

T.C  
ŞİFA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ANATOMİ ANABİLİM DALI

**YAŞLANMANIN KALP DOKUSUNDA AQUAPORIN 1  
İLE AQUAPORIN 4 YOĞUNLUĞU ÜZERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**HİKMET BIÇAKÇI**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. MUSTAFA SARSILMAZ**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Prof. Dr. AHMET SONGUR**

**2015-İZMİR**

T.C  
ŞİFA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ANATOMİ ANABİLİM DALI

**YAŞLANMANIN KALP DOKUSUNDA AQUAPORIN 1  
İLE AQUAPORIN 4 YOĞUNLUĞU ÜZERİNE  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**HİKMET BIÇAKÇI**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. MUSTAFA SARSILMAZ**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Prof. Dr. AHMET SONGUR**

**Bu tez Şifa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü  
tarafından ‘2014-27’ proje numarası ile desteklenmiştir**

**Tez No: 2015-600**

**2015-İZMİR**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Şifa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08 / 06 / 2015

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ, Şifa Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Ahmet SONGUR, Afyon Kocatepe Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Mete ERTÜRK, Ege Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Sedat MEYDAN, Bezmialem Vakıf Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Tolgahan ACAR, Şifa Üniversitesi



ONAY: Bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Doktora eğitim sürecim boyunca ve her zaman maddi manevi desteğini esirgemeyen değerli hocamız ve tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ'a, yoğun iş temposuna rağmen bizi hiçbir zaman geri çevirmeyen hocamız Prof. Dr. Ahmet SONGUR'a teşekkür eder ve hürmetlerimi sunarım.

Yine bu süreçte beni sürekli motive eden ve yol gösteren hocam Doç. Dr. Sedat MEYDAN'a, Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi AD.'den Yrd. Doç. Dr. Tolgahan ACAR'a, çalışmanın gerçekleşmesinde çok büyük emekleri ve yardımları olan G.O.P. Üniversitesi Tıp Fak. Anatomi AD.'den Doç. Dr. Ufuk TAŞ ve diğer öğretim üyelerine, Histoloji ve Embriyoloji AD.'den Arş. Gör. Seda OCAKLI ve diğer öğretim üyelerine, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fak.'den Doç. Dr. Sevil ÇAY'a,

Yardımlarını her ihtiyaç duyduğumda gördüğüm çalışma arkadaşlarım Öğr. Gör. Rauf AÇIKGÖZ, Öğr. Gör. İsmet DEMİRTAŞ, Öğr. Gör. Süleyman KUYUMCU, Arş. Gör. Abdurrahman NALBANT, Arş. Gör. Veli NEHİR, Arş. Gör. İsmail ÖZKAN ve Ergün AKTÜRK'e,

Hayatın güzelliklerini ve de cefasını benimle paylaşan değerli eşim Selda BIÇAKÇI, ailemizin ve evimizin neşesi çocuklarımız Esra Şevval ve Hüseyin Belya ile şefkat kahramanı annem Hülya BIÇAKÇI' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY SAYFASI .....</b>	<b>ii</b>
<b>ÖNSÖZ.....</b>	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>iv</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....</b>	<b>vii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ .....</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>x</b>
<b>TABLolar DİZİNİ .....</b>	<b>xi</b>
<b>1 GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2 GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Kalp (Cardium, Cor) .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Gelişimi.....	4
2.1.2 Histolojisi.....	4
2.1.2.1 Endokard (Endocardium ) .....	5
2.1.2.2 Miyokard (Myocardium).....	6
2.1.2.3 Epikard (Epicardium) .....	7
2.1.3 Anatomisi.....	8
2.1.3.1 Kalbin Boşlukları .....	10
2.1.3.2 Atriyum ve Ventriküller Arası Geçitler (Ostia atrioventricularia) ...	13
2.1.3.3 Ventriküllerin Çıkışındaki Geçitler (Ostia arteriosa) .....	13
2.1.3.4 Kalp Kapakları .....	13
2.1.3.5 Kalbin Kan Dolaşımı (Koroner Arterler ve Venler).....	15
2.1.3.6 Kalbin Lenfatikleri .....	17

2.1.3.7	Kalbin İletim Sistemi.....	17
2.1.3.8	Kardiak İnnervasyon .....	18
2.1.3.9	Perikard .....	19
<b>2.2</b>	<b>Aquaporinler .....</b>	<b>20</b>
2.2.1	Aquaporinler ve Aquagliseroporinler .....	21
2.2.2	Aquaporin Moleküler Yapısı .....	22
2.2.3	Aquaporin Tipleri ve Fonksiyonları .....	23
<b>2.3</b>	<b>İmmunohistokimya .....</b>	<b>27</b>
2.3.1	Genel Bilgiler.....	27
2.3.2	İmmunohistokimyada Kullanılan Antikorlar.....	28
2.3.3	İmmunohistokimya Metodları .....	28
2.3.3.1	İmmunenzimatik Boyama Metodları.....	29
2.3.3.2	İmmunfluoresan Boyama Metodları.....	30
<b>3</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Hayvanların Temini.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Örneklerin Alınması .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Kalp Dokusunun Histolojik Olarak İncelenmesi .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>İmmunohistokimya .....</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>Western Blot Tekniği .....</b>	<b>34</b>
<b>3.6</b>	<b>İstatistiksel analiz.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Histolojik Bulgular.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>İmmunohistokimyasal Bulgular .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Western Blot Bulguları.....</b>	<b>41</b>

<b>5 TARTIŞMA.....</b>	<b>43</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>48</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>49</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>50</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>51</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>52</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a.	: Arteria
Aa	: Arteriae
APAP	: Alkalin fosfataz-Antialkalin fosfataz
AQP	: Aquaporin
AV	: Atriyoventriküler
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
cc	: Kübik santimetre
cGMP	: Siklik guaninmonofosfat
cm	: Santimetre
Cx43	: Connexin 43
DETAB	: Deneysel tıp araştırma birimi
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit
GAG	: Glikozoksidaz-Antiglikozoksidaz
gr	: Gram
H	: Hidrojen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojenperoksit
HAYDEK	: Hayvan deneyleri yerel etik kurulu
HE	: Hematoksilen eozin
HRP	: Horse radish peroksidase
kDA	: Kilodalton
KO	: Knockout
KPB	: Kardiyopulmoner bypass
mOsm	: Miliosmol
MPTP	: Mitochondrial permeability transition pore
mRNA	: Messengar ribonükleik asit



n.	: Nervus
Na	: Sodyum
NPA	: Asparjin-Prolin-Alanin
NPF	: Asparjin-Prolin-Fenilalanin
NPS	: Asparjin-Prolin-Serin
°C	: Santigrat derece
PAP	: Peroksidaz-Antiperoksidaz
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
r.	: Ramus
RNA	: Ribonükleikasit
SA	: Sinoatriyal
T8	: Thoracal 8
V	: Volt
v.	: Vena
Vv.	: Venae
W	: Watt
WB	: Western Blot
µM	: Mikrometre

## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Genç farede hematoksilen-eozin yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti.....	36
Resim 2. Yaşlı farede hematoksilen-eozin yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti.....	37
Resim 3: Genç farede AQP1 immunohistokimya yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti.....	38
Resim 4: Yaşlı farede AQP1 immunohistokimya yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti.....	38
Resim 5: Genç farede AQP4 immunohistokimya yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti.....	39
Resim 6: Yaşlı farede AQP4 immunohistokimya yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti.....	39
Resim 7: Genç farede AQP1 negatif kontrol kalp dokusu kesiti.....	40
Resim 8: Yaşlı farede AQP1 negatif kontrol kalp dokusu kesiti.....	40

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Miyokardiyal su düzeyinin kontraktilite üzerine etkisi. ....	2
Şekil 2: Kalbin embriyolojik gelişimi .....	5
Şekil 3: Kalp duvarının tabakaları.....	6
Şekil 4: Kalp kası hücrelerinin elektron mikroskop görüntüsü.....	8
Şekil 5: Kalp; anatomik yeri ve duruşu.....	9
Şekil 6: Kalp transvers kesit, kalp boşlukları (T8 seviyesinden alttan görünüm).....	12
Şekil 7: Kalp kapakları.....	14
Şekil 8: Kalp arter ve venleri (Sternokostal yüzden görünüm).....	16
Şekil 9: Kalp arter ve venleri (Diyafragmatik yüzden görünüm) .....	16
Şekil 10: Kalbin iletim sistemi .....	18
Şekil 11: AQP1, AQP4 ve aqualiseroporinlerin şematik gösterimi. ....	20
Şekil 12: Aquaporinlerin moleküler yapısı .....	22
Şekil 13: Geçerli bilgiler ve varsayımlar ışığında AQP1 ve AQP4'ün kalpteki rolü	25
Şekil 14: Yaşlı ve genç farelerde aquaporin düzeylerinin western blot analizi. ....	42

## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Histolojik takip serileri .....	32
Tablo 2: Aquaporin 1 ve 4 boyanma yoğunluğunun değerlendirilmesi.....	33
Tablo 3: İmmunohistokimya boyama serileri .....	34
Tablo 4: Yaşlı ve genç farelerin kalp dokusu kesitlerinde AQP1 ve AQP4 proteinlerinin semikantitatif olarak immunohistokimyasal değerlendirme sonuçları	41

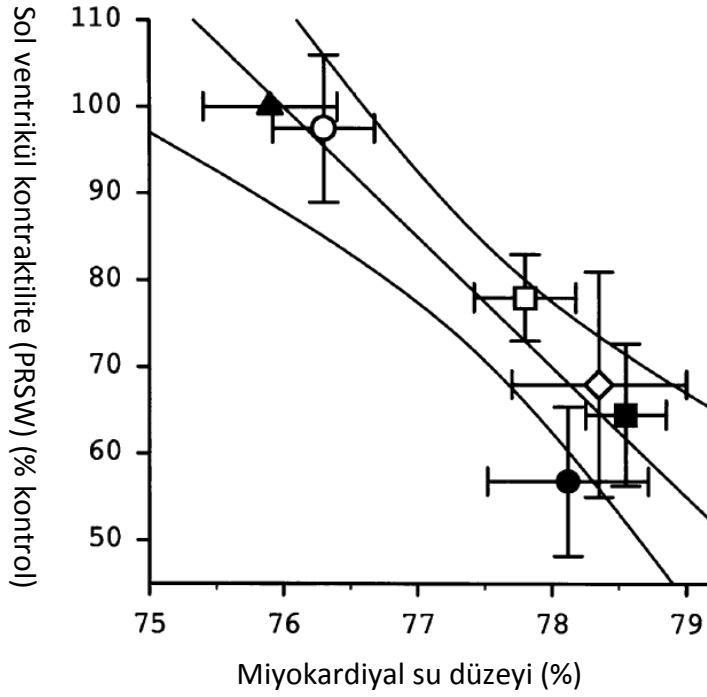
## 1 GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan ve diğer canlı organizmalarda hücrelerin başlıca bileşeni olan suyun; özellikle de çok hücreli yaşamda membran boyunca hareketi hayati öneme sahiptir. Homeostazın devam ettirilebilmesi; suyun vücuttaki dağılımı, pH dengesi ve elektrolit düzeylerine önemli ölçüde bağımlıdır (Hall 2010).

Hücreleri çevreleyen biyolojik membranlar; yapısal proteinler, genetik materyal ile yaşam için gerekli metabolit ve molekülleri muhafaza ederek yapısal bütünlüğü korurlar (Agre, King et al. 2002; Bhattacharjee, Carbrey et al. 2004).

Hücrelerin dış ortam koşullarına rağmen iç ortam bütünlüğünü nasıl muhafaza ettikleri 1920'lerde çift katmanlı lipid membranın tanımlanmasıyla anlaşılır hale gelmiştir. Lipid zardan suyun difüzyonu ile ilgili tartışmalar devam ederken 1960'larda eritrositler ve deri epitel gibi su geçişinin yüksek olduğu dokularda suyun difüzyon dışında başka yollarla da geçişinin olması gerektiği görüşleri dile getirilmiştir. Eritrositlerde ve *Xenopus Leavis* (*X. Leavis*) oositlerinde yapılan çalışmalarda ilk kez Glukoporin 1 adı verilen proteinin su kanallarına örnek olduğu öne sürülmüştür (Bhattacharjee, Carbrey et al. 2004; Chae, Kang et al. 2008). Yine *X. Leavis* oositlerinde yapılan çalışmalarda su geçirgenliği çok yüksek olan kanallar gösterilmiş ve 1997' de Human Genom Organization tarafından bu kanallar aquaporinler olarak isimlendirilmiştir (Bhattacharjee, Carbrey et al. 2004).

Kalp dokusunda su dengesinin sağlanması, kardiyak fonksiyonlar açısından büyük önem taşımaktadır. İnterstisyel alandaki suyun az miktarda artması bile miyokardiyal kontraktilitede (kasılma gücünde) belirgin azalmaya yol açmaktadır (Mehlhorn, Geissler et al. 2001)(Şekil 1).



(Mehlhorn, Geissler et al. 2001) Modifiye edilmiştir.

Şekil 1: Miyokardiyal su düzeyinin kontraktilite üzerine etkisi.

İskemi ve reperfüzyon hasarı da dâhil olmak üzere birçok kardiyak patoloji, kardiyak dokudaki sıvı artışı ile birliktelik göstermektedir (Mehlhorn, Geissler et al. 2001).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalara bakıldığında insan kalp dokusunda AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7, AQP8, AQP9, AQP10 ve AQP11 olduğu rapor edilse de AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7' nin varlığı güvenilir şekilde ortaya konulabilmiştir (Butler, Au et al. 2006). Özellikle aquaporin 1 ve 4'ün insan kalbinde protein düzeyinde varlığı gösterilmiş ve çalışmalar bu iki aquaporin üzerine yoğunlaşmıştır. Bunlardan kardiyak aquaporin 1 en fazla mikro vasküler damarlarda bulunurken aquaporin 4'ün daha çok kas hücresinde bulunduğu bildirilmiştir (Rutkovskiy, Valen et al. 2013).

Fare ve sıçanlar üzerinde yapılan kardiyak iskemi-reperfüzyon çalışmaları neticesinde AQP1 ve AQP4 ekspresyonlarının hem mRNA hem de protein düzeyinde değişikliğe uğradığı immunohistokimya, PCR ve Western blot çalışmalarıyla ortaya konulmuştur (Rutkovskiy, Bliksoen et al. 2012). Yine iskelet kas dokusunda da yoğun

bulunan aquaporin 4'ün özellikle musküler distrofiler gibi hastalıklarda yoğun olarak etkilendiği gösterilmiştir (Au, Butler et al. 2008).

Yaşlanma ile bütün dokularda sıvı kaybı meydana gelir. Bu kaybın yapılan bazı çalışmalarda aquaporin yoğunluğunun ya da fonksiyonlarının değişimi ile ilişkili olabileceği söylenmektedir. Özellikle intervertebral diskler, böbrekler ve tükürük bezleri gibi dokularda yaşlanma ile birlikte AQP1, AQP2, AQP3, AQP5 konsantrasyonlarının değiştiği gösterilmiştir (Tas, Cayli et al. 2012). Bu değişikliklerin yaşlanmanın fizyolojik süreci ve yaşlanma ile olan fonksiyon değişiklikleri ile doğrudan ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla bu çalışmada yaşlanmanın kalp dokusunda aquaporin 1 ile aquaporin 4 yoğunluğu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kalp (Cardium, Cor)

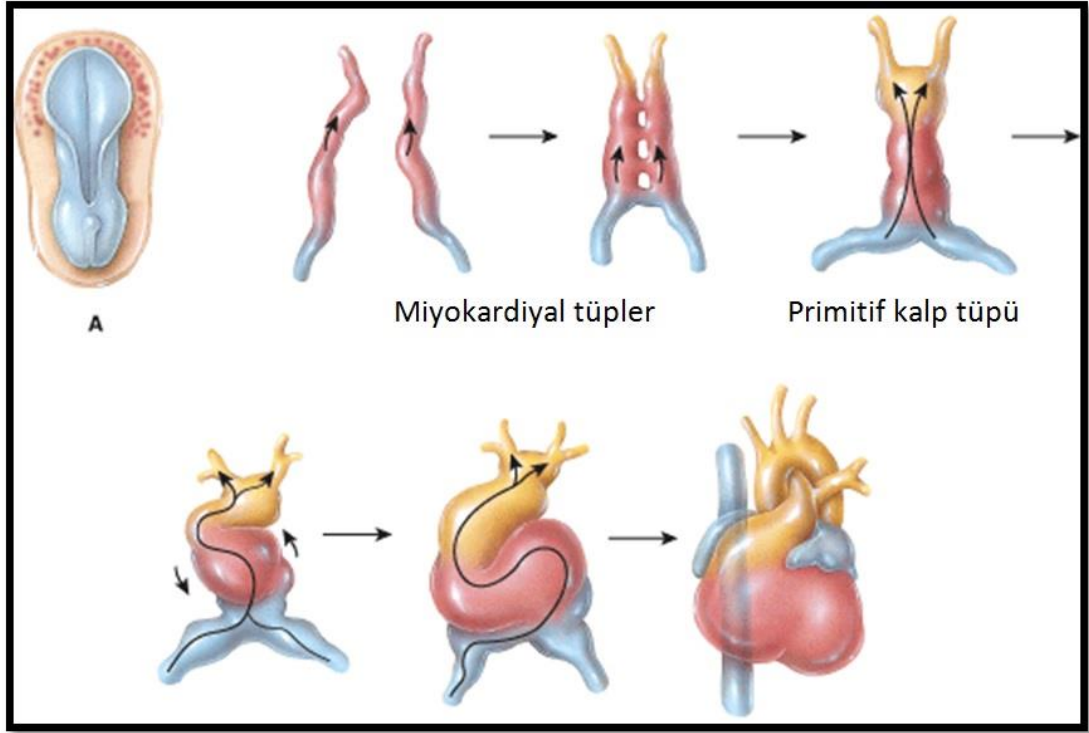
#### 2.1.1 Gelişimi

Embriyonal hayatın 19. gününde gelişimine başlayan kalp; nöral tabakanın ‘kardiyojenik bölge’ olarak adlandırılan mezodermal bölümünden gelişir. Kardiyojenik bölgede endokardiyal kalp tüpleri denilen vasküler yapıda bir çift tüp oluşur (Şekil 2) ve 20. günde bu tüpler birleşerek primitif kalp tüpünü meydana getirir. Embriyo katlanmalarıyla torasik bölgeye yerleşen primitif kalp tüpü başlangıçta yalnızca endotelden oluşurken 22. günde kalın bir mezoderm tabakası bu tüpü sarar ve miyokardiyum ile kardiyak jel tabakası denilen iki yeni tabakaya dönüşür. Gelişen miyokardiyum hücreleri tarafından salgılanan kardiyak jel tabakası, miyokardiyumun endokardiyal tüpten ayrılmasını sağlar. Sinus venosus ve septum transversum bölgelerinden kalbin dış yüzeyine doğru göç eden mezotelyal hücreler de epikardiyumu oluştururlar (Junqueira 2006; Ross 2011).

#### 2.1.2 Histolojisi

Kalp yapı bakımından anulus fibrosus ve kalp duvarı olmak üzere iki esas parça olarak kabul edilebilir. Anulus fibrosus, kalbin iskeleti denilebilecek bir yapı olup atriyumlar ve ventriküller arasında bulunan bağ doku tabakasıdır.





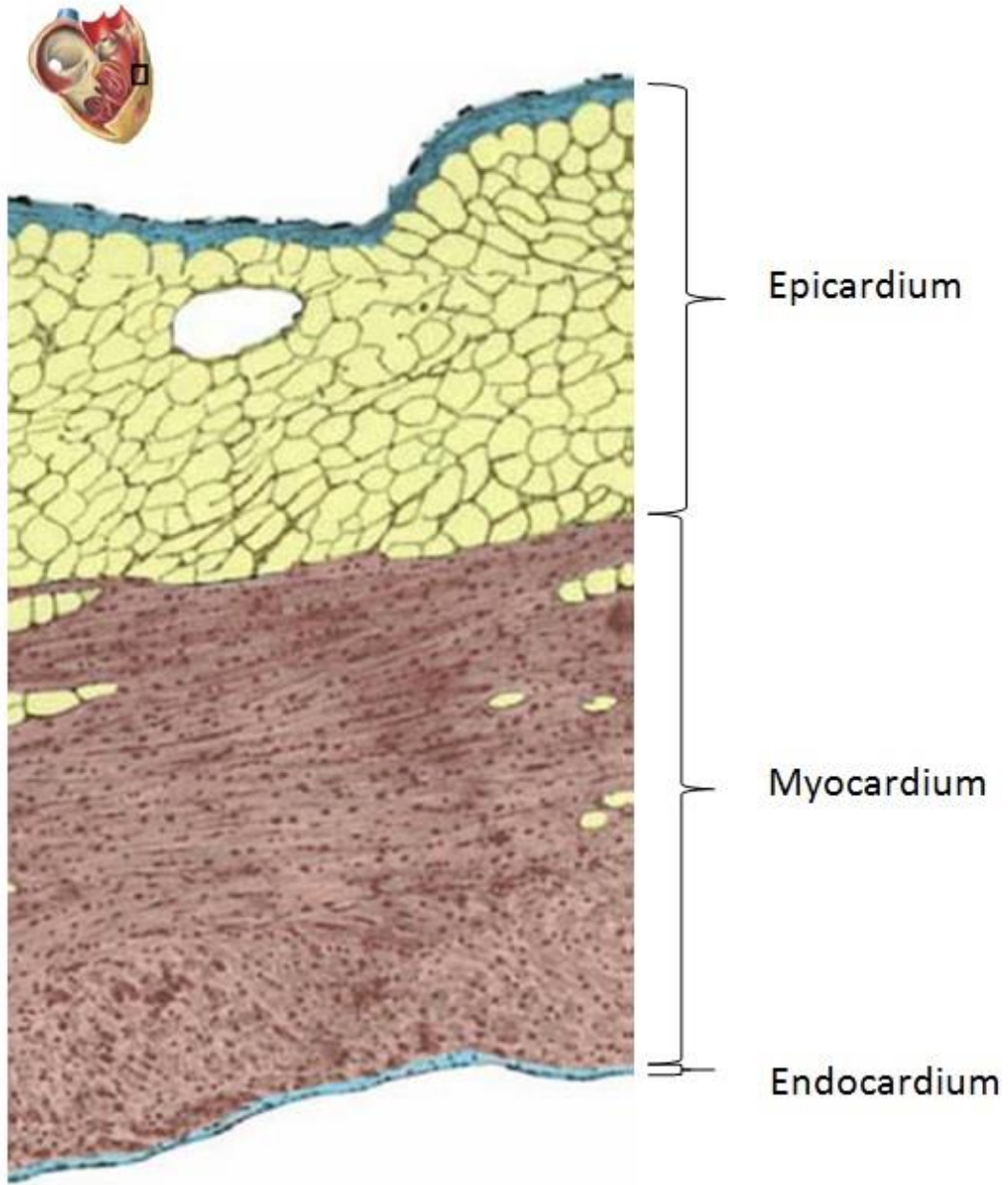
(<http://www.hdwalls.xyz/> 2015) Modifiye edilmiştir.

Şekil 2: Kalbin embriyolojik gelişimi

Kalp duvarı ise 3 tabakadan oluşmuştur (Şekil 3).

### 2.1.2.1 Endokard (Endocardium )

Atriyumların ve ventriküllerin iç yüzeyini döşeyen aynı zamanda kalp kapaklarının oluşumuna katılan endotel tabakasıdır. Endotel tabakasını miyokarda bağlayan damarlanması zengin gevşek bağ dokusundan oluşan tabakaya ise subendotelyal tabaka denir. Subendotelyal tabakada ayrıca sinirler ve purkinje lifleri de bulunur. Endokard kalınlığı genelde miyokardla ters orantılı olarak değişmektedir yani atriyumlarda endokard ventriküllere göre daha kalın bir yapıdadır (Junqueira 2006).



(Sobotta 2011) Modifiye edilmiştir.

Şekil 3: Kalp duvarının tabakaları

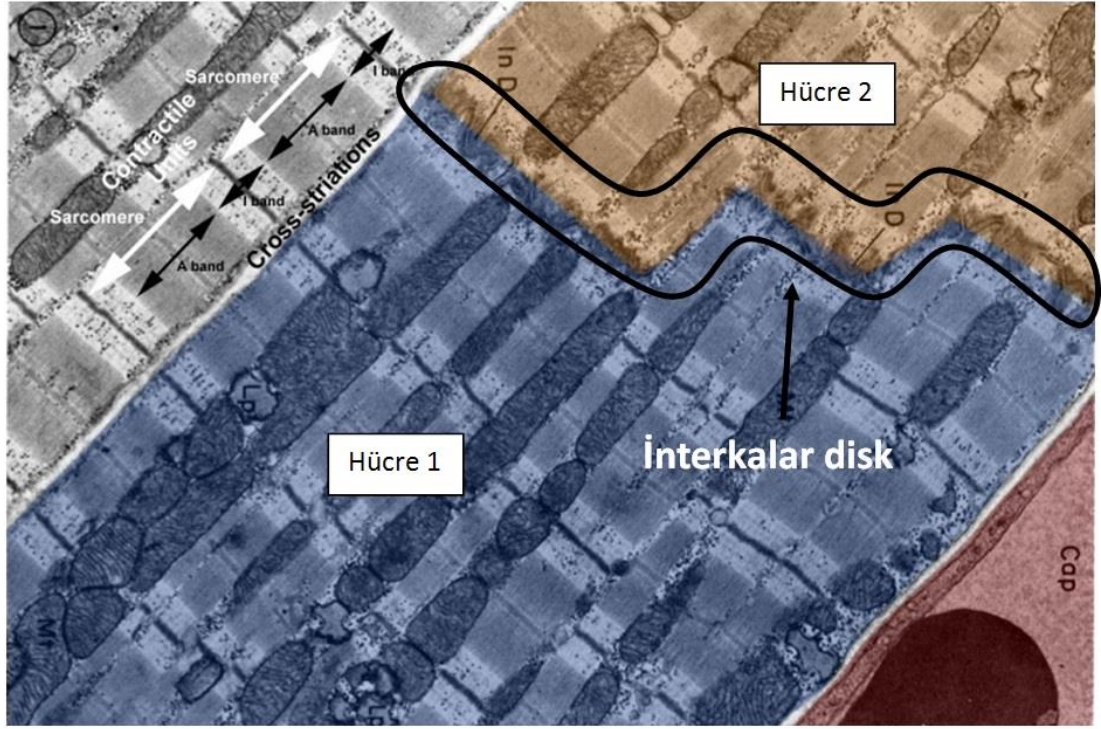
### 2.1.2.2 Miyokard (Myocardium)

Ortadaki kas tabakası olup en kalın olan tabakadır. 3 katmandan oluşan kas tabakası içte ve dışta spiral ortada ise sirküler seyreden liflerden oluşmuştur. Miyokard

en belirgin olarak ventriküllerde bulunmakla birlikte en kalın olduğu yer sol ventriküldür. Bu kalınlık her odacıkta, odacıkların fonksiyonel ihtiyaçlarına göre değişir. Kalp kası hücreleri yapısal olarak iskelet kasına benzemekle birlikte aralarında farklılıklar mevcuttur. Kalp kası hücreleri dallanarak birbirleri ile kompleks bağlantılar yaparlar. Bu bağlantılar kalbin kas tabakasının bir ağ gibi örülmüş hücrelerden oluşmasına ve böylece kasılma esnasında derinlemesine bir dalga etkisi oluşmasına sebep olurlar. Kalp kası hücrelerinin histolojik olarak incelenmesinde, hücrelerin oluşturduğu zincirleri düzensiz aralıklarla enlemesine kesen koyu renkli çizgilenmeler görülmektedir. Bunlar birbirine komşu kalp kası hücrelerinin birleşme yerlerinde bulunan kompleks bağlantı bölümleri olup interkalar diskler (*discus intercalaris*) (Şekil 4) olarak isimlendirilirler. İnterkalar diskler her zaman düz olmayıp basamaklı bir yapı da gösterebilirler. Basamaklı yapıda enine bölüm kas liflerine dik pozisyonda lateral bölüm ise paralel pozisyonudur. Bu disklerde yapısal olarak 3 farklı bağlantı şekli bulunmaktadır. Fasya adherens, makula adherens (desmozom) ve gap junction (neksus) olarak sınıflanan bu bağlantı şekillerinden neksuslar diskin lateral bölümünde olup hücreler arası iyonik devamlılığı sağlarlar (Junqueira 2006; Ross 2011).

### **2.1.2.3 Epikard (Epicardium)**

Kalbin en dış yüzeyini saran seröz visseral perikard ve değişen miktarda yağ dokusundan oluşmuştur. Perikard açıldığında kalbe parlak görüntüsünü veren bu tabakadır (Ross 2011).



([https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/ANAT2511\\_Muscle\\_Tissue](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/ANAT2511_Muscle_Tissue) 2015)  
Modifiye edilmiştir.

Şekil 4: Kalp kası hücrelerinin elektron mikroskop görüntüsü.

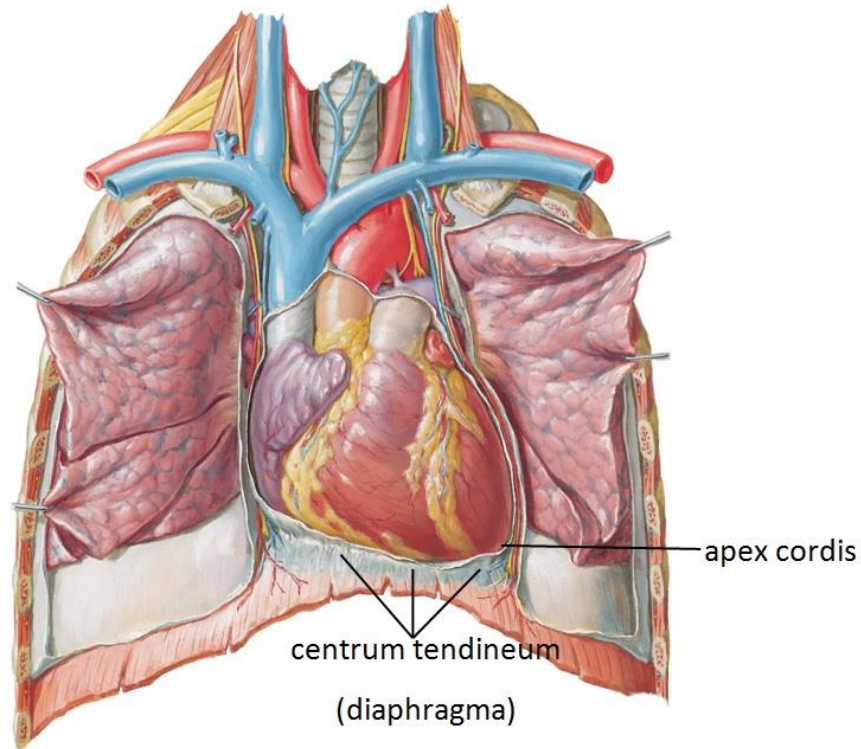
### 2.1.3 Anatomisi

Kalp orta mediastinumda yerleşmiş, büyük oranda kas dokusundan oluşan içi boş kesik koni şeklinde bir organdır (Şekil 5). Kalbin yaklaşık olarak 2/3'ü orta hattın sol tarafında bulunup göğüs ön duvarına arkaya göre daha yakın pozisyonda ve genellikle sağlıklı her insanın kendi yumruğu büyüklüğündedir. Yetişkin bir insanda boyutları yaklaşık olarak; 12 cm (taban-tepe) – 9cm (yatay eksen) – 6 cm (ön – arka) olup ağırlığı erkeklerde 280-340 gr kadınlarda ise 230-280 gr civarındadır. Ventriküller (sağ ve sol) ve atriyumlar (sağ ve sol) denilen odacıklar ile kalp boşluğu esas olarak dört bölümden oluşmaktadır. Kalbin üç yüzü, bir kenarı, bir tabanı ve bir de tepesi vardır (Arıncı 2014; Sarsılmaz 2014).

Kalbin tabanı (basis cordis) arkaya, biraz yukarı, sağa doğru bakar ve büyük oranda sol atriyum, daha küçük bir bölümü ise sağ atriyum tarafından

oluşturulmaktadır. Kalbe gelen büyük venlerin tamamı kalbin tabanından girerek atriyumlara açılırlar (Cumhur 2012).

Koni şeklinde tanımlanan kalbin tepesi apex cordis olarak isimlendirilmiştir. Apex' in yönü; öne, aşağı ve sola doğrudur. Apex cordis' in göğüs ön duvarındaki izdüşümü 5. ve 6. kostalar arasında (5. interkostal aralık) ve orta hattan 8-10 cm solda bulunmaktadır (Williams 2008).



(Netter 2014) Modifiye edilmiştir.

Şekil 5: Kalp; anatomik yeri ve duruşu

Facies sternocostalis öne ve yukarı doğru bakar, bu yüzü büyük ölçüde sağ ventrikül kısmen de sağ atriyum ve sol ventrikül oluşturur. Kalbin bu yüzü; sternum, 4., 5. ve 6. kıkırdak kostalarla buna uyan interkostal aralıklara komşudur. Sternokostal yüzde kalp boşluklarını birbirinden ayıran bölmelerin izdüşümleri şeklinde olan ve içerisinde kalbin kendi dokusunun kanlanmasını sağlayan koroner damarların seyrettiği iki oluk dikkat çekmektedir. Bunlardan sağ ve sol ventriküller arasındaki bölmenin (septum interventriculare) pozisyonuna uyan ve kalbin tepesine doğru uzanan oluk sulcus interventricularis anterior olarak isimlendirilir. Diğer oluk ise

atriyumlar ile ventrikülleri ayıran sınırın dışarıdan anlaşılmasını sağlayan sulcus coronarius' dur. Sulcus coronarius ön yüzde sağ atriyumu sağ ventrikülden ayırır (Williams 2008).

Facies diaphragmatica, diaphragma üzerine oturmuştur ve kalbin alt-arka yüzünü oluşturur. Bu yüz büyük ölçüde sol ventrikül olmak üzere her iki ventrikül tarafından oluşturulur. Diaphragma aracılığı ile midenin fundusu ve karaciğer ile komşuluk yapar. Sulcus coronarius'ta seyreden ve büyük bir ven olan sinus coronarius bu yüzü kalbin tabanından ayırır. Yine bu yüzde ventriküllerin birleşme yerine uyan konumda bulunan ve içerisinde koroner damarların seyrettiği sulcus interventricularis posterior denilen oluk bulunur. Sinus coronarius'dan apex'e doğru uzanan bu oluk apex cordis'in hemen sağında ön yüzde bulunan olukla (sulcus interventricularis anterior) birleşerek incisura apicis cordis denilen çentiği meydana getirirler (Arıncı 2014).

Facies pulmonalis sinistra; margo optusus olarak da bilinir ve bu bölüm kalbin akciğerler ile temasından dolayı kenardan çok yüzü hatırlattığı için genelde facies pulmonalis sinistra olarak isimlendirilir. Bu yüzü auricula sinistra, sol atriyum ve sol ventrikül meydana getirir. Kalbin sağ kenarı; sağ akciğere bakar (facies pulmonalis dextra) direkt grafide keskin bir kenar gibi görüldüğü için margo acutus denilir. Facies pulmonalis dextra'yı sağ atriyum oluşturur (Sarsılmaz 2014).

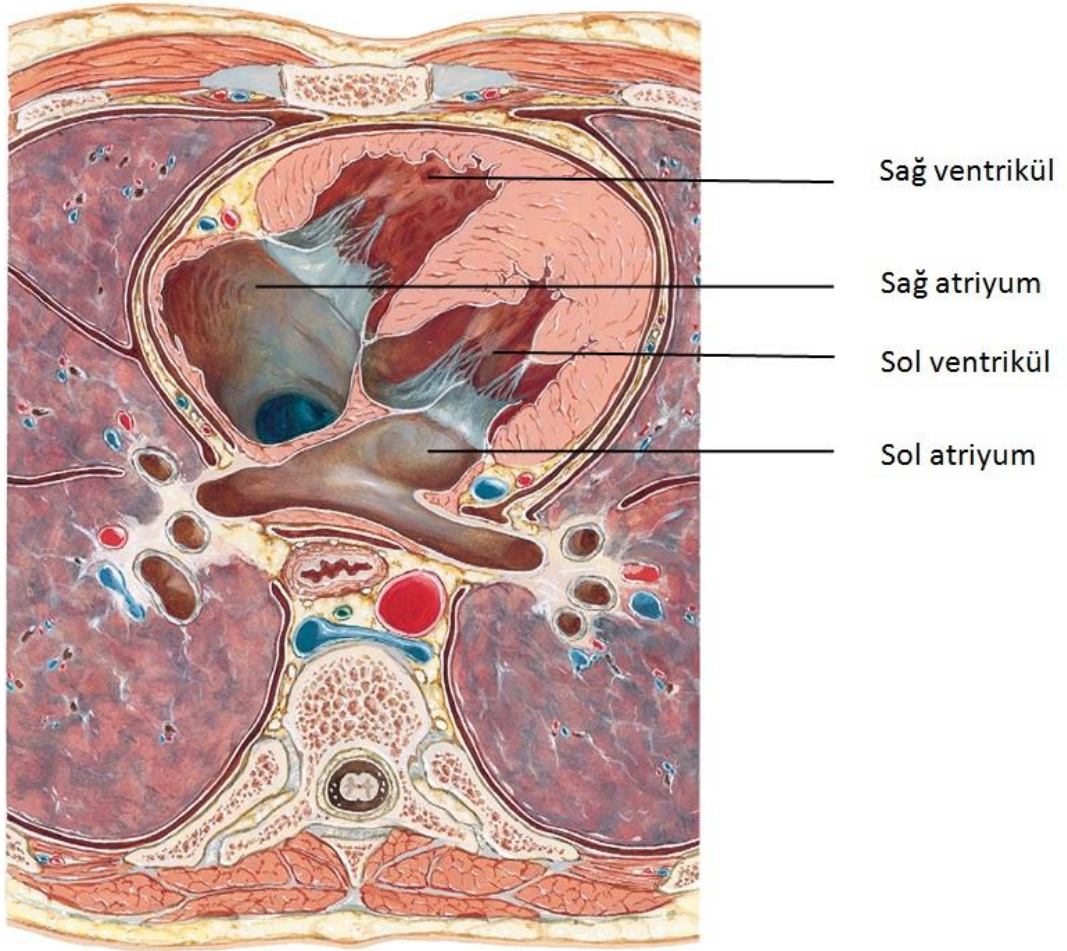
### **2.1.3.1 Kalbin Boşlukları**

Fonksiyonel olarak kalp sağ kalp (sağ atriyum ve sağ ventrikül) ve sol kalpten (sol atriyum ve sol ventrikül) oluşur (Şekil 6). Sağ ve sol kalbi oluşturan boşluklardan kalbin taban kısmında ve anatomik pozisyonda geride olanlar atriyumlardır (atrium cordis). Sağdaki atrium dextrum, soldaki atrium sinistrum olarak isimlendirilir. Daha büyük olan boşluklar ise kalp ventrikülleri (ventriculus cordis) olup ventriculus dexter ve ventriculus sinister olarak isimlendirilirler. Sağ ve sol kalp birbirlerinden atriyumlar arasındaki septum interatriale ve ventriküller arasındaki bölme olan septum interventriculare ile ayrılır (Arıncı 2014).

Sağ atriyum (atrium dextrum); kalbin sağ üst kenarında yerleşmiş ve küp şeklinde olup embriyolojik gelişim bakımından iki bölgeden oluşur. Crista terminalis

(v. cava superior'un önündeki endotelyal plika) denilen sınırla ayrılan bu bölgelerden birincisi esas atriyum (atrium proprium) olarak isimlendirilir. Auricula dextra' nın da dâhil olduğu bu bölge musculus pectinealis'ler nedeniyle girintili çıkıntılı bir görünüm kazanmıştır. İkincisi ise embriyolojik olarak sinus venosus' tan gelişen ve sinus venarum cavarum olarak isimlendirilen bölgedir ki sistemik dolaşımdaki venöz kanı getiren büyük damarlar (vena cava superior, vena cava inferior) buraya açılır. Sinus venarum cavarum'un duvarı atriyumları ayıran septum gibi düzgündür. Vena cava inferior'un ağzının medialinde kalbin venöz kanının drene olduğu sinüs coronarius'un ağızlanma yeri vardır ve ostium sinus coronarii olarak isimlendirilir. Atriyumları ayıran septum üzerinde intrauterin dönemde kanın sağ atriyumdan sol atriyuma geçmesini sağlayan foramen ovale isimli delik bulunur. Bu delik doğumdan sonra solunumun ve aktif pulmoner dolaşımın başlamasıyla kapanır ve sığ bir çukura döner. Bu çukura fossa ovalis denir. Sağ ventrikülü (ventriculus dexter) crista supraventricularis isimli bir düz kas kabartısı kısmen ikiye böler. Bu şekilde sağ atriyumdan gelen kanın giriş yolu ve sağ ventrikülden çıkacak kanın çıkış yolu ayrılmış olur. Ventrikülün üst kısmında koni şeklindeki infundibulum veya conus arteriosus denilen bölge kanın orificium pulmonale aracılığı ile truncus pulmonalis'e geçmesini sağlar. Conus arteriosus'un duvarları düzgün iken, geride kalan ventrikül yüzeylerinde trabecula carnae isimli oldukça çıkıntılı kas kabartıları vardır. En az bir trabecula carnae, septum interventriculare ile ön duvar arasında köprü oluşturacak şekilde uzanarak trabecula septomarginalis adını alır. Bu trabekül boyunca His demeti'nin (fasciculus atrioventricularis) bir dalı olan moderatör bant uzanır. Sol atriyum (atrium sinistrum); boşluğu da sağ atriyum kadar belirgin olmasa da, iki kısma bölünmüştür. Pulmoner venlerin açıldığı arka kısım düzgün yüzeyli bir duvara sahipken musculus pectinealis'lere sahip ön kısım duvarı sol auricula ile devam eder. Bu kısım embriyonik atriyumdan oluşmuştur. Septumdaki ince bölge valvula foraminis ovalis'dir. Burası sağ atriyumdan, foramen ovale'nin döşemesi olarak görülen yapıdır. Sol ventrikül (ventriculus sinister); koni şeklinde bir boşluk olup, sol atriyumun önünde yerleşmiştir. Enine kesitte ise neredeyse tam daire şeklindedir. Kanın sol ventrikülde içeri ve dışı doğru akış yolları sağ ventriküldeki kadar net belirlenmiş değildir. Sistemik dolaşıma pompalanan kanın çıktığı yer olan sol ventrikül en kalın kas (miyokard) katlarına sahiptir. Sol ventriküldeki trabecula carnea'lar sağdakinin aksine daha ince ve narin

yapıdadırlar. Septum interventriculare; sağ ventrikülün büyük bölümü sol ventrikülün önünde yerleştiği için sol ventrikülün ön sağ tarafında bulunur. Kalın ve ince olan iki kısımdan oluşan septumun kalın kısmı pars muscularis olarak isimlendirilir. Yukarıda, atriyum ile ventrikül arasındaki geçiş yerinde septum ince ve membranöz yapıda olup buraya da pars membranacea denir. Pars membranacea'nın ufak bir parçası, sağ atrioventriküler kapağın (triküspit kapak) tutunduğu yerin hemen üstünde uzanır. Böylelikle sağ atriyum ile sol ventrikül arasında da uzanmış olur. Sağ atriyum ile sol ventrikülün komşuluk yaptığı bu kısma septum atrioventriculare denir (Williams 2008; Arıncı 2014; Sarsılmaz 2014).



(Netter 2014) Modifiye edilmiştir.

Şekil 6: Kalp transvers kesit, kalp boşlukları (T8 seviyesinden alttan görünüm)



### **2.1.3.2 Atriyum ve Ventriküller Arası Geçitler (Ostia atrioventricularia)**

Atriyumlar ile ventriküller arasında iki geçit vardır. Sırasıyla bu geçitlere; sağ atriyum ve sağ ventrikül arasında ostium atrioventriculare dextrum, sol atriyum ve sol ventrikül arasındakine de ostium atrioventriculare sinistrum adı verilir. Bu geçitlerde atriyumlardan ventriküllere kanın geçişini kontrol eden kapaklar bulunmaktadır (Sarsılmaz 2014).

### **2.1.3.3 Ventriküllerin Çıkışındaki Geçitler (Ostia arteriosa)**

Kalpten sistemik ve pulmoner dolaşıma pompalanan kanı taşıyan iki büyük arterin sağ ve sol ventrikülden çıkış yaptıkları yerlerde iki geçit bulunur. Sol ventrikülden aorta'nın çıktığı yer ostium aorta, sağ ventrikülden truncus pulmonalis'in çıktığı yer ise ostium trunci pulmonalis olarak isimlendirilir. Yine bu geçitlerin ağızlarında geçişi kontrol eden kapaklar bulunur (Sarsılmaz 2014).

### **2.1.3.4 Kalp Kapakları**

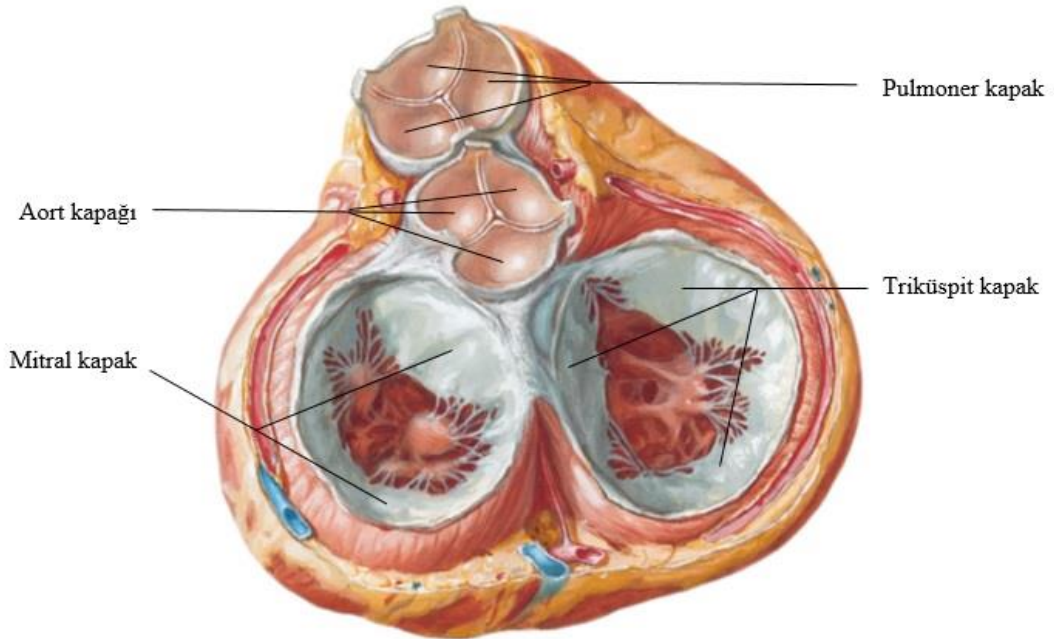
Valva atrioventriculare dextra (valva tricuspidalis, Triküs pit kapak); ostium atrioventriculare dextrum'da bulunan sağ atriyum ve sağ ventrikül arasında kan geçişini kontrol eden kapaktır (Şekil 7). Cuspis anterior, cuspis posterior ve cuspis septalis olmak üzere 3 adet üçgen şeklinde kapakçıktan meydana gelir. Bu kapakçıklar yapı itibarıyla, endokardiyumun fibröz bağ dokusu lifleri ile güçlendirilmesiyle oluşmuştur. Bu kapakçıklar ostium atrioventriculare dextrum'u saran anulus fibrosus dexter isimli bağ dokusu yapılara tutunur, serbest kenarları ise ventrikül boşluğuna uzanır. Bu kapakçıkların ventriküllere bakan yüzlerindeki çıkıntılara chorda tendinea denilen ince bağ dokusu lifleri tutunur. Bu lifler de ventriküllerde bulunan m. papillaris isimli parmaklı çıkıntılar şeklindeki kaslara tutunurlar.

Valva atrioventriculare sinistra (valva bicuspidalis, Mitral kapak); ostium atrioventriculare sinistrum'da bulunur ve sağdakine göre biraz daha küçük olup cuspis

anterior ve cuspis posterior olmak üzere iki kapakçıktan oluşmuştur (Şekil 7). Bu kapakçıkları sol ventrikül duvarındaki m. papillaris'lere bağlayan chorda tendinea'lar sağ tarafa göre daha kalın fakat daha az sayıdadırlar.

Valva trunci pulmonalis; ostium trunci pulmonalis'i saran fibröz halkaya tutunmuş üç adet semilunar kapakçıktan (valvula semilunaris anterior, valvula semilunaris dextra ve valvula semilunaris sinistra) oluşmuştur (Şekil 7). Kapakçıkların damar boşluğuna doğru uzanan serbest kenarlarının uç kısımlarında noduli valvularium semilunarium (corpora arantii) denilen nodüller bulunmaktadır. Nodül ile damar duvarı arasında bulunan kapakçık bölümüne ise lunula valvularum semilunarium denilir.

Valva aorta; yapısal olarak valva trunci pulmonalis'teki kapakçıkların aynısı fakat daha büyük, daha kalın ve daha sağlam olan üç adet semilunar kapakçıktan (valvula semilunaris posterior, valvula semilunaris dextra ve valvula semilunaris sinistra) oluşmuştur (Şekil 7). Bu kapakçıklar ile aort duvarı arasında cep şeklinde bölümler bulunmakta ve sinus aortae (sinus valsalvae) olarak isimlendirilmektedir. Bu sinusların ikisinden kalp dokusunu besleyen koroner arterler başlar (Arıncı 2014; Sarsılmaz 2014).



(Netter 2014) Modifiye edilmiştir.

Şekil 7: Kalp kapakları

### 2.1.3.5 Kalbin Kan Dolaşımı (Koroner Arterler ve Venler)

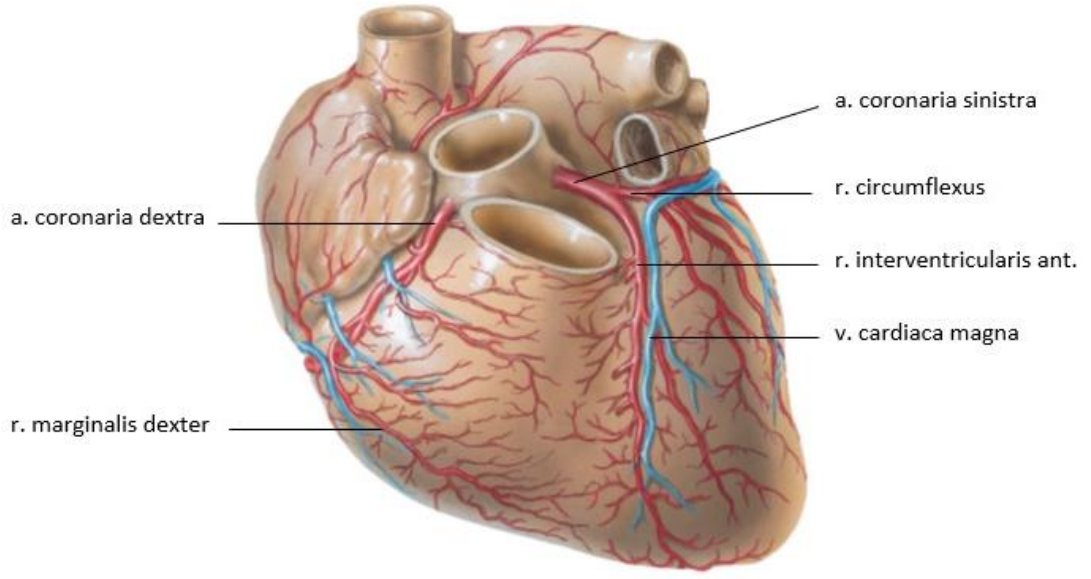
Sağ ve sol koroner arterler, aort'un sol ventrikülden ayrıldığı yerin hemen üzerinde bulbus aorta'dan köken alırlar (Şekil 8).

Sağ koroner arter (a. coronaria dextra); bulbus aorta'dan çıktıktan sonra sağa doğru ilerleyerek sağ atriyum ve sağ ventrikül arasındaki sulcus coronarius'tan aşağıya doğru iner. Sonra kalbin sağ kenarından arkaya dönerek sulcus coronarius'taki seyrine devam eder. Gidişatı esnasında sağ atriyum ve sağ ventrikülü besler. Sağ koroner arterin en büyük dalı sulcus interventricularis posterior'dan apex'e doğru ilerleyen ramus interventricularis posterior'dur. Bu dal her iki ventrikülün diyafragmatik yüzlerini ve septum interventriculare' nin arka 1/3'ünü besler. Ayrıca, kalbin sağ kenarı hizasında verdiği diğer bir dal ramus marginalis dexter olarak isimlendirilir.

Sol koroner arter (a. coronaria sinistra); bulbus aortadan çıkıp truncus pulmonalis'in arkasında kısa bir seyirden sonra iki dala (ramus interventricularis anterior ve ramus circumflexus) ayrılır. Ramus interventricularis anterior, sulcus interventricularis anterior'da seyrederek apex'e doğru iner. Her iki ventrikülün kanlanmasında da rol oynar. Ayrıca septum interventriculare' nin 2/3 ön kısmının kanlanmasını sağlar. Ramus circumflexus, sulcus coronarius içinde sola doğru ilerlerken önce auricula sinistra ve sol ventrikül içindedir. Sonra kalbin arka yüzünü çevreler ve genellikle de sulcus interventricularis posterior'a ulaşmaz. Bu arterin en büyük dalı veya devamı olan rami ventriculi sinistri posterior, sol ventrikülün diyafragmatik yüzünü besler (Williams 2008).

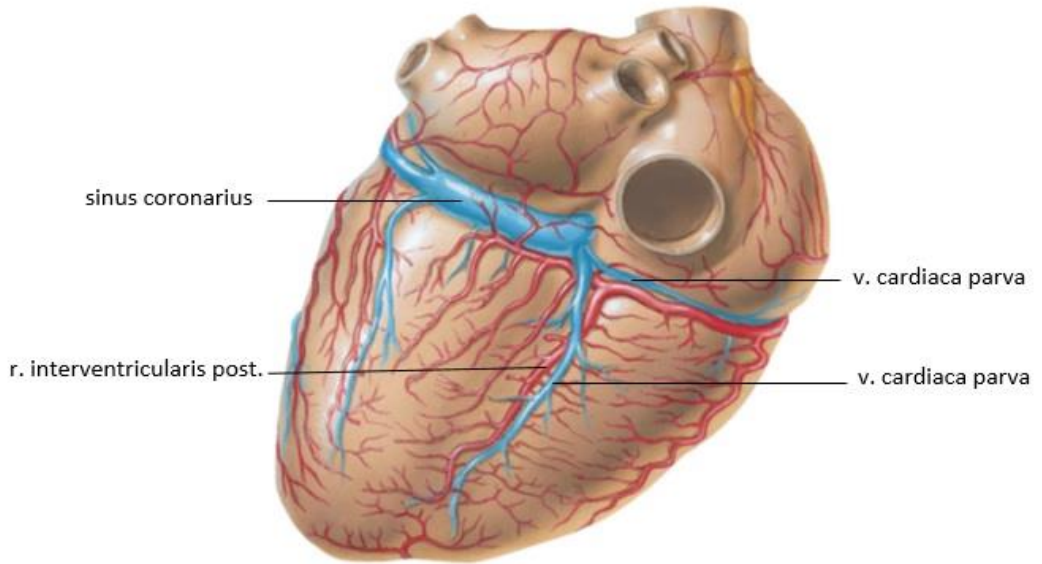
Kalp dokusu venöz kanının çoğu arterlere eşlik eden venlerle toplanarak sinus coronarius 'ta sonlanır. Sinus coronarius kalp venöz kanının yaklaşık olarak %60' lık bölümünü sağ atriuma ulaştırırken venöz kanın kalan %40'lık kısmı kalbin boşluklarına doğrudan açılan küçük venlerle drene edilir.

Vena cordis (cardiaca) magna, sulcus interventricularis anterior'da sol koroner arterin r. interventricularis anterior'una eşlik ederek yukarı doğru uzanır. Sinus coronarius'a ulaşmak için a. circumflexa'nın yanında seyretmek üzere sola döner ve sinus coronarius'a dönüşür.



(Netter 2014) Modifiye edilmiştir.

Şekil 8: Kalp arter ve venleri (Sternokostal yüzden görünüm)



(Netter 2014) Modifiye edilmiştir.

Şekil 9: Kalp arter ve venleri (Diyafraqmatik yüzden görünüm)

Sinus coronarius; sulcus coronarius'un arka sol yanı üzerinde sağa doğru uzanan ve sağ atriyum arka duvarında sonlanan yaklaşık 3 cm uzunluğundaki kalın bir vendir. Sonlanmasına yakın yerde vena cordis media ve vena cordis parva'yı alır (Şekil 9).

Vena cordis media; sulcus interventricularis posterior'daki koroner artere yandaş olarak uzanarak sinus coronarius'a drene olur.

Vena cordis parva ise sağ koroner arter ile birlikte arkada sağ atriyum ve sağ ventrikül arasında sulcus coronarius içerisinde uzanarak sinus coronarius'a drene olur.

Sinus coronarius'a dökülen bütün bu venlere ek olarak iki ven grubu daha vardır;

Vv. cardiacea anteriores; sağ ventrikülün ön yüzünden kalkıp, sinus coronarius'un ön duvarını delerek sağ atriyuma dökülür.

Vv. cordis minimae; çoğu sağ atriyuma az bir kısmı da sol ventriküle açılırlar. Diseksiyonda görülemeyecek kadar küçük olan bu venler aynı zamanda doğrudan kalp boşluklarına açılırlar (Williams 2008).

#### **2.1.3.6 Kalbin Lenfatikleri**

Endokardiyum ve miyokardiyumdan gelen lenf damarları epikardiyuma komşu bir ağ oluştururlar. Sol yarıyı drene eden lenf damarları koroner damarların sol dalı boyunca uzanarak trakeanın alt ucundaki lenf düğümlerine boşalırlar. Sağ yarı lenfatikleri; kalbin sağ kenarı, sağ ventrikül alt yüzü ve sağ atriyumu drene ederek brakiosefalik lenf düğümlerinde sonlanır (Sarsılmaz 2014).

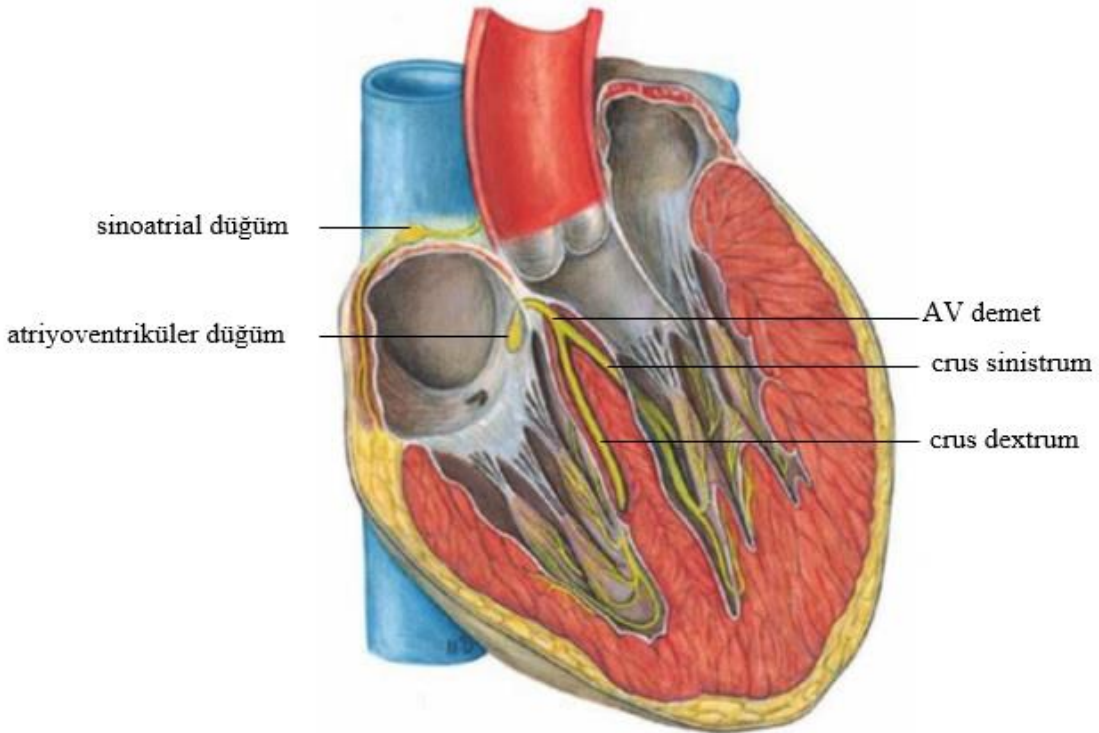
#### **2.1.3.7 Kalbin İletim Sistemi**

Myokardiyumun belli bölgelerinde özelleşmiş kalp kası hücreleri oldukça gelişmiş duyarlılık ve otomatik ritim oluşturma kabiliyetine sahiptir.

Sinoatriyal (SA) düğüm (Nodus sinoatrialis - Keith Flack); sağ atriyumda crista terminalis ve vena cava superior'un ağzı arasındadır. Uyarılar her iki atriyuma ve atriyoventriküler (AV) düğümüne yayılır. Kanlanması sağ koroner arterin dallarından gerçekleşir.

Atriyovenriküler düğüm (Nodus atrioventricularis-Ashoff Tawara); sağ atriyumun tabanında, septum interatriale'ye yakın, sinus coronarius'un sağ atriyuma açıldığı ağzın medialinde ve trikuspid kapağın septal kuspisinin üzerinde yerleşmiştir (Şekil 10). AV demet (His) buradan kaynaklanır. Kanlanması büyük oranda sağ koroner arterden sağlanır.

AV demet (His demeti); AV düğümünden doğar. Buradan anulus fibrosus ismi verilen atriyovenriküler halka (AV halkası)'ya geçer. Septum interventriculare'nin membranöz parçasının arka kenarından aşağı inerek septumun muskuler kısmına girer. Burada crus dextrum ve crus sinistrum şeklinde iki dala ayrılır. Her iki dal da musküler kısmın içinden aşağı inerek iki ventrikülün duvarlarında dağılırlar (Williams 2008).



(Sobotta 2011) Modifiye edilmiştir.

Şekil 10: Kalbin iletim sistemi

### 2.1.3.8 Kardiak İnnervasyon

Kalbe gelen sinirler sempatik ve parasempatik kardiak sinirlerdir. Sempatik kardiak lifler truncus sympathicus'a ait, üst-orta-alt servikal sempatik ganglionlar ile

ilk dört (veya beş) torakal sempatik ganglionlardan gelirler. Parasempatik lifler ise n. vagus tarafından taşınır.

Parasempatik ve sempatik kardiak sinirler arcus aorta'nın altında bifurcatio trachea'nın arkasında sinaps yaparak plexus cardiacus'u oluştururlar. Bu plexus'tan çıkan lifler koroner arter dallarıyla birlikte kalbe dağılırlar. Parasempatik aktivasyon kalp hızını azaltır ve atım hacmini düşürürken, sempatik aktivasyon kalp hızını ve atım hacmini artırır (Williams 2008; Sarsılmaz 2014).

### **2.1.3.9 Perikard**

Kalbi ve büyük damarların kök kısımlarını saran iki katlı seröfibröz yapıda bir kesedir.

Fibröz perikard (pericardium fibrosum); en dışta bulunan tabaka olup, yoğun, düzensiz yapıda bağ dokusundan oluşmuştur. Altta centrum tendineum'a (diyafragma'ya), önde birçok küçük ligamentle sternum'a, arkada da vertebralara tutunmuştur. Aort'un, truncus pulmonalisin, v. cava superior'un, v. cava inferior'un ve pulmoner venlerin tunica adventitia'sı ile devam eder.

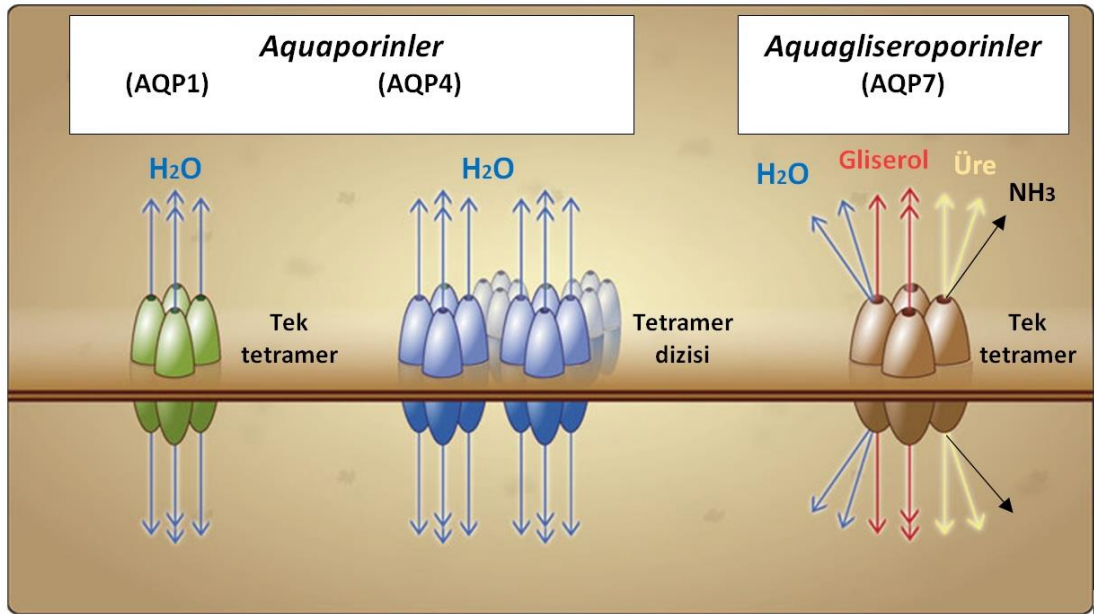
Seröz perikard (pericardium serosum); lamina parietalis ve lamina visceralis denilen iki tabakadan oluşur. Lamina parietalis, perikardiyal boşluğu döşeyen seröz mezotelyumdur ve fibröz perikardın iç yüzüne yapışıktır. Kalp kasının üzerini örten ince katman ise lamina visceralis olup epicardium olarak da isimlendirilmektedir.

İki seröz tabaka arasındaki boşluk olan cavitas pericardialis içerisinde liquor pericardii denilen yaklaşık 20-30 cc'lik bir sıvı vardır ve kalbin hareketini kolaylaştırır (Williams 2008; Arıncı 2014).

## 2.2 Aquaporinler

Spesifik su kanallarının varlığına dair fikirler uzun süredir öne sürülmekteydi. Benga ve ark. 1986'da su transferiyle ilgili olduğunu düşündükleri 28-kDa ağırlığında bir protein tanımladılar ancak bunun izolasyonunu ya da çoğaltılmasını gerçekleştirememişlerdir (Benga, Popescu et al. 1986; Benga 2006; Kuchel 2006). Bu proteinlerin bağımsız olarak varlığı Peter Agre ve grubu tarafından eritrositlerde ortaya çıkarılıp ve membran geçiş kanalları olarak tanımlanmıştır (Smith and Agre 1991). *Xenopus* oositlerinde bu proteinin ekspresyonunda, membran su geçirgenliğinin ciddi şekilde arttırdığı ve oositlerin hipoozmotik ortamda patladıkları görülmüştür (Agre 2004). Peter Agre bu buluşuyla 2003'te Nobel Kimya Ödülü'nü almaya hak kazandı.

Aquaporinlerin memelilerde benzer moleküler yapıya sahip 13 izoformu tanımlanmıştır. Bunlar yaklaşık 320 aminoasit kalıntısı uzunluğa sahip ve moleküler ağırlığı 28 kDa civarında, membranlar üzerinde bulunan tetramerler şeklindedir (Şekil 11) ve her monomerin kendine ait su kanalı bulunmaktadır.



(Rutkovskiy, Valen et al. 2013) Modifiye edilmiştir.

Şekil 11: AQP1, AQP4 ve aquagliseroporinlerin şematik gösterimi.



Monomere ait kanal aynı anda sadece bir su ya da gliserol molekülünün geçişine izin verirken katyon, anyon ve protonların geçişine müsaade etmez. Kanallar genellikle asparajin-prolin-alanin (NPA) şeklinde yüksek düzeyde korunmuş üç aminoasit dizisi içerirler. Aquaporinlerin bazı izoformlarının gazların ve ağır metal iyonların da transferini gerçekleştirdiği iddia edilse de (Wu and Beitz 2007; Boron 2010) bu henüz bir varsayımdan ibarettir. Kanalların üst düzey seçiciliği porların büyüklüğü ve yapılanması ile ilişilidir. İnsan vücudunda aquaporin ekspresyonunun olduğu en önemli yer böbreklerdir. Su reabsorbsiyonunda en önemli rol AQP2' ye ve buna yardımcı olarak AQP1, AQP3, AQP4, AQP6, AQP7 ve AQP8' e aittir (King, Kozono et al. 2004). Diğer bir kritik bölge de, esas olarak AQP4'ün bulunduğu beyindir (Amiry-Moghaddam, Otsuka et al. 2003). Muköz bezler ve tükürük bezleri de özellikle AQP5 olmak üzere aquaporin içerirler. Bu AQP'ler su geçişini sağlayarak solunum epiteli ve göz (Moore, Ma et al. 2000) gibi nemli dokuların korunmasını sağlar. Lens hidrsayonu ağırlıklı olarak AQP0'a bağlıdır (Fischbarg 2012). AQP1 ve AQP4 ekspresyonunun iskelet ve kalp kaslarında olduğu görülmüştür. Aquaporinlerin; dehidrasyon, enfeksiyon, iskemi gibi stres durumlarında koruyucu mekanizma içerisinde önemli rollerinin olduğu düşünülmektedir.

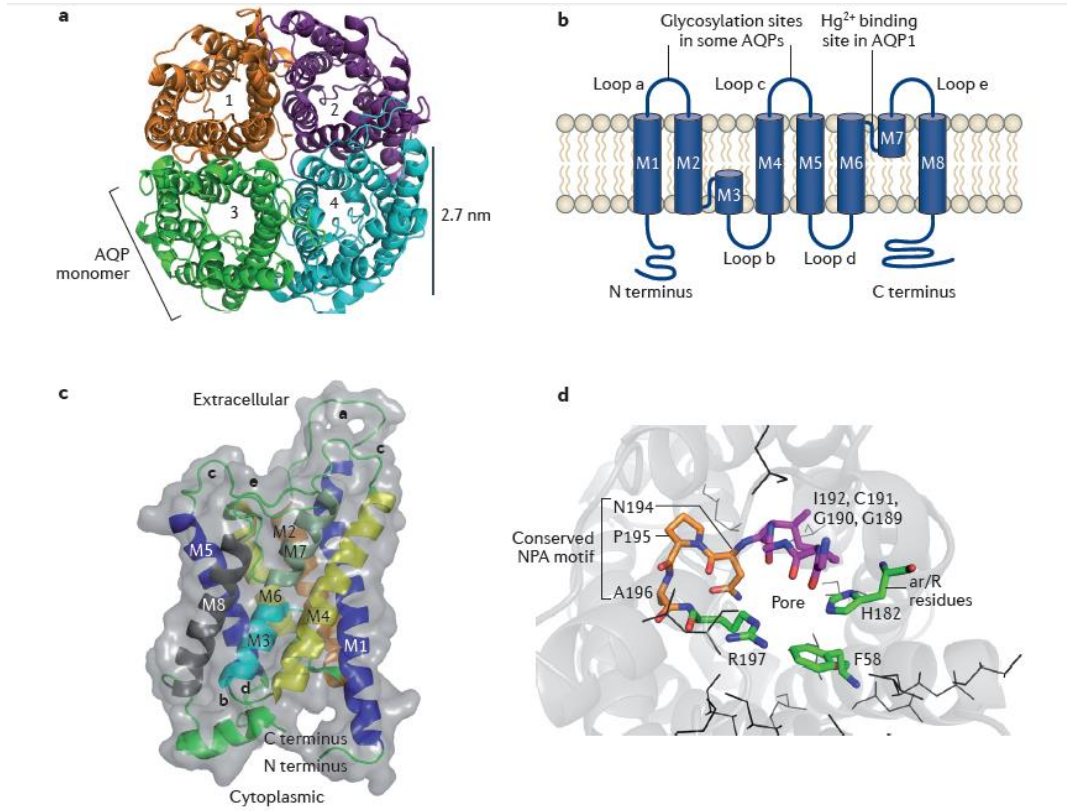
### **2.2.1 Aquaporinler ve Aquagliseroprinler**

Memelilerde suya geçirgen olan aquaporinler AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6, AQP8, AQP12 iken aquagliseroprinler AQP3, AQP7, AQP9 ve AQP10'dur. Her iki grup da aynı büyük protein ailesine ait ise de dizi benzerlikleri %30 civarındadır. Aquaporinler por merkezinde iki NPA dizisine sahip olup su için yüksek seçicilik gösterirken, aquagliseroprinlerde en az bir NPA dizisi asparajin-prolin-fenilalanin (NPF) veya asparajin-prolin-serin (NPS) ile yer değiştirerek por büyüklüğü artarak suyun yanında gliserol, üre ve amonyak gibi bazı küçük solütlerin de geçişine izin verilir. Ayrıca bu kanallar nispeten hidrofobiktir (Ishibashi, Kondo et al. 2010). Aquagliseroprinler çoğunlukla cilt, yağ dokusu ve karaciğerde bulunur. Son çalışmalar aquagliseroprinlerin gliserol metabolizmasında (Kuriyama, Kawamoto et al. 1997; Skowronski, Lebeck et al. 2007) ve cilt hidrasyonunda (Draeos 2012) rolleri

olduğunu göstermiştir. Şekil 11’de aquaporin ve aquagliseroporinlerin genel karakteristik özellikleri şematize edilmiştir. Sarmalın karboksi (C) ve N terminal uçları sitoplazma içerisinde bulunur.

## 2.2.2 Aquaporin Moleküler Yapısı

Aquaporinler membranlar üzerinde tetramerler şeklinde organize olmaktadır. AQP yapısını oluşturan monomerlerden her biri yaklaşık 28 kDa ağırlığında olup, altı  $\alpha$ -heliks (M1, M2, M4, M7 ve M8), iki yarım heliks (M3 ve M7) sarmalı ile beş te bağlayıcı koldan (a-e) oluşmaktadır (Şekil 12)(Verkman, Anderson et al. 2014).



(Verkman, Anderson et al. 2014) Modifiye edilmiştir.

Şekil 12: Aquaporinlerin moleküler yapısı

### 2.2.3 Aquaporin Tipleri ve Fonksiyonları

Permeabilite özelliklerine göre aquaporinler 3 grupta sınıflandırılabilir:

Su selektif aquaporinler (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 ve AQP8); Aquagliseroporinler; su, gliserol, üre ve bazı diğer solütleri geçirebilir (AQP3, AQP7, AQP9 ve AQP10). Subselüler aquaporin veya süper-aquaporinler (AQP11 ve AQP12) diğer aquaporinlerle benzerliği azdır (Murai-Hatano, Kuwagata et al. 2008).

AQP0; önceleri ana intrinsik protein olarak (MIP) bilinmekteydi. AQP0, sığır, kemirgenler gibi farklı türlerde ve insanlarda lens dokusunda bulunabilmektedir. Gözde lens akomodasyonu önemli hacim değişiklikleri ile ilişkilidir ki bu da hücre membran porlarıyla sağlanan hızlı su akışını gerektirir. Ayrıca AQP0'ın kan damarlarından yoksun olan lensin mikrosirkülasyonunda da muhtemel etkisi görülmektedir. Bulgular göstermiştir ki AQP0'ın su transferindeki etkisinin dışında lens fibril bileşkelerindeki aralıklarda oluşan hücre adhezyonunda da yapısal bir rolü bulunmaktadır (Harries, Akhavan et al. 2004). Diğer aquaporinlerin aksine AQP0'ın su geçirgenliği oldukça düşüktür. Lenste AQP1'e göre AQP0'ın su geçirgenliği 40 kez daha düşüktür (Liu, Xu et al. 2010).

AQP1; bu proteinlerden ilkidir ve insan eritrositlerinde tanımlanmıştır (Preston, Jung et al. 1993). Esas olarak kırmızı kan hücreleri, beyin, akciğerler ve böbreklerde eksprese edilen AQP1 su reabsorpsiyonu ve sıvı sekresyonu ile ilişkilidir. Böbrekte tanımlanmış aquaporinler (AQP1, AQP2, AQP3, AQP4) içerisinde en fazla eksprese edilen AQP1 özellikle su resorpsiyonun en fazla yapıldığı proksimal tübül ve henlenin inen ince kolunda bulunur (Tradtrantip, Tajima et al. 2009). Bu proteinin aynı zamanda kapiller endotelinde de eksprese edilmesi insanlarda su transportundaki önemini göstermektedir.

AQP2; başlıca böbreklerde eksprese edilmektedir ve bu proteinin mutasyonunun diabetes insipidus ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Deen, Verdijk et al. 1994). Aynı proteinin insan kulağında saccus endolymphaticus'da da eksprese edilmesi endolemf dengelinin sağlanmasında da aktif rol aldığını düşündürmektedir (Ishibashi 2009). AQP2'nin aynı zamanda köpeklerde rete testis, epididimis ve ductus deferens'de de bulunduğu bildirilmiştir (Domeniconi, Orsi et al. 2007).

AQP3; böbrekler,(Ishibashi, Sasaki et al. 1994) üriner sistem, sindirim sistemi, solunum sistemi (King, Choi et al. 2001), deri ve göz (Hamann, Zeuthen et al. 1998) gibi birçok değişik organda gösterilmiştir. Çoğu zaman bu proteinin ekspresyonu epitelyal hücreler ve lümen yüzeyinde gerçekleşmektedir. *X. Leavis* oositlerinin kullanıldığı birçok çalışmada bu proteinin gliserol ile etilen glikol, propilen glikol ve asetamid gibi bazı maddeleri de geçirdiği gösterilmiştir(Yamaji, Valdez et al. 2006).

AQP4; Serebral ödem vakalarında (iskemik, travmatik, inflamatuvar, tümöre bağlı vs.) bu proteinin ekspresyonun artması beyinde su dengesinin ayarlanmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (King, Choi et al. 2001).

AQP5'in özellikle alveolar epitel, trakea ve bronş ağacının üst bölümlerinde eksprese edildiği görülmüştür (Gomes, Agasse et al. 2009). AQP5'in akciğerlerde su dengesinin sürdürülmesinde önemli bir fonksiyonu bulunmaktadır (Verkman 2005). Oral mukozada tükürük salgınlmında (Tsubota, Hirai et al. 2001) ve tükürük bezi ile gözyaşı salgılarında da (Steinfeld, Cogan et al. 2001) fonksiyonu olduğu bildirilmiştir. Bu proteinin aynı zamanda korneal hücrelerde de tespit edilmesi epitel ve alttaki stromanın saydamlığının sürdürülmesindeki önemini göstermiştir.

AQP6; nın yapılan çalışmalarda intraselüler veziküllerde bulunduğu ve başlıca nitrat transferinde rol aldığı ayrıca böbrek tübüllerinde de bulunarak klorid gibi bazı iyonların geçişini sağladığı gösterilmiştir (Gomes, Agasse et al. 2009). AQP6 ile ilgili ayırıcı özellik, transmisyon elektron mikroskopu ile yapılan çalışmalarda bu proteinin hücre yüzeyinde değil böbrek toplayıcı kanal epitelyal hücrelerinde intraselüler veziküllerde bulunuyor olmasıdır.

AQP7'nin; bazı solütlerin yanında su geçirgenliği de bulunmaktadır. Bu protein başlıca yağ dokusu, testis, kalp, iskelet kası ve böbreklerde eksprese edilmektedir. Yağ dokusunda gliserol sekresyonunun daha kolay olmasının AQP7 varlığıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Rodriguez, Catalan et al. 2006). AQP7 ayrıca düşük molekül ağırlıklı noniyonik sürfaktanların geçişini de sağlamaktadır.

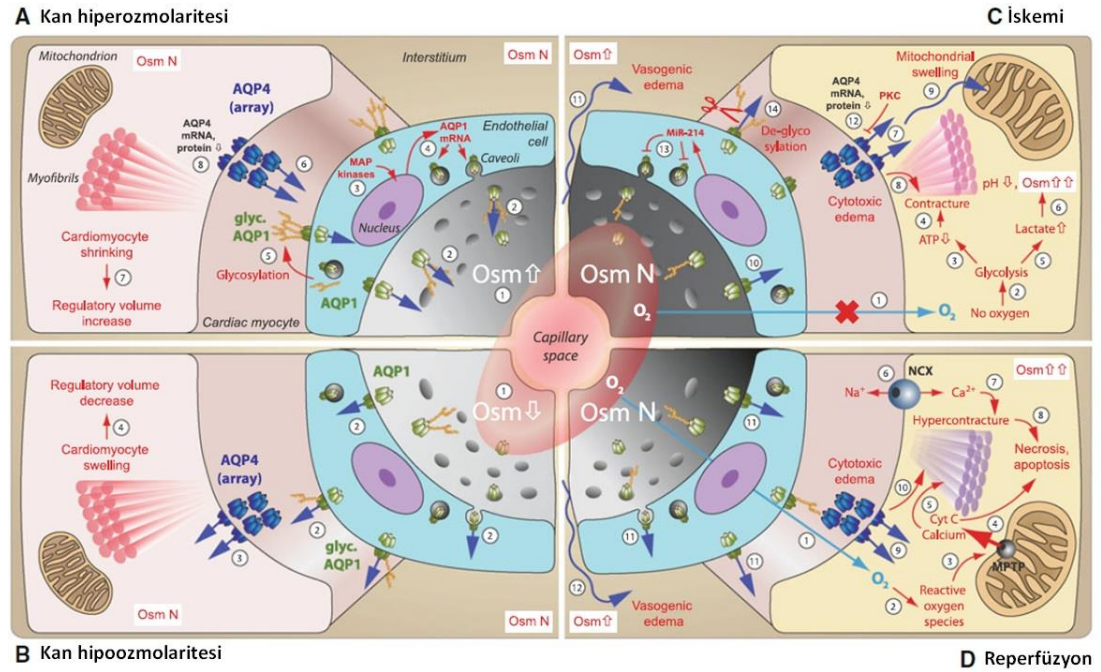
AQP8; birçok doku ve organda, özellikle de pankreas, karaciğer, tükürük bezleri, böbrekler, testisler, epididimis, duodenum, mide, jejenum, akciğer, trakea ve plasentada eksprese edilmektedir. İnsan, rat ve farelerde bu rekombinant proteinin indüksiyonu su geçirgenliği gösterirken AQP8 insan ve ratlarda üre ve gliserole geçirgen değildir. Bununla birlikte insanlarda AQP8' in formamid ve metilamonyum

gibi amonyak türevlerini geçirgen olması, invivo amonyak taşınmasında ve asit-baz dengesinde fizyolojik bir etkisi olduğunu göstermektedir (Liu, Nagase et al. 2006).

AQP9; karaciğer, lökosit, testis, beyin ve overlerde tanımlanmış olup su ve bazı küçük solütlerin geçişiyle ilişkili proteinlerdir. Bu proteinin laktat ve gliserole olan geçirgenliği enerji metabolizmasında önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (Tait, Saadoun et al. 2008; Gomes, Agasse et al. 2009).

AQP10; insanlarda ince bağırsakta özellikle de jejunumda bulunmaktadır (Ishibashi, Morinaga et al. 2002) ve emici epitelyal hücrelerde de bulunarak aquagliseroporinlerle benzer fonksiyonları göstermektedir.

AQP11 ve AQP12 süper-aquaporinler olarak isimlendirilen yeni bir alt sınıf aquaporin ailesindedirler (Ishibashi 2009). AQP11 böbrek, beyin, karaciğer, testis, kalp, bağırsak ve yağ dokusunda eksprese edilmekteyken, fonksiyonu net olarak bilinmemektedir. AQP12 sadece pankreas asiner hücrelerinde bulunmuştur ancak lokalizasyonu net olarak gösterilememiştir (Gorelick, Praetorius et al. 2006; Buffoli 2010). Bu proteinin pankreasta bulunması sindirim enzimlerinin ya da pankreatik hücre sıvılarının salınımında bir yolakla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Rojek, Praetorius et al. 2008).



(Rutkovskiy, Valen et al. 2013) Modifiye edilmiştir.

Şekil 13: Geçerli bilgiler ve varsayımlar ışığında AQP1 ve AQP4' ün kalpteki rolü

Dört panelde (**a-d**) dört farklı durum gösterilmiştir: Kan hiper-hipoozmolaritesi ile iskemi ve reperfüzyon. Şekilde resmedilen iki hücre aquaporin ihtiva eden kardiyomiyositler ve endotel hücrelerdir.

**a** Kan hiperozmolaritesi. Plazma ozmolaritesinin artması (1); interstisyel aralıktaki suyun endotel hücreleri üzerinden geçişine neden olur. Bu geçiş kısmen apikal ve bazolateral membranlarda ve kaveollarda eksprese edilen AQP1 (2) içerisinden gerçekleşir. Hiperozmolarite MAP kinaz cevabını (3) tetikleyerek AQP1 mRNA (4) ekspresyonunu stimüle eder. Hiperozmolarite aynı zamanda AQP1 moleküllerinin glikozilasyonunun artmasına neden olur (5). Ozmotik gradyenti yüksek olan kardiyomiyositler su geçişini plazma membranında kare diziler halinde bulunan AQP4'ler (6) üzerinden gerçekleştirir. Kardiyomiyositler su kaybederek büzülür ve 'regülatör volüm artışı' olarak isimlendirilen fizyolojik cevap ortaya çıkar (7). Bu esnada hücre AQP4 mRNA ve protein transkripsiyonu azalır (8).

**b** Kan hipoozmolaritesi. Bu durum fare ve insanlardaki aquaporin ekspresyonu yönüyle çalışılmamıştır. Buna rağmen, muhtemelen kan ozmotik basıncındaki düşüş(1) interstisyel aralığa AQP1 üzerinden (2) kısmi bir su geçişini stimüle edecektir. Daha sonra su AQP4 (3) üzerinden kardiyomiyositlere geçiş yapar. Kardiyomiyositlerin şişmesi regülatör volüm düşüşünü tetikler (4).

**c** İskemi. Miyokard dokusunda kan akımını durması hızlı bir oksijen yetmezliğine sebep olur (1) ve kardiyomiyositlerde diğer metabolik yol olan glikolizis (2) başlar. ATP üretimindeki büyük düşüş(3) miyofibrillerin kademeli olarak kontraktürüne (4) sebep olurken laktat fazlalığı (5) pH'yı düşürerek sitoplazma ozmolaritesi yükselir (6). Bu durum da difüzyon ve muhtemelen de AQP4 kanalları yoluyla su girişine neden olarak (7), bilinmeyen bir mekanizmayla meydana gelen kontraktürün (8) artmasına katkıda bulunur. Hücre şişmesi sonucu mitokondri de şişer (9). Kardiyomiyositlerdeki artmış ozmolarite interstisyuma yönelerek endotel hücrelerden interstisyuma su geçişine (AQP1 ile) neden olur (10). İskemik hasar sonucu parasellüler su transferinin artmasıyla endotel bariyer bozulur(11). İskemik kardiyomiyositlerde protein kinaz C' nin potansiyel etkisiyle AQP4 ekspresyonu azalırken (12), endotel hücrelerinde MİR-214 (13) muhtemel etkisiyle AQP1 ekspresyonu azalır ve protein deglikozilasyonu gerçekleşir (14).

d reperfüzyon. Oksijen dokuya tekrar girer (1) fakat tamamı solunumda kullanılmayarak zararlı oksijen türevlerinin(2) oluşumuna sebep olur. Bunlar da mitokondriyal permeabilite geçiş porlarının (MPTP) açılmasına (3) sebep olarak kalsiyum ve sitokrom C içeren düşük molekül ağırlıklı mitokondri içeriğinin sitoplazmaya salınmasına (4) sebep olur. Sitokrom C apoptozisi tetiklerken kalsiyum iskemik kontraktürün daha da artmasına sebep olur (5). Düşük pH'daki iskemik hücrelerde kan akımının tekrar başlaması  $Na^+/H^+$  değişimini tetikleyerek sodyum/kalsiyum pompasının ters yönde çalışmasına (6) sebep olur ve hücre içine kalsiyum pompalanır. Kalsiyum kontraktürü arttırırken (7) MPTP' nin de açılmasını stimüle eder ve sonuçta hücrenin apoptoz ve nekrozunu hızlandırır (8). Reperfüze kan normo-ozmotikken kardiyomiyositler laktat birikiminden dolayı hiperozmotiktir. Bu durum muhtemelen AQP4 (9) yoluyla su girişini fazlaca arttırarak iskemi esnasında oluşan sitotoksik ödemin ilerlemesine yol açar. Bu aşamada ayrıca AQP4 hiperkontraktürün oluşmasıyla ilişkili olabilir (10). İnterstisyumdan kardiyomiyositlere su geçişini kompanse etmek için kapiller lümeninden AQP1 (11) ve endotel duvar defektleri (12) yoluyla geçiş olur. Bu da vazojenik ödeme yol açar.

## 2.3 İmmunohistokimya

### 2.3.1 Genel Bilgiler

İmmunohistokimya; temel olarak işaretlenmiş antikor ile antijen birleşmesi reaksiyonudur. Çok duyarlı ve özgün bir boyama yöntemidir. Hücre veya dokularda yer alan bir molekülün tespit edilmesi için bu moleküle karşı hazırlanan işaretli antikorların ışık veya elektron mikroskobu düzeyinde gösterilmesi esasına dayanır. Belirlenmesi çok zor olan protein ve enzim gibi yapılar, immunohistokimyasal teknikler sayesinde gösterilebilmektedir. Bu tekniğin dezavantajı kullanılan maddelerin kısa ömürlü olması ve saklama koşullarına dikkat edilmediği takdirde bozulmasıdır (Osborn 1994; Demir 2001).

İmmunohistokimyasal çalışma, ilk olarak 1941 yılında fluoressan boyayla birleştirilmiş antijen-antikor kompleksinin dokuda gösterilmesiyle başlamıştır. Çok

hassas olan bu yöntemde, doku ve hücre elemanlarının lokalizasyonu kolaylıkla yapılabilmektedir. Ancak spesifik olmayan zemin boyanması, çapraz reaksiyon gelişmesi, yalancı pozitiflik bu tekniğin uygulanmasında karşılaşılan zorluklardır (Osborn 1994; Demir 2001).

### **2.3.2 İmmunohistokimya Kullanılan Antikorlar**

İmmunohistokimyasal boyamanın temel elemanı olan antikor molekülü karmaşık bir yapıya sahiptir. Antikorlar “Y” harfi şeklinde iki zincirden oluşur. Y’nin kısa bacakları antijene bağlanırken, uzun bacağı ise komplemana bağlanır. Bu boyamada poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki tür antikor kullanılır (Polak 1987; Kohler and Milstein 2005). Poliklonal antikorlar farklı hücreler tarafından üretilir ve bir antijen üzerinde farklı bölgelere bağlanır. Genellikle tavşanlardan elde edilir. Çok sayıda antikor içerdiklerinden dolayı, dokular için yeterince spesifik değildirler (Kohler and Milstein 2005). Monoklonal antikorlar belirli bir klona ait oldukları için antijen üzerindeki özel bir epitop ile reaksiyona girer. Sadece farelerden elde edilir. Poliklonal antikora göre avantajlı yönleri vardır. Bunlar; nonspesik antikorların bulunmayışı, yüksek homojenlik, parçalar ve bütün arasında varyasyonun olmamasıdır. Üretiminde karşılaşılan zorluklar, fiksasyon işleminde epitopun etkilenmesi, monoklonal antikorlar için dezavantajlardır (Demir 2001; Kohler and Milstein 2005).

### **2.3.3 İmmunohistokimya Metodları**

İmmunenzimatik ve immunfluoresan olmak üzere iki temel boyama metodu vardır.



### 2.3.3.1 İmmunenzimatik Boyama Metodları

Bu yöntemde reaksiyon sonucunu görmek için işaretli enzimler kullanılır. Enzimlerin renklendirilmiş reaksiyon ürünleri, mikroskopta antijen-antikor kompleksinin immun reaksiyonu sonucu olarak gözlenir. Alkalen fosfataz, b-galaktozidaz, glikoz oksidaz, horse-radish peroksidase (HRP) en sık kullanılan enzimlerdir. Dokuda veya hücrede bulunan antijen konsantrasyonunun fazla olması, boyanmanın daha da koyu olmasına neden olur (Polak 1987; Demir 2001). Direkt ve indirekt olmak üzere başlıca iki immunenzimatik boyama metodu vardır. Alınan dokunun özelliği, araştırmacının gereksinimi, duyarlılık derecesi, inkübasyon süresi ve maddi olanaklar tercih edilecek yöntemi belirleyen kriterlerdir (Polak 1987).

**Direkt Yöntem:** Bu yöntemde, bir antijen doğrudan işaretli olan ilgili antikora bağlanır. Tek bir antikor kullanıldığı için çok düşük boyanmalar görülebilir. Kullanımı giderek azalmaktadır (Polak 1987).

**İndirekt Yöntem:** Bu boyama metodunda, işaretlenmemiş primer antikor antijene bağlanır. İşaretlenmiş olan sekonder antikor, primer antikor-antijen kompleksini antijen olarak kabul eder ve bu komplekse bağlanır. Daha sonra bu ikili antikor yapısının üzerine substrat-kromojen solüsyonu ilave edilir. Primer antikor ve sekonder antikorun elde edildiği immunglobulin uyumlu olmalıdır. Doku ve antikor uyumsuzluğu, reaksiyonun gerçekleşmemesi, sonucu olumsuz şekilde etkiler (Polak 1987). İndirekt yöntem, direkt yönteme göre daha fazla tercih edilir. Duyarlılığı daha fazladır. Birden fazla sekonder antikorla birleşmenin olabilmesi, indirekt yöntem için avantajdır. Kullanılan maddeye göre bu yöntem üçe ayrılır:

**a- Avidin-Biyotin Yöntemi (ABC Metodu):** Avidin, yumurta akından elde edilen bir glukoproteindir. Karaciğerde bulunan vitaminlerden olan biyotine karşı yüksek bir afinitesi vardır. ABC Metodu bu afiniteden yararlanılarak yapılan bir yöntemdir. Duyarlılığı diğer metotlara göre daha fazladır. Biyotinli sekonder antikorun üzerine peroksidaz enzimiyle işaretli avidin-biyotin kompleksi ilave edilir. Daha sonra substrat-kromojen solüsyonu eklenerek doku antijeni görünür hale getirilir (Hsu, Raine et al. 1981; Demir 2001).

**b- Enzim-Antienzim Kompleks Yöntemi (PAP Metodu):** İşaretsiz antikor metodu olarak bilinen bu yöntemde, sekonder antikorun üzerine çözünebilirliği yüksek

olan enzim-antienzim immün kompleksi ve substrat-kromojen solüsyonu ilave edilir. Enzim-antienzim kompleksleri peroksidaz-antiperoksidaz (PAP), alkalın fosfataz-antialkalın fosfataz (APAP), glikoz oksidaz-antiglikoz oksidaz (GAG) şeklinde olabilir. En sık peroksidaz-antiperoksidaz kompleksi kullanılır (Polak 1987; Demir 2001).

**c- İndirekt İmmunoperoksidaz Yöntemi:** Doku antijenine bağlanmış olan primer antikor üzerine peroksidaz taşıyan sekonder antikor eklenir. Oluşan bu yapı üzerine substrat kromojen bileşiği ilave edilir (Polak 1987; Demir 2001).

### **2.3.3.2 İmmunfluoresan Boyama Metodları**

Bu yöntemde, antikorlara bağlamak için fluorezan bir madde (fluorokrom) kullanılır. Bu madde yüksek oranda kısa dalga ışınlarını absorbe edebilme özelliğine sahip olmalıdır. Fluorokrom için uygun filtreler kullanılır. Fluorezan mikroskop altında ortaya çıkan mavi, yeşil ve kırmızı renklere göre değerlendirme yapılır (Osborn 1994).

### 3 GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Hayvanların Temini

Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi yerel etik kurul izni (HADYEK-78) alındıktan sonra Gaziosmanpaşa Deneysel Tıp Araştırma Birimi'nde (DETAB) gerçekleştirildi. Çalışmada 14 adet Balb/C cinsi beyaz fare (50-80 g) kullanıldı. Hayvanlar yedişerli iki eşit gruba bölündü. Grup I iki aylık genç hayvanlar grubu (n=7), Grup II 18 aylık yaşlı hayvanlar grubu (n=7) olarak düzenlendi. Uygulama öncesinde fareler oda sıcaklığında ( $22\pm 1$  °C) ve %40-50 nem oranında tutuldu. Işık düzeni ise 12 saat gündüz, 12 saat gece olacak şekilde ayarlandı. Yeme ve içmeleri serbest bırakıldı. 1 hafta gözlem altında tutulan sıçanların günlük fizik muayeneleri yapıldı.

#### 3.2 Örneklerin Alınması

Herhangi bir sağlık problemi olmayan fareler ketamin/ ksilazin (50/10 mg/kg) anestezisi altında eksanguinasyon yolu ile öldürüldü. Kalp dokusu çıkarılarak yarısı sıvı azot tankında hızlı bir şekilde soğutularak western blot uygulaması için -80 °C' de saklandı. Alınan kalp dokusunun diğer yarısı ise immunohistokimyasal ve histopatolojik değerlendirmelerde kullanılmak üzere % 10'luk formalin solüsyonuna alındı.

#### 3.3 Kalp Dokusunun Histolojik Olarak İncelenmesi

Kalp dokuları çıkarılarak % 10'luk formaline alındı. Rutin histolojik takipler (Tablo 1) yapıldıktan sonra dokular parafine gömüldü. Parafine gömülen dokulardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoxylin-eosin (H&E) yöntemi ile boyandı. Boyanmış kesitler Zeiss Axio Lab A1 ışık mikroskobu altında incelendi.

Tablo 1: Histolojik takip serileri

Sıra No	Kullanılan Madde	Kimyasal Bekletilme Süresi
1	%70 Alkol	2 saat
2	%80 Alkol	1.5 saat
3	%96 Alkol I	30 dakika
4	%96 Alkol II	30 dakika
5	%100 Alkol I	30 dakika
6	%100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	30 dakika
9	Xylol II	30 dakika
10	Yumusak Parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumusak Parafin	1 saat
12	Y. Parafin + Sert Parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat

### 3.4 İmmunohistokimya

Parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra, distile suya alınan dokular antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (600W) 5 dakika kaynatıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için

Ultra V Block (Ultra V Block, TA-125-UB, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) solüsyonu ile muameleden sonra primer antikor (Aquaporin 1 rabbit polyclonal IgG, Abcam, ab-15080, California, USA; Aquaporin 4 mouse monoclonal IgG, Abcam, ab-9512, Cambridge, UK) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor 30 dakika (biyotinli anti-mouse IgG, Diagnostic BioSystems, KP 50A, Pleasanton, USA), streptavidin horseradish peroksidaz 30 dakika ve 3-Amino-9-ethyl carbazole kromojeni uygulandıktan sonra Mayer's hematoksilenle zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine phosphate buffered saline (PBS) kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. PBS ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı (Tablo 3). Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Zeiss Axio Lab A1) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

Aquaporin 1 ve 4 ekspresyonu immunohistokimyasal olarak daha önce Kanter'in (Kanter 2011) belirlediği yöntemle değerlendirildi. Bu yöntemde her hayvan için 40x büyütmede ki iki kesit de ve her bir kesit için sekiz alan da immunreaktivite yoğunluğu Tablo 2'de gösterildiği şekilde değerlendirildi.

Tablo 2: Aquaporin 1 ve 4 boyanma yoğunluğunun değerlendirilmesi

<b>Derece</b>	<b>Sembol</b>
yok	(-)
çok az	(±)
az	(+)
orta	(++)
yüksek	(+++)
çok yüksek	(++++)

Tablo 3: İmmunohistokimya boyama serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	Deparafinizasyon	1 saat
2	Distile su	5 dakika
3	Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)'de (pH: 7.6)	5 dakika
4	%3'lük H2O2'de	5 dakika
5	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
6	Primer antikor oda ısısında	1 saat
7	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
8	Sekonder antikor	30 dakika
9	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
10	Streptavidin peroksidaz	30 dakika
11	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
12	AEC Kromojen	1-10 dakika
13	Distile su	5 dakika
14	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	1 dakika
15	Akarsuda	1 dakika
16	Kurulama	
17	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

### 3.5 Western Blot Tekniği

Yaşlı ve genç fare gruplarından alınan doku örnekleri, örnek tamponu içinde (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 5 µg/mL Aprotinin, 5 µg/mL Leupeptin, 5 µg/mL Pepstatin A ) hücre ekstratı hazırlandı. Hazırlanan hücre ekstratları üzerinde protein ölçümü yapıp, aynı zamanda %7,5 lik SDS jeli hazırlandı.

Jelin polimerasyonu tamamlandıktan sonra, hücre ekstratları Laemli sample buffer ile dilüye edilip, 95°C de 5 dakika kaynatıldı. Elektroforetik yürütme için, örnekler jelle yüklenip 100V altında örneklerin yürütülmesi sağlandı. Jelde yürütülen örneklerin semidry transfer yöntemini kullanarak proteinlerin membranlara transferi sağlandı. Membrana transfer edilen proteinlerin bloklanması amacıyla %5'lik süt tozu ve %0,1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi (bloklama çözeltisi) içine bırakıldı. 1 saatlik bloklama sonunda membran primer antikolar ile gece boyu inkübe edilecektir. Bu süre sonunda membran 3 kez %0,1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkanıp, sekonder antikor uygulaması yapıldı. 1 saat anti rabbit sekonder antikor ile membranın inkübasyonu sonrası tekrar 3 kez %0,1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkandı. Membrandaki proteinlerin görüntülenmesi amacıyla ECL çözeltisi kullanıldı. İkincil antikora bağlı bulunan horseradish peroksidaz enzimi, ECL çözeltisi içinde bulunan Lumigen PS-3 substratını katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan luminol ışığa yol açacağından, bu ışımaya, özel görüntüleme cihazları ile saptandı. Elde edilen protein bantları genç ve yaşlı sıçanlarda karşılaştırılıp istatistiksel analizleri yapıldı.

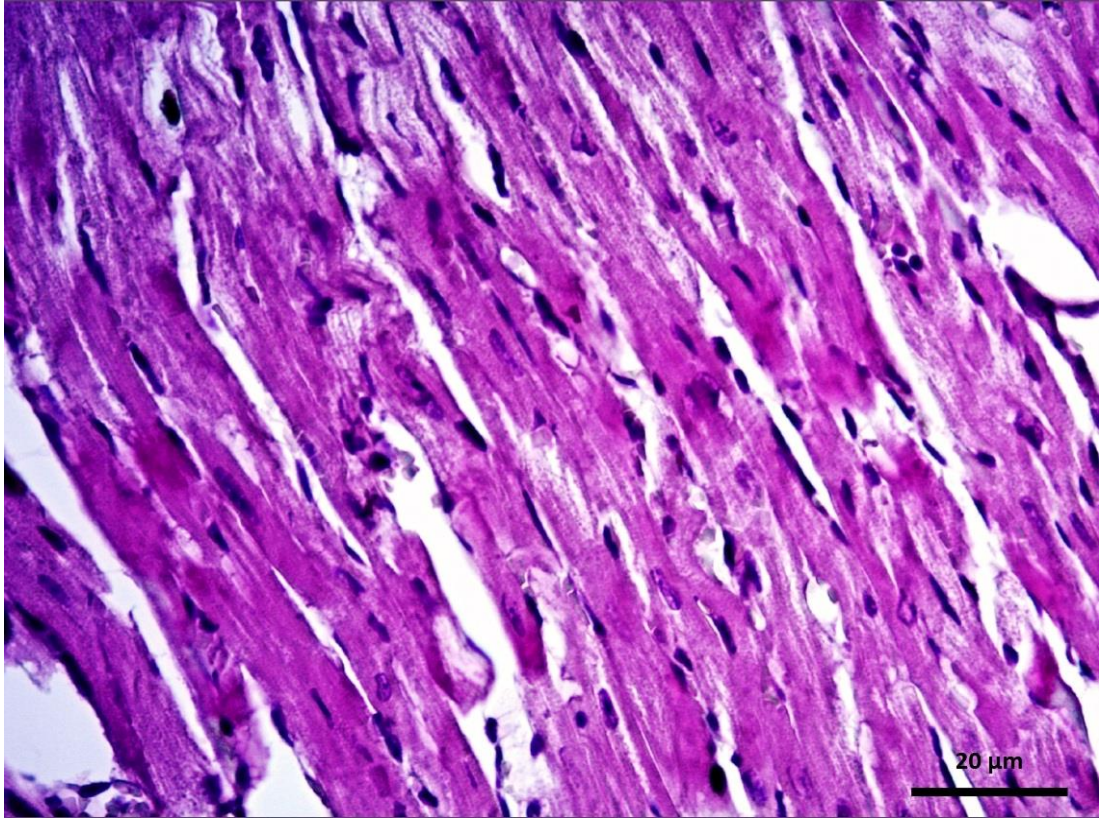
### **3.6 İstatistiksel analiz**

Grupların dağılımı Levene testi ile analiz edildi. Western blot analiz sonuçlarının normal dağılıma uyması nedeniyle gruplar arası karşılaştırmada student t-testi kullanıldı. İmmunohistokimyasal sonuçlar açısından gruplar arası karşılaştırmada ise ki kare testi kullanıldı. İstatistiksel analizler IBM-SPSS 21.0 programıyla yapıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

## 4 BULGULAR

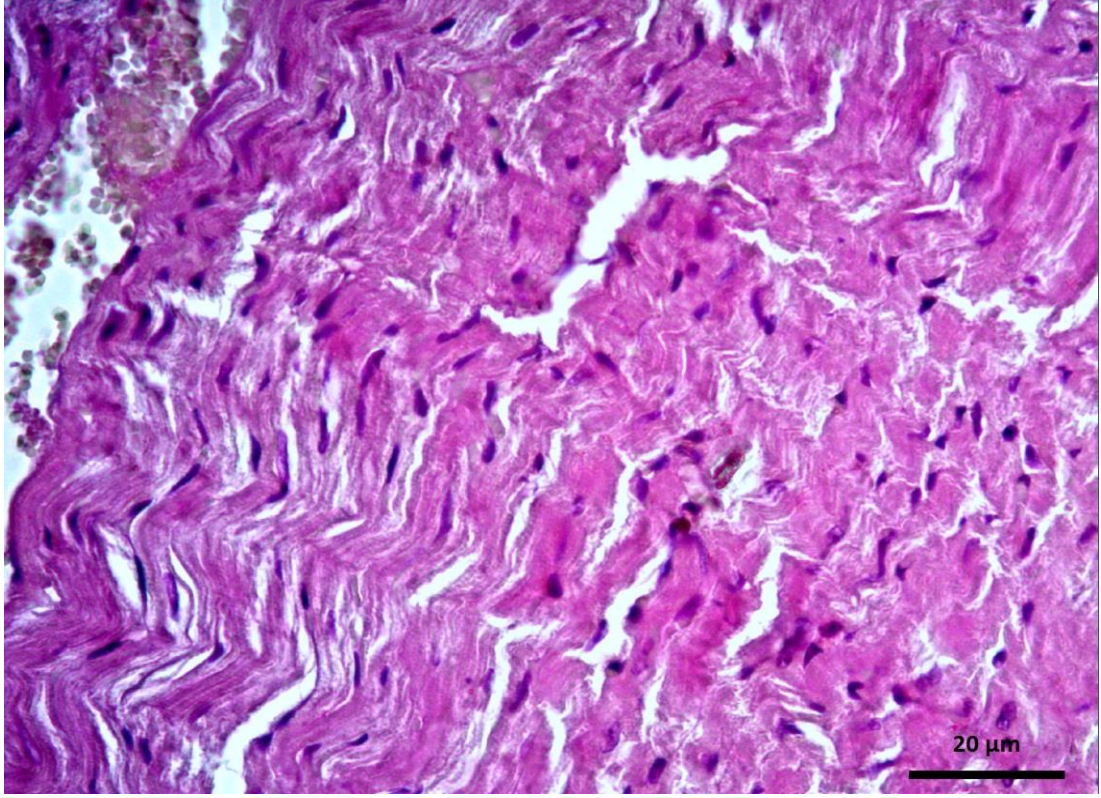
### 4.1 Histolojik Bulgular

Genç yaşlı hayvanlarda kalbin normal histolojik yapısı Zeiss Axio Lab A1 ışık mikroskobu ile fotoğraflanarak resim 1 ve 2 de gösterildi (Resim 1,Resim 2). Genç farelerde normal kalp dokusu yapısı izlendi. Herhangi bir patolojiye rastlanılmadı. Yaşlı farelerde kas liflerinin gevşek bir şekilde düzenlendiği ve interstisyel mesafenin artmış olduğu görüldü. Kan damarlarında belirgin konjesyon görüldü.



Resim 1: Genç farede hematoksilen-eozin yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti.



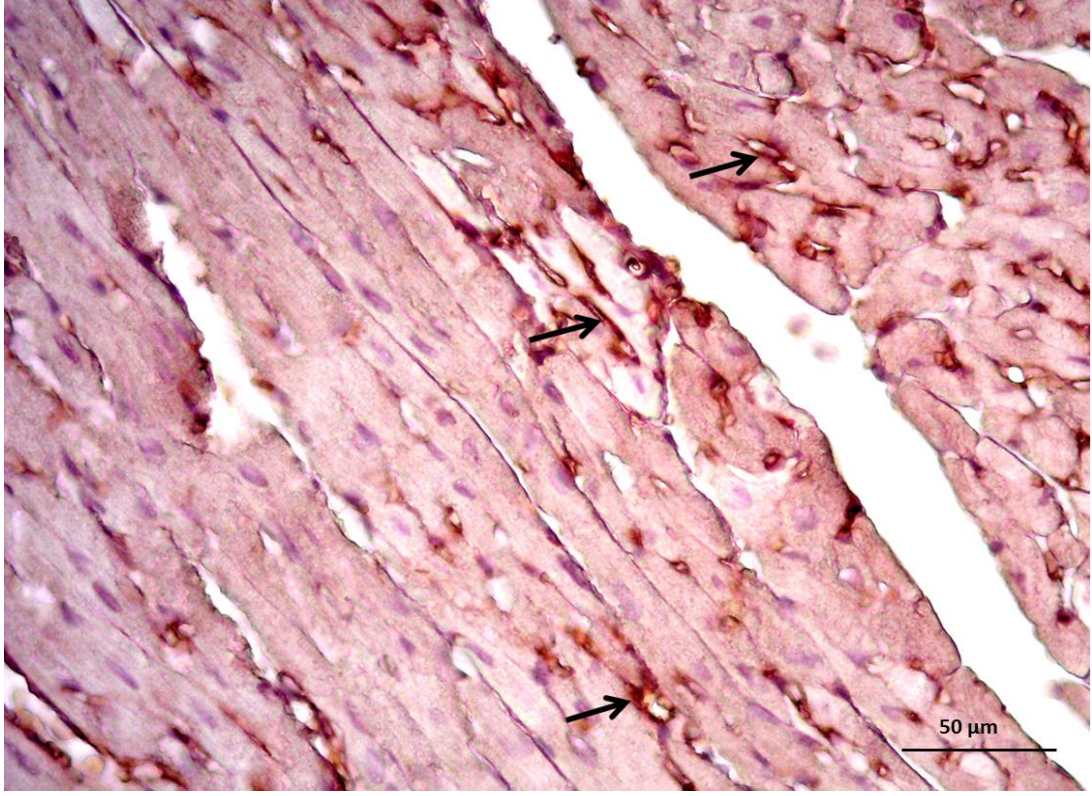


Resim 2. Yaşlı farede hematoksilen-eozin yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti.

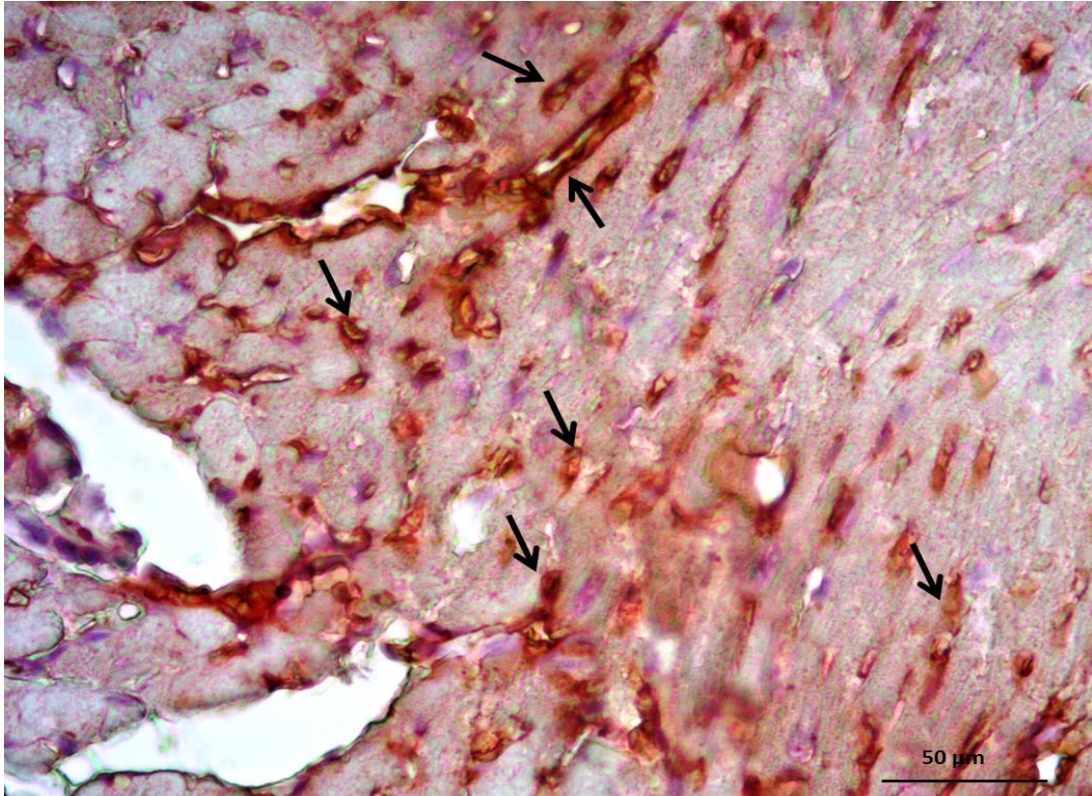
#### 4.2 İmmunohistokimyasal Bulgular

Yaşlı ve genç farelerin kalp dokusu kesitlerinde AQP1 ve AQP4 proteinleri immunohistokimyasal olarak boyanarak gösterildi. Negatif kontrol boyamalarında herhangi bir immunreaktivite gözlemlenmedi (Resim 7, Resim 8). Sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirilerek Tablo 4'de gösterildi. Yaşlı farelerin kalp dokularında AQP1 ve AQP4 'ün immun reaktivitesinin anlamlı bir şekilde artmış (+++) olduğu görülürken (Resim 4, Resim 6) genç farelerin kalp dokusunda orta düzeyde (++) bir boyanma izlendi (Resim 3, Resim 5).

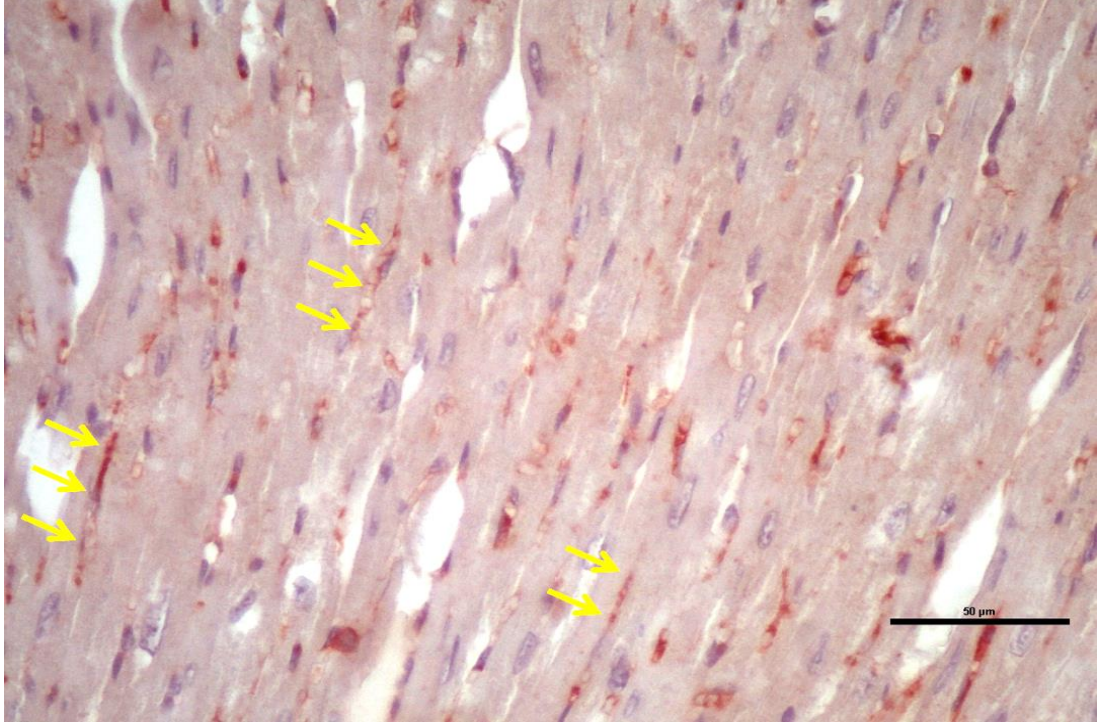
AQP1 ekspresyonu yaşlı farelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksekti ( $p=0.013$ ). Benzer şekilde AQP4 ekspresyonu da genç farelere kıyasla yaşlı farelerde belirgin olarak daha yüksek saptandı ( $p=0.037$ ).



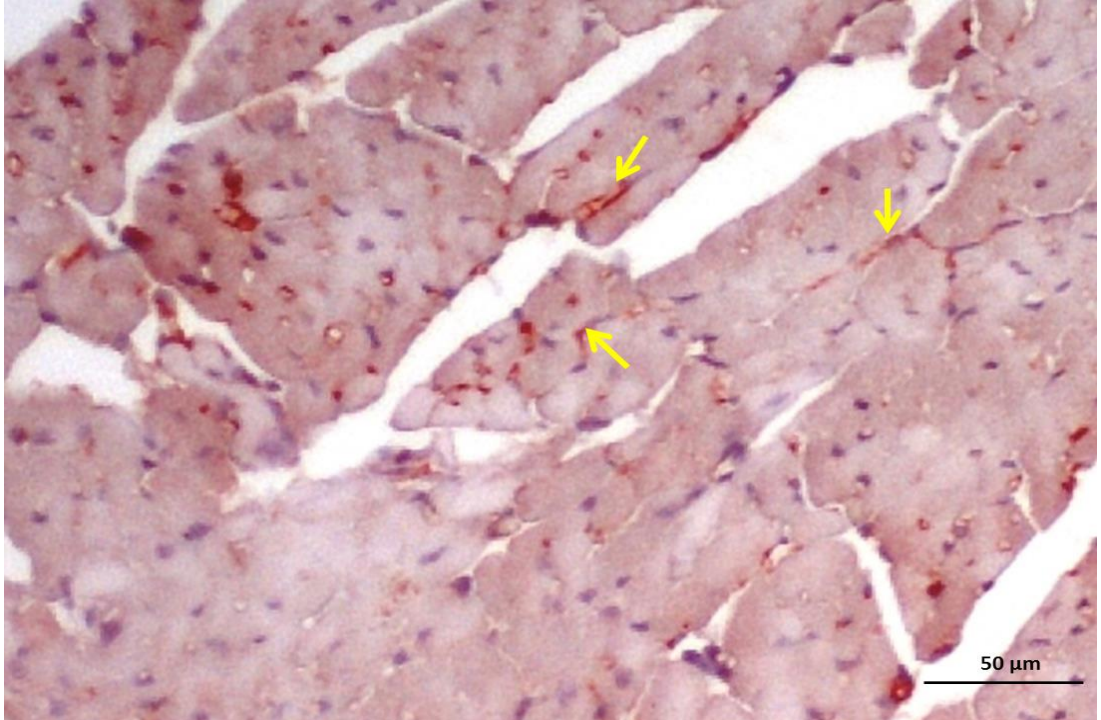
Resim 3: Genç farede AQP1 immunohistokimya yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti. Okların ucu AQP1 antikoruyla pozitif boyanmış endotel hücrelerini göstermektedir.



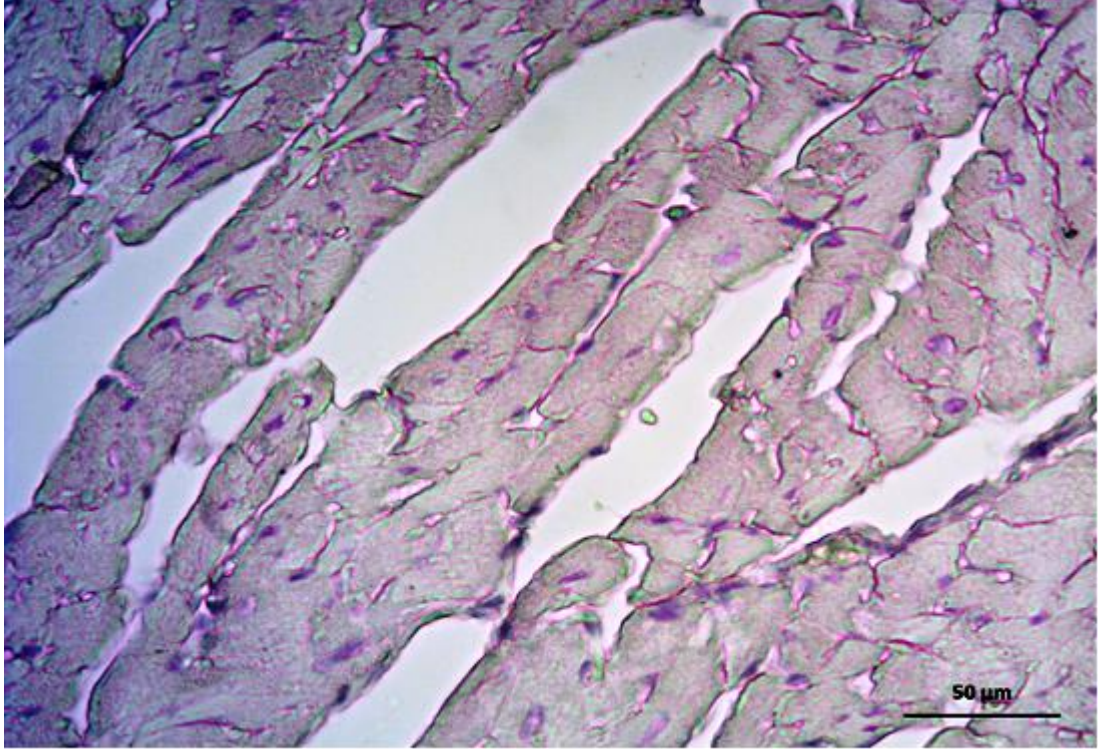
Resim 4: Yaşlı farede AQP1 immunohistokimya yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti. Okların ucu AQP1 antikoruyla pozitif boyanmış endotel hücrelerini göstermektedir.



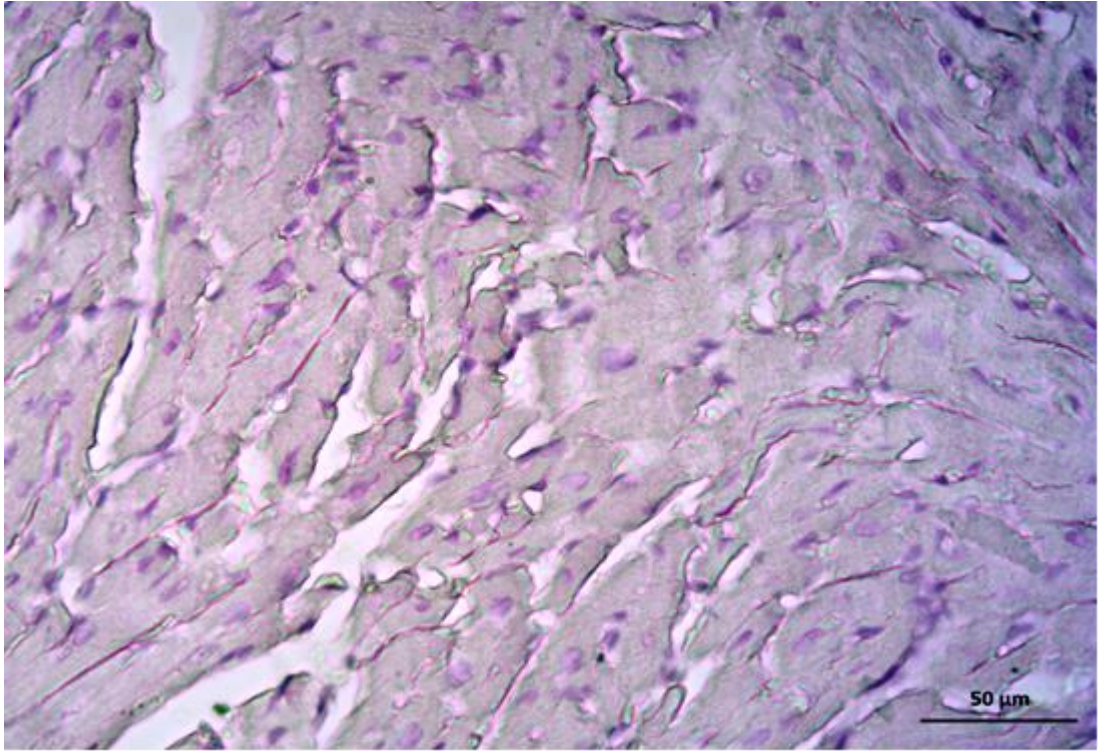
Resim 5: Genç farede AQP4 immunohistokimya yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti. Okların ucu AQP4 antikoruyla pozitif boyanmış olan kardiyomiyositlere ait hücre membranlarını işaret etmektedir.



Resim 6: Yaşlı farede AQP4 immunohistokimya yöntemi ile boyanmış x40'lık büyütmedeki kalp dokusu kesiti. Okların ucu AQP4 antikoruyla pozitif boyanmış olan kardiyomiyositlere ait hücre membranlarını işaret etmektedir.



Resim 7: Genç farede AQP1 negatif kontrol kalp dokusu kesiti.



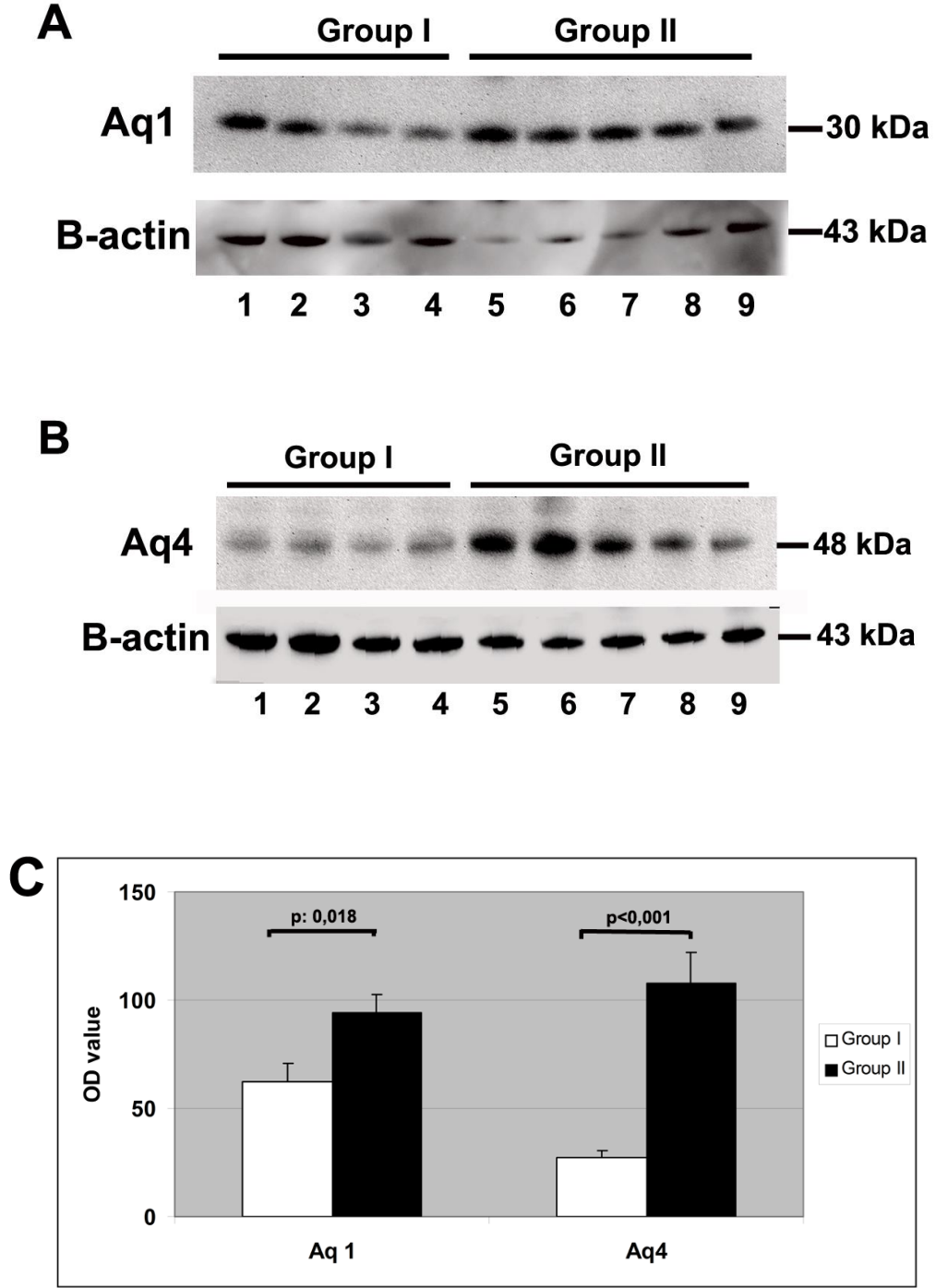
Resim 8: Yaşlı farede AQP1 negatif kontrol kalp dokusu kesiti.

Tablo 4: Yaşlı ve genç farelerin kalp dokusu kesitlerinde AQP1 ve AQP4 proteinlerinin semikantitatif olarak immunohistokimyasal değerlendirme sonuçları (n: 7 her grup için).

	<b>Genç</b>	<b>Yaşlı</b>
<b>AQP1</b>	(++)	(++++)
<b>AQP4</b>	(++)	(+++)

### **4.3 Western Blot Bulguları**

Yaşlı ve genç farelerin kalp dokularında AQP1 ve AQP4 proteinlerinin yoğunluğunun gösterilmesi amacı ile Anti- AQP1 ve Anti- AQP4 antikorları kullanılarak western blot analizi yapıldı. Kalp dokusunda AQP1 ve AQP4 proteinlerinin yoğunluğunun yaşlı farelerde gençlere oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gösterildi (Şekil 14).



Şekil 14: Yaşlı ve genç farelerde aquaporin düzeylerinin western blot analizi. A-AQP1, B- AQP4, C-optik dansite analizi. Grup I. Genç, Grup II Yaşlı fareler.

## 5 TARTIŞMA

Kardiyak fonksiyon büyük oranda su balansı ile bağlantılıdır. Hatta su düzeyindeki minimal bir artış bile kontraksiyon gücünde zayıflamaya neden olur (Mehlhorn, Geissler et al. 2001). Su dengesi başlıca mikrosirkülasyonla kontrol edilirken interstiyel aralıktaki bazı sıvılar kardiyak lenflere drene olur. Miyokardiyal hücreler ozmotik gradyent ve hidrostatik basınca göre plazma membranından su transferiyle kendi hacimlerini ayarlayabilirler. Ekstravazasyon esnasında su, endotelial hücreler arasında (paraselüler) ya da difüzyon ile iyon kanalları gibi ko-transport mekanizmaları ile ve aquaporinler ile (transselüler) geçiş gösterebilir (Rutkovskiy, Valen et al. 2013).

Miyokardiyal su dengesi ozmotik kan basıncı değişiklikleri ile ayarlanır. Kan hiperozmolaritesi; su alımının azalması, artmış su kaybı, santral diabetes insipidus ve intrinsik böbrek hastalıklarına bağlı gelişir. Diabetik ketoasidozda kan ozmolaritesi 400 mOsm/kg'ı geçebilir. Bu gibi durumlarda ekstravasküler alandaki su dolaşıma yönelerek hacmin artırılmasını sağlar. Hiperozmolariteye kardiyak cevap kompleks ve ozmolar yüke bağlı gelişir. Hafif hipertonsitenin (320 mOsm) pozitif inotropik etkisi varken, 400 mOsm üzeri değerlerde konsantrasyona bağlı olarak kasılma gücü azalmaktadır. Ayrıca hiperozmolarite rat kalbinde iskemik toleransı arttırmaktadır (Adler and Verbalis 2006; Rutkovskiy, Valen et al. 2013). Akut koroner yetmezlik kalıcı hale geldiğinde miyokardiyal hücrelerin ölümüne neden olur. İskemide en etkili tedavi reperfüzyondur ancak bu da iskeminin üzerine ek olarak bir hasar oluşmasına neden olur ve 'iskemi-reperfüzyon hasarı' olarak isimlendirilir. İskemi-reperfüzyon hasarında mitokondriyal geçiş porlarının açılmasının hücre ölümündeki primer sebep olduğu öne sürülmüştür (Argaud, Gateau-Roesch et al. 2008). Bu porların mitokondri iç membranında bulunan ve 1,5 kDa.'a kadar olan bazı moleküllerin geçişine izin veren protein kompleksleri olduğu varsayılmaktadır. Reperfüzyonda bu porların açılması mitokondri iç membranında depolarizasyona ve muhtemelen tüm organelin dağılmasına neden olmaktadır. Porların açılması başlıca oksijen radikalleri tarafından tetiklenmekte, sodyum-kalsiyum pompasının ters yönde çalışmasıyla meydana gelen kalsiyum yüklenmesi kardiyomiyosit kontraktürüne ve aritmilere sebep olmaktadır (Rutkovskiy, Valen et al. 2013).

Son zamanlarda aquaporinlerin kardiyak patofizyolojideki muhtemel rollerine dikkat çekilmektedir. İnsan kalbinde eksprese edilen aquaporin izoformlarının AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7, AQP8, AQP9, AQP10 ve AQP11 olduğu rapor edilse de AQP1, AQP3, AQP4 ve AQP7 (Butler, Au et al. 2006) için güvenilir protein sinyali alınabilmiştir. Bunlardan da özellikle AQP1 ve AQP4 ön plana çıkarak; kardiyak ödem ve iskemi-reperfüzyon hasarında rolleri olabileceği düşünülmektedir (Rutkovskiy, Valen et al. 2013).

Yapılan çalışmalarda AQP1'in; böbrek korteks ve medullası, koroid pleksus, kan-beyin bariyerindeki mikrodamarlar, beyin korteksinin bazı bölümleri ve afferent nosisseptif nöronlar, kornea endoteli, gözyaşı bezleri, lens epitel hücreleri, peritoneal mezotel, kırmızı dalak pulpası, pankreatik kanallar, kondrositler, safra kesesi, solunum sistemi epiteli ile iskelet ve kalp kası gibi birçok dokuda bulunduğu gösterilmiştir (Rutkovskiy, Valen et al. 2013). AQP1'in en önemli fonksiyonu transepitelyal su akışını sağlamasıdır. AQP1 ekspresyonunun olduğu retina ve gözyaşı bezleri gibi glandüler dokularda bu akış gereklidir (Ma, Yang et al. 1998; Verkman 2006). Memeli türlerinin kalbinde eksprese edilebilen temel su kanalının AQP1 olduğu bilinmektedir. Gen delesyonu yapılan AQP KO modeller AQP'lerin kardiyovasküler hastalıklardaki rolüne ilişkin önemli veriler elde edilmesini sağlamıştır. AQP1 KO farelerde yapılan çalışmalarda histomorfometrik ölçümlerde aorta ve mezenterik arter duvar kalınlığında belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada AQP1 KO farelerin 24 saatlik sistolik ve diastolik kan basıncı ölçümlerinden elde edilen değerler sistolik kan basıncının belirgin olarak düştüğünü fakat diastolik basıncın değişmediği ve sirkadiyen ritmin bozulmadığını göstermiştir. AQP1 delesyonu olan farelerde AQP4 ve AQP8 ekspresyonunda artma olduğu belirtilmiştir (Montiel, Leon Gomez et al. 2013). Ding ve ark.'nın gerçekleştirdiği bir çalışmada, kardiyopulmoner baypas (KPB) uygulanan koyunlarda KPB sonrası AQP1 ekspresyonunda mRNA ve protein düzeyinde belirgin bir artış olduğu ve miyokardiyal ödem seviyesinin yükselme gösterdiği bildirilmiştir. KPB sonrası cGMP inhibitörü olan 1H-(1,2,4) oxadiazolo (4,3-alpha) quinoxalin-1-one (ODQ) ile tedavi edilenle sadece KPB uygulanan grup kıyaslandığında AQP1 mRNA ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı ve tedavi grubunda cGMP inhibisyonuyla miyokardiyal ödemin kontrol grubuna göre önemli derecede azalarak kardiyak fonksiyonları geliştirdiği belirtilmiştir (Ding, Yan et al.



2013). Başka bir çalışma sonucuna göre de; ana gap junction proteini olan Cx43 ekspresyonuyla AQP1 arasında yakın bir ilişki olduğu ve KPB uygulanan keçilerde AQP1 ekspresyonunda azalma olduğu ifade edilmektedir (Yan, Huang et al. 2013).

Mevcut bilgiler AQP1'in başlıca kan ve lenf damarlarının endotel hücrelerinde eksprese edildiğini göstermektedir. Fakat AQP1 sadece kardiyak endotel hücrelerde olmayıp; insan kardiyak damar düz kas hücrelerinde ve rat kardiyomiyositlerinin kaveol ve T-tübüllerinde de bulunmaktadır (Rutkovskiy, Valen et al. 2013). Bizim çalışmamızda da AQP1'in ekspresyonu genç ve yaşlı farelerin kalbinde hem western blot hem de immunohistokimyasal yöntemle gösterildi. AQP1'in immunohistokimyasal olarak kardiyak endotel hücrelerinde eksprese edildiği belirlendi.

Kalp dokusunda eksprese edilen bir diğer aquaporin olan AQP4, diğer aquaporinler içerisinde su geçirgenliği yönünden en yüksek kapasiteye sahip su kanalı olarak bilinmektedir (Warth, Eckle et al. 2007). AQP4'ün moleküler yapısının diğer aquaporinlerin aksine kare diziler oluşturan tetramer dizileri şeklinde olduğu gösterilmiştir. WB ile fare kalbinde AQP4'ün 3 izoformu gösterilmiştir. Bunlar daha önce beyinde de gösterilen (Sorbo, Moe et al. 2008) M1, M23 ve MZ izoformlarıdır. M1 en yüksek su geçirgenliğine sahipken, M23'ün en düşük su geçirgenliğine sahip AQP4 izoformu olduğu bildirilmiştir (Rojek, Praetorius et al. 2008). Ratlarda yapılan çalışmalarda immunohistokimyasal yöntemlerle böbrek, solunum yolları, göz, beyin ve kalın bağırsakta AQP4 ekspresyonu olduğu görülmüştür. Birçok dokuda AQP4 fonksiyonu tam olarak anlaşılamamakla birlikte özellikle beyin ve kalp dokusunda oluşan ödem mekanizmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Fare kalplerinde iskemi-reperfüzyon hasarının qPCR' la yapılan değerlendirilmesinde; AQP4 mRNA seviyesinde azalma görülürken protein düzeyinde değişiklik gözlemlenmediği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise AQP4 geni silinmiş knock-out (KO) farelerde iskemi reperfüzyon sonrası infarkt alanında vahşi tip farelere göre bariz bir azalma olduğu bildirilmiştir (Rutkovskiy, Stenslokken et al. 2012). İnsan, rat ve fare kalplerinde AQP4 mRNA düzeyinde eksprese edilirken protein düzeyinde ekspresyon yalnız fare kardiyomiyositlerinde kayda değer düzeyde, insanlarda ise minimal düzeyde gösterilmiştir (Rutkovskiy, Valen et al. 2013). Bizim çalışmamızda da AQP4'ün ekspresyonu genç ve yaşlı farelerin kalbinde hem western blot hemde

immunohistokimyasal yöntemle protein düzeyinde gösterildi. İmmunohistokimyasal boyamalarımızda AQP4'ün kardiyomiyositlerin hücre membranlarında yer aldığı görüldü.

Yaşlanma büyük ölçüde geri dönüşü olmayan fizyolojik açıdan karmaşık ve devamlı bir süreçtir. Kardiyovasküler sistemde yaşa bağlı olarak kalp rezervi azalırken, vasküler sertlik ve sol ventrikül diyastolik fonksiyon bozukluğu meydana gelir. Kalpte gözlenen anatomik değişiklikler hücresel düzeyde başlar. Yaşlanma ile artan miyosit apoptozu ve nekroz nedeniyle kalp miyositlerinde bir azalma oluşur. Bunu kompanze etmek için, kalan miyositlerin boyutunda artma meydana gelir. Artmış kollajen ve kollajenlerdeki çapraz bağlanma ile azalmış elastin de miyokard kalınlığındaki artışa katkıda bulunur (Gupta, Verma et al. 2015). Yine yaşlanma ile mitokondri fonksiyonlarında azalma, serbest oksijen radikallerinde artış meydana gelir. Bu durum özellikle endotelial nitrik oksid (eNOS) düzeylerini azaltıp anjiogenezi inhibe etmektedir (Lahtenvuo and Rosenzweig 2012). Yaşlanma sonucu ortaya çıkan anjiogenezdeki azalma, çalışmamızda saptamış olduğumuz yaşlı farelerdeki AQP1 ekspresyon düzeylerindeki artışa yol açmış olabilir. İntersitisyel ortamdaki su dengesinin sağlanması ve yaşlılığa bağlı kardiyak disfonksiyonun azaltılması açısından anjiogenezdeki azalmaya karşı kompensatuvar bir cevap olarak kardiyak damar endotelinde AQP1 ekspresyon düzeyleri artıyor olabilir.

Yapılan bazı çalışmalarda kalp dışındaki diğer dokularda da yaşlanma ile birlikte meydana gelen değişiklikler ve bu dokulardaki AQP izoformlarının ekspresyonundaki farklılıklar ortaya konulmaya çalışılmıştır. Ratlarda yapılan bir çalışmada; yaşlanma ile birlikte intervertebral disklerdeki AQP1 ve AQP3 miktarlarında belirgin bir azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Tas, Cayli et al. 2012). AQP ve yaş ilişkisini gösteren diğer bir çalışmada 1 ve 12 haftalık ratların retinalarında AQP1, AQP3, AQP4, AQP6 ve AQP9 miktarlarının arttığı, 40 haftalık ratlarda ise belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir (Ortak, Cayli et al. 2012). 56464 hastanın BOS ve serumu ile yapılan bir araştırmada; AQP4 seropozitifliğinin yaşlılarda belirgin şekilde daha fazla olduğu ve cinsiyet karşılaştırılmasında da kadınların erkeklere oranla çok daha yüksek seropozitiflik gösterdiği sonucu elde edilmiştir (Quek, McKeon et al. 2012). İnoue ve arkadaşları parotis bezinde AQP5 seviyesinin yaşlı sıçanlarda gençlere oranla iki kattan daha fazla arttığını göstermişlerdir. Bununla birlikte asetil kolin verilmesiyle

apikal membrandaki AQP5 seviyelerinin gençlerde yaşlılara oranla iki kat daha fazla arttığını göstermişlerdir (Inoue, Iida et al. 2003). Farelerin beyin ve beyincik dokuları kullanılarak RT-PCR ve WB ile yapılan bir çalışmada ise yaşlanma ile birlikte AQP4 miktarında belirgin bir artış olduğu gösterilmiştir (Gupta and Kanungo 2011). Araştırmacılar bu artışın yaşlanma ile azalan su ve elektrolit dengesinin devam ettirilmesi ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda da kalp dokusunda artmış olan AQP4 düzeyleri yaşlanma ile azalan su ve elektrolit dengesinin devam ettirilmesi ile ilişkili olabilir. Ayrıca parotis bezinde yaşlanma ile meydana gelen artışa benzer bir şekilde kardiyak dokudaki artmış AQP4 düzeyleri, azalmış AQP4 fonksiyonlarına karşı kompanseuar bir cevabın sonucu olabilir.

AQP4 geni silinmiş knock-out (KO) farelerde iskemi reperfüzyon sonrası infarkt alanında vahşi tip farelere göre bariz bir azalma olduğu göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda göstermiş olduğumuz yaşlanmayla birlikte artmış olan AQP4 düzeyleri, yaşlılardaki iskemiye olan eğilimi artıran faktörlerden biri olabilir. Bu artış en düşük su geçirgenliğine sahip olan M23 izoformuna olabileceği gibi en yüksek su geçirgenliğine sahip M1 izoformunda olabilir. Bu açıdan bu konunun aydınlatılması önemlidir. Özellikle AQP4 ün 3 izoformu olan M1, M23 ve MZ izoformlarından hangisinin yaşlanma ile birlikte arttığını araştırır ileriye yönelik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## ÖZET

**Giriş ve amaç:** Kalp dokusunda su dengesinin sağlanması, kardiyak fonksiyonlar açısından büyük önem taşımaktadır. İnterstisyel alandaki suyun az miktarda artması bile miyokardiyal kontraktilitede (kasılma gücünde) belirgin azalmaya yol açmaktadır. Yaşlanma ile bütün dokularda sıvı kaybı meydana gelir. Bu sıvı kaybı, dokuda suyun ve bazı küçük katı moleküllerin geçişini kolaylaştıran su kanal proteinleri olan aquaporinlerin (AQP) yoğunluğunun ya da fonksiyonlarının değişimi ile ilişkili olabilir. Özellikle AQP1 ve AQP4'ün insan kalbinde varlığı gösterilmiş ve çalışmalar bu iki aquaporin üzerine yoğunlaşmıştır. Bunlardan kardiyak AQP 1 en fazla mikrovasküler damarlarda bulunurken AQP 4'ün daha çok kas hücresinde bulunduğu bildirilmiştir. Bu amaçla çalışmamızda yaşlanmanın kalp dokusunda AQP1 ve AQP4 yoğunluğu üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada 14 adet Balb/C cinsi beyaz fare (50-80 g) kullanıldı. Hayvanlar iki eşit gruba bölündü. Grup I iki aylık genç hayvanlar grubu (n=7), Grup II 18 aylık yaşlı hayvanlar grubu (n=7) olarak düzenlendi. Kalp dokusu çıkarılarak yarısı western blot uygulaması için diğer yarısı ise İmmunohistokimyasal ve histopatolojik değerlendirmelerde kullanıldı. Western blot yöntemi ile AQP1 ve AQP4'ün yoğunluğu belirlendi. Rutin histolojik takipler yapıldıktan sonra dokular parafine gömüldü. Parafine gömülen dokulardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak immunohistokimyasal olarak AQP1 ve AQP4 boyandı. Aynı zamanda hematoxylin-eosin (H&E) boyama yapıldı. Boyanmış kesitler ışık mikroskobu altında incelendi.

**Bulgular:** Bu çalışmada AQP1 ve AQP4'ün ekspresyonu genç ve yaşlı farelerin kalbinde western blot ve immunohistokimyasal yöntemle gösterildi. Her iki yöntemle de AQP1 ve AQP4'ün ekspresyonunun yaşlanma ile kalp dokusunda arttığı belirlendi.

**Sonuç:** Kalp dokusunda artmış olan AQP 1 ve AQP4 düzeyleri, yaşlanma ile azalan su ve elektrolit dengesinin devam ettirilmesi ile ilişkili olabilir.

**Anahtar kelimeler;** Fare, kalp, yaşlanma, aquaporin1 ve aquaporin4

## ABSTRACT

**Introduction and objective:** It is of great importance for cardiac functions to ensure the water balance of heart tissue. Even a small amount of water increase in the interstitial space leads to a significant reduction in myocardial contractility (force of contraction). Fluid loss occurs in all tissues with aging. This fluid loss, may be related with changes in the intensity and functions of aquaporin (AQP) which are the water channel proteins facilitating the passage of water and some small rigid molecules in tissue. Especially the presence of AQP 1 and AQP 4 has been indicated in human heart and the studies have been focused on these two aquaporin. It has been reported that the AQP 4 mostly exist in muscle cells while the cardiac AQP 1 mostly exist in micro-vascular vessels.

For this purpose, the present study is aimed to research the effects of the aging on AQP 1 and AQP 4 on the heart tissue.

**Material and Method:** In this study, 14 Balb/C type white mice (50-80 gr) were used. Animals were divided into two equal groups. Group I was arranged as two months young animals group (n=7) and Group II as eighteen months old animals group (n=7). The heart tissue was removed and half of it was used for western blotting application while the other half was used for immunohistochemical and histopathological evaluations. Density of AQP1 and AQP4 was determined by western blot method. Tissues were embedded in paraffin after routine histological procedures. 4-5  $\mu\text{m}$  thick sections were taken from the paraffin embedded tissues and AQP1 and AQP4 were stained immunohistochemically. Also hematoxylin-eosin (H&E) were stained and all sections were examined under the light microscope.

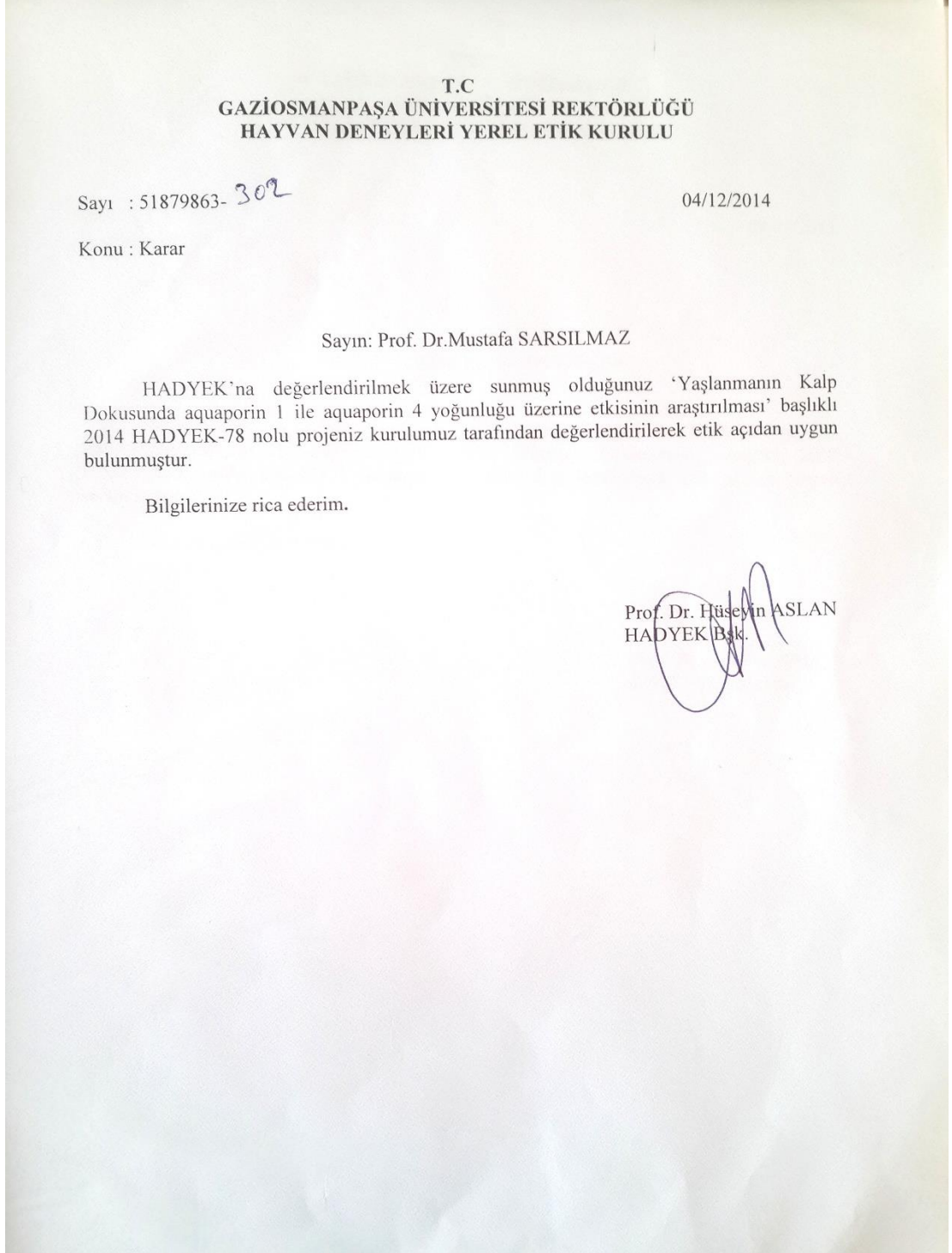
**Findings:** In this study, the expression of AQP1 and AQP4 were shown with western blot and immunohistochemistry in hearts of young and old mice. With either method, increased AQP1 and AQP4 expression was determined in heart tissue with aging.

**Conclusion:** Increased AQP1 and AQP4 levels in the heart tissue may be correlated with the maintenance of water and electrolytes balance which decreasing with aging.

**Key Words;** Mice, heart, aging, aquaporin 1 and aquaporin 4

## EKLER

### Ek 1: Hayvan deneyleri yerel etik kurul izni



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hikmet BIÇAKÇI  
Doğum Yeri ve Yılı : TOKAT, 1983  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

Lise : Tokat Anadolu Lisesi (1994-2001)  
Lisans : Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi (2001-2007)  
Doktora : İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi AD. (2011-2013)  
Şifa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi AD. (2013-2015)

### **Çalıştığı Kurum ve Yıl:**

Van Başkale Merkez Sağlık Ocağı (2007)  
Tokat Merkez 1 No'lu Sağlık Ocağı (2007-2008)  
Tokat İl Sağlık Müsürlüğü (2008-2009)  
Tokat Merkez 3 No'lu Sağlık Ocağı (2009)  
Tokat Medical Park Hastanesi (2009-2011)  
Malatya Sevgi Hastanesi (2011-2013)  
Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi AD. Öğretim Görevlisi (2013-...)

## KAYNAKLAR

Adler, S. M. and J. G. Verbalis (2006). "Disorders of body water homeostasis in critical illness." *Endocrinol Metab Clin North Am* 35(4): 873-94, xi.

Agre, P. (2004). "Nobel Lecture. Aquaporin water channels." *Biosci Rep* 24(3): 127-63.

Agre, P., L. S. King, et al. (2002). "Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine." *J Physiol* 542(Pt 1): 3-16.

Amiry-Moghaddam, M., T. Otsuka, et al. (2003). "An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 2106-11.

Argaud, L., O. Gateau-Roesch, et al. (2008). "Increased mitochondrial calcium coexists with decreased reperfusion injury in postconditioned (but not preconditioned) hearts." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(1): H386-91.

Arıncı, K. (2014). *Anatomi*. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri.

Au, C. G., T. L. Butler, et al. (2008). "Changes in skeletal muscle expression of AQP1 and AQP4 in dystrophinopathy and dysferlinopathy patients." *Acta Neuropathol* 116(3): 235-46.

Benga, G. (2006). "Water channel proteins: from their discovery in Cluj-Napoca, Romania in 1985, to the 2003 Nobel Prize in chemistry and their implications in molecular medicine." *Keio J Med* 55(2): 64-9.

Benga, G., O. Popescu, et al. (1986). "p-(Chloromercuri)benzenesulfonate binding by membrane proteins and the inhibition of water transport in human erythrocytes." *Biochemistry* 25(7): 1535-8.



- Bhattacharjee, H., J. Carbrey, et al. (2004). "Drug uptake and pharmacological modulation of drug sensitivity in leukemia by AQP9." *Biochem Biophys Res Commun* 322(3): 836-41.
- Boron, W. F. (2010). "Sharpey-Schafer lecture: gas channels." *Exp Physiol* 95(12): 1107-30.
- Buffoli, B. (2010). "Aquaporin biology and nervous system." *Curr Neuropharmacol* 8(2): 97-104.
- Butler, T. L., C. G. Au, et al. (2006). "Cardiac aquaporin expression in humans, rats, and mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(2): H705-13.
- Chae, Y. K., S. K. Kang, et al. (2008). "Human AQP5 plays a role in the progression of chronic myelogenous leukemia (CML)." *PLoS One* 3(7): e2594.
- Cumhur, M. (2012). *Fonksiyonel Anatomi*.
- Deen, P. M., M. A. Verdijk, et al. (1994). "Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine." *Science* 264(5155): 92-5.
- Demir, R. (2001). *Histolojik Boyama Teknikleri*. Ankara, Palme Yayıncılık.
- Ding, F. B., Y. M. Yan, et al. (2013). "The role of aquaporin 1 activated by cGMP in myocardial edema caused by cardiopulmonary bypass in sheep." *Cell Physiol Biochem* 32(5): 1320-30.
- Domeniconi, R. F., A. M. Orsi, et al. (2007). "Aquaporin 9 (AQP9) localization in the adult dog testis excurrent ducts by immunohistochemistry." *Anat Rec (Hoboken)* 290(12): 1519-25.
- Draelos, Z. (2012). "Aquaporins: an introduction to a key factor in the mechanism of skin hydration." *J Clin Aesthet Dermatol* 5(7): 53-6.
- Fischbarg, J. (2012). "Water channels and their roles in some ocular tissues." *Mol Aspects Med* 33(5-6): 638-41.

Gomes, D., A. Agasse, et al. (2009). "Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms." *Biochim Biophys Acta* 1788(6): 1213-28.

Gorelick, D. A., J. Praetorius, et al. (2006). "Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain." *BMC Biochem* 7: 14.

Gupta, D., S. Verma, et al. (2015). "The changes in cardiac physiology with aging and the implications for the treating oncologist." *J Geriatr Oncol*.

Gupta, R. K. and M. Kanungo (2011). "Glial molecular alterations with mouse brain development and aging: up-regulation of the Kir4.1 and aquaporin-4." *Age (Dordr)* 35(1): 59-67.

Hall (2010). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*.

Hamann, S., T. Zeuthen, et al. (1998). "Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye." *Am J Physiol* 274(5 Pt 1): C1332-45.

Harries, W. E., D. Akhavan, et al. (2004). "The channel architecture of aquaporin 0 at a 2.2-Å resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39): 14045-50.

Hsu, S. M., L. Raine, et al. (1981). "Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures." *J Histochem Cytochem* 29(4): 577-80.

<http://www.hdwalls.xyz/>. (2015). "<http://www.hdwalls.xyz/images/-Of-The-Following-Represents-The-Formation-Of-The-Primitive-Heart-Tube>." Retrieved 01 May, 2015.

[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/ANAT2511\\_Muscle\\_Tissue](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/ANAT2511_Muscle_Tissue). (2015). "ANAT2511\_Muscle\_Tissue." Retrieved 01 May, 2015.

Inoue, N., H. Iida, et al. (2003). "Age-related decreases in the response of aquaporin-5 to acetylcholine in rat parotid glands." *J Dent Res* 82(6): 476-80.

- Ishibashi, K. (2009). "New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12." *Handb Exp Pharmacol*(190): 251-62.
- Ishibashi, K., S. Kondo, et al. (2010). "The evolutionary aspects of aquaporin family." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(3): R566-76.
- Ishibashi, K., T. Morinaga, et al. (2002). "Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin." *Biochim Biophys Acta* 1576(3): 335-40.
- Ishibashi, K., S. Sasaki, et al. (1994). "Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14): 6269-73.
- Junqueira, L. C. (2006). *Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitabevi*.
- Kanter, M. (2011). "Thymoquinone attenuates lung injury induced by chronic toluene exposure in rats." *Toxicol Ind Health* 27(5): 387-95.
- King, L. S., M. Choi, et al. (2001). "Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1." *N Engl J Med* 345(3): 175-9.
- King, L. S., D. Kozono, et al. (2004). "From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9): 687-98.
- Kohler, G. and C. Milstein (2005). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975." *J Immunol* 174(5): 2453-5.
- Kuchel, P. W. (2006). "The story of the discovery of aquaporins: convergent evolution of ideas--but who got there first?" *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52(7): 2-5.
- Kuriyama, H., S. Kawamoto, et al. (1997). "Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability." *Biochem Biophys Res Commun* 241(1): 53-8.

- Lahteenvuori, J. and A. Rosenzweig (2012). "Effects of aging on angiogenesis." *Circ Res* 110(9): 1252-64.
- Liu, J., J. Xu, et al. (2010). "Aquaporin 0 enhances gap junction coupling via its cell adhesion function and interaction with connexin 50." *J Cell Sci* 124(Pt 2): 198-206.
- Liu, K., H. Nagase, et al. (2006). "Purification and functional characterization of aquaporin-8." *Biol Cell* 98(3): 153-61.
- Ma, T., B. Yang, et al. (1998). "Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels." *J Biol Chem* 273(8): 4296-9.
- Mehlhorn, U., H. J. Geissler, et al. (2001). "Myocardial fluid balance." *Eur J Cardiothorac Surg* 20(6): 1220-30.
- Montiel, V., E. Leon Gomez, et al. (2013). "Genetic deletion of aquaporin-1 results in microcardia and low blood pressure in mouse with intact nitric oxide-dependent relaxation, but enhanced prostanoids-dependent relaxation." *Pflugers Arch* 466(2): 237-51.
- Moore, M., T. Ma, et al. (2000). "Tear secretion by lacrimal glands in transgenic mice lacking water channels AQP1, AQP3, AQP4 and AQP5." *Exp Eye Res* 70(5): 557-62.
- Murai-Hatano, M., T. Kuwagata, et al. (2008). "Effect of low root temperature on hydraulic conductivity of rice plants and the possible role of aquaporins." *Plant Cell Physiol* 49(9): 1294-305.
- Netter, F. H. (2014). *Atlas Of Human Anatomy*.
- Ortak, H., S. Cayli, et al. (2012). "Age-related changes of aquaporin expression patterns in the postnatal rat retina." *Acta Histochem* 115(4): 382-8.
- Osborn, M. (1994). *Immunofluorescence microscopy of cells*. San Diego.
- Polak, J. (1987). *Current Techniques and Problems*. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks. London, Oxford University Press, 1987.

Preston, G. M., J. S. Jung, et al. (1993). "The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel." *J Biol Chem* 268(1): 17-20.

Quek, A. M., A. McKeon, et al. (2012). "Effects of age and sex on aquaporin-4 autoimmunity." *Arch Neurol* 69(8): 1039-43.

Rodriguez, A., V. Catalan, et al. (2006). "Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice." *FEBS Lett* 580(20): 4771-6.

Rojek, A., J. Praetorius, et al. (2008). "A current view of the mammalian aquaglyceroporins." *Annu Rev Physiol* 70: 301-27.

Ross, M. H. (2011). *Histology*.

Rutkovskiy, A., M. Bliksoen, et al. (2012). "Aquaporin-1 in cardiac endothelial cells is downregulated in ischemia, hypoxia and cardioplegia." *J Mol Cell Cardiol* 56: 22-33.

Rutkovskiy, A., K. O. Stenslokken, et al. (2012). "Aquaporin-4 in the heart: expression, regulation and functional role in ischemia." *Basic Res Cardiol* 107(5): 280.

Rutkovskiy, A., G. Valen, et al. (2013). "Cardiac aquaporins." *Basic Res Cardiol* 108(6): 393.

Sarsılmaz, M. (2014). *İnsan Anatomisi*. İstanbul, Akademi Basın ve Yayıncılık.

Skowronski, M. T., J. Lebeck, et al. (2007). "AQP7 is localized in capillaries of adipose tissue, cardiac and striated muscle: implications in glycerol metabolism." *Am J Physiol Renal Physiol* 292(3): F956-65.

Smith, B. L. and P. Agre (1991). "Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins." *J Biol Chem* 266(10): 6407-15.

Sobotta (2011). *Atlas of Human Anatomy*.

- Sorbo, J. G., S. E. Moe, et al. (2008). "The molecular composition of square arrays." *Biochemistry* 47(8): 2631-7.
- Steinfeld, S., E. Cogan, et al. (2001). "Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjogren's syndrome patients." *Lab Invest* 81(2): 143-8.
- Tait, M. J., S. Saadoun, et al. (2008). "Water movements in the brain: role of aquaporins." *Trends Neurosci* 31(1): 37-43.
- Tas, U., S. Cayli, et al. (2012). "Aquaporin-1 and aquaporin-3 expressions in the intervertebral disc of rats with aging." *Balkan Med J* 29(4): 349-53.
- Tradtrantip, L., M. Tajima, et al. (2009). "Aquaporin water channels in transepithelial fluid transport." *J Med Invest* 56 Suppl: 179-84.
- Tsubota, K., S. Hirai, et al. (2001). "Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjogren's syndrome." *Lancet* 357(9257): 688-9.
- Verkman, A. S. (2005). "More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins." *J Cell Sci* 118(Pt 15): 3225-32.
- Verkman, A. S. (2006). "Aquaporins in endothelia." *Kidney Int* 69(7): 1120-3.
- Verkman, A. S., M. O. Anderson, et al. (2014). "Aquaporins: important but elusive drug targets." *Nat Rev Drug Discov* 13(4): 259-77.
- Warth, A., T. Eckle, et al. (2007). "Upregulation of the water channel aquaporin-4 as a potential cause of postischemic cell swelling in a murine model of myocardial infarction." *Cardiology* 107(4): 402-10.
- Williams, P., Bannister LH, Berry MM, Patricia C, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ (2008). *Gray's Anatomy*. Churchill-Livingstone, UK.
- Wu, B. and E. Beitz (2007). "Aquaporins with selectivity for unconventional permeants." *Cell Mol Life Sci* 64(18): 2413-21.

Yamaji, Y., D. M. Valdez, Jr., et al. (2006). "Cryoprotectant permeability of aquaporin-3 expressed in *Xenopus* oocytes." *Cryobiology* 53(2): 258-67.

Yan, Y., J. Huang, et al. (2013). "Aquaporin 1 plays an important role in myocardial edema caused by cardiopulmonary bypass surgery in goat." *Int J Mol Med* 31(3): 637-43.