.31).



Şekil 4.31 Kimerin verilen kalplerde cAMP miktarında değişimler. Değerler nmol/gr olarak ifade edilmiş, kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı 7'dir.

Şekil 4.32'de görüldüğü gibi cGMP miktarı 10 nM kimerin grubunda kontrole göre bir artma eğilimi göstermiştir ancak bu artma istatistiksel bakımdan anlamlılığa ulaşmamıştır. Kimerin 100, 1000 nM doz grupları ile kimerin 1000 nM 2. dakika grubunda cGMP miktarlarında  $p < 0.05$  düzeyinde anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.32 Kimerin verilen kalplerde cGMP miktarında değişimler. Değerler nmol/gr olarak ifade edilmiş, kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı 7'dir. \*  $p < 0.05$  kontrolden anlamlı farklı.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda omentin (100, 200 ve 400 ng/ml) ve kimerin (10, 100 ve 1000 nM) izole perfüze sıçan kalplerinde doza bağlı şekilde SVGB ve +dP/dtmax değerlerini anlamlı olarak azalttı. Omentin ve kimerin uygulanan kalplerde *CaV1.2* gen ekspresyonu da kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde azaldı. *CaV1.2* gen ekspresyonunun azalması kalp kasında hücre içinde  $Ca^{+2}$ 'nin azalmasına ve böylece negatif inotropik etkiye neden olur. PI3K/Akt sinyal yolunun aktivasyonu ile Akt'ın Ser473 ve Thr308 pozisyonunda fosforilasyonu gerçekleşir (Walther vd., 2014). Fosforile olan Akt ise, Ser1177 pozisyonundan eNOS fosforilasyonunu sağlayarak NO yapımını artırır (Walther vd., 2014; Maruyama vd., 2012; Burger vd., 2006). Nitrik oksit solubl guanil siklazı aktive ederek cGMP oluşumuna yol açar. Bir sonraki aktivasyon cGMP bağımlı protein kinaz G (PKG)'dir. Protein kinaz G *CaV1.2* mRNA miktarını ve bunun sonucunda  $Ca^{+2}$  kanal akımını azaltarak kalp kası hücrelerine giren  $Ca^{+2}$  miktarını düşürür (Manoury, Montiel & Balligand, 2012; Peng, Lu, Lei & Feng, 2003). Böylece hücreye giren  $Ca^{+2}$ 'nin azalması kalpte negatif inotropik etki ile sonuçlanır. Troponin I'nın fosforilasyonundan sonra PKG ayrıca kalp kası hücrelerinde miyofilamentleri  $Ca^{+2}$ 'ya duyarsızlaştırarak kalbin kontraktilesi üzerinde negatif inotropik etkiler gösterir (Manoury, Montiel & Balligand, 2012).

Çalışmamızda her ne kadar ortamdaki NO miktarı ölçülemedi olsa da, omentinin ve kimerinin izole sıçan kalplerine uygulanması sonucunda eNOS mRNA miktarları kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Ayrıca eNOS gen ekspresyonunun artışı ile birlikte hücrede cGMP miktarları da artmıştır. Bu bulgular da omentin ve kimerinin negatif inotropik etkilerine NO'nun aracılık yaptığını desteklemektedir. cGMP, cAMP-PKA sinyal yolu ile PDE'lerin düzenlenmesine de katılabilir. cGMP, PDE2'yi indüklerken PDE3'ü inhibe eder. Düşük konsantrasyonlardaki NO, PDE3'ün inhibisyonu ile ortamdaki cAMP düzeyinin artmasına böylece cAMP-PKA sinyal yolu ile LTCC akımının artmasına neden olur. Başka bir deyişle düşük konsantrasyonlardaki NO, cAMP-PKA hücre içi sinyaliyle LTCC fosforilasyonunu gerçekleştirerek pozitif inotropik etkilere yol açar (Walther vd., 2014). Yüksek dozlarda NO'nun ise PKG aracılığı ile LTCC aktivasyonunu inhibe ederek negatif inotropik etkiler gösterdiği bulunmuştur. Son yapılan çalışmalara göre NO ile ilgili genel fikir NO'nun miyokardiyal fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin bifazik olduğu yönündedir (Massion vd., 2003; Seddon vd., 2007; Van de Sandt vd., 2013).

Değişik çalışmalarda endotel hücrelerine omentin verilmesi sonucunda PI3K/Akt sinyal yolu ile NO üretiminin artırıldığı ve PI3K sinyal yolunun inhibitörü olan LY294002 ile NO salınımının ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir (Yamawaki vd., 2010; Yamawaki vd., 2011b; Kazama vd., 2013).

Çalışmamızda da omentinin kalp üzerindeki negatif inotropik etkisi LY294002 ile antagonize edilebilmiştir. Yani omentinin en yüksek dozu olan 400 ng/ml ile LY294002'nin birlikte kullanılması, omentinin tek başına SGVB ve  $+dP/dt_{max}$  değerlerinde oluşturduğu azalmaları engellenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda omentinin kalp üzerinde oluşturduğu negatif inotropik etkisinin PI3K sinyal yolu aracılıklı olduğu ve NO'nun bu etkide işe karıştığı söylenebilir. Omentin PI3K/Akt sinyal yolu üzerinden Akt'ı fosforile ederek, NO yapımını arttırır. (Maruyama vd., 2012; Kataoka vd., 2014). Ancak bu çalışmada omentinin negatif inotropik etkilerinin NO sentaz inhibitörü olan L-NAME ile antagonize edilip edilmediği araştırılmamıştır. Kimerin gruplarında oluşan negatif inotropik etkiler ise L-NAME ile antagonize edilebilmiştir. Bu bulgu da kimerinin kalp üzerinde neden olduğu negatif inotropik etkilere NO'nun aracılık yapabileceğini göstermektedir.

Kalpte yapılan NO, eksitasyon kontraksiyon bağlantısının düzenlenmesinde işe karışır. Endojen kaynaklı eNOS aktivasyonunun köpeklerde ventriküler aritmilere karşı direnci arttırarak aritmilerde koruyucu olabileceği bildirilmiştir (Massion vd., 2003). eNOS geni çıkarılmış farelerde yaşlanma ile birlikte hipertrofi ve hipertansiyon geliştiği görülmüştür. Bundan başka eNOS geni eksik (-/-) olan farelerde miyokard infarktüsü ile birlikte sistolik ve diyastolik fonksiyonların bozulduğu, kapiller yoğunluğun azaldığı belirlenmiştir (Manoury vd., 2012). Massion ve arkadaşları (Massion vd., 2003) ise hipertrofik kardiyomiyopatide ve kalp yetmezliğinin geç döneminde miyositlerdeki eNOS mRNA miktarlarının azaldığını bulmuşlardır. İskemi ve reperfüzyonun erken döneminde kalpteki eNOS miktarlarında artış görülmektedir (Van de Sandt vd., 2013) ve NO artışı kalbi iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı çeşitli mekanizmalarla korumaktadır (Balligand, Feron & Dessy, 2009). NO aktivitesinin veya sentezinin bozulmasıyla oluşan hipertansiyon, aterosklerozis ve kalp yetmezliğiyle ilişkili kardiyovasküler hastalıklarda NO oluşumunun arttırılması endotel fonksiyonlarının iyileştirilmesine yönelik ilaçların tasarımı için yeni bir terapötik hedef olarak düşünülebilir (Fulton vd., 1999).

PI3K sinyal yolunun bir alt birimi PI3Ka olup PI3Ka sinyalinin azalması kalp kası hücrelerinde bulunan LTCC sayısını azaltır ve azalan LTCC akımı kontraktilitede azalma ile sonuçlanır (Zhongju, Ballou, Jiang, Cohen & Lin, 2013). Başka bir deyişle, PI3Ka kalp kasılmasının pozitif düzenlenmesine katılmaktadır. Çünkü yetişkin farelerde artan *PI3Ka* ekspresyonu ile in vitro kontraktilite de arttırmıştır (Yano vd., 2008). Çalışmamızda hem omentin hem de kimerin gruplarında *PI3Ka* gen ekspresyon düzeylerinde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. PI3Ka ile LTCC akımı arasındaki pozitif ilişki göz önünde bulundurulduğunda omentin ve kimerin verilen gruplardaki *CaV1.2*

geninin mRNA miktarındaki anlamlı azalmanın PI3Kα ile bağlantılı olmadığı sonucuna varılmaktadır.

PI3K sinyal yolunun bir diğer alt birimi PI3Kγ'dır. Bu alt birim GPCR'ler ile aktive olur ve kalp kasılmasının düzenlenmesinde rol oynar. PI3Kγ'nın katalitik alt ünitesi p110γ olup cAMP miktarını düzenler (Ghigo vd., 2011; Oudit vd., 2003). p110γ cAMP'yi yıkan PDE'leri aktive eder ve aktive olan PDE'ler cAMP'nin yıkılmasına neden olur. Bu durum hücre içindeki cAMP miktarını azaltarak kontraktilite üzerinde negatif etkiye neden olur (Kerfant vd., 2005; Ghigo vd., 2011; Oudit vd., 2003). Çalışmamızda omentin ve kimerin uygulanan gruplarda *PI3Kγ* gen ekspresyon düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı azalmalar bulunmuştur. *PI3Kγ* gen ekspresyonu ile birlikte değerlendirmemiz gereken cAMP miktarlarının ise istatistiksel olarak anlamlı artmadığı ancak kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında iki kat gibi sayısal bir artış gösterdiği dikkat çekmektedir. Literatürde *PI3Kγ* gen ekspresyon düzeyleri azaldığında hücre içi cAMP miktarlarının artış gösterdiği belirlenmiştir (Crackower vd., 2002; Kerfant vd., 2006; Ghigo vd., 2011). Çünkü *PI3Kγ* geni kapatılmış farelerde azalmış fosfodiesteraz aktivitesi cAMP miktarında artmaya neden olmuştur (Rose, Kabir & Backx, 2007). *PI3Kγ* düzeyinde azalma ile birlikte cAMP miktarında anlamlı artma olmaması omentinin ve kimerinin gözlediğimiz negatif inotropik etkisi ile uyumludur.

Çalışmamızda omentinin ve kimerinin kalp kasılması üzerindeki moleküler düzeyde etkilerini araştırmak amacıyla  $\beta 1$ -AR ve  $\beta 2$ -AR gen ekspresyonları çalışılmıştır. Ancak omentin ve kimerin verilen gruplar ile kontrol grupları kıyaslandığında her iki gen ekspresyonu açısından da istatistiksel düzeyde anlamlı bir farklılığa ulaşamamıştır. Ayrıca omentin ve kimerin verilen gruplar ile kontrol grupları karşılaştırıldığında kalp kasılma kuvvetinde azalma bulunmuş fakat dakikada kalp atım sayısında istatistiksel açıdan bir fark gözlenmemiştir. Bu bulgular omentinin ve kimerinin kalp kasılma kuvvetini azaltıcı etkisine  $\beta 1$ -AR ve  $\beta 2$ -AR'lerin aracılık etmediğini düşündürmektedir.  $\beta$ -AR'lerin uyarılması sonucunda hücre içindeki cAMP düzeyinin arttığı ve bunun sonucunda bulgularımızın aksine kalbin kasılma kuvvetinin arttığı bilinmektedir (George & Pitt, 2006). Ancak çalışmamızda cAMP düzeyinde anlamlı bir artma yoktu. Omentin ve kimerin verilen gruplarda cAMP miktarlarındaki istatistiksel olarak anlamlı olmayan bu artış *PI3Kγ* gen ekspresyon düzeyindeki azalma nedeni ile olabilir. Çünkü *PI3Kγ* gen ekspresyon düzeyinde azalma cAMP artışına yol açar (Kerfant vd., 2006).

Çalışmamızda omentin ve kimerin gruplarında sol ventrikülün kasılma indeksi olarak değerlendirdiğimiz SGVB ve  $+dP/dt_{max}$  değerlerinde görülen azalmaya rağmen *SERCA2a* mRNA miktarlarında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Bu bulgular kasılmada gözlediğimiz azalmada *SERCA2a* gen ekspresyonunun işe karışmadığı izlenimini vermektedir. Aşırı *SERCA2a* gen

ekspresyonunda SR'a  $Ca^{+2}$  alımının artışıyla gevşemenin hızlandığı ve böylece kontraktilitenin arttığı görülmüştür (Kranias & Hajjar, 2012; Vetter vd., 2002). Tam tersi azalmış *SERCA2a* ekspresyonu kontraktilite bozukluklarına neden olmaktadır (Penitentea vd., 2014). Çünkü *SERCA2a* mRNA düzeyinde azalma hücre içinde  $Ca^{+2}$  homeostasisinin bozulması ve kalp kasılmasının azalması ile sonuçlanmaktadır (Periasamy vd., 1999). Ayrıca azalmış *SERCA2a* protein düzeyi ve *SERCA2a* aktivitesi kalp kası lifinin bozulmuş gevşemesi ile ilişkilidir (Penitentea vd., 2014). Çünkü *SERCA2a* ekspresyonunun azalması sitozoldeki  $Ca^{+2}$ 'nin SR'a geri alımını azaltır. Böylece sitozoldeki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu artar ve hücre gevşemesi bozulur (Penitentea vd., 2014). Kalp kası lifinde bozulan gevşeme ile ventriküllerin hem gevşeme zamanı hem de süresi uzar (Cain vd., 1998). Omentinin ve kimerinin negatif inotropik etkisine karşılık *SERCA2a* gen ekspresyonunda azalma görülmemesinin açıklanması için başka çalışmalara gerek vardır.

Omentin verilen kalplerde *PLN* gen ekspresyon düzeylerinde de istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Öte yandan kimerin 100 ve 1000 nM dozu uygulanan kalplerde *PLN* mRNA miktarlarında kontrollere göre istatistiksel olarak küçük fakat anlamlı bir azalma görülmüştür. *SERCA2a* aktivitesi *PLN* fosforilasyonu ile düzenlenir (Park & Oh, 2013). Fosfolambanın fosforilasyonu *SERCA* aktivitesinin artmasına neden olur (MacLennan & Kranias, 2003). *Fosfolamban* gen kayıplarında *SERCA2a*'nın  $Ca^{+2}$  afinitesi,  $Ca^{+2}$ 'nin SR'ye alınan miktarı ve  $Ca^{+2}$ 'nin SR'den salınması artar. Bunların sonucunda kalp hiperdinamik duruma geçer (Vangheluwe vd., 2006). Tam tersine *PLN*'nin aşırı ekspresyonu ile *SERCA2a*'nın  $Ca^{+2}$  afinitesi azalırken kalp kası hücrelerinin kontraktilitesi ve gevşemesi azalır (Vangheluwe vd., 2006).

Omentinin tüm dozlarında kalpteki kasılma gücü azalmış olmasına rağmen azalan kasılma gücü ile birlikte koroner akım miktarlarında belirgin bir değişme gözlenmemiştir. Koroner akımda bir azalma eğilimi görülmüş fakat bu azalma anlamlı bulunmamıştır. Diğer taraftan Yamawaki ve arkadaşları (Yamawaki vd., 2010) izole sıçan aortunda ve mezenterik arterinde noradrenalinin oluşturduğu kontraksiyon yanıtlarını omentin ile inhibe etmişlerdir. Ayrıca omentin uygulanmasının ardından endotelden NO salınımına bağlı olarak damar vazodilatasyonunun indüklendiğini gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılar 1-300 ng/ml omentin dozlarını uygulamışlardır. Çalışmamızdaki omentin dozları ise 100-200-400 ng/ml olup iki çalışmadaki dozlar birbirine benzerdir. Koroner perfüzyon basıncı koroner vasküler tonüsün iyi bir indeksi olarak bilinir. Ancak çalışmamızda koroner perfüzyon basıncı yerine koroner akım miktarları ölçülebilmektedir. Her iki çalışmada farklı sonuçların alınması yöntem farklılığına bağlı olabilir.

Çalışmamızda kimerinin 1000 nM doz grubunda, bu peptidin verilmesinin 2. dakikasında koroner akım miktarları yaklaşık % 30-40 oranında azalmış ve bu azalma anlamlı bulunmuştur. Ayrıca kimerinin uygulanması süresince koroner akım değerleri kontrole doğru değişme göstermiş fakat kontrol değerlerinin altında kalmıştır. Lobato ve arkadaşları (Lobato vd., 2012) sıçan aortunda yaptıkları çalışmada kimerinin  $\alpha$ 1-adrenerjik agonisti olan fenilefrin'in ve endotelin-1'in vazokonstriksiyon yanıtlarını arttırdığını göstermişlerdir (Lobato vd., 2012). Watts ve arkadaşları da (Watts vd., 2013) obez ve hipertansif sıçanlardan alınan izole torasik aort ile obez insanlardan alınan izole mezenterik arterler üzerinde 1000 nM dozundaki kimerinin kasılmaya neden olduğunu bulmuşlardır. Watts ve arkadaşları (Watts vd., 2013) çalışmalarında NO sentaz inhibitörü olan N- $\omega$ -nitro-L-arjinin kimerinin neden olduğu kasılma yanıtını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda koroner akımda oluşan azalmanın kalbin kasılma gücünün azalmasından ve kimerinin vazokonstriktör etkisinden kaynaklandığı söylenebilir. Ancak azalan koroner akım miktarlarının azalmış olan kasılma gücüne bağlı olarak mı yoksa kimerinin vazokonstriksiyon etkisinden mi kaynaklandığını açıklamak için başka çalışmalara gerek vardır.

MAPamp, MAP'ın ilk fazında (faz 0) Na<sup>+</sup> kanallarından Na<sup>+</sup> iyonlarının hücre içine difüzyonuna bağlıdır (Jing-Sheng, 2002). Çalışmamızda omentin ve kimerin MAPamp'ü değerlerini anlamlı değiştirmediler. Bu bulgumuz omentin ve kimerin proteinlerinin faz 0 sırasında Na<sup>+</sup> kanal akımını değiştirmedikleri izlenimini vermektedir. Öte yandan, MAP<sub>90</sub> AP'nin repolarizasyon fazı hakkında bilgi verir (Olejnickova vd., 2015) ve dakikadaki kalp atım sayısı ile ters orantılıdır (Wang, Chen, Liu, Xiao & Wang, 2014). MAP<sub>90</sub> hem omentin hem de kimerin gruplarında kontrol gruplarına göre istatistiksel düzeyde anlamlı değişme göstermemiştir. MAP<sub>90</sub> parametresinde anlamlı bir değişme olmaması çalışmamızdaki  $\beta$ 1-2-AR'lerin gen ekspresyon düzeylerinde ve sonuç olarak da dakikadaki kalp atım sayısında anlamlı düzeyde bir değişiklik olmamasına bağlı olabilir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız omentinin ve kimerinin izole sıçan kalplerinde kardiyovasküler fonksiyonlara ve gen ekspresyonlarına etkisini araştıran ilk çalışma olması nedeni ile özgündür. Bulgularımız omentin ve kimerin proteinlerinin izole perfüze sıçan kalplerinde negatif inotropik etki yaptığını halbuki dakikada kalp atım sayısını, MAPamp ve MAP90'ı değiştirmedeğini göstermiştir. Omentin koroner akımı etkilememiş kimerin ise yüksek dozda koroner akımı azaltmıştır.

Omentin ve kimerin *eNOS* gen ekspresyonunu ve yüksek dozlarda doku cGMP düzeyini arttırmıştır. Bu nedenle negatif inotropik etkiye *eNOS* gen ekspresyonunda artma ile NO oluşumu ve NO ile aktive edilen cGMP aracılık edebilir. LY294002, omentinin ve L-NAME kimerinin negatif inotropik etkilerini ortadan kaldırmıştır. Bu bulgular da omentin ve kimerinin negatif inotropik etkisinde NO'nun işe karışabileceğini göstermektedir. Omentinin ve kimerinin *CaV1.2* gen ekspresyonunu azaltması negatif inotropik etkiye katkı yapabilir. Omentin ve kimerin *PI3Ka* gen ekspresyonunu etkilemediğinden her iki adipositokinin *CaV1.2* geninin mRNA miktarını azaltmasının *PI3Ka* ile bağlantılı olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda omentin ve kimerin *PI3Ky* gen ekspresyonunu azaltmış fakat doku cAMP miktarlarını değiştirmemiştir. Bu bulgular her iki adipositokinin kalplerin kasılma gücünü azaltması ile uyumludur. Omentin ve kimerin  *$\beta$ 1-2-AR* ve *SERCA2a* gen ekspresyonunu değiştirmemiştir. Bu bulgular kasılmada azalmada  *$\beta$ 1-2 AR* ve *SERCA2a* gen ekspresyonunun rol oynamadığı izlenimini vermektedir. Kimerin *PLN* gen ekspresyonunu azalttığı halde omentin etkilememiştir. Bu adipositokinlerin *PLN* gen ekspresyonuna etkileri arasındaki farklılıkları açıklamak için başka çalışmalar gereklidir. Omentinin ve kimerinin kardiyovasküler etkileri ve bunların gen ekspresyonları ile ilişkisi bundan sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abel, D. (2004). Measurement of Left Ventricular Performance in Langendorff Perfused Mouse Hearts. *Animal Models of Diabetic Complications Consortium*, (1), 1-2.
- Acierno, R., Gattuso, A., Guerrieri, A., Mannarino, C., Amelio, D., Tota, B. (2008). Nitric oxide modulates the frog heart ventricle morphodynamics. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151:51-60.
- Alexopoulos, N., Katritsis, D., Raggi, P. (2014). Visceral adipose tissue as a source of inflammation and promoter of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 233, 104-112.
- Alloatti, G., Marcantoni, A., Levi, R., Gallo, M.P., Del Sorbo, L., Patrucco, E., Barberis, L., Malan, D., Azzolino, O., Wymann, M., Hirsch, E., Montrucchio, G. (2005). Phosphoinositide 3-kinase c controls autonomic regulation of the mouse heart through Gi-independent downregulation of cAMP level. *FEBS Letters*, 579(1), 133-40.
- Antzelevitch, C., Moe, G.K. (1981). Electrotonically mediated delayed conduction and reentry in relation to "slow responses" in mammalian ventricular conducting tissue. *Circ Res*. 49(5):1129-39.
- Auguet, T., Quintero, Y., Riesco, D., Morancho, B., Terra, X., Crescenti, A., Broch, M., Aguilar, C., Olona, M., Porrás, J.A., Hernandez, M., Sabench, F., del Castillo, D., Richart, C. (2011). New adipokines vaspin and omentin. Circulating levels and gene expression in adipose tissue from morbidly obese women. *BMC Med Genet.*, 28,12(1), 60.
- Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L., Vogt, P.K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*, 2005;5 (12), 921-929.
- Balligand, J.L., Feron, O., Dessy, C., (2009). eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues. *Physiol Rev.*, 89: 481-534, 2009.
- Barrett, K.E., Barman, S.M., Brooks, H.L. (2010). Ganong's Review of Medical Physiology. (23rd ed.). New York: McGraw-Hill Medical.

## **"KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"**

- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415 (6868), 198-205.
- Bjorndal, B., Burri L., Staalesen, V., Skorve, J., Berge, RK. (2011). Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J. Obes.*, 490650-15.
- Blaudszun, G., Licker, M.J., Morel, D.R. (2013). Preload-adjusted left ventricular dP/dtmax: a sensitive, continuous, load in dependent contractility index. *Exp Physiol.*, 98(10), 1446-56.
- Boron, W.F., Boulpaep, E.L. (2012). *Medical Physiology*, 2e Updated Edition with Student Consult Online Access. (2nd updated ed.). London: Elsevier Health Sciences.
- Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., Jowett, Collier G., Walder, K., Segal, D. (2007). Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*, 148(10), 4687-4694.
- Bozaoglu, K., J.E. Curran, C.J. Stocker, M.S. Zaibi, D. Segal, N. Konstantopoulos, S., Morrison, M. Carless, T.D. Dyer, S.A. Cole, H.H. Goring, E.K. Moses, K. Walder, M.A. Cawthorne, J. Blangero, J.B. Jowett. (2010). Chemerin, a novel adipokine in theregulation of angiogenesis. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 95, 2476-2485.
- Briana, D.D., Boutsikou, M., Baka, S., Gourgiotis, D., Marmarinos, A., Liosi, S., Hassiakos, D., Malamitsi-Puchner, A. (2010). Omentin-1 and vaspin are present in the fetus and neonate, and perinatal concentrations are similar in normal and growth-restricted pregnancies. *Metabolism*, 60(4), 486-490.
- Brodde, O.E., Michel, M.C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.*, 51: 651-690.
- Burger, D., Lei, M., Geoghegan-Morphet, N., Lu, X., Xenocostas, A., Feng, Q. (2006). Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res.*, 72(1):51-9.

## "KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"

- Cain, B.S., Meldrum, D.R., Joo, K.S., Wang, J.F., Meng, X., Cleveland, J.C. J.r., Banerjee, A., Harken, A.H. (1998). Human SERCA2a levels correlate inversely with age in senescent human myocardium. *J Am Coll Cardiol.*, 32(2), 458-467.
- Carol DG. General Biology Lecture. Tissues, Organs, and Organ Systems.(cited 2009 Jun 4) <http://www.carolguze.com/text/102-1tissueorganssystems.shtml>.
- Chakaroun, R., Raschpichler, M., Kloting, N., Oberbach, A., Flehmig, G., Kern, M., Schon, M.R., Shang, E., Lohmann, T., Dressler, M., Fasshauer, M., Stumvoll, M., Bluher, M. (2012). Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Metabolism*, 61(5), 706-14.
- Cherian, S., Lopaschuk, G.D., Carvalho, E. (2012). Cellular cross-talk between epicardial adipose tissue and myocardium in relation to the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am j physiol Endocrinol Metab.*, 303, E937-E949.
- Chilian, W.M. (1997). Coronary microcirculation in health and disease. Summary of NHLBI workshop. *Circulation*, 95(2), 522-8.
- Chu, S.H., Lee, M.K., Ahn, K.Y., Im, J.A., Park, M.S., Lee, D.C., Jeon, J.Y., Lee, J.W. (2012). Chemerin and adiponectin contribute reciprocally to metabolic syndrome. *Plos One*, 7(4):e34710.
- Coelho, M., Oliveira, T., Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci.*, 9, 2, 191-200.
- Crackower, M.A., Oudit, G.Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H.Y., Rybin, V.O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A.J., Benovic, J.L., Kahn, C.R., Izumo, S., Steinberg, S.F., Wymann, M.P., Backx, P.H., Penninger, J.M. (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*, 110 (6), 737-749.
- Darcy, P. (Ed.) (2004). The massage connection anatomy and physiology. (2th Ed.). Philadelphia, US: Lippincott Williams & Wilkins.

## **"KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"**

- De Souza Batista, C.M., Yang, R.Z., Lee, M.J., Glynn, N.M., Yu, D.Z., Pray, J., Ndubuizu, K. Patil, S., Schwartz, A., Kligman, M., Fried, S.K., Gong, D.W., Shuldiner, A.R., Pollin, T.I., McLenithan, J.C. (2007). Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes*, 56(6), 1655-61.
- Döring, H.J. (1990). The isolated perfused heart according to Langendorff. *BVM Biomesstechnik*, 39(6), 481-504.
- Du, X.Y., Leung, L.L. (2009a) Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity. *Acta Biochim Biophys Sin.*, 41(12):973-9.
- Du, X.Y., Zabel, B.A., Myles, T., Allen, S.J., Handel, T.M., Lee, P.P., Butcher, E.C., Leung, L.L. (2009b) Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. *J Biol Chem.*, 284(2):751-8.
- El-Mesallamy, H.O., El-Derany, M.O., Hamdy, N.M. (2011). Serum omentin-1 and chemerin levels are interrelated in patients with Type 2 diabetes mellitus with or without ischaemic heart disease. *Diabet Med.*, 28(10):1194-200.
- Ernst, M.C., Sinal, C.J. (2010). Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol Metab.*, 21(11), 660-7.
- Ernst, M.C., Haidl, I. D., Zuniga, L. A., Dranse, H. J., Rourke, J. L., et al.(2012). Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance. *Endocrinology* 153: 672-682.
- Eto, H., Suga, H., Matsumoto, D., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Araki, J., Yoshimura, K. (2009). Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* ., 124(4), 1087-97.
- Fabiato A. (1985). Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *Gen Physiol.*, 85(2):247-89.

## **“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”**

- Fain, J.N., Sacks, H.S., Buehrer, B., Bahouth, S.W., Garrett, E., Wolf, R.Y., Carter, R.A., Tichansky, D.S. & Madan, A.K. (2008). Identification of omentin mRNA in human epicardial adipose tissue: comparison to omentin in subcutaneous, internal mammary artery periadventitial & visceral abdominal depots. *International Journal of Obesity*, 32(5), 810-815.
- Fain, J.N., Sacks, H.S., Bahouth, S.W., Tichansky, D.S., Madan, A.K., Cheema, P.S. (2010). Human epicardial adipokine messenger RNAs: comparisons of their expression in subcutaneous, subcutaneous, and omental fat. *Metabolism*, 59(9), 1379-86.
- Falk, E., Thim T., Kristensen, I.B. (2009). Atherosclerotic plaque, adventitia, perivascular fat, and carotid imaging. *JACC Cardiovascular Imaging*, 2(2), 183-6.
- Fang, M., Chen, Y., Wang, J. (2014). Epicardial adipose tissue: the accomplice implicated in the genesis and maintenance of atrial fibrillation. *Chin Med J.*, 127(14), 2700-6.
- Ferland, D.J., Watts, S.W. (2015). Chemerin: A comprehensive review elucidating the need for cardiovascular research. *Pharmacological Research* 99, 351–361.
- Ferrier G.R., Howlett S.E. (2001). Cardiac excitation-contraction coupling: role of membrane potential in regulation of contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 280(5):H1928-44.
- Fleige, S., Pfaffl M.W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3):126-39.
- Franz, M.R. (1994). Bridging the gap between basic and clinical electrophysiology: what can be learned from monophasic action potential recordings? *J. Cardiovasc Electrophysiol.*, 5(8):699-710.
- Franz, M.R., Swerdlow, C.D., Liem, L.B., & Schaefer, J. (1988). Cycle length dependence of human action potential duration in vivo. Effects of single extrastimuli, sudden sustained rate acceleration and deceleration, and different steady-state frequencies. *J. Clin Invest.* 82(3):972-9.

## **"KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"**

- Franz, M.R. (1999). Current status of monophasic action potential recording: theories, measurements and interpretations *Cardiovascular Research.*, 41(1), 25–40.
- Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399(6736):597-601.
- Gao, X., Mi, S., Zhang, F., Gong, F., Lai, Y., Gao, F., Zhang, X., Wang, L., Tao, H. (2011). Association of chemerin mRNA expression in human epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis. *Cardiovasc. Diabetol.*, 10, 87.
- George, M.S., Pitt, G.S. (2006). The real estate of cardiac signaling: location, location, location. *Proc Natl Acad Sci.*, 103(20):7535-6.
- Gerard, J.T., Derrickson, B. (2014). Principles of Anatomy and Physiology. Hoboken, NJ:John Wiley&Sons, Inc.
- Ghigo, A., Morello, F., Perino, A., Damilano, F., Hirsch, E. (2011). Specific PI3K Isoform Modulation in Heart Failure: Lessons from Transgenic Mice. *Curr Heart Fail Rep*, 8(3), 168–175.
- Gimeno, R.E. & Klaman, L.D. (2005). Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Current Opinion in Pharmacology*, 5, 122–128.
- Golia, E., Limongelli, G., Natale, F., Fimiani, F., Maddaloni, V., Russo, P.E., Riegler, L., Bianchi, R., Crisci, M., Palma, G.D., Golino, P., Russo, G.M., Calabrò, R., Calabrò, P. (2014). Adipose tissue and vascular inflammation in coronary artery disease. *World J Cardiol*, 6(7), 539-554.
- Goralski, K.B., McCarthy, T.C., Hanniman, E.A., Zabel, B.A., Butcher, E.C., Parlee, S.D., Muruganandan, Sinal C.J. (2007). Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.*, 282(38), 28175-28188.

## "KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"

- Grant, A.O. (2009). Cardiac Ion Channels. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.*, 2(2):185-94.
- Green, D., Hutton, P. (1999). Coronary circulation. *Current Anaesthesia and Critical Care*. 10, 70-76.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (2001). Textbook of Medical Physiology. (10th ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Günel, N., Bilgiç A. (1997). Diyastolik fonksiyonlar: Diyastol Fizyolojisi, Fonksiyon Bozuklukları ve Elektrokardiyografi ile Değerlendirilmesi. *Türk Kardiyoloji Derneği*, 25:54-64.
- Güler, T. (1997). Kardiyovasküler fizyoloji.  
[http://www.tayfunguler.com/Nonweb\\_files/Anestezi/KVS\\_physiology](http://www.tayfunguler.com/Nonweb_files/Anestezi/KVS_physiology).
- Haghighi, K., Kolokathis, F., Pater, L., Lynch, R.A., Asahi, M., Gramolini, A.O., Fan, G.C., Tsiapras, D., Hahn, H.S., Adamopoulos, S., Liggett, S.B., Dorn, G.W., MacLennan, D.H., Kremastinos, D.T., Kranias, E.G. (2003). Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest.*, 111: 869–876.
- Haghighi, K., Kolokathis, F., Gramolini, A.O., Waggoner, J.R., Pater, L., Lynch, R.A., Fan, G.C., Tsiapras, D., Parekh, R.R., Dorn, G.W. 2nd, MacLennan, D.H., Kremastinos, D.T., Kranias, E.G. (2006). A mutation in the human phospholamban gene, deleting arginine 14, results in lethal, hereditary cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(5), 1388–1393.
- Hah, Y.J., Kim, N.K., Kim, M.K., Kim, H.S., Hur, S.H., Yoon, H.J., Kim, Y.N., Park, K.G. (2011). Relationship between Chemerin Levels and Cardiometabolic Parameters and Degree of Coronary Stenosis in Korean Patients with Coronary Artery Disease. *Diabetes Metab. J.*, 35(3), 248-254.
- Hamlin, R.L., del Rio.C. (2012). dP/dt(max) a measure of 'baroinometry'. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 66(2):63-5.



## “KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

Hart, R. & Graves D.R. (2010). Chemerin contributes to inflammation by promoting macrophage adhesion to VCAM-1 and fibronectin through clustering of VLA-4 and VLA-5. *J. Immunol.*, 185(6), 3728-3739.

Harvey, R.D., Hell, J.W. (2013). CaV1.2 signalling complexes in the heart. *J. Mol Cell Cardiol.* 58,143-52.

Hauer, H. (2005). Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc.*, 64(2), 163-9.

Havel, P.J. (2004). Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*, 53 (1), S143–51.

He, M.X., Downey, H.F. (1998). Downregulation of ventricular contractile function during early ischemia is flow but not pressure dependent. *Am J Physiol.* 275(5 Pt 2), H1520-3.

Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S., Wegener, J.W. (2014). L-type cav1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *American Physiological Society*, 94(1), 303–326.

<http://what-when-how.com/paramedic-care/principles-of-electrocardiography-clinical-essentials-paramedic-care-part-2/>

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pacemaker\\_potential\\_annotated.gif](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pacemaker_potential_annotated.gif)

Hyvönen, M.T., Spalding, K.L. (2014). Maintenance of white adipose tissue in man. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, B.C. 4436, 1357-2725.

Iacobellis, G., Bianco, A.C. (2011a). Epicardial adipose tissue: emerging physiological, pathophysiological and clinical features. *Trends Endocrinol Metab.*, 22(11), 450-7.

Iacobellis, G., Malavazos, A.E., Corsi, M, M. (2011b). Epicardial fat: from the biomolecular aspects to the clinical practice. *Int J Biochem Cell Biol.*, 43(12), 1651-4.

Ikonnikov, G. & Yelle, D. (Ed.), (2011). *Physiology of cardiac conduction and contractility. Adv Physiol Educ.*, 35 (1):28-32.

## **“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”**

- Iozzo, P. (2011). Myocardial, Perivascular, and Epicardial Fat. *Diabetes Care*, 34(2), S371–S379.
- Jiang, M.T., Moffat, M.P., Narayanan, N. (1993). Age-related alterations in the phosphorylation of sarcoplasmic reticulum and myofibrillar proteins and diminished contractile response to isoproterenol in intact rat ventricle. *Circ Res.*, 72(1), 102–111.
- Jing-Sheng, XIA., Zhen, LI., Jian-Wen, D., Hong, Tu., Zeng, F., (2002). Dauricine-induced changes in monophasic action potentials and effective refractory period of rabbit left ventricle in situ. *Acta Pharmacol.*, 23(4):371-375.
- Josette, M.N., Azadeh, Y., Carla, G. T., Peter, Z., & Jeffrey, T.W. (2012). Adipokines and the cardiovascular system: mechanisms mediating health and disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 90(8), 1029-59.
- Kadoglou, N.P., Tahmatzidis, D.K., Giannakoulas, C., Kapelouzou, A., Gkontopoulos, A., Parissis, J., Lampropoulos, S., Kottas, G. (2014). Serum levels of novel adipokines, omentin-1 and chemerin, in patients with acute myocardial infarction: KOZANI STUDY. *J. Cardiovasc Med.*, 16(5),41–6.
- Kamp, T.J., Hell, J.W. (2000). Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Circ Res.*, 87(12), 1095-1102.
- Kataoka, Y., Shibata, R., Ohashi, K., Kambara, T., Enomoto, T., Uemura, Y., Ogura, Y., Yuasa, D., Matsuo, K., Nagata, T., Oba, T., Yasukawa, H., Numaguchi, Y., Sone, T., Murohara, T., Ouchi, N. (2014). Omentin prevents myocardial ischemic injury through AMPK- and Akt-dependent Mechanisms. *Journal of the American College of Cardiology*, 24(24), 2722-33.
- Katz, AM. (2006). *Physiology of the Heart*. Physiology of the heart 4th ed. Published by Lippincott Williams & Wilkins in Philadelphia.
- Katz, A.M. (2002). Ernest Henry Starling: His predecessors, and the “Law of the heart.” *Circulation*, 106(23): 2986-92.

## **"KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"**

Katzung, B. (2004). *Basic & Clinical Pharmacology*, Ninth Edition.

Kaur, J., Adya, R., Tan, B.K., Chen, J., Randeve, H.S. (2010). Identification of chemerinreceptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391, 1762–1768.

Kazama, K., Usui,, T., Okada M., Hara, Y., Yamawaki, H. (2012). Omentin plays an anti-inflammatory role through inhibition of TNF-alpha-induced superoxide production in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 686(1-3), 116–123.

Kazama, K., Okada, M., Hara, Y. & Yamawaki, H. (2013). Novel Adipocytokine, Omentin, Inhibits Agonists-Induced Increases of Blood Pressure in Rats. *J. Vet. Med. Sci.*, 75(8), 1029–1034.

Kazama, K., Okada, M., Yamawaki, H., (2014). A novel adipocytokine, omentin, inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *J. Biochem Biophys Res Commun.*, 452(1):142–6.

Kerfant, B.G., Gidrewicz, D., Sun, H., Oudit, G.Y., Penninger, J.M. & Backx, P.H. (2005). Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release and Load Are Enhanced by Subcellular cAMP Elevations in PI3K gamma-deficient Mice. *Circ Res.*, 96(10), 1079-1086.

Kerfant, B.G., Rose, R.A., Sun, H., & Back, P.H. (2006). Phosphoinositide 3-kinase c Regulates Cardiac Contractility by Locally Controlling Cyclic Adenosine Monophosphate Levels. *Trends Cardiovasc Med.*, 16(7), 250–256.

Khavandi, K., Khavandi, A., Asghar, O., Greenstein, A., Withers, S., Heagerty, A.M., Malik, R.A. (2009). Diabetic cardiomyopathy—a distinct disease? *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 23(3), 347–360.

Komolka, K., Albrecht, E., Wimmers, K., Michal, J.J. & Maak, S. (2014). Molecular Heterogeneities of Adipose Depots-Potential Effects on Adipose-Muscle Cross-Talk in Humans, Mice and Farm Animals. *Journal of Genomics*, 2, 31-44.

## **"KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"**

- Korzick, D.H. (2003). Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update. *Adv Physiol Educ.*, (1-4), 192-200.
- Kranias, E.G., Hajjar, R.J. (2012). Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulatome. *Circ Res.*, 110(12), 1646-1660.
- Kuperman, D.A., Lewis, C.C., Woodruff, P.G., Rodriguez, M.W., Yang, Y.H., Dolganov, G.M., Fahy, J.V., Erle, D.J. (2005). Dissecting asthma using focused transgenic modeling and functional genomics. *J Allergy Clin Immunol.*, 116(2), 305-11.
- Lau, D.C., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P.E., Verma, S. (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 288(5), H2031-41.
- Lee, H.Y., Després, J.P., Koh, K.K. (2013). Perivascular adipose tissue in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 230(2), 177-84.
- Lee, J.K., Schnee, J., Pang, M., Wolfert, M., Baum, L.G., Moremen, K.W., Pierce, M. (2001). Human homologs of the Xenopus oocyte cortical granule lectin. *Glycobiology*, (1), 65-73.
- Liao, R., Podesser, B.K., Lim, C.C. (2012). The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 303(2), H156-H167.
- Lim, G., Venetucci, L., Eisner, D.A. (2007). Casadei B. Does nitric oxide modulate cardiac ryanodine receptor function? Implications for excitation-contraction coupling. *Cardiovascular Research*, 77(2), 256-64.
- Limas, C. J., Olivari, M. T., Goldenberg, I. F., Levine, T. B., Benditt, D. G. & Simon, A. (1987). Calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum in human dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.*, 21(8), 601-605.
- Lin, Y.K., Chen, Y.C., Chang, S.L., Lin, Y.J., Chen, J.H., Yeh, Y.H., Chen, S.A., Chen, Y.J. (2013). Heart failure epicardial fat increases atrial arrhythmogenesis. *Int J Cardiol.*, 167(5), 1979-83.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Lobato, N.S., Neves, K.B., Filgueira, F.P., Fortes, Z.B., Carvalho, M.H., Webb, R.C., Oliveira, A.M., Tostes, RC. (2012). The adipokine chemerin augments vascular reactivity to contractile stimuli via activation of the MEK-ERK1/2 pathway. *Life Sci.* 15, 91(13-14), 600-6.
- Machackova, J., Barta, J., Dhalla, N.S. (2005). Molecular defects in cardiac myofibrillar proteins due to thyroid hormone imbalance and diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 83: 1071-1091.
- MacLennan, D.H., Kranias, E.G. (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 4(7), 566–577.
- Madamanchi, A. (2007).  $\beta$ -Adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill Journal of Medicine*, 10(2), 99-104.
- Manoury, B., Montiel, V., Balligand, J.L. (2012). Nitric oxide synthase in post ischaemic remodelling: new pathways and mechanisms. *Cardiovasc Res.*, 94(2):304-15.
- Martinez-Moreno, M., Alvarez-Barrientos, A., Roncal, F., Albar, J.P., Gavilanes, F., Lamas, S., Rodriguez- Crespo I. (2005). Direct interaction between the reductase domain of endothelial nitric oxide synthase and the ryanodine receptor. *FEBS Lett.* 579(14), 3159–3163.
- Maruyama, S., Shibata, R., Kikuchi, R., Izumiya, Y., Rokutanda, T., Araki, S., Kataoka, Y., Ohashi, K., Daida, H., Kihara, S., Ogawa, H., Murohara, T., Ouchi, N. (2012). Fat-derived factor omentin stimulates endothelial cell function and ischemia-induced revascularization via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 287(1), 408–417.
- Massion, P.B., Feron, O., Dessy, C., Balligand, J.L. (2003). Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res.*, 93(5), 388-98.
- Matsuo, K., Shibata, R., Ohashi, K., Kambara, T., Uemura, Y., Hiramatsu-Ito, M., Enomoto, T., Yuasa, D., Joki, Y., Ito, M., Hayakawa, S., Ogawa, H., Kihara, S., Murohara, T., Ouchi, N., (2015). Omentin functions to attenuate cardiac hypertrophic Response. *Mol Cell Cardiol*, 79, 195–202.
- Mattu, H.S. & Randeve, H.S. (2013). Role of adipokines in cardiovascular Disease. *Journal of Endocrinology*, 216, 1, T17–T36.

## **“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”**

- McCardle, W.D., Katch, F., Katch, V.L. (1991). *Exercise Physiology*, U.S.A., Lea and Febiger Malver.
- McDowell, S.A., McCall, E., Matter, W.F., Estridge, T.B., Vlahos, C.J. (2004). Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) regulates excitation-contraction coupling in neonatal cardiomyocytes. *American Journal of Physiology.*, 286(2), H796-805.
- Mika, D., Leroy, J., Vandecasteele, G., Fischmeister, R. (2012). PDEs create local domains of cAMP signaling. *J. Mol Cell Cardiol.* 52,323–9.
- Minajeva, A., Kaasik, A., Paju, K., Seppet, E., Lompre, A.M., Veksler, V., Ventura-Clapier, R. (1997). Sarcoplasmic reticulum function in determining atrioventricular contractile differences in rat heart. *Am J Physiol.*, 273(5Pt2), H2498–2507.
- Molica, F., Morel, S., Kwak, B.R., Jeanrenaud, R. F., Steffens, S. (2015). Adipokines at the crossroad between obesity and cardiovascular Disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 113(3), 553-66.
- Moore, H.J., Franz, M.R. (2007). Monophasic action potential recordings in humans. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 18(7), 787-90.
- Moreno-Navarrete, J.M., Catalan, V., Ortega, F., Gomez-Ambrosi, J., Ricart, W., Fruhbeck, G., Fernandez-Real, J.M. (2010). Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutr. Metab.* 7-27.
- Morton J.K., Michael J.L. (2006). Assesment of Myocardial Blood Flow and Metabolism. Grossman’s Cardiac Catheterization, Angiography and Intervention. (7th Ed.). Philadelphia, US: Lippincott Williams & Wilkins, 335-65.
- Murad, N., Tucci, P.J. (1999). Developed pressure data may provide misinformation when used alone to evaluate systolic function in isovolumetric left ventricle preparations. *Braz J Med Biol Res.*, 32(6):7736.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Narumi, T., Watanabe, T., Kadowaki, S., Kinoshita, D., Yokoyama, M., Honda, Y., Otaki, Y., Nishiyama, S., Takahashi, H., Arimoto, T., Shishido, T., Miyamoto, T., Kubota, I. (2014). Impact of serum omentin-1 levels on cardiac prognosis in patients with heart failure. *Cardiovasc Diabetol.*, 23, 13, 84.
- Nerbonne, J.M., Kass, R.S. (2005). Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev* 85(4), 1205–53.
- Northcott, J.M., Yeganeh, A., Taylor, C.G., Zahradka, P., & Wigle, J.T. (2012). Adipokines and the cardiovascular system: mechanisms mediating health and disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 90, 1–31.
- Ohashi, K., Shibata, R., Murohara, T., Ouchi, N. (2014). Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(7), 348-55.
- Olejnickova, V., Novakova, M., Provaznik, I. (2015). Isolated heart models: cardiovascular system studies and technological advances. *Med Biol Eng Comput*, 53(7), 669-678.
- Oudit, G.Y., Crackower, M.A., Eriksson, U., Sarao, R., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Gidrewicz, D., Rybin, V.O., Wada, T., Steinberg, S.F., Backx, P.H., Penninger, J.M.(2003). Phosphoinositide 3kinase gammadeficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. *Circulation*, 108(17), 2147-52.
- Ouwens, D.M., Sell, H., Greulich, S., Eckel, J. (2010). The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med.*, 14(9), 2223-34.
- Park, W.J., Oh, J.G. (2013). SERCA2a: a prime target for modulation of cardiac contractility during heart failure. *BMB Reports*, 46(5), 237-243.
- Pawson, T. & Nash, P. (2000). Protein–protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.*, 14(9), 1027–47.
- Payne, G.A., Kohr, M.C., Tune, J.D. (2012). Epicardial perivascular adipose tissue as a therapeutic target in obesity-related coronary artery disease. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), 659-69.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Peng, T., Lu, X., Lei, M., Feng, Q. (2003). Endothelial nitric oxide synthase enhances lipopolysaccharide stimulated tumor necrosis factor alpha expression via Campmediated p38 MAPK pathway in cardiomyocytes. *J. Biol Chem.*, 278(10), 8099-105.
- Penitente, A.R., Novaes, R.D., Silva, M.E., Silva, M.F., Quintão-Júnior, J.F., Guatimosim, S., Cruz, J.S., Chianca-Jr, D.A., Natali, A.J., Neves, C.A. (2014). Basal and  $\beta$  adrenergic cardiomyocytes contractility dysfunction induced by dietary protein restriction is associated with downregulation of SERCA2a expression and disturbance of endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  regulation in rats. *Cell Physiol Biochem.*, 34(2), 443-54.
- Periasamy, M., Reed, T.D., Liu, L.H., Ji, Y., Loukianov, E., Paul, R.J., Nieman, M.L., Riddle, T., Duffy, J.J., Doetschman, T., Lorenz, J.N., Shull, G.E. (1999). Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sacro(endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J. Biol Chem.*, 274 (4), 2556-62.
- Periasamy, M., Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA Pump Isoforms: Their Role In Calcium Transport And Disease. *Muscle Nerve.*, 35(4), 430-442.
- Petroff, M.G., Kim, S.H., Pepe, S., Dessy, C., Marbán, E., Balligand, J.L., Sollott, S.J. (2001). Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of  $Ca^{2+}$  release in cardiomyocytes. *Nature Cell Biol.*, 3(10), 867-873.
- Pinnell, J., Turner, S., Howell, S., (2007). Cardiac muscle physiology. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 7 (3), 85-88.
- Poulos, S.P., Hausman, D.B., Hausman, G.J. (2010). The development and endocrine functions of adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 323, 20-34.
- Rhee, E.J. (2011). Chemerin: A Novel Link between Inflammation and Atherosclerosis? *Diabetes Metab J.*, 35(3), 216-8.
- Roh, S., Song, S., Choi, K., Katoh, K., Wittamer, V., Parmentier, M., Sasaki, S. (2007). Chemerin-A new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 3, 362(4), 1013-1018.



## **"KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"**

- Rose, R.A., Kabir, M.G., Backx, P.H. (2007). Altered heart rate and sinoatrial node function in mice lacking the cAMP regulator phosphoinositide 3-kinase-gamma. *Circ Res.*, 101(12), 1274-82.
- Rourke, J.L., Dranse, H.J. & Sinal, C.J. (2013). Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Etiology and Pathophysiology/Obesity Comorbidities*, 14(3), 245-62.
- Sacks, H.S, Fain, J.N. (2007). Human epicardial adipose tissue: A review. *Am Heart J.*, 153(6), 907-17.
- Sandow, A. (1952). Fundamental mechanics of skeletal muscle contraction. *Am.J.Phys.Med.*, 31(2), 103-25.
- Sarantitis, I., Papanastasopoulos, P., Manousi, M., Baikoussis, N.G., Apostolakis, E., (2012). The Cytoskeleton of the Cardiac Muscle Cell *Hellenic J. Cardiol.*, 53(5): 367-79.
- Schaffler, A., Neumeier, M., Herfarth, H., Furst, A., Scholmerich J., Buchler, C. (2005). Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 1732(1-3), 96-102.
- Seddon, M., Shah, A.M., Casadei, B., (2007). Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res.*, 75(2), 315-26.
- Sengul, C., Ozveren, O. (2013). Epicardial adipose tissue: a review of physiology, pathophysiology, and clinical applications. *Anadolu Kardiyol Derg.*, 13, 261-5.
- Shaffer, F., McCraty, R., Zerr, C.L. (2014). A healthy heart is not a metronome: an integrative review of the heart's anatomy and heart rate variability. *Frontiers in Psychology*, 5, 1040.
- Schiller, N.B. (2003). Ejection fraction by echocardiography. The full monty or just a peep show? *American Heart Journal*, 146 (3): 380-2.
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A., Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff—still viable in the new millennium. *J. Pharmac Toxicol Methods*, 55 (2), 113–126.

## **"KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"**

- Solaro, R.J. (2011). *Regulation of Cardiac Contractility*. San Rafael (CA):Morgan & Claypool Life Sciences.
- Spiroglou, S.G., Kostopoulos, C.G., Varakis, J.N., Papadaki, H.H. (2010). Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.*, 17(2), 115-130.
- Sun, H., Kerfant, B.G., Zhao, D., Trivieri, M.G., Oudit, G.Y., Penninger, J.M., Backx, P.H. (2006). Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> currents via increased PI3K $\alpha$ /PKB signaling. *Circ Res.*, 98(11), 1390–7.
- Sutherland FJ, Hearse DJ. (1999). The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological Research*, 41(6), 613-627.
- Suzuki, Y.A., Shin, K., Lonnerdal, B. (2001). Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry*, 40(51), 15771-15779.
- Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Delpón, E. (2010). Cardiac electrophysiological effects of nitric oxide. *Cardiovascular Research*, 87, 593–600.
- Tan, B.K., Adya, R., Farhatullah, S., Lewandowski, K.C., O'Hare, P., Lehnert, H., Randeve, H.S. (2008). Omentin-1, a novel adipokine, is decreased in overweight insulin resistant women with the polycystic ovary syndrome: Ex vivo and in vivo regulation of omentin-1 by insulin and glucose. *Diabetes*, 57 (4), 801-8.
- Tan, Y.H., Zheng, X.L., Tang, C.K, (2015). The protective functions of omentin in cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta* 448, 98–106.
- Tong, X., Evangelista, A., Cohen, R.A. (2010). Targeting the Redox Regulation of SERCA in Vascular Physiology and Disease. *Curr Opin Pharmacol.*, 10(2), 133–138.
- Tsuji, S., Uehori, J., Matsumoto, M., Suzuki, Y., Matsuhisa, A., Toyoshima, K., Seya, T. (2001). Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J. Biol. Chem.*, 276 (26), 23456-23463.

## "KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"

- Ucgun, T., Basar. C., Memisogullari, R., Demirin, H., Türker, Y., Aslantaş, Y. (2014). Serum visfatin and omentin levels in slow coronary flow. *Rev Port Cardiol*, 33(12), 789–94.
- Van de Sandt, A.M., Windler, R., Gödecke, A., Ohlig, J., Zander, S., Reinartz, M., Graf, J., van Faassen, E.E., Rassaf, T., Schrader, J., Kelm, M., Merx, M.W. (2013). Endothelial NOS (NOS3) impairs myocardial function in developing sepsis. *Basic Res Cardiol.*, 108(2), 330.
- Vangheluwe, P., Sipido, K.R., Raeymaekers, L., Wuytack, F. (2006). New perspectives on the role of SERCA2's  $Ca^{2+}$  affinity in cardiac function. *Biochim Biophys Acta.*, 1763(11), 1216-28.
- Verhagen, S.N., Visseren, F.L. (2011). Perivascular adipose tissue as a cause of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 214(1), 3-10.
- Vetter, R., Rehfeld, U., Reissfelder, C., Weiss, W., Wagner, K.D., Gunther, J., Hammes, A., Tschöpe, C., Dillmann, W., Paul, M. (2002). Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase improves reticular  $Ca^{2+}$  handling in normal and diabetic rat hearts. *Faseb J.*, 16(12), 1657–9.
- V. De Clercq, J.E., Enn, A., Yeganeh, C.G., Taylor, & Zahradka, P. (2013). Modulation of Cardiovascular Function by Adipokines Cardiovascular & Haematological Disorders. *Drug Targets*, 13(1), 59-72.
- Voss, J., Jones, L.R., Thomas, D.D. (1994). The physical mechanism of calcium pump regulation in the heart. *Biophys J.*, 67(1), 190–196.
- Walther, S., Pluteanu, F., Renz, S., Nikonova, Y., Maxwell, J.T., Yang, L.Z., Schmidt, K., Edwards, J.N., Wakula, P., Groschner, K., Maier, L.S., Spiess, J., Blatter, L.A., Pieske, B., Kockskämper, J. (2014). Urocortin 2 stimulates nitric oxide production in ventricular myocytes via Akt- and PKA-mediated phosphorylation of eNOS at serine 1177. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 307(5), H689-700.
- Wang, Y., Chen, M.S., Liu, H.C., Xiao, J.H., & Wang, J.L. (2014). The relationship between frequency dependence of action potential duration and the expression of TRPC3 in rabbit ventricular myocardium. *Cell Physiol Biochem.* 33(3), 646-56.

## **“KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”**

- Watts, S., Dorrance, A.M., Penfold, M.E., Rourke, J.L., Sinal, C.J., Seitz, B., Sullivan, T.J., Charvat, T.T., Thompson, J.M., Burnett, R., Fink, G.D. (2013). Chemerin connects fat to arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 33(6): 1320–1328
- Weigert, J., Neumeier, M., Wanninger, J., Filarsky, M., Bauer, S., Wiest, R., Farkas, S., Scherer, M.N., Schäffler, A., Aslanidis, C., Schölmerich, J., Buechler, C. (2010). Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 72(3), 342–348.
- Wittamer, V., Franssen, J.D., Vulcano, M., Mirjolet, J.F., Le Poul, E., Migeotte, I., Brezillon, S., Tyldesley, R., Blanpain, C., Detheux, M., Mantovani, A., Sozzani, S., Vassart, G., Parmentier, M., Communi D. (2003). Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J. Exp. Med.*, 198, 977-985.
- Wittamer, V., Grégoire, F., Robberecht, P., Vassart, G., Communi, D., Parmentier, M. (2004). The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency. *J. Biol Chem.*, 279(11), 9956-62.
- Xue, Y., Jiang, L., Cheng, Q., Chen, H., Yu, Y., Lin, Y., Yang, X., Kong, N., Zhu, X., Xu, X., Wan, W., Zou, H. (2012). Adipokines in psoriatic arthritis patients: the correlations with osteoclast precursors and bone erosions. *Plos One*, 7(10), e46740.
- Xu, L., Zhu, G.B., Wang, L., Wang, D.F., Jiang, X.R. (2012). Synovial Fluid Omentin-1 Levels Are Inversely Correlated With Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis. *Journal of Investigative Medicine*, (60), 3.
- Yamawaki, H., Tsubaki, N., Mukohda, M., Okada, M., Hara, Y. (2010). Omentin, a novel adipokine, induces vasodilation in rat isolated blood vessels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 393(4), 668–672.
- Yamawaki, H., (2011a). Vascular effects of novel adipocytokines: focus on vascular contractility and inflammatory responses. *Biol Pharm. Bull.*, 34, 307-310.

## **"KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)"**

- Yamawaki, H., Kuramoto, J., Kameshima, S., Usui, T., Okada, M., Hara, Y. (2011b). Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 408(2), 339–343.
- Yamawaki, H., Kameshima, S., Usui, T., Okada, M. & Hara, Y. (2012). A novel adipocytokine, chemerin exerts anti-inflammatory roles in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 423(1), 152-157.
- Yan, Q., Zhang, Y., Hong, J., Gu, W., Dai, M., Shi, J., Zhai, Y., Wang, W., Li, X., Ning, G. (2012). The association of serum chemerin level with risk of coronary artery disease in Chinese adults. *Endocrine*, 41(2), 281–288.
- Yang, R.Z., Lee, M.J., Hu, H., Pray, J., Wu, H.B., Hansen, B.C., Shuldiner, A.R., Fried, S.K., McLenithan, J.C., Gong, D.W. (2006). Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290(6), E1253–61.
- Yang, S.G., Kittnar, O. (2010). New insights into application of cardiac monophasic action potential. *Physiol Res.*, 59(5), 645-50.
- Yano, N., Tseng, A., Zhao, T.C., Robbins, J., Padbury, J.F., Tseng, Y.T. (2008). Temporally controlled overexpression of cardiac-specific PI3K $\alpha$  induces enhanced myocardial contractility a new transgenic model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 295 (4), H1690-4.
- Yoruk, U., Yaykasli, K.O., Ozhan, H., Memişoğullari, R., Karabacak, A., Bulur, S., Aslantaş, Y., Başar, C., Kaya, E. (2014). Association of omentin Val109Asp polymorphism with coronary artery disease. *Anadolu Kardiyol Derg.*, 14(6), 511–4.
- Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., Stewart, C.N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 3(1), 112-23.

## “KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)”

- Zheng, L., Weng, M., Qi, M., Qi, T., Tong, L., Hou, X., Tong, Q. (2012). Aberrant expression of intelectin-1 in gastric cancer: its relationship with clinicopathological features and prognosis. *J. Cancer Res Clin Oncol.*, 138(1), 163–72.
- Zhong, Y., Reiser, P.J., Matlib, M.A. (2003). Gender differences in myosin heavy chain-beta and phosphorylated phospholamban in diabetic rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 285(6), H2688–H2693.
- Zhong, X., Zhang, H.Y., Tan, H., Zhou, Y., Liu, F.L., Chen, F.Q., Shang, D.Y. (2011). Association of serum omentin-1 levels with coronary artery disease. *Acta Pharmacol. Sin.*, 32(7), 873-8.
- Zhong, X., Li, X., Liu, F., Tan, H., Shang, D. (2012). Omentin inhibits TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in endothelial cells via ERK/NF-kappaB pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 425(2), 401–406.
- Zhongju, L., Ballou, L.M., Jiang, Y.P., Cohen, I.R., Lin, R.Z., (2013). Restoration of defective L-type Ca<sup>2+</sup> current in cardiac myocytes of type 2 diabetic *db/db* mice by Akt and PKC-I. *J Cardiovasc Pharmacol.* 58(4): 439–445.

## Özgeçmiş

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı :Özden Kutlay  
Uyruğu :T.C  
İletişim adresleri :ozden.2007gmail.com

### Eğitim Durumu

Derece	Bölüm	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	2003
Y. Lisans	Fizyoloji A.D.	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2005
Doktora	Fizyoloji A.D.	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2012-2016

### Yayınlar:

A.1 Aydın, Y., Kutlay, O., Arı, S., Duman, S., Uzuner, K., Aydın, S. (2007) *Planta Med.*, 73(13):1365-71.

A.2 Binay, C., Simsek, E., Cilingir, O., Yuksel, Z., Kutlay, O., Artan, S. (2014) Prevalence of nonclassic congenital adrenal hyperplasia in Turkish children presenting with premature pubarche, hirsutism, or oligomenorrhoea. *Int. J. Endocrinol.*

A.3 Gursoy, H., Erol, N., Deger Bilgec, M., Basmak, H., Kutlay, O., Aslan, H. (2015) Bilateral Coats' Disease Combined with Retinopathy of Prematurity. Case Reports in Ophthalmological Medicine.

### Bilimsel Etkinlikler

Deney Hayvanları kullanım sertifikası 2012

Erasmus Öğrenci değişim Programı ile 1 Haziran-1 Eylül 2014 tarihleri arasında Institute of Biophysics Biological Researche Centre Szeged /Hungary gözlemci olarak bulundu.







