

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DİLATE KARDİYOMİYOPATİLİ HASTALARDA MRP-1 ve
MRP-2 GEN EKSPRESYONLARININ ANALİZİ**

Şeyda Ercan

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2015

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DİLATE KARDİYOMİYOPATİLİ HASTALARDA MRP-1 ve
MRP-2 GEN EKSPRESYONLARININ ANALİZİ**

Şeyda Ercan

**Tez Danışmanı
Doç.Dr.Veysel Sabri Hançer**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2015

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Şeyda ERCAN



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1.ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. KARDİYOMİYOPATİLER.....	5
4.2 KARDİYOMİYOPATİLERİN SINIFLANDIRILMASI.....	6
4.2.1. Hipertrofik Kardiyomiyopati	6
4.2.2. Dilate Kardiyomiyopati.....	7
4.2.3. Restriktif Kardiyomiyopati	8
4.2.4. Aritmojenik Sağ Ventrikül Kardiyomiyopatisi.....	10
4.2.5. Özel Kardiyomiyopatiler.....	11
4.3. DİLATE KARDİYOMİYOPATİ.....	13
4.3.1. Dilate Kardiyomiyopati Etyolojisi ve Sınıflandırma	13
4.3.2 Dilate Kardiyomiyopati de Doğal Seyir ve Prognoz.....	16
4.3.3 Dilate Kardiyomiyopati Patofizyolojisi	16
4.3.4 Dilate Kardiyomiyopatinin Klinik Belirtileri.....	17
4.3.5. Dilate Kardiyomyopati Tedavisi	18
4.3.6. Dilate Kardiyomiyopati ve Genetik	19
4.4. ATP BAĞIMLI TAŞIYICI PROTEİNLER	20
4.4.1. Çoklu İlaç Direnci İle İlişkili Protein Ailesi	20
4.4.2. ABCB1 (MDR-1) Geni	21
4.4.3. P-glikoprotein (P-gp, ABCB1, MDR1, Çoklu İlaç Direnci Proteini 1)	22
4.4.4. MRP Çoklu İlaç Direnci İlişkili Protein Ailesi	23

5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
5.1. MATERYAL	26
5.1.1. Sarf Malzemeler	26
5.1.2. Cihazlar	27
5.2.YÖNTEM	27
5.2.1. Total RNA İzolasyonu	27
5.2.2. Formaldehit AgaroZ Jel Elektroforezi	28
5.2.3. cDNA Sentezi.....	28
5.2.4. cDNA Varlığının Doğrulanması	29
5.2.5. MRP-1 ve MRP-2 Geni İçin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu....	30
6. BULGULAR	32
6.1. MRP1 ve MRP2 GENİNİN ANLATIMI	34
6.1.1. Total RNA İzolasyon ve Kalitatif Tayini.....	34
6.1.2. cDNA Sentezi ve Kalitatif Tayini	34
6.1.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Q RT-PCR) Analizleri..	35
7. TARTIŞMA.....	39
8. SONUÇ.....	44
9.TEŞEKKÜR	45
10.KAYNAKLAR.....	46
EKLER	

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Özel kardiyomiyopatiler.....	12
Tablo 2: Dilate kardiyomiyopati sınıflaması ve etyolojik nedenler.	15
Tablo 3: cDNA sentezi için kullanılan bileşenler.....	29
Tablo 4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon ve solüsyonu.....	29
Tablo 5: Gerçek zamanlı PZR için PZR bileşenleri.	31
Tablo 6: MRP-1 ve MRP-2 transkript varlığının belirlenmesinde kullanılan Gerçek Zamanlı PZR programı.	31
Tablo 7: DKMP ve sağlıklı kontrollerde MRP1, MRP2 ve ABL1 düzeylerinin karşılaştırılması.....	32

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Hipertrofik kardiyomiopatinin şematik görüntüsü.....	7
Şekil 2: Dilate kardiyomiopatinin şematik görüntüsü.	8
Şekil 3: Restriktif kardiyomiopatinin şematik karşılaştırması.	9
Şekil 4: Aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiopatisinin şematik karşılaştırması.	11
Şekil 5: MDR 1 geninin 7. kromozomdaki yerleşimini gösteren diyagram.....	21
Şekil 6: P-glikoprotein moleküler mekanizması.	23
Şekil 7: MRP1 moleküler mekanizması	24
Şekil 8 :DKMP ve sağlıklı kontrollerde MRP1, MRP2 ve ABL1 geni düzeylerinin ortalama Ct değerleri.	32
Şekil 9: Total RNA örnekleri. Fotoğrafta 28S ve 18S’lik rRNA’lar görülmektedir.	34
Şekil 10: cDNA sentezi ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görünüşleri. 1-6 cDNA	35
Şekil 11: MRP1 Geni için gerçekleştirilen Q RT-PCR’ın ekran görüntüsü.....	36
Şekil 12: MRP1 geni için erime eğrisi analizi.	36
Şekil 13: MRP2 geni için gerçekleştirilen Q RT-PCR’ın ekran görüntüsü.....	37
Şekil 14: MRP2 geni için erime eğrisi analizi.....	37
Şekil 15: ABL1 Geni için gerçekleştirilen Q RT-PCR’ın ekran görüntüsü	38

SİMGE VE KISALTMALAR

DKMP	:Dilate Kardiyomiyopati
KMP	:Kardiyomiyopati
ABC	:ATP Bağlayıcı Kaset Protein
ABCC	:ATP Bağlayıcı Kaset Protein (C Ailesi)
MRP	:Çoklu İlaç Direnci İle Bağlantılı Protein
ABL1	:Abelson Lösemi Virüs Onkogen Eşdeğeri
kDA	:Kilodalton
DCM	:Dilated Cardiomyopathy
FHC	:Ailesel Hipertrofik Kardiyomiyopati
FDC	:Ailesel Dilate Kardiyomiyopati
MYH7	:Kardiyak Beta-Miyozis Ağır Zinciri
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
RNA	:Ribonükleik Asit
KAH	:Kroner Arter Hastalığı
EKG	:Elektrokardiyografi
HIV	:İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
ACE	:Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ATP	:Adenozin Trifosfat
P-gp	:P-glikoprotein
BCRP	:Meme Kanseri Rezistans Proteini
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	:Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
EF	:Ejeksiyon Fraksiyonu
EDTA	:Etilendiamin Tetraasetik Asit
cDNA	:Komplementer DNA
MOPS	:Morfolinopropan Sülfonik asit
DEPC	:Dietilpirokarbonat

Etik Kurul Kararı:**Karar No:** 01.09.2014/23-166

Aşağıda belirtilen çalışmamız 01.09.2014 tarihli T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu toplantısında incelenmiş, çalışmanın yapılmasında etik ve bilimsel açıdan bir sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Yüksek Lisans Tez Proje No: TBG/ YL/ 1942014

İBAPKO No: 20140108



1.ÖZET

Dilate kardiyomiyopati (DKMP), normal sol ventrikül duvar kalınlığı ile beraber kasılma disfonksiyonu ve ventrikülde genişleme ile karakterize, ilerleyici kalp kası hastalığıdır. Kardiyomiyopatinin kalıtsal hastalıklar, infeksiyonlar ve toksinleri de içeren birçok nedeni bulunmaktadır. DKMP'nin yaklaşık dörtte biri idiyopatiktir. Ekokardiyografi ve aile ağacı çalışmalarıyla idiyopatik olarak adlandırılan DKMP hastalarının %20'si ailesel bulunmuştur. Ailenin diğer bireylerinde de hastalık çeşitli şekillerde kendini gösterebilir. Dilate kardiyomiyopati saptanan kişilerde hastanın diğer aile bireylerinin de (Çocukları dahil) araştırılmasının önemi belirtilmektedir.

Hastalığın tedavisi sırasında ilaçlara gösterilen direnç mekanizmaları ve ilaçlara bağlı yan etkiler, ilaç metabolize eden enzimlerdeki genetik varyasyonlara bağlı olarak aynı toplumdaki bireyler arasında farklılık gösterir. Bu fark, ilaç direnci oluşturan MRP genlerinin ekspresyonuna bağlı olabilir.

Bu çalışmada, MRP-1 ve MRP-2 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi ile tedavide çoklu ilaç kullanımı gerektiren DKMP' li hastalarda tedaviye yanıtındaki kişisel farklılıkların açıklanması ve hastalığa ait tedavinin moleküler temellerinin daha fazla aydınlatılmasına destek olunmasını amaçladık. 90 DKMP tanısı konan hasta ile 90 sağlıklı erişkin kontrolden oluşan 2 grubun periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Total RNA örnekleri cDNA'ya çevirildi. Hedef gen (MRP-1 ve MRP-2) ve referans gene (ABL) ait tasarlanan primerler kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Q PCR) yapıldı. Böylece referans ve hedef gene ait cDNA'lar çoğaltıldı. Genlerin ekspresyon düzeyleri ölçülerek, veriler kaydedildi. Elde edilen veriler doğrultusunda, DKMP hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre MRP-1 mRNA düzeyinin 6 kat, MRP-2 mRNA düzeyinin ise 77 kat fazla olduğu hesaplandı.

Bu çalışmanın sonucunda, MRP-1 ve MRP-2 genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi DKMP hastalığının tedavisine katkı sağlayabilir. Ancak bunun için DKMP' li hastalarda daha fazla gen ailesinin ve sayısının artırılarak elde edilen verilerin desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Dilate kardiyomiyopati, MRP-1 ve MRP-2 geni, gen ekspresyonu.

2. SUMMARY

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a progressive disease of heart muscle characterized by contractile dysfunction and ventricular dilatation with normal left ventricular wall thickness. There are many causes of cardiomyopathy including hereditary diseases, infections and toxins. According to echocardiography and pedigree studies; approximately 20% of DCM cases are assigned a diagnosis of idiopathic dilated cardiomyopathy. Disease could be seen in the other members of family due to familial inheritance. The patient's other family members also (including children) are required to be checked their health conditions.

During the treatment of DKMP; the resistance mechanisms and side effects of drugs, varies between individuals in society due to genetic variations in drug metabolizing enzymes. This difference may be depends on the expression of MRP genes that makes the multiple drug resistance.

In this study, as a result of the evaluation of gene expression analysis of MRP-1 and MRP-2, we aimed to explain the differences of the treatment response of the DCM patients, who need the multiple drug usage, and help to clarify the molecular bases of treatment. 90 DCM patients and 90 healthy individuals peripheral blood samples were collected for total RNA isolation. cDNA was prepared by using the total RNA isolated from the samples. Q-PCR was evaluated by using the target genes (MRP-1 and MRP-2) and a reference gene (ABL) primers, the reference and target cDNA's were replicated. The expression levels of the target gene and the references were measured for analysis. According the results of the analyses, the DCM patients had 6 times increased expression levels on MRP-1 gene mRNA versus healthy individuals and 77 times increased expression levels on MRP-1 gene mRNA versus healthy individuals.

Evaluation the gene expression of MRP-1 and MRP-2 may contribute to the treatment of DCM disease. But this study needs to be improved by increasing the gene families and supported by the other scientific data.

Key words : Dilated cardiomyopathy ,MRP-1 and MRP-2 genes , gene expression.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Dilate kardiyomiyopati genetik veya sonradan kazanılan kronik bir kalp hastalığıdır. Kalbin giderek büyüdüğü, kalp boşluklarının genişlediği ve kalbin kasılma kuvvetinin giderek zayıfladığı bir hastalıktır. DKMP'nin yaklaşık dörtte biri idiyopatiktir. Ekokardiyografi ve aile ağacı çalışmalarıyla idiyopatik olarak adlandırılan DKMP hastalarının %25'i ailesel bulunmuştur (1).

Kalp yetersizliği nedenlerinden biridir ve genelde ilerleyici bir hastalıktır. Her hastada seyri ve şiddeti farklı olabilir. Hastalık bazen çocuk veya genç yaşta bazen de erişkin yaşta kendini göstermeye başlar. Ne yazık ki ani ve erken yasta ölüm riski yüksektir. Ailesel bir hastalık olduğu için ailenin diğer bireylerinde de hastalık çeşitli şekillerde kendini gösterebilir. Dilate kardiyomiyopati saptanan kişilerde hastanın diğer aile bireylerinin de (Çocukları dahil) araştırılması gereklidir.

DKMP çoklu ilaç tedavisi gerektiren, tedavilerin kişilere göre değiştiği, uzun dönem takip gerektiren, maliyeti yüksek, prognozu kötü olan kronik bir hastalıktır. Medikal tedavi halen DKMP de en etkin ve ilk sıra tedavi seçeneğidir. Kullanılan çoklu ilaç tedavisine rağmen hastadan hastaya klinik seyir ve ilaç dozlarında farklılıklar izlenmektedir. Bu farklılıkların bir sebebi de ilaçlara karşı gelişen dirençtir.

Tedavi sırasında ilaçlara gösterilen direnç mekanizmaları ve ilaçlara bağlı yan etkiler ilaç metabolize eden enzimlerdeki genetik değişikliklere bağlı olarak aynı toplumdaki bireyler arasında farklılık gösterir. Bu fark, ilaç direnci oluşturan MRP genlerinin ekspresyonuna bağlı olabilir.

Çoklu ilaç direnci ilişkili protein (Multidrug Resistance Associated Protein, MRP), ABC taşıyıcı ailesinin ABCC alt ailesine dahildir. ABCC alt ailesi 13 proteinden oluşmaktadır. Bunlardan dokuzu MRP ile ilişkilidir ve MRP1'den MRP9' a kadar isimlendirilmiştir (sırasıyla ABCC1-6 ve ABCC10-12) (2).

MRP-1 ve MRP-2 doğal organik ilaçlara karşı direnç geliştirirler. 1992 yılında keşfedilen MRP-1, 16.(16p13.1) kromozomda yerleşiktir ve 190 kDa büyüklüğündedir (3). Çoklu ilaç direnci ilişkili protein 2 (Multidrug Resistance Associated Protein 2, MRP2),

ABC taşıyıcı ailesinin ABCC alt ailesine dahildir (4). İnsan MRP2 geni (ABCC2) 32 ekson içermekte ve 10q24 kromozomunda bulunmaktadır (5).

Kalp yetmezliğinde, tedavide çoklu ilaç kullanımı gerektiren DKMP' li hastalarda tedavi süresince ilaca direnç geliştiği bilinmektedir. Bazı hasta gruplarında düşük dozda dahi yeterli etkisi gözlenen ilaç kullanımının, diğer hasta grubunda aynı etkiyi göstermeyip yüksek dozda belirlenen ilaç tedavisi uygun bulunmuştur. Bu çalışmamızda, ilaca direnç gelişmesinde etken olduğu bilinen ABC gen ailesine ait MRP1 ve MRP2 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenerek bu iki genin DKMP hastalığının tedavisinde ilaç direnci oluşmu üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tedavi başlangıcından önce, hastaya ait bu iki genin transkript miktarını belirlemek, ilaç kullanımında oluşacak muhtemel direnci öngörmek açısından önemli olacaktır. MRP-1 ve MRP-2 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi sonucunda, tedaviye yanıtındaki kişisel farklılıkları açıklamak ve doğru hastaya, doğru zamanda, etkin dozda ilaç verilmesi ile uygulanan tedavilerin etki düzeylerinin artırılmasının, hastalığın prognozu açısından da önemli olacağı ve DKMP hastalığına ait tedavinin moleküler temellerinin daha fazla aydınlatılması ile yeni tedavilerin geliştirilebileceği öngörülmüştür.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. KARDİYOMİYOPATİLER

Kardiyomiyopatiler en belirgin özelliğın kalp kasının doğrudan tutulumu ile karakterize, heterojen bir grup hastalığı oluşturmaktadırlar. Literatürde kardiyomiyopatiler için pek çok sınıflama olmasına rağmen 1995’de Dünya Sağlık Örgütü tarafından geliştirilen sınıflama esas kabul edilmiştir (6). Bununla birlikte son dönemde tanımlanan birçok klinik tablo nedeniyle bu sınıflama yetersiz kalmış ve “Amerika Kalp Cemiyeti” tarafından yeni bir sınıflama yapılmıştır. Kardiyomiyopatiler, elektriksel ve/veya mekanik disfonksiyonla ilişkili miyokard hastalıklarının bir heterojen grubudur ve sıklıkla genetik nedenlere bağlıdır. Bu tanımlamaya göre, kardiyomiyopatiler genellikle miyokardiyal yetersizlik ile ilişkilidirler ve bu ya mekanik (Sistolik veya diyastolik) veya yaşamı tehdit eden aritmilere yol açan primer elektriksel bozukluğa bağlıdır. Kardiyomiyopatiler ya sadece kalbi ilgilendirir veya sistemik hastalıkların bir parçası olabilirler (7). Başlıca iki gruba ayrılırlar; primer kardiyomiyopatiler (Genetik, genetik olmayan, edinilmiş) sadece kalp kasını ilgilendirirler, sekonder kardiyomiyopatiler yaygın sistemik hastalıkların bir parçası olarak patolojik miyokardiyal tutulum gösterirler. İnfiltratif hastalıklara, depo hastalıklarına, ilaçlara veya toksik metabolitlere, inflamatuvar hastalıklara, endokrin hastalıklara, otoimmün hastalıklara ve nöromusküler hastalıklara bağlı olarak sekonder kardiyomiyopatiler gelişebilirler.

WHO/ISCF sınıflamasında kardiyomiyopatiler baskın fizyopatolojik özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Dilate kardiyomiyopati (DKMP), en yaygın formdur; Kardiyomiyopatilerin çoğundan sorumludur ve ventrikül dilatasyonu, kontraktıl disfonksiyon ve kalp yetmezliği semptomları ile karakterizedir. Hipertrofik kardiyomiyopati (HKM); Sol ventrikül hipertrofisi olarak ta bilinir. Sıklıkla interventriküler septumun asimetrik tutulumu vardır ve hastalığın geç evrelerine kadar kontraktıl fonksiyon korunur veya artar. Restriktif kardiyomiyopati (RKM), batı ülkelerindeki en nadir formdur, diyastolik dolumun bozulması ve bazı olgularda ventrikülde endokardiyal skarlaşma ile kendini gösterir. Kardiyomiyopatiler arasındaki ayırım mutlak değildir ve sıklıkla örtüşmektedir. Özel anlamda HKM’li hastalarda duvar sertliği de artmıştır (Miyokardiyal hipertrofinin sonucu olarak) ve RKM’nin bazı

özellikleri mevcuttur. Kardiyomiyopatinin daha seyrek iki formu tanımlanmıştır: Aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiyopatisi ve sınıflandırılmamış kardiyomiyopati. Bu son grup içerisinde fibroelastoz, minimal dilatasyonlu sistolik disfonksiyon ve belirgin trabekülasyonlar ve derin girintilerle birlikte yoğun endokardiyal kalınlaşma ile karakterize olağan dışı bir hastalık olan izole ventrikül dilatasyon yer alır. Bunun yanı sıra, HKM'nin geç dönemlerinde ventrikül dilatasyonu ve sistolik kalp yetmezliği oluşabilir ve DKM'yi taklit edebilir (8).

4.2 KARDİYOMİYOPATİLERİN SINIFLANDIRILMASI

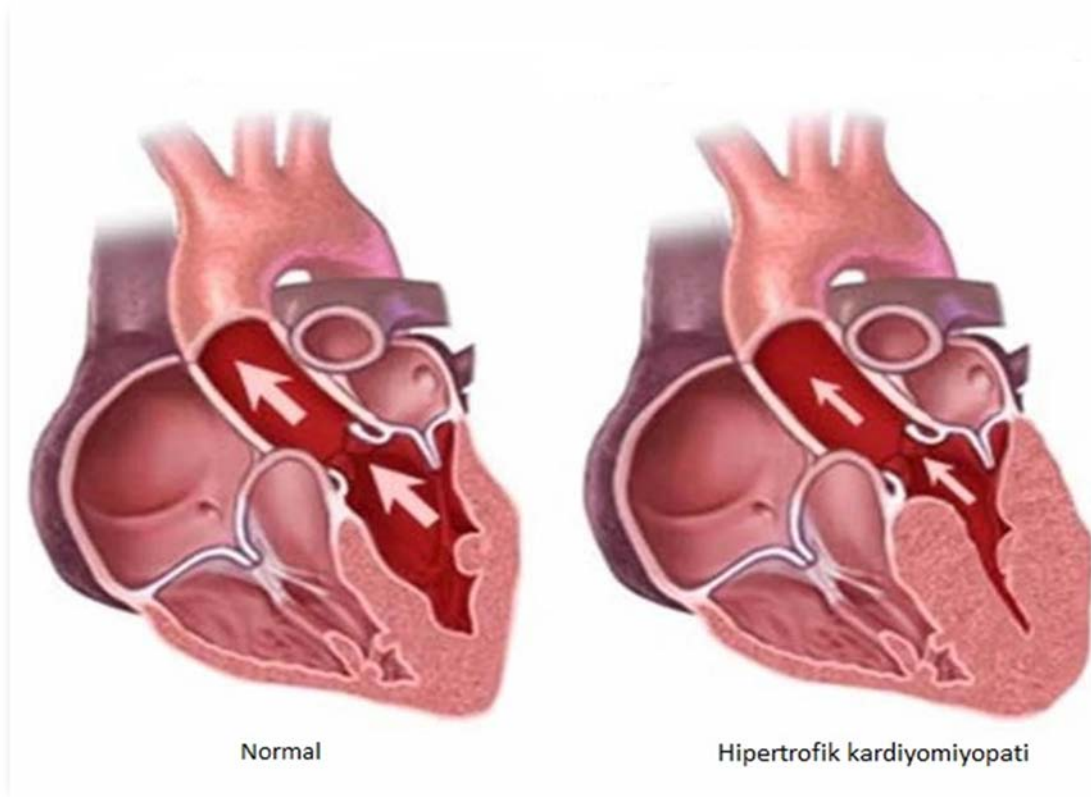
Primer kardiyomiyopatinin üç ana kategorisinin her biri hipertrofik, dilate ve restriktif birçok ailede bulunan Mendeliyan kalıtımının tutarlı fenotipinin gösterdiği gibi tek gen mutasyonları nedeni ile olabilir. Çoğu diğer Mendeliyan ve mitokondriyal hastalık aynı zamanda temel metabolik bozukluklarının sekonder sonuçları nedeniyle kardiyomiyopatiye neden olur.

4.2.1. Hipertrofik Kardiyomiyopati

Hipertrofik kardiyomiyopati 1:500 oranında görülen otozomal dominant genetik bir kalp kası hastalığıdır. Morfolojik olarak hipertrofi ile karakterizedir ve başka bir sistemik veya kalp hastalığı olmaksızın hipertrofiye, dilate olmamış, normal sistolik fonksiyona ve anormal diyastolik fonksiyona sahip sol ventrikül ile tanımlanmaktadır (Şekil 1). Hipertrofik kardiyomiyopatili hastaların birçoğunda istirahatte sol ventrikül çıkış yolu obstruksiyonu mevcuttur ve bu fizyolojik provokasyon ile belirginleşebilir (7). Hipertrofik kardiyomiyopatilerin yaklaşık yarısı ailesel olup, sarkomer proteinini kodlayan genlerde bozukluk saptanmıştır. Hipertrofik kardiyomiyopati genellikle erken erişkin dönemde tanı alsa da, sarkomer mutasyonlarının neden olduğu geç başlangıçlı hipertrofik kardiyomiyopati olguları da mevcuttur (9).

Ailesel hipertrofik kardiyomiyopati, tanımlanmış kalın ve ince filamentlerin primer defektleri olan sarkomer bir hastalıktır. En az 10 ve belki de daha fazla lokusta mutasyon ailesel hipertrofik kardiyomiyopati'ye (FHC) neden olur (10). İlk tanımlanan gen kardiyak beta-miyozis ağır zinciridir (MYH7). Çalışan popülasyona bağlı olarak tüm FHC'de saptanan mutasyonların ~ %50'si MYH7'de genindedir. (11,12). Ebeveynlerinin hiçbirinin

etkilenmediği olgularda da MHY mutasyonları olabilir, bu da genetik değişikliğin anne ve babanın yumurta ve spermelerinde olabileceğini akla getirmektedir. Anne ve babasının lökosit DNA'larında mutasyon görülmemesine rağmen FHC'li ve MYH72 de aynı mutasyonu olan iki kardeş germline mozaizm olasılığını fazlasıyla düşündürmektedir (13). Beta miyozin ağır zincirin işleyişinde değişikliğe yol açan mutasyonlar, tespit edilme yaşı, elektrokardiyografik anomaliler ve ani ölüm açısından kötü prognozludur (14,15). Bu yüzden spesifik mutasyonu takiben ilgili spesifik geni tanımlamak klinik açıdan oldukça önemlidir (16).

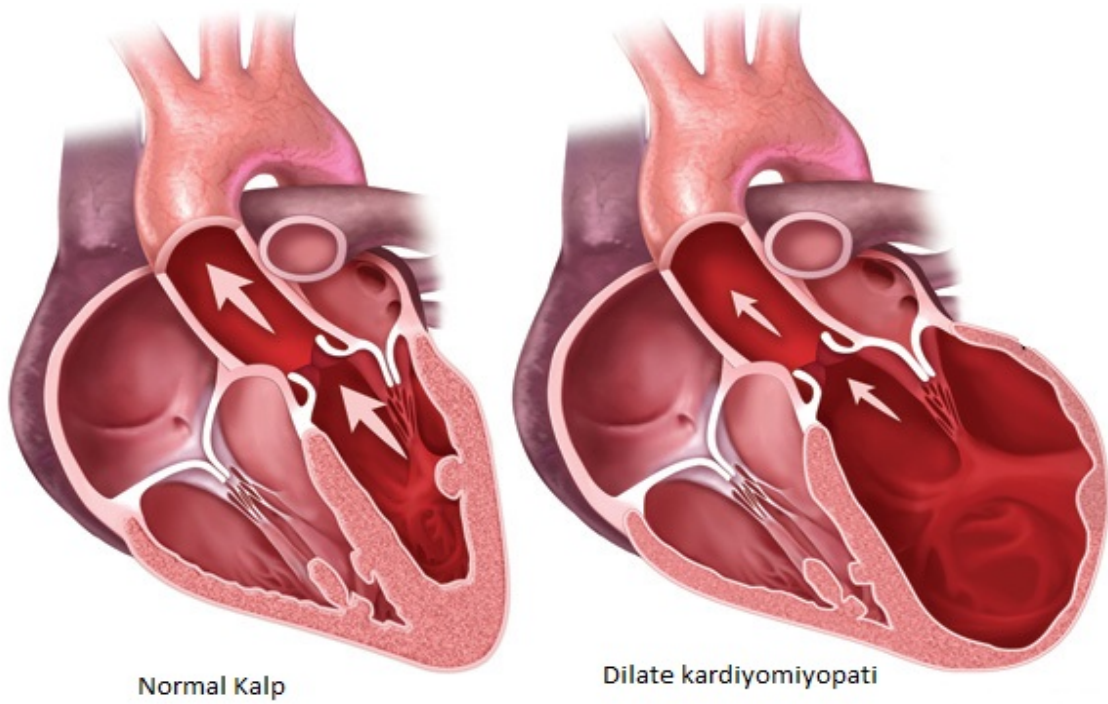


Şekil 1: Hipertrofik kardiyomiyopatinin şematik görüntüsü.

4.2.2. Dilate Kardiyomiyopati

Dilate kardiyomiyopati kalp boşluklarında dilatasyon ve sistolik disfonksiyonla karakterizedir (Şekil 2). Dilate kardiyomiyopati progresif kalp yetersizliği nedenidir ve ventriküler ve supraventriküler aritmilere, iletim sistemi anormalliklerine, tromboemboliye ve ani ölüme yol açabilir. Dilate kardiyomiyopati sıklığı 1:2500'dir ve kalp

transplantasyonunun en sık nedenidir. Sıklıkla 3. veya 4. dekatta olmak üzere her yaş grubunda ortaya çıkabilir. Dilate kardiyomyopatinin yaklaşık %20- 35'i aileseldir. Bunun dışında pek çok nedeni vardır. İnfeksiyöz ajanlar (Coxsackievirus, adenovirus, parvovirus, HIV gibi virüsler; bakteriler; mantarlar, parazitler), toksinler, alkol, kemoterapötik ajanlar, otoimmün hastalıklar, nöromusküler hastalıklar, metabolik ve endokrin hastalıklar başlıca nedenleri oluşturmaktadır. Otozomal, resesif ve X'e bağlı kalıtım söz konusudur ve ilişkili pek çok gen tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları kardiyak aktin, tropomyosin, troponin T, I, ve C, miyozin ağır zincir, miyozin bağlayan protein C'dir (7). Hastaların yaklaşık yarısında etiyoloji belirlenemez ve idiyopatik dilate kardiyomyopati olarak adlandırılır.



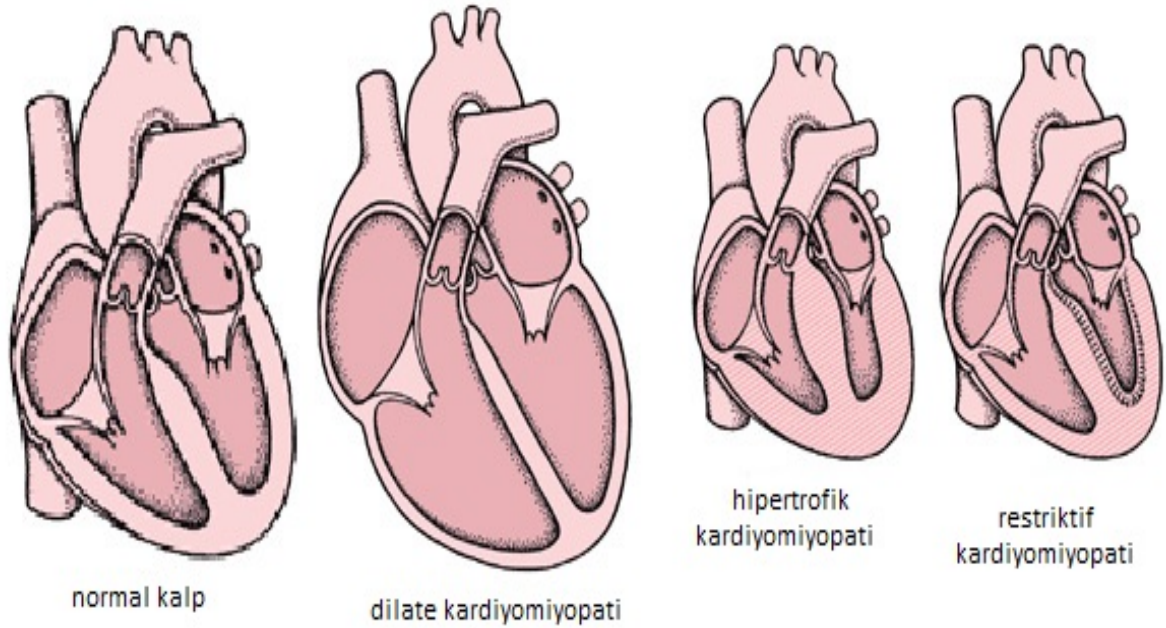
Şekil 2: Dilate kardiyomyopatinin şematik görüntüsü.

4.2.3. Restriktif Kardiyomyopati

Restriktif kardiyomyopati kalbin sistolik fonksiyonlarının ve duvar kalınlıklarının normal ya da normale yakın olduğu, diyastolik volümün azaldığı ve restriktif doluş paterninin gözlemlendiği bir kalp kası hastalığıdır (Şekil 3). Atriyum sıklıkla dilatedir ve diyastolik fonksiyon bozulmuştur. Sekonder restriktif kardiyomyopati hipertrofik, dilate

ve iskemik kardiyomiyopatilerin geç döneminde veya amiloid gibi spesifik miyokard hastalıklarına bağlı olarak gelişebilir (17). İdiyopatik veya primer restriktif kardiyomiyopatide ise bu nedenlerin hiçbirisi söz konusu değildir ve bu durum oldukça nadirdir.

Restriktif Kardiyomiyopati olgularının çoğunun patogenezi, miyokardın infiltrasyonu veya yenilenmesini veya her ikisini de kapsar. Nedenleri farklıdır ve nongenetik veya genetik olabilir. Genetik nedenler çoğunlukla kalbe sekonder etkileri olan metabolik hastalıklardır. Diğer birçok neden arasında primer genetik formları olan restriktif kardiyomiyopatinin bir şeklide endokardiyal fibroelastozistir. Diğer mutasyonlar perikardiyal konstrüksiyon yoluyla restriksiyona neden olurlar. Sekonder bir nedeni olmayan ve hemodinamik restriksiyona yol açan primer miyokardiyal fibrozisin izole olduğu aile ağaçları sınıflandırılabilir değildir.

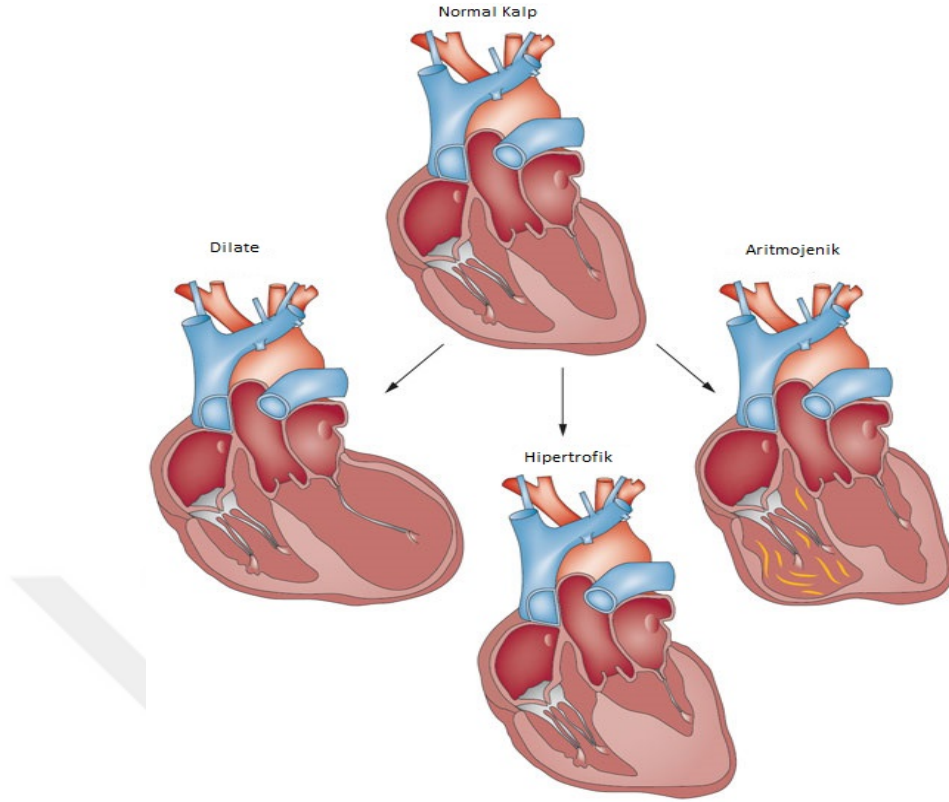


Şekil 3: Restriktif kardiyomiyopatinin şematik karşılaştırması.

4.2.4. Aritmojenik Sağ Ventrikül Kardiyomiyopatisi

Aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiyopatisi (ASVK) ilk kez 1977 yılında Fontaine ve ark. tarafından sağ ventrikül miyokardını tutan, dilatasyon, bölgesel hipokinetik alanlar ve sol dal bloğu örnekle ventriküler taşikardi ile karakterize ailevi bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Şekil 4) (18,19). Sağ ventrikül serbest duvarı kısmen veya hemen hemen tamamen yağ ve fibröz doku ile yer değiştirmiştir (20,21). İnsidans ve prevalansı kesin olarak bilinmemektedir. Daha önce kardiyak yakınması olmayan 65 yaşın altındaki ani ölümlerin kardiyak nedenlerini araştırıldığı bir çalışmada sıklık %5 olarak bildirilmiştir (22). Aritmisi olan genç atletlerde %6, kardiyak arrest-ani ölüm atağı geçirmiş olan atletlerde ise %23 gibi yüksek bir sıklıkta saptanmıştır (23).

Hastalığın edinsel (İnflamatuvar, toksik veya iskemik) ve kalıtsal olduğu konusunda teoriler ileri sürülmektedir. Bazı araştırmacılara göre kalp kasında inflamatuvar hücrelere rastlanması ASVK' nin miyokardit sekeli olarak geliştiğini göstermektedir (24;28). Buna karşılık çok sayıda ailesel olgular bildirilmiş ve hastalığın kalıtımının tam olmayan geçişli ve değişken iletilen otozomal dominant karakterde olduğu ileri sürülmüştür (29;33). Tek yumurta ikizlerinde hastalığın görülmesi genetik bozukluğu desteklemektedir (34). Kısa süre önce DNA "bağlantı" analizi ile Rampazzo ve ark. (35) tarafından 14q23-q24, Ahmad ve ark. tarafından 3p23 lokalizasyonunda anormal genlerin bulunması ve bu lokalizasyonlar ile beraber kromozom 1, 2, 3, ve 14'te iki ayrı yerde olmak üzere toplam beş ayrı yerde bozuklukların tespit edilmesi sonucunda hastalığın kalıtsal olduğu fikri önemli ölçüde kabul görmüştür (36;39). Otozomal dominant iletilen bu kromozom bozukluklarının yanısıra Yunanistan'ın Naksos adasında diffüz nonepidermolitik palmoplantar keratoderma ile beraber olan 17. kromozomda bozukluk ve otozomal resesif geçiş gösteren nadir bir formu da tanımlanmıştır (40,41). Genetik biliminin hızla ilerlemesine rağmen henüz tanı için genetik bir test yoktur.



Şekil 4: Aritmojenik sağ ventrikül kardiyomyopatisinin şematik karşılaştırması.

4.2.5. Özel Kardiyomyopatiler

Kardiyomyopatiler ya sadece kalbi ilgilendirirler veya sistemik hastalıkların bir parçası olabilirler. Başlıca iki gruba ayrılırlar. Primer kardiyomyopatiler (genetik, genetik olmayan, edinilmiş) sadece kalp kasını ilgilendirirler. Sekonder kardiyomyopatiler yaygın sistemik hastalıkların bir parçası olarak patolojik miyokardiyal tutulum gösterirler. İnfiltratif hastalıklara, depo hastalıklarına, ilaçlara veya toksik metabolitlere, inflamatuvar hastalıklara, endokrin hastalıklara, otoimmün hastalıklara ve nöromusküler hastalıklara bağlı olarak sekonder kardiyomyopatiler gelişebilirler (Tablo 1).

İskemik: Kroner Arter daralması veya iskemik hasarla açıklanamayan deprese ventriküler fonksiyonla birlikte dilate KMP şeklinde ortaya çıkar.
Valvular: Kapak darlığı veya yetersizliğine bağlı oluşan sol ventrikül disfonksiyonu olarak ortaya çıkar.
Hipertansif: Sistolik veya diyastolik disfonksiyonlarla ilişkili kalp yetmezliği belirtileri olan sol ventrikül hipertrofisi şeklinde ortaya çıkar.
İnflamatuvar: Miyokardit nedeniyle oluşan kardiyak disfonksiyon.
Metabolik: Endokrin bozukluklar, glokojen depo hastalığı, hipokalemi gibi yetmezlikler ve beslenme hastalıkları gibi çok çeşitli nedeni vardır.
Genel Sistemik Hastalık: Bağ dokusu hastalıkları vesarkoidoz ve lösemi gibi infiltratif hastalıkları içerir.
Kas Distrofileri: Duchenne, Becker-type ve miyotonik distrofileri içerir.
Nöromuskular Hastalık: Friedreich ataksisi, Noonan sendromu, and lentiginosisi içerir.
Duyarlılık ve Toksik Reaksiyonlar: Alkol reaksiyonları, katekolaminler, antrasiklinler, radyasyon ve diğerlerini içerir.
Peripartum: İlk olarak peripartumda ortaya çıkar ancak heterojen bir grup olduğu düşünülmektedir.

Tablo 1: Özel kardiyomiyopatiler.

4.3. DİLATE KARDİYOMİYOPATİ

Dilate kardiyomiyopati normal sol ventrikül duvar kalınlığı ile beraber kasılma disfonksiyonu ve ventrikülde genişleme ile karakterize ilerleyici kalp kası hastalığıdır. Sağ ventrikülde de genişleme ve disfonksiyon olabilir. Eksantrik hipertrofi nedeniyle kalbin total kitlesinde artış mevcuttur. Miyokardiyal yeniden yapılanma, azalmış ejeksiyon fraksiyonu ve stroke volüm, artmış kaviter volüm ve basınçlarıyla birlikte hemodinamik bozulmaya yol açar (42).

Dilate kardiyomiyopatiden bir veya birden fazla neden sorumlu olabilir. Miyokardiyumdaki normal müsküler fonksiyonda gelişen tüm değişiklikler, değişen derecelerdeki kompanzasyon mekanizmalarının sonucudur.

Dilate kardiyomiyopatinin tanısında ekokardiyografi esastır. Kalp boşluklarının çapları ile fonksiyonları değerlendirilebilir ve kapak ve perikard anormallikleri dışlanabilir. Troponin ve natriüretik peptidlerin ölçümü tanı ve prognozun belirlenmesinde yardımcıdır. Kardiyak manyetik rezonans görüntüleme ve çok kesitli bilgisayarlı tomografi günümüzde kardiyomiyopati hastalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Dilate kardiyomiyopati yaşlı hastalarda koroner arter hastalığının dışlanması tedavinin şeklinin belirlenmesinde önemlidir. Koroner arter hastalığının sıklıkla görüldüğü bu yaş grubunda anlamlı koroner arter darlığını dışlamak için çoğunlukla koroner anjiyografi yapılması gerekmektedir.

Dilate kardiyomiyopati yaşlı hastalar genç hastalara göre daha kötü prognoza sahip olsalar bile prognoz geçmiş yıllara göre kalp yetersizliği tedavisinde iyileşmelere paralel olarak düzelmiştir. Bu özellikle anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, anjiyotensin reseptör blokerleri ve betablokerlerin kullanımı ile ilişkilidir. Medikal tedavi ve hastalığın daha erken teşhisi ile dilate kardiyomiyopati yaşlı hastaların yaşam oranları son yirmi yılda belirgin artmıştır (43). Yaşlı hastalarda ilaçlara bağlı yan etki gelişme riski daha yüksek ve ilaçların terapotik aralığı daha dar olsa bile anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri/anjiyotensin reseptör blokerleri ve beta- blokerler standart tedavi olarak mutlaka önerilmelidir.

4.3.1. Dilate Kardiyomiyopati Etyolojisi ve Sınıflandırma

Amerika Birleşik Devletlerinde konjestif kalp yetmezliği olgularının yaklaşık dörtte biri DKM'ye bağlıdır. Geriye kalanların çoğunda hastalık nedeni, koroner arter hastalığının

veya daha seyrek olarak hipertansif kalp hastalığının sekelidir (44). Klinik DKM tablosu gösteren tüm hastaların yarısından fazlasında derin incelemeye rağmen herhangi bir etiyoloji tanımlanamaz ve bu hasta grubu idiyopatik DKM olarak değerlendirilir (45). Bu durumun, şimdiye kadar belirlenmemiş çeşitli miyokard hasarının yaygın bir tablosu olma ihtimali vardır. Etken veya etkenler belirsiz olsa da, tüm ilgi, üç olası temel hasar mekanizması üzerine yoğunlaşmıştır: (1) ailesel ve genetik faktörler, (2) viral miyokardit ve diğer sitotoksik saldırılar ve (3) immünolojik anormallikler.

DKMP' de ailesel köken, beklenenden daha yaygın karşılaşılan bir faktördür. DKMP'li hastaların yaklaşık %25-30'unun, bir genetik mutasyon sonucu olarak kalıtsal bir hastalık formu taşıdıkları düşünülür (46). DKMP hastalarının bazı asemptomatik akrabalarında, aşikar semptomatik DKMP'ye ilerleyebilen subklinik sol ventrikül büyümesi veya disfonksiyonu yada her ikisi birden bulunur (47). Çoğu ailesel olgu otozomal dominant geçiş göstermektedir. Bir düzineden fazla kromozomal bölge tanımlanmıştır ve daha fazlasının tanımlanma olasılığı yüksektir (48). Ailesel DKMP, hücre iskeletini, çekirdek membranını veya desmin, titin ve troponin T gibi kontraktil proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır (48;51). İstisnai bir formu, lamin A/C genindeki mutasyonlara bağlıdır ve iletim kusurlarıyla değişken iskelet kası tutulumuyla ve erişkinliğe kadar yaşama oranının azalmasıyla ilişkilidir (52). Bir diğer varyant fosfolambanı etkiler ve miyosellüler kalsiyum düzensizliğine yol açar (53).

Bununla birlikte, ailesel DKMP genetik olarak oldukça heterojendir ve aynı zamanda otozomal resesif ve X geçişli kalıtım tanımlanmıştır (54). Ailesel X geçişli DKMP formlarından biri, miyositlerin hücre iskeletinin bir bileşeni olan proteini (distrofin) kodlayan genin promotor bölgesindeki ve birincil eksonundaki bir delesyona bağlıdır (55). Bu hastalık formu, ortaya çıkan kardiyak distrofin eksikliğinin ilgili DKMP'nin nedeni olduğu yönünde düşündürmüştür (56). (Mitokondriyal DNA'yı tutan mutasyonlarda bildirilmiştir (57).

Belirgin ailesel bağlantı görülmeyen hastaların herhangi birinde DKMP'ye genetik yatkınlık olup olmayacağı hala belirsizdir. İleride aşikar klinik DKMP gelişme riski bulunan asemptomatik taşıyıcılarda hastalığa yatkınlığın belirteçlerini tanımlamada moleküler genetik tekniklerin kullanımına yoğun bir ilgi artışı vardır. DKMP'li hastalarda olumsuz klinik seyirle ilişkili olan anjiyotensin dönüştürücü enzim DD genotipi bu belirteçlerin bir örneği olabilir (58). Ailesel bir bağlantı bulgusu olmadığı durumlarda bile,

yetmezliğe giren kalpte çeşitli gen değişimleri ve değişken kontraktil proteinlerden oluşan bir protein ekspresyonu gözlenir (43).

Ailesel DKMP
Ailesel bilinmeyen genler (İdiyopatik)
Sarkomerik protein mutasyonları
Z- band mutasyonları (LIM protein)
Sitoskeletal genler (Distrofin, desmin)
Nükleer membran mutasyonları (Lamin)
Mitokondriyal sitopatiler
Hafif dilate konjestif kardiyomiyopati
Ailesel olmayan DKMP
İdiyopatik DKMP
Miyokardit (İnfektif, otoimmün, inflamatuvar)
Peripartum DKMP
Alkol
İnfiltratif hastalıklar (Amiloidoz, sarkoidoz, hemokromatozis)
Bağ dokusu hastalıkları (SLE, skleroderma, poliarteritis nodoza, ankilozan spondilit)
Endokrin hastalıklar(Hipotiroidi, akromegali, feokromasitoma)
Nutrisyonel (Tiamin, karnitin, selenyum, hipofosfatemi, hipokalsemi)
Nöromusküler hastalıklar
HIV
Radyasyon
Kronik taşikardi
İlaçlar (Kardiyotoksik kemoterapötikler, kokain, lityum, prednisone)
Akut romatizmal ateş

Tablo 2: Dilate kardiyomiyopati sınıflaması ve etyolojik nedenler.

4.3.2 Dilate Kardiyomiyopati de Doğal Seyir ve Prognoz

DKM'nin seyri iyi bilinmemektedir. Bir çok hastada hiç semptom görülmez veya çok az görülür. Bu hastalarda hastalığın ilerleyişi belirsiz olmasına karşın uzun süreli prognozun iyi olmadığına ilişkin bazı bulgular vardır. Bununla birlikte, semptomatik hastalarda hastalığın seyri genellikle progresif kötüleşme şeklindedir. Kalp yetmezliği hastalarının %10-50'si çalışmadaki hasta kohortuna bağlı olarak bir yıl içinde ölmektedir (30). Tipik bir kalp yetmezliği hastası için yıllık mortalite oranı yaklaşık %11-13 hesaplanmıştır (31).

DKM nedeni ölüm riski yükselmiş hastalar için çeşitli klinik belirleyiciler tanımlanmıştır: protodiyastolik galo ritm varlığı, ventrikül aritmileri, ileri yaş ve miyopatik ventrikülün inotrop uyarıma yanıt verme başarısızlığı (32). Bununla birlikte, tek bir özelliğin belirleyicilik açısından güvenilirliği yüksek değildir ve herhangi bir hastada klinik seyri ve sonucu belirli bir doğruluk derecesiyle tahmin etmek zordur. Bunun yanı sıra, özellikle sağ ventrikül hem dilate hem disfonksiyonel ise daha fazla ventrikül büyümesinin ve daha ağır disfonksiyonun daha kötü prognozla korelasyon gösterme eğilimi vardır (33).

4.3.3 Dilate Kardiyomiyopati Patofizyolojisi

Dilate kardiyomiyopati hipertrofi olmadan ya da minimal hipertrofi ile birlikte sol ventrikül boşluk boyutlarında artış ile beraber ventrikülde sistolik disfonksiyonla karakterizedir. Hipertrofiye sol ventrikül kitlesinin boşluk boyutlarına oranıyla karar verilir. Dilate kardiyomiyopati kişilerde bu oran azalmıştır. Kalp boşluğu boyutlarındaki genişleme primer veya sekonder nedenlerden oluşabilmektedir. Dilate kardiyomiyopatiler sistolik ve diastolik disfonksiyonların ikisiyle de ilişkilidir. Primer anomalide sistolik fonksiyon azalması ön plandadır. Bunu sistol sonu ve diastol sonu volümlerde artma izlemektedir (59,60). İlerleyici ventriküler dilatasyon mitral ve triküspit yetmezliğine neden olur. Mitral yetmezliğide ventriküler duvar stresi ve sistol sonu hacimleri arttırırken kardiyak outputu azaltır. Sistolik disfonksiyon ve kardiyak outputtaki azalma nedeniyle erken kompanzasyon atım hacmi, kalp hızı veya her ikisinde (Kardiyak output= atım hacmi x kalp hızı) artış ile kompanse edilmektedir. Ayrıca periferik vasküler tonusta artış da buna eşlik etmektedir. Bu periferik tonustaki artış uygun kan basıncının

sürdürülmesine yardım etmektedir. Ayrıca hemoglobin disosiasyon eğrisinde kayma ile birlikte doku oksijen alım oranında artış gözlenmiştir (61). Düşük kardiyak outputta temel kompanzasyon Frank-Starling Kanunu ile açıklanmaktadır. Kalp kası ventriküler dolum sırasında ne kadar gerilirse o kadar güçlü kontraksiyon meydana gelir ve daha fazla kan pompalayabilir. Bununla birlikte aşırı gerilme myokardiyal kontraktıl bölümlerde yetmezliğe neden olmaktadır. Bu kompanse tuvar mekanizmalar dilate kardiyomiyopatili kişilerde kısmi kompanzasyon ile semptomları baskılayıp tanıyı geciktirebilmektedir. Ayrıca, bu kompanse tuvar mekanizmalar miyokardiyal hasar, disfonksiyon ve geometrik remodelingin (Konsantrik yada eksantrik)'in daha da ilerlemesine yol açmaktadır (62).

4.3.4 Dilate Kardiyomiyopatinin Klinik Belirtileri

Hastalığın klinik bulguları, başlangıç döneminde belirsizdir. Etkilenmiş kişilerde yorgunluk, halsizlik, dispne veya çarpıntı gözlenir. Hastalık ilerledikçe kasılma işlevinde gerileme, kalp yetmezliği, atrial ve ventriküler aritmiler gibi bulgular gözlenir (63). Hastaların üçte birinde göğüs ağrısı görülür. Hastalık progresif olur, hastaların çoğu semptomlar başladıktan sonra genellikle beş yıl içinde ölür (64). Hastalığın belirli bir patolojik bulgusu olmamasına rağmen kardiyak kütlede artış ve ventriküler duvar hipertrofisi gözlenir. Bununla birlikte, klinik septom gözlenmeyen hastalar da vardır. Sol ventriküler dilatasyon ve sistolik fonksiyonda bozukluk olmasına rağmen bireyler asemptomatik görülebilir. Bu bireylerde semptomlar egzersiz durumlarında kendini gösterir (63). Erken ölümler, pompalamanın tamamiyle bozulması, tromboembolik olaylar ve aritmi gibi bozukluklardan dolayı meydana gelir. DKM' nin tanısında kontraksiyon işlevinin azalmasına bağlı olarak kardiyak sistolik ve diastolik boyutunda artma en temel bulgudur (64). Sistolik kan basıncı genellikle normal olmakla beraber bazı hastalarda düşük olabilir. Hastaların çoğu taşikardiktir ve solunum hızı artmış olarak görülür (65).

Yukarıda belirtildiği gibi klinik belirtileri arasında ilerleyen bir kalp yetmezliği, kardiyak dilatasyon, azalmış sistolik fonksiyon, aritmiler, pompa yetersizliği, inme, tromboembolizm ve hastalığın herhangi bir evresinde ani ölüm görülebilir (66;69). Ölümün üçte ikisi ilk iki yıl içerisinde meydana gelir. Beş yıllık mortalite oranı yaklaşık % 50 olup hastaların ancak üçte biri 10 yıl hayatta kalabilir (70).

Makroskobik olarak incelendiğinde; dört odacığın dilatasyonu açıkça görülür (66,71). Ventriküller, atriyumlardan daha fazla genişlemiştir (71). Her iki ventrikül odacığında pıhtı

oluşumu sık görülür (66). Sol ventrikül duvarı kalınlığı normaldir, fakat bazı olgularda sol ventrikül kütleğinde artış olduğu bildirilmiştir (66,71). Koroner arterler ve kardiyak duvarlar normaldir (71).

Mikroskopik olarak incelendiğinde; perivasküler ve interstisiyel fibrozise ait geniş alanlar açığa çıkar. Az miktarda nekroz ve nekroz bölgesinin çevresinde mononükleer hücre göçü görülür. Miyosit boyutunda belirgin bir çeşitlilik vardır; bazı miyokardiyal hücreler hipertrofik iken bazıları atrofiktir (71). Göğüs röntgeninde sağ ventrikül büyümesi ile beraber veya sadece sol ventrikül büyümesi ile kardiyomegali görülür (70,72).

EKG bulguları çeşitlidir ve nonspesifiktir. Özellikle sol dal blokları (Left bundle branch blocks, LBBB) tüm dilate kardiyomiyopati tiplerinde geneldir (71;73). Bazı EKG'ler sol ventrikül hipertrofisi gösterebilir (72). Atriyal ve ventriküler taşiaritmiler görülür (70;73), en yaygın olanı atriyal fibrilasyondur (72).

Ekokardiyografi DKMP'nin tanısı için kullanılan en kullanışlı testtir (72). Tüm odacıklar, ejeksiyon fraksiyonunda bir azalma ve hipokinetik sistolik duvar fonksiyonu ile dilate olmuştur. Ventrikül duvar kalınlığı normal veya artmış olarak bulunur (66,72).

4.3.5. Dilate Kardiyomyopati Tedavisi

Kalp yetmezliği hastalarının tedavisinin amaçları hayatta kalmayı güçlendirmek, semptomları ve maluliyeti asgariye indirmek , fonksiyonel kapasiteyi güçlendirmek ve hastalığın ilerlemesini geciktirmektir. Tedavide farmakolojik tedavi , destek cihazları ,kalp nakli , kardiyak resenkronizasyon tedavisi kullanılmaktadır.

Kalp yetmezliğinin farmakolojik tedavisinde;

1. Diüretikler
 - a. loop diüretikler (Furosemid)
 - b. potasyum tutucu diüretikler (Spironolakton)
 - c. tiazit grubu diüretikler
2. Vazodilatörler
 - a. organik nitratlar
 - b. nitroprussit
 - c. natriüretik peptitler
 - d. nesiritit

3. pozitif inotropik ajanlar
 - a. kardiyak glikozitler (Digoksin)
4. Adrenerjik agonistler
 - a. dobutamin
 - b. dopamin
 - c. adrenalin
 - d. noradrenalin
5. Fosfodiesteraz inhibitörleri
 - a. amrinon
 - b. milrinon
 - c. enoksimon
 - d. levosimendan
6. Nörohormonal inhibitörler
 - a. Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri
 - b. Anjiotensin reseptör blokerleri
 - c. Aldosteron reseptör antagonistleri
7. Antiadrenarjik ilaçlar
 - a. Beta adrenarjik reseptör blokerleri

4.3.6. Dilate Kardiyomiyopati ve Genetik

İdiyopatik dilate kardiyomiyopatinin (DCM) prevalansı, hipertrofik kardiyomiyopatinin yaklaşık iki katıdır ve yaklaşık olarak 100.000’de 2-8’dir. Açıklanamamış DCM olarak değerlendirilmiş hastaların yaklaşık yarısı idiyopatik olarak tarif edilerek, sol taraftadır (74). Ailesel birçok dilate kardiyomiyopatinin (FDC) vakası bildirilmiş olmasına rağmen, probandların rastgele serilerinde kardiyak hastalığın klinik bulgularını saptamak için çok az çalışma yürütülmüştür. Bu nedenle idiyopatik DCM’li hastaların ne kadarının Mendeliyan hastalığı olduğu, ne kadarının Mendeliyan hastalığı için yeni bir mutasyona sahip olduğu ve ne kadarının nongenetik nedenli fenokopilere sahip olduğu belirsizdir. Mendeliyan bir durumu veya çevresel nedenleri düşündüren pozitif aile öyküsü tahminleri %7’den %30’lara kadar artar (11).

DCM’li hastalarda ciddi disritmi riski olması nedeniyle, bu hastalığı olan bireylerin erken tespiti hayat kurtarıcı olabilir. Ekokardiyografi subklinik hastalığı olan etkilenmiş

akrabaları hassasiyetle tespit eder. Şüpheli sol ventrikül büyümesi veya disfonksiyonu olan bireyler ayaktan ekokardiyografik olarak gözlenir ve tanı yine kesin olmazsa başka tetkikler yapılabilir. İdiyopatik DCM'li her hastada ayrıntılı aile öyküsünün alınması gerekir, çünkü bu hastaların yaklaşık %20'sinin etkilenmiş akrabalarının olduğu bilinmektedir (75). Herhangi bir yakın akrabanın nispeten genç yaşta kardiyomiyopati, disritmi veya ani ölüm öyküsü varsa, ailesel hastalığın riski hakkında danışma ve aile ağacının gözden geçirilmesinin olası yararları olduğu önerilmelidir. FDC vakalarının çoğunluğunda otozomal kalıtım vardır, fakat X'e bağlı, otozomal resesif ve mitokondrial formları da vardır (76;79). Klinik değişkenlik, tüm aile ağaçlarında tanımlanır; hastalığın ciddiyetinde, klinik fenotipte ve başlangıç yaşında farklılıkları tipiktir.

FDC'nin otozomal dominant formlarının çoğunun nedenlerinin belirlenmesinde son birkaç yılda hatırı sayılır derecede ilerleme kaydedilmiştir. Hem enerji oluşturulması hem de enerji iletimini etkileyen mutasyonlar DCM fenotipine neden olabilir. Miyokardın histolojik incelemesi genel olarak nonspesifik hipertrofi ve fibrozisi gösterir. Halbuki elektron mikroskopunda mitokondriler belirgin şekilde farklıdır. Bu bulgular diğer nedenlere bağlı konjestif kalp yetersizliği olgularında gözükmez. Mitokondriyal kromozomun farklı mutasyonları dilate kardiyomiyopatiye neden olabilmesine rağmen, çocukluk çağında başlayanları da kapsayan çoğu olgunun kalıtım şekli maternal geçişi akla getirmez (79).

4.4. ATP BAĞIMLI TAŞIYICI PROTEİNLER

4.4.1. Çoklu İlaç Direnci İle İlişkili Protein Ailesi

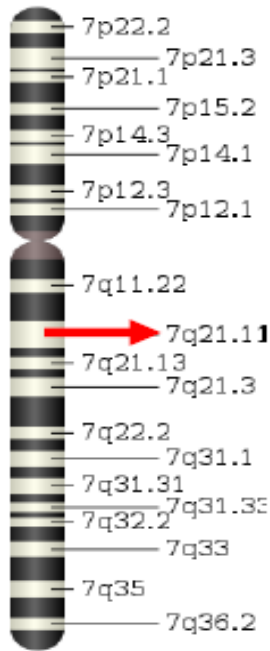
ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcı ailesi çeşitli ilaçların, ksénobiyotiklerin ve endojen bileşiklerin, membranlardan taşınmasını sağlayan proteinlerden oluşmaktadır. ABC proteinleri substratlarını membranlardan pompalayan, ATP'ye bağımlı olarak çalışan primer aktif taşıyıcılardır. Bunların barsak segmentleri, karaciğer, böbrek gibi ilaç Emilimi, metabolizması ve atılımından sorumlu organların yanı sıra, beyin ve kalp gibi diğer önemli dokulardaki varlığı da bilinmektedir. ABC taşıyıcı ailesinin önemli üyeleri olan P-glikoprotein (P-gp), çoklu ilaç direnci bağlantılı proteinler (MRP'ler) ve meme kanseri direnç proteini (BCRP), ilaçların barsak atılımında rol oynamakta; karaciğer ve böbreklerde ise ilaçların sırasıyla safra ve idrar ile atılımlarını kolaylaştırmaktadır. Bu

nedenle, ABC taşıyıcılarının ilaç ve ilaç metabolitlerinin farmakokinetiğinde ve detoksifikasyonunda önemli görev üstlendiği bilinmektedir (80;83).

4.4.2. ABCB1 (MDR-1) Geni

ABCB1 geni diğer adıyla MDR-1 (P-gp), 7.kromozomun q21.1 bölgesinde yerleşim gösterir. 200 kilobaz (kb) uzunluğunda olup 28 eksone sahiptir (Şekil 5). MDR 1 geni 4,5 kb'lık bir mRNA' yi kodlar ve P-gp oluşur. Genin kodlayan bölgesi tamamının sadece %5 kadarlık kısmını oluşturur (84).

Değişik dokuların plazma zarında yer alan taşıyıcı proteinlerin, ilaçların farmakokinetiğinde önemli bir yere sahiptir. Özellikle barsaklarda, hepatik ve böbrek epitel hücrelerindeki yerleşiminden dolayı, bu taşıyıcı proteinler ilaçların emilmesi, biyouygunluk ve eliminasyonu açısından önemlidir. Ayrıca kan-beyin ve kan-plasenta sınırları gibi kanorgan sınırlarında yer almalarından dolayı ilaçların organlara transferinde önemli rol oynarlar. Sadece endojen bileşenlerin değil ilaçları da içeren ekzojen substratları da taşıyan MDR1 gen ürünü olan P-glikoproteini, taşıyıcı proteinler arasında en çok dikkati çekendir. Bunun nedeni pek çok tedavi ilacının P-glikoprotein substratı olması ve bazı hücrelerde P-glikoprotein ifadesini etkileyen mutasyonların görünmesidir(85).



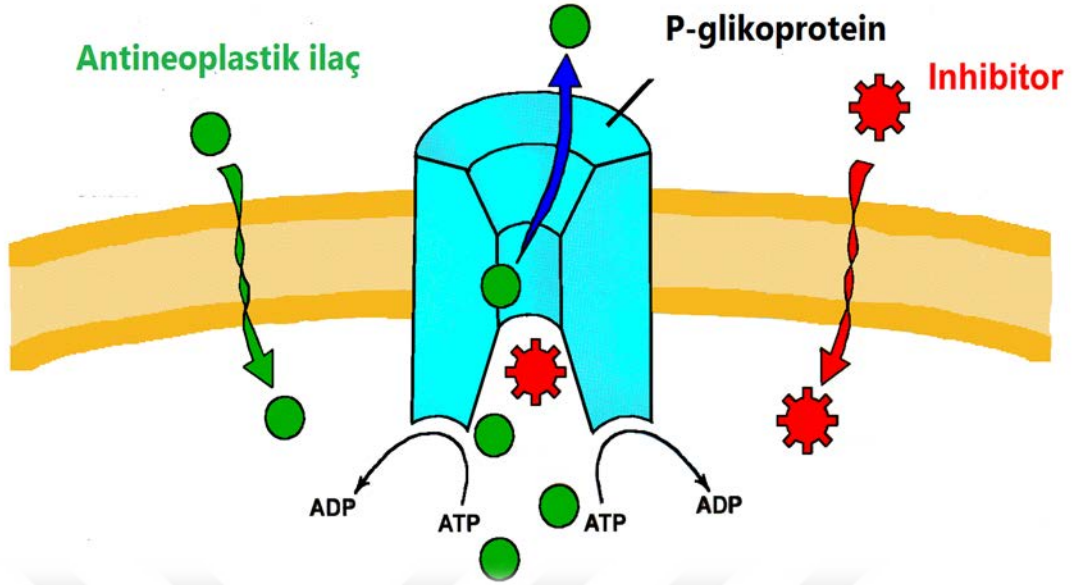
Şekil 5: MDR 1 geninin 7. kromozomdaki yerleşimini gösteren diyagram.

4.4.3. P-glikoprotein (P-gp, ABCB1, MDR1, Çoklu İlaç Direnci Proteini 1)

ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcı ailesinin ilk keşfedilen üyesi olan P-glikoprotein (P-gp), ATP hidrolizine bağımlı olarak çalışan ve efluks (dışa atım) pompası işlevi gören bir membran proteinidir (Şekil 6). ABC ailesinin ABCB alt ailesine ait olan P-gp, insanda 7q21.1'de yer alan MDR1/ABCB1 geni tarafından kodlanmaktadır ve klonlanan ilk ABC taşıyıcısıdır. P-gp 1280 amino asitin birleşmesinden oluşur ve molekül ağırlığı 170 kilodalton'dur. Molekül, altışar transmembranal segment içeren iki transmembranal alan ve iki nükleotid bağlayıcı alandan oluşmaktadır (84;87).

P-gp, 1976 yılında Juliano ve Ling tarafından, kolşisine dirençli Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde aşırı eksprese edilen bir yüzey glikoproteini olarak tanımlanmıştır. (88). Daha sonra, tümör hücrelerinde varlığı gösterilmiş ve bu hücrelerde P-gp'nin antineoplastik ilaçları hücre dışına atarak çoklu ilaç direnci olarak tanımlanan hücresel sürecin gelişmesinde rol oynadığı saptanmıştır.

P-gp, ilaç ve diğer ksenobiyotikleri vücuttan uzaklaştırarak doğal bir savunma mekanizması işlevi görmektedir. P-gp'nin anatomik lokalizasyonu ve efluks fonksiyonu göz önüne alındığında ilaçların emilimi, dağılımı ve eliminasyonunda önemli rol oynadığı görülmektedir. Beyin, plasenta, testis, lenfosit gibi dokularda lokalize olan P-gp, çeşitli kan-doku bariyerini oluşturarak ilaçların duyarlı doku ve hücrelere girişlerini sınırlandırmakta ve bu dokularda toplanmalarını azaltmaktadır. P-gp, bu hassas dokuları zararlı maddelere karşı doğal koruma fonksiyonunu gerçekleştirirken, bir taraftan da ilaç dağılımını etkileyerek özellikle bazı ilaçların (antipsikotik ilaçlar, HIV proteaz inhibitörleri, antineoplastik ilaçlar) terapötik etkilerini göstermelerine engel olabilir. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda P-gp inhibisyonu ve indüksiyonunun ilaç etkileşmelerine neden olduğu gösterilmiştir (85,87,89,90).



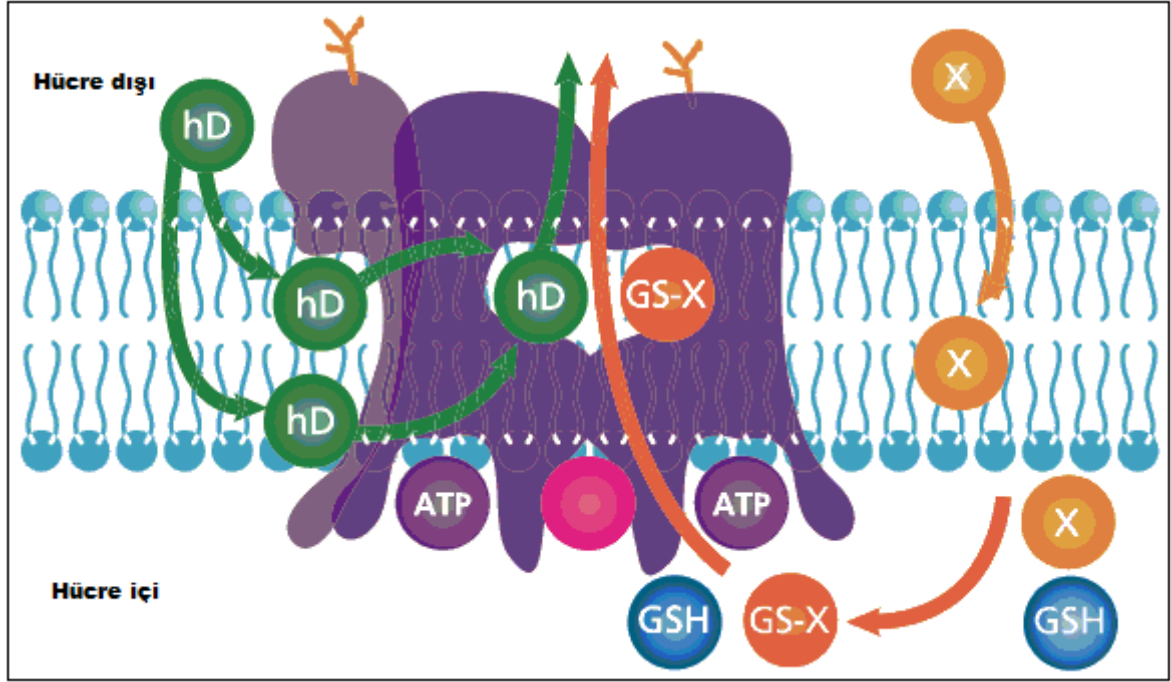
Şekil 6: P-glikoprotein moleküler mekanizması.

4.4.4. MRP Çoklu İlaç Direnci İlişkili Protein Ailesi

MRP ailesi 1992 yılında tanımlanmış olup, şu ana kadar dokuz MRP geni tanımlanmıştır. ATP bağımlı taşıyıcı proteinlerin şimdiye kadar bilinen en büyük protein grubudur. MRP'ler Pgp'den farklı olarak N-terminalinde ilave bir yapısal farklılık gösterir.

MRP'ler organik anyonik taşıyıcılardır. Örneğin metotreksat gibi anyonik ilaçları ve asidik ligandlar ile konjuge olmuş glukronat, glutatyon, sülfat gibi ilaçları taşırlar. MRP-1, MRP-2 ve MRP-3 doğal organik ilaçlara karşı direnç geliştirir iken, MRP-4'ün nükleozid analoglarına karşı direnç oluşmasında rolü vardır.

MRP-1: MRP-1 geni 16p13.1'de yerleşiktir ve 190 kDa büyüklüğündedir. MRP-1'in aşırı ekspresyonu sonucu vinka alkaloidleri, epipodofilotoksinler, doksorubisin, mitoksantrona karşı belirgin direnç oluşturmakta, daunorubisin ve epirubisine karşı da oldukça yüksek oranda direnç oluşabilmektedir. İki ayrı mekanizma ile glutatyonun MRP-1'e bağlı direnç oluşmasında rol oynamakta olup, ya MRP-1'in bir substratı gibi ilacı bağlayabilmekte veya ilaçlar MRP-1 tarafından glutatyon aracılıklı olarak taşınabilmektedir (Şekil 7). MRP-1 ayrıca modifiye olmamış ksenobiyotiklerin taşınmasında da görev almakta ve sıklıkla bu işlem için glutatyonla ihtiyaç göstermektedir.



Şekil 7: MRP1 moleküler mekanizması (hd: hidrofobik ilaçlar, X: anyonik konjugatlar, GSH: glutatyon).

MRP-2: Çoklu ilaç direnci ilişkili protein 2 (Multidrug Resistance Associated Protein 2, MRP2), ABC taşıyıcı ailesinin ABCC alt ailesine dahildir. MRP2'nin biyokimyasal karakterizasyonu, 1990'da Ishikawa ve arkadaşlarının (91), hepatositlerin kanaliküler membranında bulunan ve glutatyon-S konjugatlarını taşıyabilen bir ATP-bağımlı taşıyıcı proteini bulmaları ile başlamıştır. 1996 yılında insan ve sıçan MRP2 geninin klonlanması ile MRP2'nin yapısı aydınlatılmıştır (92). İnsan MRP2 geni (ABCC2) 32 ekson içermekte ve 10q24 de bulunmaktadır. Herbiri 6 transmembran segmentten (TM) oluşan MSD1 ve MSD2 olmak üzere iki ve 5 TM'dan oluşan ek bir (MSD0) çoklu membrana bağlanan alan içermektedir. Ayrıca diğer ABC taşıyıcı proteinler gibi iki adet ATP'nin bağlandığı sitozolik nükleotid bağlayan alan (NBD) içermektedir (93).

MRP-3: 1997 yılında keşfedilen MRP-3 geni 17q21'de yerleşiktir. MRP-1'e dizi benzerliği olan bir proteindir. Organik anyonların taşınmasını sağlar. MRP-1 ve MRP-2'ye yapı olarak çok benzemesine rağmen, direnç mekanizmasında glutatyon aracılık etmez. Karaciğer, pankreas, böbrek üstü bezleri, böbrekler ve GİS'de bulunur. Karaciğerde organik anyonların kana salınımında ve safra tuzlarının salınımında rol oynar. Böbrek üstü bezlerindeki rolleri bilinmemektedir.

MRP-4: 13q31'de yerleşiktir. Nükleozid analoglarına karşı direnç oluşmasında rolü vardır. Ayrıca HIV ilaçlarına karşı da [azidotimidin monofosfat ve 9-(2-fosfonilmetoksietil)adenin] direnç oluşmasında rol oynamaktadır.

MRP-5: 3q27'de yerleşiktir. MRP-4 gibi nükleozid analoglarına karşı direnç oluşmasında rolü vardır.

MRP-6: 16p13.1'de yerleşiktir. En çok karaciğer ve böbreklerden eksprese edilmektedir. Dirençli tümör hücrelerinde MRP-1 ile birlikte MRP-6'nın da aşırı ekspresyonu izlenmektedir.

MRP-7: 6p21'de yerleşiktir. Molekül yapısı MRP-1, MRP-2, MRP-3 ve MRP-6'ya çok benzemektedir. 6. kromozomun kısa kolunda kodlanan MRP-6, bu kromozomu glutatyon metabolizmasındaki genler ile paylaşmaktadır. Glutatyon S-konjugatları ile ilgili ilaçlara karşı birlikte direnç oluşturmaktadır.

MRP-8 ve MRP-9: 16q12'de yerleşiktir. 2001 yılında MRP ailesinin iki üyesi daha keşfedildi ve literatüre ABCC11 (MRP-8) ve ABCC12 (MRP-9) isimleri ile katıldı. Her ikisi de 16q12'de yerleşiktir. MRP-8'in %40'ı, MRP-9'un %42'si MRP-5 ile identiktir ve diğer MRP'lerden yapısal olarak daha küçüktür. Fonksiyonel olarak ta nükleozid analoglarına karşı direnç oluşmasında rol oynar ve bu özellikleri MRP-4 ve MRP-5'e benzer.

5. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmaya T.C İstanbul Bilim Üniversitesi Etik Kurulu'ndan 01.09.2014/23-166 tarih ve sayı numarası ile onay alınarak başlandı.

T.C İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Hastanesi'nin Kardiyoloji Polikliniğine başvurmuş ve retrospektif olarak ekokardiyografik değerlendirme ile etyolojisine bakılmaksızın dilate kardiyomiyopati (KMP) tanısı (LVDSÇ:>5.6cm ve EF<%40) konulan 90 hasta dahil edildi. Malignite öyküsü , aktif enfeksiyon veya kronik böbrek yetmezliği olan hastalar çalışma dışında tutuldu.

Elde edilen veriler T.C İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Hastanesi'nin Kardiyoloji Polikliniğine başvurmuş ve kardiyak değerlendirme sonucu Dilate KMP izlenmeyip, yukarıda belirtilen dışlama kriterleri gözlenmeyen 90 kontrol birey sonuçları ile kıyaslandı.

5.1. MATERİYAL

5.1.1. Sarf Malzemeler

Total RNA İzolasyon Kiti	Filtreli Tüp	Oligo-dT primer
1.5 ml santrifüj Tüpü	Distile Su	0.5 ml santrifüj Tüpü
Bağlanma Tamponu	Sosyum Asetat	Ribonükleaz inhibitörü
Eritrosit Bağlanma Tamponu	EDTA	dNTP Mix
Yıkama Tamponu-I	cDNA Sentez Kiti	Capillar

5.1.2. Cihazlar

Real-Time PCR	Santrifüj	Vortex
Elektroforez Sistemi	Rotorgene RG3000 Corbett	

5.2.YÖNTEM

5.2.1. Total RNA İzolasyonu

90 hasta ve 90 kontrol bireyi için, içerdiği özel filtreli tüpleri ile periferik kandan izolasyon yapılma amaçlı DNaz I uygulamasını da kapsayan Hibri Gen total RNA izolasyon kiti (İstanbul, Türkiye) kullanılarak Total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kitin içerdiği eritrosit parçalama tamponu ya da ficol solüsyonu kullanılarak periferik kandan lökositler ayrılıp, 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. 400 µl bağlanma tamponu eklenerek çalkalamalı karıştırıcıda 15 saniye karıştırıldı. Karışım toplama tüpü içine yerleştirilmiş filtreli tüpe aktarıldı ve oda sıcaklığında 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldı. Filtreli tüpün üzerine 90 µl DNaz I inkübasyon tamponu ve 10 µl DNaz I içeren karışım eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi, sonrasında 500 µl Yıkama Tamponu-I eklenip 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldı ve filtreli tüpe 250 µl Yıkama Tamponu-II eklenip 13.000 dev./dak. hızda 4 dakika santrifüjlendi. Filtreli tüp toplama kabından çıkartıldıktan sonra 1.5 ml'lik boş bir santrifüj tüpünün içerisine yerleştirildi. Üzerine 50 µl çözücü tampon eklenip ve 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Filtreden geçerek santrifüj tüpünde toplanan, içerisinde RNA çözeltisini içeren yaklaşık 25-30 µl sıvı – 70°C'de saklandı.

5.2.2. Formaldehit AgaroZ Jel Elektroforezi

Morfolinopropan sülfonikası (MOPS) agaroz jeli hazırlamak için 0.5 gram agaroz 36 ml RNaz içermeyen distile su içerisine konuldu ve agaroz tamamen çözülene kadar ısıtıldı. Çözelti oda ısısında veya musluk altında elle dokunulabilir sıcaklığa erişene kadar soğutuldu ve içerisine yürüme tamponu olan MOPS'dan 5 ml ve %37'lik formaldehitden 9 ml eklendi. Kabarcıkların oluşmamasına dikkat edilerek karıştırıldı. MOPS ve formaldehit eklenmesi zaten soğutulmuş olan agaroz jel çözeltisinin daha fazla soğumasına neden olacağı için, dökme işlemi agaroz tamamen jel haline dönüşmeden hızlı bir şekilde gerçekleştirildi. Son olarak etidyum bromür eklenerek 75 °C'de 10 dakika ısıtılıp buz üzerine alınan total RNA örnekleri, jel katılaştıktan sonra kuyucuklara yüklendi.

10X MOPS hazırlanışı:

0.4 M MOPS, pH 7.0	0.1 M sodyum asetat	0.01 M EDTA
--------------------	---------------------	-------------

5.2.3. cDNA Sentezi

Kontrol ve hasta gruplarına ait elde edilen total RNA örneklerinden ticari bir kit olan Hibri Gen cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA 'ya dönüştürüldü. Üretici firmanın önerdiği şekilde işlemler gerçekleştirildi.

1. RNA çözeltisi -70°C'den alınarak buz üzerine konuldu.
2. Spektrofotometrede ölçüm yapılarak 1 µg RNA içerecek hacimde çözelti alındı.
3. Üzerine 1 µl Oligo-dT primer 100µM ve toplam hacmi 20 µl' ye tamamlayacak kadar nükleazsız DEPC'li distile su eklendi.
4. Çözelti 0,5 ml'lik PCR tüpünde karıştırıldı ve 70°C'de 5 dk bekletildi ve hemen buza konuldu.
5. Buz üzerinde konularak sırasıyla, 4 µl tepkime tamponu, 1 µl ribonükleaz inhibitörü (20U/µl), 1 µl dNTP karışımı eklendi.
6. Karışım Pipet ile karıştırılıp 37°C'de 5 dakika bekletildi.
7. 1µl M-MuLV ters transkriptaz (20U/µl) eklenerek 42 °C'de 1 saat ardından 70 °C' de 10 dk bekletilip, buza konuldu.
8. Elde edilen cDNA +4°C' de saklandı.

DEPC'li steril su	Reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı
Oligo-dT primer 100 µM	1 µl
Total RNA	1 µg
0,5 ml'lik PZR tüpünde karıştırıldıktan sonra 70°C'de 5 dakika bekletildi ve tüpler hemen buza alındı. Karışımın üzerine aşağıda belirtilen maddeler eklendi.	
Reaksiyon tamponu 10Mm	4 µl
dNTP karışımı	1 µl
Ribonükleaz inhibitörü (20U/µl)	1 µl
Pipet ile karıştırılıp 37°C'de 5 dakika bekletildi. Karışımın üzerine 1 µl M-MuLV ters transkriptaz (20U/µl) eklendi ve 42°C'de 1 saat bekletildi. Ardından 70°C'de 10 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı. Buzda soğutulan örnekler -20°C'de saklandı.	

Tablo 3: cDNA sentezi için kullanılan bileşenler.

5.2.4. cDNA Varlığının Doğrulanması

Revers Transkripsiyon basamağından sonra elde edilen örneklerdeki cDNA varlığı % 2.5 (w/v)'luk agaroz jelde cDNA'ların varlığı ve kalitesi kontrol edildi.

Agaroz jel hazırlanışı:

Tampon/Solüsyon Adı	İçerik	Son Konsantrasyon
5X TBE Tamponu pH=8.0	Tris baz	445 mM
	EDTA	10 mM
	Borik asit	445mM
Elektroforez Yükleme Solüsyonu	Bromofenol mavisi	2.5 mg/ml
	%10 SDS	%1 (w/v)
	Gliserol	% 87 (v/v)

Tablo 4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon ve solüsyonu.

Elektroforez yürütme tamponu olarak hazırlanan 5X TBE stok, dH₂O ile 1/10 oranında sulandırıldı. Hazırlanan %2.5 (w/v)'luk agaroz jele, 5-6 µl PZR ürünü, 2-3 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi ve 120V'da 20 dakika yürütüldü.

5.2.5. MRP-1 ve MRP-2 Geni İçin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hedef gen olan MRP-1 ve MRP-2 geninin periferik kandaki anlatım düzeyini belirlemek için MRP-1 ve MRP-2 cDNA'sına özgün primerler tasarlandı ve sentezletirildi. Referans gen (ABL1) için de primer tasarlanıp sentezletirildi.

	Primerler	Ürün (bp)
MRP1	Forward primer 5-CAGTGACCTCTGGTCCTTAAACAA-3 Reverse primer 5-TTGGCGCATTCCTTCTTCC-3	122
MRP2	Forward primer 5-GACACATCTGCCATTCGACAT-3 Reverse primer 5-CGGATTGTGGCTTCCATATCA-3	140
ABL1	Forward primer 5-TGACCCGAGGCACAGTAA-3 Reverse primer 5-GCATCAACCAGACTCGTG-3	165

Tablo 5.'de belirtilen Sybr Green boya içeren 2X RT PCR master mix (Hibrigen) ve diğer PZR bileşenleri ile hazırlanan 28 µl'lik reaksiyon karışımına Tablo 6.'da verilen çoğaltım programı "Rotorgene RG3000 Corbett" cihazı kullanılarak uygulandı.

2X RT PCR master mix bileşenleri:

100 mM KCl	4 mM MgCl ₂	400 µM dNTPs
0.1 U/µl Taq DNA Polymerase	1x SYBR Green	ther optimized buffer components

PZR Bileşenleri	µl/Tüp
Steril distile su	8 µl
MRP-1 veya MRP-2 -F primer (10pmol/µl)	1 µl
MRP-1 veya MRP-2 -R primer(10pmol/µl)	1 µl
2X RT PCR master mix	15 µl
cDNA	3 µl
Toplam Hacim	28 µl

Tablo 5: Gerçek zamanlı PZR için PZR bileşenleri.

Program Türü	Sıcaklık (0C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	5 dk	-
Denatürasyon	95	20 sn	38
Bağlanma	57	22 sn	
Uzama	72	22 sn	

Tablo 6: MRP-1 ve MRP-2 transkript varlığının belirlenmesinde kullanılan Gerçek Zamanlı PZR programı.

Her deneyde, yaklaşık miktarları önceden bilinen kontrol cDNA'ları da kullanılarak PZR verimi hesaplandı. Hedef ve referans gene (ABL1) ait çoğaltılan cDNA'ların miktar değerlendirmesi yapıp farklılık oranları nicel olarak ortaya koyuldu.

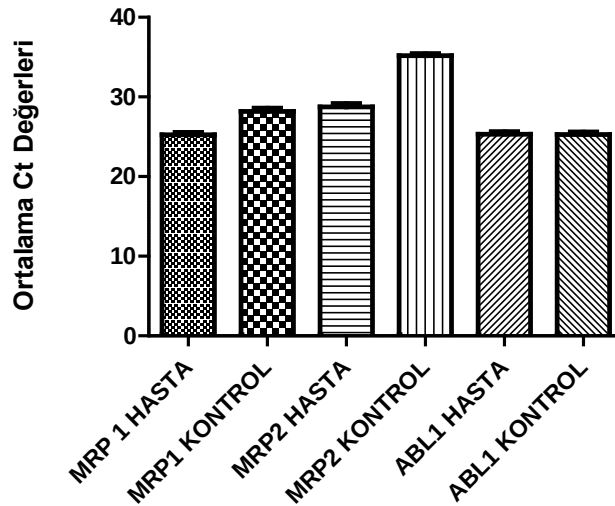
6. BULGULAR

DKMP hasta grubu ile sağlıklı kontrol arasında hedef genlerden biri olan MRP1 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Unpaired t test; $t=5,675$; $p < 0,0001$). DKMP hasta grubu ile sağlıklı kontrol arasında hedef genlerden bir diğeri olan MRP2 düzeyleri açısından da istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Unpaired t test; $t=14,44$; $p < 0,0001$). DKMP hasta grubu ile sağlıklı kontrol arasında referans gen olan ABL1 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Mann Whitney U test; $U= 197,5$; $p < 0,9566$).

	DKMP n= 90	Sağlıklı Kontrol n=90	P
Ortalama MRP1 ED	25,73	28,51	$< 0,0001$
Ortalama MRP2 ED	28,58	35,13	$< 0,0001$
Ortalama ABL1 ED	25,26	25,24	$< 0,9566$

Tablo 7: DKMP hastaları ve sağlıklı kontrollerde MRP1, MRP2 ve ABL1 düzeylerinin karşılaştırılması.

Çalışmada Yer Alan Grupların Ortalama Ct Değerleri



DKMP ve sağlıklı kontrollerde MRP1, MRP2 hedef genleri ve ABL1 referans geni düzeyleri

Şekil 8 :DKMP hastaları ve sağlıklı kontrollerde MRP1, MRP2 ve ABL1 geni düzeylerinin ortalama Ct değerleri.

Denklem 1. Pfaffl Denklemi

$$Oran = \frac{(E_{hedef})^{\Delta Ct hedef (kontrol-hasta)}}{(E_{referans})^{\Delta Ct referans (kontrol-hasta)}}$$

E: PZR verimi, ED: Eşik değeri, Q- RT PZR sırasında her örneğin logaritmik faza girdiği döngü numarası (Ct: Threshold cycle)

Kontrol ve Hasta Gruplarında MRP-1 Oranı

$$Oran = \frac{1,936^{(28,51-25,73)}}{1,943^{(25,24-25,26)}} = \frac{1,936^{2,78}}{1,943^{-0,02}} = 6,35$$

Kontrol ve Hasta Gruplarında MRP-2 Oranı

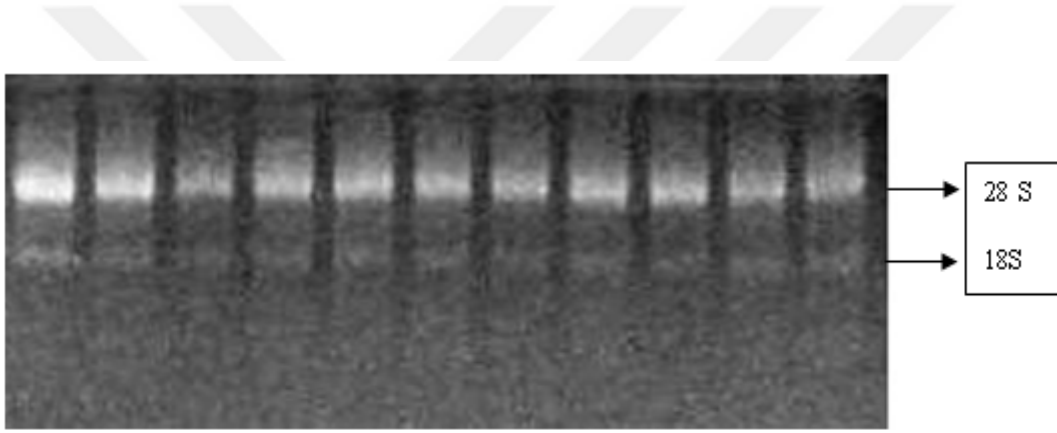
$$Oran = \frac{1,936^{(35,13-28,58)}}{1,943^{(25,24-25,26)}} = \frac{1,936^{6,55}}{1,943^{-0,02}} = 76,7$$

Pfaffl denklemi kullanılarak Q- RT PCR sonucu elde edilen mRNA miktar verileriyle hesaplama yapıldı. 90 DKMP hastası ve 90 sağlıklı erişkinden alınan kan örneklerinde MRP-1 ve MRP-2 hedef genleri, ABL1 referans geni ile karşılaştırılarak mRNA düzeyleri incelendi. MRP-1 geni için, hedef gen/referans gen sonucu 6,35 olarak bulunurken MRP-2 geni için hedef gen/referans gen sonucu 76,7 olarak bulundu. Buna göre, DKMP hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre MRP-1 mRNA ekspresyonunun 6 kat fazla olduğu, MRP-2 mRNA ekspresyonunun ise 77 kat fazla olduğu belirlendi.

6.1. MRP1 ve MRP2 GENİNİN ANLATIMI

6.1.1. Total RNA İzolasyon ve Kalitatif Tayini

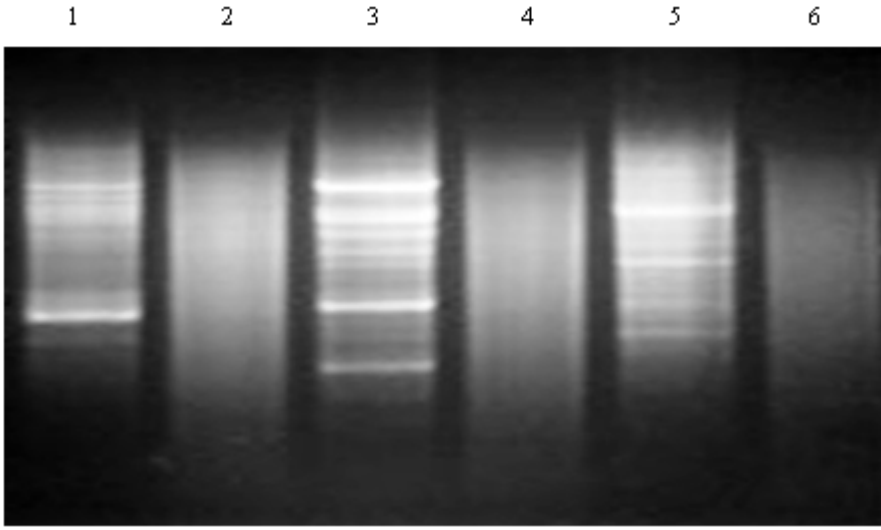
Total RNA izolasyonu, 90 DKMP hastası ve 90 sağlıklı kontrolden oluşan kontrol grubuna ait periferik kan örneklerinden Materyal ve Yöntem bölümünde 5.2.1.'de belirtilen yöneme göre gerçekleştirildi. Total RNA'nın parçalanmadan izole edilmesinin kanıtı olan 28S ve 18S'lik ribozomal RNA'lara ait bantlar formaldehit agaroz jel elektroforezinde parlak ve keskin şekilde gözlendi (Şekil 8).



Şekil 9: Total RNA örnekleri. Fotoğrafta 28S ve 18S'lik rRNA'lar görülmektedir.

6.1.2. cDNA Sentezi ve Kalitatif Tayini

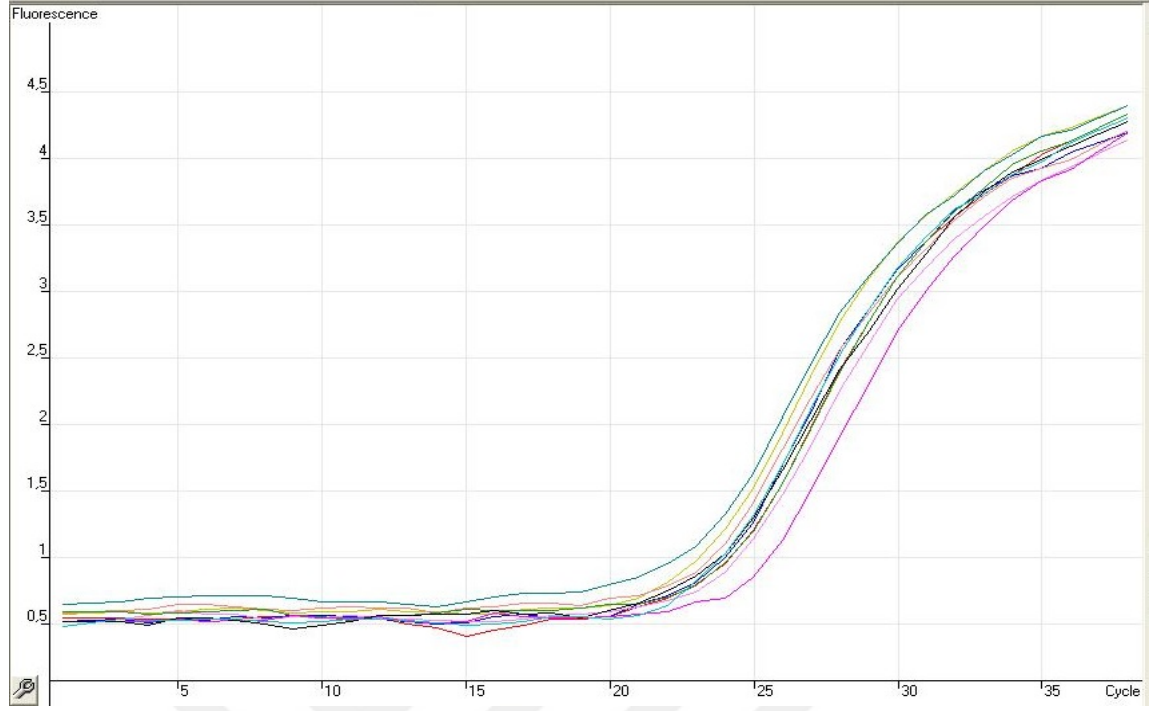
Total RNA örneklerinden cDNA sentezi, Materyal ve Yöntem Bölümü 5.2.3'de belirtilen yöneme göre yapıldı. Elde edilen cDNA örneklerinden 5'er µl alınıp %2,5 (w/v)'luk agaroz jelde analizi yapıldı. cDNA'lara ait bantlar UV ışık altında gözlendi (Şekil 9).



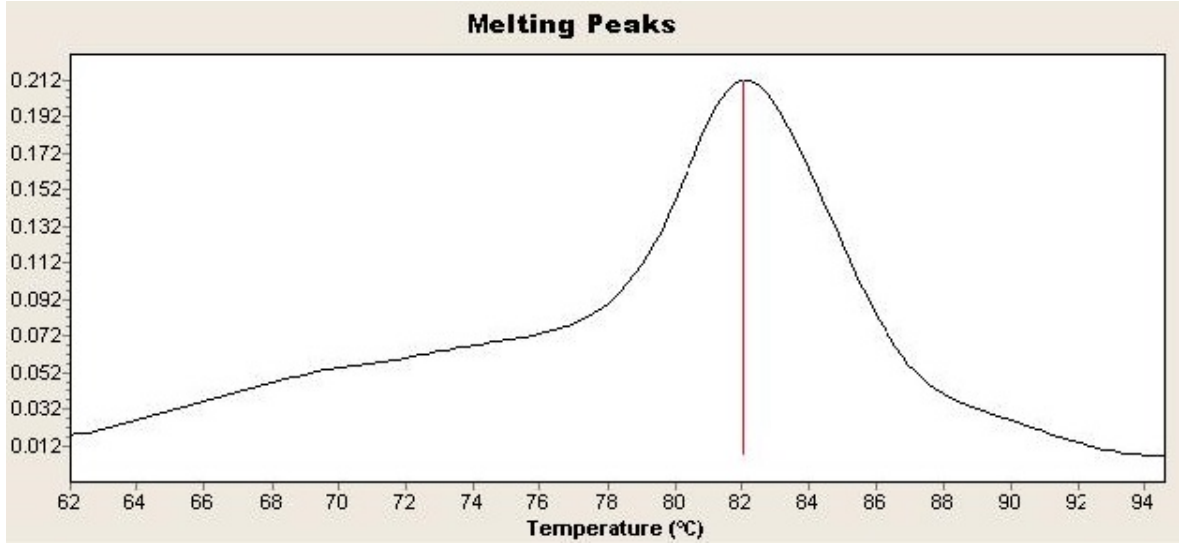
Şekil 10: cDNA sentezi ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görünüşleri. 1-6 cDNA

6.1.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Q RT-PCR) Analizleri

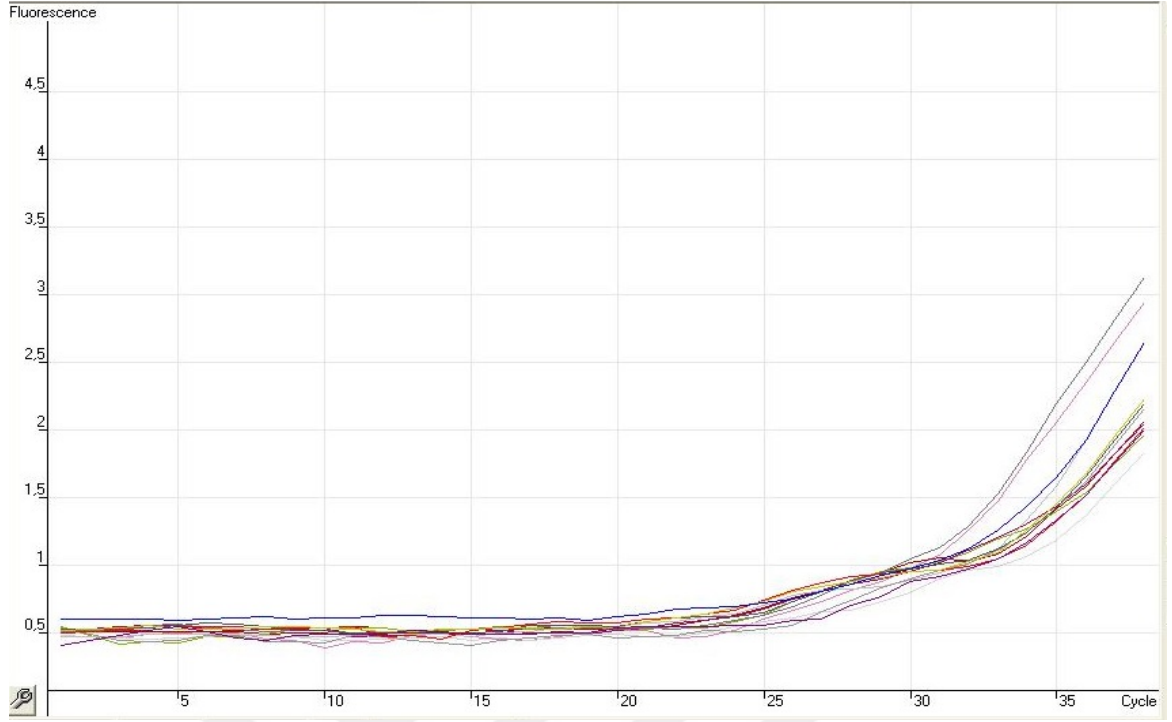
İzole edilen total RNA örneklerinden MRP-1 ve MRP-2 genine ait olan mRNA'ları belirlemek için Materyal ve Yöntem Bölümü 5.2.3.'de belirtildiği gibi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Kontrol ve hasta bireylere ait hedef gen olan MRP-1, MRP-2 ve referans gen olan ABL1 için gerçekleştirilen Q RT-PCR'ın ekran görüntüleri ve erime eğrisi analizi şekil 10, 11, 12, 13, 14' de verildi.



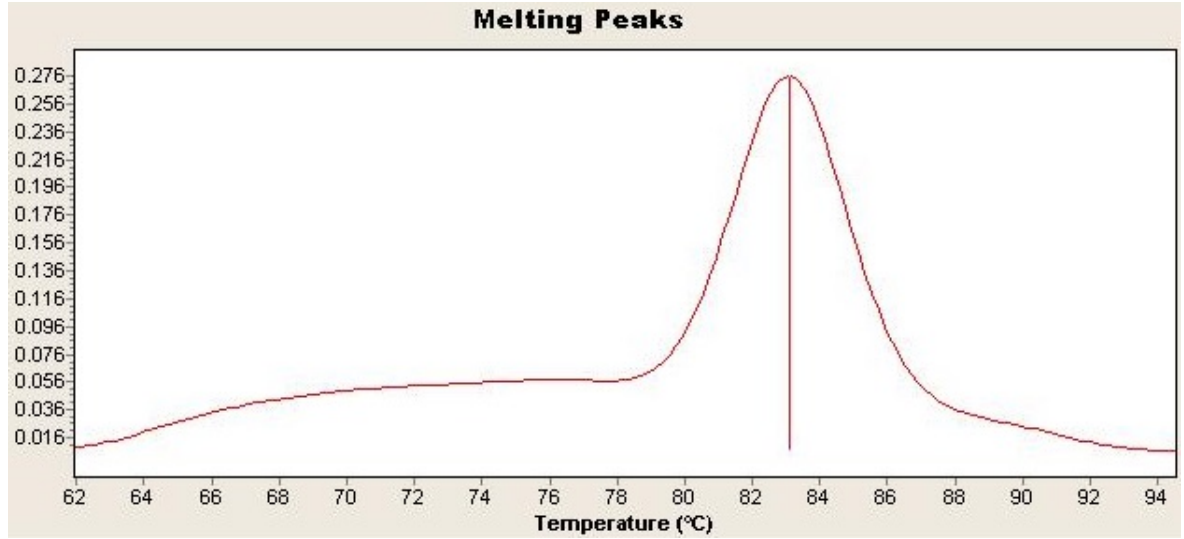
Şekil 11: MRP1 Geni için gerçekleştirilen Q RT-PCR'ın ekran görüntüsü



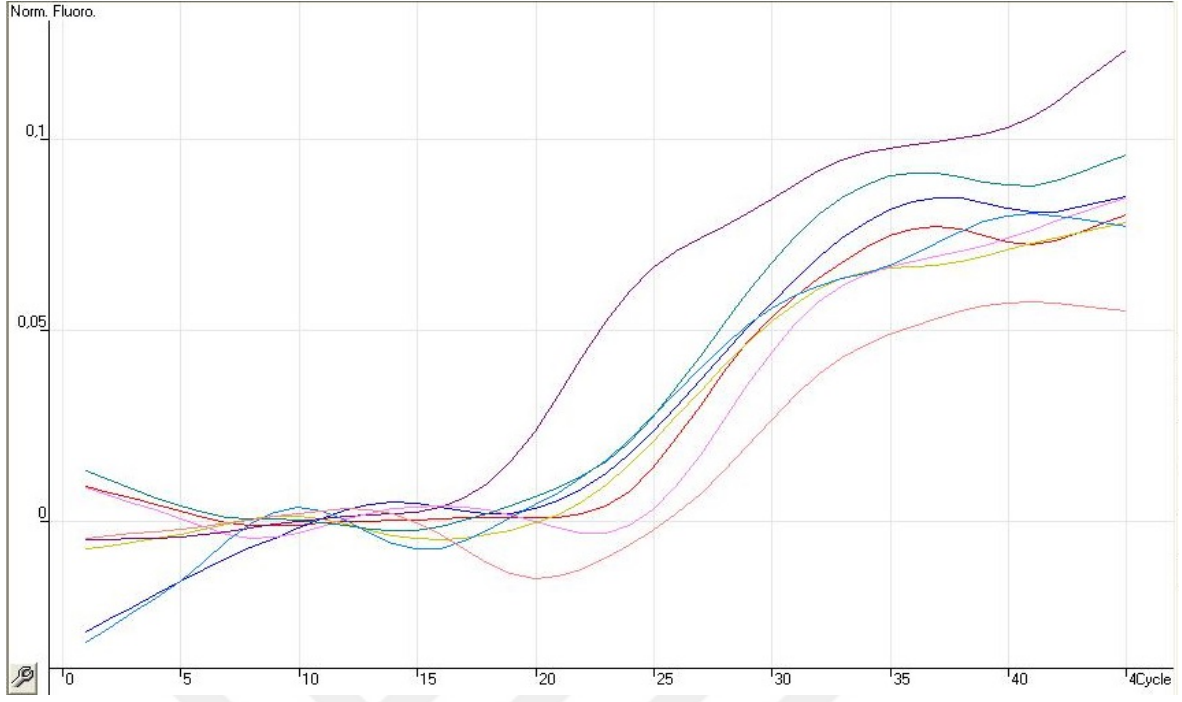
Şekil 12: MRP1 geni için erime eğrisi analizi.



Şekil 13: MRP2 geni için gerçekleştirilen Q RT-PCR'ın ekran görüntüsü.



Şekil 14: MRP2 geni için erime eğrisi analizi.



Şekil 15: ABL1 Geni için gerçekleştirilen Q RT-PCR'ın ekran görüntüsü

7. TARTIŞMA

Ventrikül dilatasyonu, kontraktıl disfonksiyon ve kalp yetmezliği semptomları ile karakterize olan DKMP' de ailesel köken, beklenenden daha yaygın karşılaşılan bir faktördür. DKMP'li hastaların yaklaşık %25-30'unun mutasyonlar sonucu kalıtsal bir hastalık formu taşıdıkları düşünülür (46). Bununla birlikte, ailesel DKMP genetik olarak oldukça heterojen, aynı zamanda otozomal resesif ve X geçişli kalıtım tanımlanmıştır (54). Bir düzineden fazla kromozomal bölge tanımlanmıştır ve daha fazlasının tanımlanma olasılığı yüksektir (48).

Dilate kardiyomiyopati oluşmasında ailesel faktörlerin dışında infeksiyöz ajanlar (Coxsackievirus, adenovirus, parvovirus, HIV gibi virüsler; bakteriler; mantarlar, parazitler), toksinler, alkol, kemoterapötik ajanlar, otoimmün hastalıklar, nöromusküler hastalıklar, metabolik ve endokrin hastalıklar belirtilmektedir. Hastaların yaklaşık yarısında etiyoloji belirlenemez ve idiyopatik dilate kardiyomiyopati olarak adlandırılır.

DKMP çoklu ilaç tedavisi gerektiren, tedavilerin kişiden kişiye değiştiği, uzun dönem takip gerektiren , maliyeti yüksek, prognozu kötü olan kronik bir hastalıktır. Medikal tedavi halen DKMP de en etkin ve ilk sıra tedavi seçeneğidir. Kullanılan çoklu ilaç tedavisine rağmen hastadan hastaya klinik seyir ve ilaç dozlarında farklılıklar izlenmektedir. Bu farklılıkların bir sebebi de ilaçlara karşı gelişen dirençtir.

Tedavi sırasında ilaçlara gösterilen direnç mekanizmaları ve ilaçlara bağlı yan etkiler ilaçları metabolize eden enzimlerdeki genetik değişikliklere bağlı olarak aynı toplumdaki bireyler arasında farklılık gösterir. Bu fark ilaç direnci oluşturan MRP genlerinin farklı ekspresyonuna bağlı olabilir.

Çoklu ilaç direnci ilişkili protein (Multidrug Resistance Associated Protein, MRP), ABC taşıyıcı ailesinin ABCC alt ailesine dahildir. ABCC alt ailesi 13 proteinden oluşmaktadır. Bunlardan dokuzu MRP ilişkilidir ve MRP1'den MRP9' a kadar isimlendirilmiştir (sırasıyla ABCC1-6 ve ABCC10-12) (2).

Kees ve ark. yaptığı çalışmada, pek çok sağlıklı dokuda düşük miktarda MRP gen ekspresyonunu göstermiş ve aralarında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. MRP ekspresyonunun sağlıklı dokulardaki bu düzgün dağılışı, bu genin varlığının sağlıklı

hücreyel fizyoloji için gerekli olduğu fikrini ortaya koymuştur. Fakat, hücredeki spesifik fizyolojik fonksiyonları konusunda hala net bulgular yer almamaktadır (94).

Aynı çalışmada, akut lenfositik lösemi (ALL) ve kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarının lenf nodu biopsisi ile elde edilen dokularında, MRP ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. İki grubun incelendiği bu çalışmada, yeni tanı konmuş ve hiç tedavi almamış hasta grubu ile hastalığın tekrar ortaya çıktığı kanserli hasta grubu ele alınmıştır. İncelenen hasta grupları arasında MRP ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Benzer şekilde, kötü prognoz izlenen hastalar ile iyi prognoz izlenen hastalar arasındaki MRP gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Sonuç olarak bahsi geçen çalışmada, kanser tedavisine gösterilen zayıf cevapta MRP gen ekspresyonlarının etkisinin gözlenmediği ortaya çıkmıştır (94). Schneider ve ark.nın yaptığı çalışmada ise, aksi şekilde ALL hastalarında yeni tanısı konmuş grup ile hastalığın tekrar nüks ettiği hasta grubunda, MRP gen ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir fark bildirilmiştir (95). Sonuç olarak, daha geniş çaplı çalışmalar sonucunda elde edilecek veriler ile MRP ekspresyonunun klinik ilişkisinin daha net ortaya konması gerekmektedir.

Tümör hücrelerinde yapılan randomize klinik çalışmalar değerlendirildiğinde, sentetik, potent ve selektif ABC modölatörlerinin antineoplastik ilaçlarla bir arada kullanılması, ilaç direncinin aşılmasında yeterli olmadığından kanser tedavisine bilinen ek bir yararı saptanamamıştır. Bu durumun nedeni olarak ABC ailesindeki birçok taşıyıcı proteinin söz konusu çoklu ilaç direncinde rol alması gösterilmektedir. Ayrıca, uygulanan antineoplastik ilacın veya modölatörün uygulama zamanının yanlış olması başarısızlıkta bir etken olabilir. Bu sonuçlar, çalışmamızın amaçları olan doğru hastaya, doğru zamanda etkin dozda ilaç uygulamasının önemi ile örtüşmektedir.

Tümör hücrelerinde, kanser ilaçlarına karşı dirençten sorumlu olduğu bilinen bu proteinlerin ayrıca böbrek, ovaryum, akciğer gibi dokularda da sentezlendiği ve ksenobiyotiklere karşı hücre içerisinde efluks pompası görevinde olup adeta bekçi bir protein gibi çalışarak savunma mekanizması oluşturduğunun gösterilmesi Schneider ve ark. bulgularını destekler niteliktedir. Ayrıca karaciğer kanaliküler zarlarında ve böbrekte proksimal tübüllerin apikal membranında yüksek oranda eksprese edilen MRP2, ilaçların metabolizma esnasında konjugasyonu, metabolitlerin oluşması ve toksinlerin atılması gibi

süreçlerde önemli aktif rol oynadığının bilinmesi, klinik açıdan da önem taşıdığını göstermektedir.

Kalpte eksprese olan ABC taşıyıcı proteinlerinin fonksiyonu net bilinmemesine rağmen, kardiyak ekspresyonu olan bazı ABC proteinlerinin diğer birçok organla ilişkisi olduğu bilinmektedir. ABCC5 proteininin insanda sol ventrikülde, damar endotelinde ve düz kas hücrelerinde lokalize olan MRP5 geninin iskelet kasları, böbrek, kalp ve beyinde yüksek oranda eksprese olduğu gösterilmiştir (96). Ayrıca, fare ve sıçanların kalbinde de eksprese olan ABCC8 (MRP8) , ABCC9 (MRP9) proteinlerinin lokalizasyonu bildirilmiş daha sonrasında da insan kalbinde MRP8 ve MRP9 geninin ekspresyonu gösterilmiştir. Bu durumda, vücudun pek çok bölgesinde ifadesi olan MRP ilaca direnç genlerinin pek çok hastalığın medikal tedavisinde belirleyici olabileceğini düşündürmüştür.

Gibson ve ark. yaptığı bir çalışmada, MRP gen ekspresyonunun ve doksorubisin (DOX) birikiminin kardiyak ve iskelet kaslarındaki yaşa bağlı etkileri izlenmiştir. DOX, kanser kemoterapisinde kullanılan, antrasiklin türevi oldukça etkili bir antibiyotiktir. DOX birikimindeki artışın kardiyomiyopatiyi tetiklediği bilinmekle beraber 4 yaşından küçük çocuklarda ve 65 yaşından büyük erişkinlerdeki yan etkileri aşikar olarak ortaya konmuş ve MRP genlerinin bu olguda önemli bir faktör olduğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmada MRP2 ve MRP7 ekspresyonunda yaşa bağlı belirgin bir azalma gözlenirken, MRP1 ekspresyonunda yaşa bağlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Çalışma sonucunda; yaşa bağlı oluşan DOX birikimindeki artışa, yaşa bağlı gelişen MRP ekspresyonundaki azalmanın bir faktör olarak sayılabileceği bildirilmiştir (97). Literatürdeki bu bilgiler ışığında, MRP genlerinin DKMP hastalığının tedavisinde ilaca direnç gelişmesinde ekspresyon miktarlarının önemli olduğunu düşündürmüştür.

Hastalıkların tedavisinde ilaca direnç gelişmesinde aktif rolü olduğu bilinen iki farklı yaklaşım söz konusudur. Bunlardan biri çoklu ilaç direnci bir diğeri ise gen polimorfizmidir. Gen polimorfizminin incelendiği çalışmalar, çoklu varyant ve geniş popülasyon gerektirmektedir. Belirlenen polimorfizmlerin ardından enzim miktar ve aktivitelerinin de değerlendirilmesi gerekmektedir.

Yan Wang ve ark. yaptığı, Asyalı ve ilaca dirençli epilepsi hastalarında ABCC2 (MRP2) gen polimorfizminin gösterilmesini içeren 8 çalışmanın meta analizinde anlamlı bir fark izlenmemiştir sadece MRP2 G1249A polimorfizmini taşıyan Asyalılarda ilaca

dirençli epilepsi oranının daha az görüldüğü belirlenmiştir (98). Bu oranın azlığı ilaç direncinin azalması sonucunda oluşabileceği düşünülse de, bu çalışmaların daha geniş hasta grubu ile doğrulanmaya ihtiyacı vardır.

Lazarowski ve ark. tarafından domuzlar üzerinde yapılan bir çalışmada, ilaç direnci oluşturan MDR1 geninin kodladığı P-glikoprotein-170 (Pgp-170) düzeyleri incelenmiştir. Pgp-170 plazma membranında katyonik akış pompasında görevli bir proteindir. Bu protein hücreden hidrofobik bileşenlerin uzaklaştırılmasını sağlamakla görevlidir. Pgp-170'in rutin olarak kalpte eksprese edilmediği fakat hipoksi anında kalpte ekspresyonunun başladığı ve arttığı izlenmiştir. Bu durum doğal olarak bu taşıyıcıların, medikal tedavi sürecinde etkili olabileceğini akla getirmektedir (99).

Yapılan çalışmalarda ABC taşıyıcı proteinleri; emilim, metabolizma, dağılım ve atılım organlarındaki ekspresyonları nedeniyle organizmadaki dokuların ksenobiyotiklerden korunmasında ve ksenobiyotik detoksifikasyonunda kritik rollerinin bulunduğu belirtilmiştir. Bu durum doğal olarak, bu taşıyıcıların ilaçların etkinliğinde ve güvenliğinde değişiklik yapabileceğini beraberinde getirmektedir. ABC proteinleri aynı zamanda emilim, metabolizma, dağılım ve atılım düzeylerinde ilaç-ilaç ve ilaç-besin etkileşmelerine sebep olabilmektedir. Bu etkileşmeler klinik olarak anlam taşımakta ve göz ardı edilmemesi gerekmektedir.

Benzer şekilde, Leier ve ark. MRP genlerinin belirli dokuları ksenobiyotiklerin zararlarından korumada rol oynadığı ve glutatyon transportunun MRP1 aracılı olduğunu öne sürmüşlerdir. Önemli olarak, glutatyon (GSH; γ -Glu-Cys-Gly) varlığında hidrofobik ve katyonik ilaçların çoğunun MRP1 ve MRP2 tarafından taşındığı belirtilmiştir (100).

Mattiello ve ark. yaptığı bir çalışmada trombositlerde Aspirinin MRP4 için substrat olduğu gösterilmiştir ve yine aynı çalışmada kronik arter bypass greftleme operasyonu sonrası MRP 4 ekspresyonunun arttığı, bu artışla beraber Aspirine karşı oluşan direncin de arttığı gözlenmiştir. Bu durumda Aspirinin etkisinin azaldığı ve Aspirine alternatif olarak Cilostazol kullanımının uygun olduğu önerilmiştir (101). Bu çalışmanın sonucu ile , bizim çalışmamızda göstermeyi amaçladığımız ilaca direnç noktasındaki kişisel farklılıkları açıklamak ve doğru hastaya, doğru zamanda, etkin ilaç uygulaması ile verilen tedavilerin bu bağlamda etki düzeylerinin artırılmasının hastalığın prognozu açısından da önemli olacağı düşüncesini destekler nitelikte olduğu anlaşılmaktadır.

Yukarıda tartışılan çalışma sonuçları, farklı organlardaki gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi yönünden önemli bulgular niteliğini taşımaktadır. Fakat literatürde DKMP hastalığı ile MRP1 ve MRP2 geninin çalışıldığı bir çalışma olmadığından, bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçları direkt olarak karşılaştıramamaktayız. Literatürde bu iki genin hedeflediği hasta grupları genelde kanser türevleridir. Tartışmada bahsi geçen çalışmalara ait bulgular ışığında, MRP1 ve MRP2 genlerinin hasta grubunun kontrol grubuna oranla artmış ekspresyonunun, DKMP hastalarının medikal tedavisi sırasında ilaca direnç oluşmasında etkin rol oynayabileceğini göstermiştir ve literatürle uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak; tedavi başlangıcından önce, hastaya ait bu iki genin transkript miktarını belirlemek, ilaç kullanımında oluşacak muhtemel direnci öngörmek açısından önemli olacaktır.

8. SONUÇ

MRP-1 ve MRP-2 genlerinin hedeflendiği çalışmaların ışığında, bu genlerin ilaç direncinde etkin rol oynadığı bilinmektedir.

Yaptığımız bu tez çalışmasında, 90 DKMP hastası ve 90 sağlıklı erişkinden alınan kan örneklerinde MRP1 ve MRP2 hedef genleri, ABL referans geni ile karşılaştırılarak mRNA ekspresyon düzeyleri incelendi ve MRP1 mRNA miktarının hasta grubunda 6 kat, MRP2'nin ise yine hasta grubunda 77 kat fazla bulunduğu saptanmıştır. Artmış MRP-1 ve MRP-2 gen ekspresyonunun tedavide çoklu ilaç kullanımını gerektiren DKMP'li hastalarda tedaviye yanıtındaki kişisel farklılıkları açıklamak için bir zemin oluşturabileceği düşünülmüştür.

Ayrıca akılcı olmayan ilaç kullanımının getireceği; hastaların tedaviye uyumunun azalması, istenmeyen ilaç etkileşimleri, bazı ilaçlara karşı direnç gelişmesi, hastalıkların tekrarlaması ya da uzaması, tedavi maliyetlerinin artması faktörlerinin önlenmesi açısından da çalışma sonuçlarımız önem taşımaktadır. Nitekim sonuçlarımızın uzun dönem takiplerinde sık dekompanse olan DKMP'li hastaların incelendiği, daha geniş hasta grupları ile yapılacak ek çalışmalarca desteklenmesi gerekmektedir.

9.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden; Prof. Dr. Volkan BALTACI'ya, Yrd. Doç. Dr. Şule Beyhan ÖZDAŞ'a, değerli tez danışmanım Doç. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e desteği ve bu çalışmadaki katkılarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni Tıbbi Biyoloji ve Genetik üzerinde çalışmaya yönlendiren, güven duyan ve her zaman destekleyen T.C İstanbul Bilim Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Çavlan ÇİFTÇİ'ye;

Projemde var olan katkıları sebebiyle T.C İstanbul Bilim Üniversitesi Şişli Florence Nightingale Hastanesi Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne;

Tez hazırlama süresince desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Sema KETENCİ ve Yrd. Doç. Dr. Melike ERSÖZ'e;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez aşamasında da desteğini esirgemeyen ve bu zorlu süreçte yanımda olan sevgili eşim Dr. Mehmet Gültekin ERCAN'a, ayrıca bugüne kadar hiçbir karşılık beklemeden, maddi ve manevi desteklerini her daim hissettiğim anneme, babama ve kardeşlerime;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

10.KAYNAKLAR

- 1) Özhan H. Dilate Kardiyomiyopati ve Genetik. *İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü Dergisi*; 2002: Haziran; 18-21.
- 2) TransportDB [Internet]. Australia: Macquarie University [updated 12/24/2010; cited 07/02/2013] Available from 07/02/2013: [http:// www.membranetransport.org](http://www.membranetransport.org)
- 3) Toyoda Y, Hagiya Y, Adachi T, Hoshijima K, Kuo MT, Ishikawa T. MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions. *Xenobiotica* 2008, 38: 833-862.
- 4) Ishikawa T, Müller M, Klünemann C, Schaub T, Keppler D. ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane. Role of the ATP-dependent transport system for glutathione S-conjugates. *J Biol Chem.* 1990, 265:19279-19286
- 5) Claudel T, Cretenet G, Saumet A, Gachon F. Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock. *FEBS Lett.* 2007, 581: 3626-3633.
- 6) Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyrfas I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93:841– 2.
- 7) Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. *Circulation* 2006; 113;1807-16.
- 8) Braunwald E. Braunwald's Heart Disease a Textbook of Cardiovascular Medicine. Ed: Philadelphia, Saunders/Elsevier, 2008: 1659-1696.
- 9) Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* 2002;105:446-497.

- 10) Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M. Hypertrophic cardiomyopathy: Distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003; 107(17):2227-2259.
- 11) Semsarian C, Seidman J, Seidman CE. Molecular genetics of inherited cardiomyopathies. In Chien KR Ed: *Molecular basis of Cardiovascular Disease*. Philadelphia, Saunders, 2004: 293–305.
- 12) Fung DCY, Yu B, Littlejohn T, Trent RJ. An online locus-specific mutations database for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat*, 1999;14(4):326-358.
- 13) Forissier JF, Richard P, Briault S, Ledeuil C, Dubourg O, Charbonnier B, Carrier L, Moraine C, Bonne G, Komajda M, Schwartz K, Hainque B. First description of germline mosaicism in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet*, 2000; 37(2):132-136.
- 14) Jeschke B, Uhl K, Weist B, Schröder D, Meitinger T, Döhlemann C, Vosberg HP. A high risk phenotype of hypertrophic cardiomyopathy associated with a compound genotype of two mutated B-myosin heavy chain genes. *Hum Genet*, 1998; 102(3):299-304.
- 15) Richard P, Isnard R, Carrier L, Dubourg O, Donatien Y, Mathieu B, Bonne G, Gary F, Charron P, Hagege M, Komajda M, Schwartz K, Hainque B. Double heterozygosity for mutations in the B-myosin heavy chain and in the cardiac myosin binding proteins C genes in a family with hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet*, 1999; 36(7):542-547.
- 16) Yu B, French JA, Jeremy RW, French P, McTaggart DR, Nicholson MR, Semsarian C, Richmond DR, Trent RJ. Counseling issues in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet*, 1998; 35(3):183-191.
- 17) Ammassi NM, Seward JB, Bailey KR, Edwards WD, Tajik AJ. Clinical profile and outcome of idiopathic restrictive cardiomyopathy. *Circulation* 2000; 101(21):2490-2496.
- 18) Fontaine G, Guiraudon G, Frank R, et al: Stimulation studies and epicardial mapping in ventricular tachycardia. Study of mechanism and selection for surgery. In reentrant arrhythmias. Ed: Kulbertus H. Lancaster, Baltimore University Park Press, 1977; 334-340.

- 19) Fontaine G, Guiraudon G, Frank R: Mechanism of ventricular tachycardia with and without associated chronic myocardial ischemia: surgical management based on epicardial mapping. In innovations in diagnosis and management of cardiac arrhythmias. Ed: Narula OS, Baltimore, Williams and Wilkins, 1979; 516–545.
- 20) Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau JL, Malergue C, Grosgeat Y. Right ventricular dysplasia: A report of 24 adult cases. *Circulation* 1982; 65(2):384-482.
- 21) Marcus FI, Fontaine GH: Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/ cardiomyopathy. *PACE* 1995; 18:1298-1612.
- 22) Loire R, Tabib A. Unexpected sudden cardiac death. An evaluation of 1,000 autopsies. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1996; 89:13-18.
- 23) Furlanello F, Bertoldi A, Dallago M, Furlanello C, Fernando F, Inama G, Pappone C, Chierchia S. Cardiac arrest and sudden death in competitive athletes with arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Pacing Clin Electrophysiol* 1998; 21:331-336.
- 24) Fontaine G, Fontaliran F, Lascault G, Frank R, Tonet J, Chomette G, Grosgeat Y. Congenital and acquired right ventricular dysplasia. *Arch Mal Couer Vaiss* 1990; 87: 915-20.
- 25) Fontaine G, Fontaliran F, Linarez Cruz E, Chomette G, Grosgeat Y: The arrhythmogenic right ventricle. In Iwa T, Fontaine G, eds. Cardiac arrhythmias: recent progress in investigation and management . *Elsevier science*, 1988: 189-202.
- 26) Fontaine G, Fontaliran F, Mesnildrey P, et al: Acquired and transmitted dysplasia. In Olsen EGJ, Sekiguchi M, eds Cardiac myopathy update 3: restrictive cardiomyopathy and arrhythmias. *University of Tokyo Press*, 1990: 173-81.
- 27) Sabel KG, Blomström-Lindqvist C, Olsson SB, Enestrom S: ARVD in brother and sister: Is it related to myocarditis. *Pediatr Cardiol* 1990; 11: 113-6
- 28) Thiene G, Corrado D, Nava A, et al: Right ventricular cardiomyopathy: Is there evidence of an inflammatory etiology?. *Eur Heart J* 1991;12: 22-27.

- 29) Nava A, Thiene G, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L, Buja G, Martini B, Stritoni P, Fasoli G. Familial occurrence of right ventricular dysplasia: A study of involving nine families. *J Am Col Cardiol* 1988; 12: 1222-1230.
- 30) Nava A, Scognamiglio R, Thiene G, Canciani B, Daliento L, Buja G, Stritoni P, Fasoli G, Dalla Volta S. A polymorphic form of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Am J Cardiol* 1987; 59: 1405-1414.
- 31) Nava A, Canciani B, Thiene G, Scognamiglio R, Buja G, Martini B, Daliento L, Fasoli G, Stritoni P, Dalla Volta S. Analyse du mode de transmission de la dysplasie ventriculaire droit. *Arch Mal Couer* 1990; 83: 923-8
- 32) Laurent M, Descaves C, Biron Y, Deplace C, Almange C, Daubert JC. Familial form of arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Am Heart J* 1987; 113: 827-836.
- 33) Canciani B, Nava A, Toso V, Martini B, Thiene G. A casual spontaneous mutation as possible cause of the familial form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 1992; 15: 2217-2226.
- 34) Buja G, Nava A, Daliento L, Scognamiglio R, Miorelli M, Canciani B, Alampi G, Thiene G. Right ventricular cardiomyopathy in identical and nonidentical twins. *Am Heart J* 1993; 126 : 1187-1280.
- 35) Rampazzo A, Nava A, Danielli GA, Buja G; Daliento G: The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 959-1021.
- 36) Ahmad F, Li D, Karibe A, Gonzalez O, Tapscott T, Hill R, Weilbaecher D, Blackie P, Furey M, Gardner M, Bachinski LL, Roberts R. Localization of a gene responsible for arrhythmogenic right ventricular dysplasia to chromosome 3p23. *Circulation* 1998; 98: 2791-2796.
- 37) Rampazzo A, Nava A, Erne P, et al: A new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVD2) maps to chromosome 1q42-q43. *Hum Mol Genet* 1995;4: 2151-2155.

- 38) Severini GM, Krajcinovic M, Pinamonti B, Sinagra G, Fioretti P, Brunazzi MC, Falaschi A, Camerini F, Giacca M, Mestroni L. A new locus for arrhythmogenic right ventricular dysplasia on the long arm of chromosome 14. *Genomics* 1996; 31: 193-200.
- 39) Rampazzo A, Nava A, Miorin M, Fonderico P, Pope B, Tiso N, Livolsi B, Zimbello R, Thiene G, Danieli GA. ARVD4, a new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 2 long arm. *Genomics* 1997; 45:259-322.
- 40) Coonar AS, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Needham EW, Houlston RS, Cliff S, Otter MI, Murday VA, Mattu RK, McKenna WJ. Gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with diffuse nonepidermolytic palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) maps to 17q21. *Circulation* 1998; 97: 2049-2107.
- 41) Protonotarios NI, Tsatsopoulou AA: The Naxos disease. In: Nava A, Rossi L. Thiene G. (Eds). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Elsevier*, 1997; 454-516.
- 42) J. Topol. Textbook of Cardiovascular Medicine Eric Lippincott Williams and Wilkins third edition turkish version, 2008 ; 1330-1351.
- 43) Kubo T, Matsumura Y, Kitaoka H, Okawa M, Hirota T, Hamada T, Hitomi N, Hoshikawa E, Hayato K, Shimizu Y, Yamasaki N, Yabe T, Nishinaga M, Takata J, Doi Y. Improvement in prognosis of dilated cardiomyopathy in the elderly over the past 20 years. *Journal of Cardiology* 2008; 52(2) :111-118.
- 44) Braunwald E, Bristow MR: Congestive heart failure: Fifty years of progress. *Circulation* 2000; 14(102):14-23.
- 45) Felker GM, Hu W, Hare JM, Hruban RH, Baughman KL, Kasper EK. The spectrum of dilated cardiomyopathy. The Johns Hopkins experience with 1,278 patients. *Medicine (Baltimore)* 1999;78:270.
- 46) Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: From mutations identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001;104:557.
- 47) Crispell KA, Hanson EL, Coates K. Periodic rescreening is indicated for family members at risk of developing familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:1503.

- 48) Kenneth R. Chien. Genotype, phenotype: Upstairs, downstairs in the family of cardiomyopathies. *J Clin Invest* 2003;111:175-178.
- 49) Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi H, Koga Y, Arimura T, Koyanagi T, Takahashi M, Hohda S, Ueda K, Nouchi T, Hiroe M, Marumo F, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A. Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 385-478.
- 50) Li D, Czernuszewicz GZ, Gonzales O, et al: Novel cardiac troponin T mutations as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 104: 2188-2193.
- 51) Wang X, Osinska H, Dorn GW, Nieman M, Lorenz JN, Gerdes AM, Witt S, Kimball T, Gulick J, Robbins J. Mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 103:2402-2409.
- 52) Taylor MR, Fain PR, Sinagra G, Robinson ML, Robertson AD, Carniel E, Di Lenarda A, Bohlmeier TJ, Ferguson DA, Brodsky GL, Boucek MM, Lascor J, Moss AC, Li WL, Stetler GL, Muntoni F, Bristow MR, Mestroni L; Familial Dilated Cardiomyopathy Registry Research Group. Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(5):771-851.
- 53) Haghighi K, Kolokathis F, Pater L, Lynch RA, Asahi M, Gramolini AO, Fan GC, Tsiapras D, Hahn HS, Adamopoulos S, Liggett SB, Dorn GW, MacLennan DH, Kremastinos DT, Kranias EG. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest* 2003; 111(6):869-945.
- 54) Sinagra G, Di Lenarda A, Brodsky GL, Taylor MR, Muntoni F, Pinamonti B, Carniel E, Driussi M, Bristow MR, Mestroni L; Heart Muscle Disease Study Group. New insights into the molecular basis of familial dilated cardiomyopathy. *Ital Heart J* 2001; 2(4):280-286.
- 55) Feng J, Yan JY, Buzin CH, Sommer SS, Towbin JA. Comprehensive mutations scanning of the dystrophin gene in patients with nonsyndromic X-linked dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2002; 18:1120-1124.

- 56) Vatta M, Stetson SJ, Perez-Verdia A, Entman ML, Noon GP, Torre-Amione G, Bowles NE, Towbin JA. Molecular remodelling of dystrophin in patients with end-stage cardiomyopathies and reversal in patients on assistance-device therapy. *Lancet* 2002; 16:936-977.
- 57) Arbustini E, Diegoli M, Fasani R. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol*, 1998; 153(5) :1501-1506.
- 58) Abraham MR, Olson LJ, Joyner MJ, Turner ST, Beck KC, Johnson BD. Anjiotensin-converting enzyme genotype modulates pulmonary function and exercise capacity in treated patients with congestive stable heart failure. *Circulation*, 2002; 106(14):1794-1803.
- 59) Bakalli A, Georgievska-Ismail L, Musliu N, Koçinaj D, Gashi Z, Zeqiri N. Relationship of left ventricular size to left atrial and left atrial appendage size in sinus rhythm patients with dilated cardiomyopathy. *Acta Inform Med*. 2012; 20(2):99-102.
- 60) Brislow RB, Mestroni L, Bohlmeier TJ, Gilbert EM Dilated cardiomyopathies. IN: Hurst's the Heart, New York McGraw Hill, 2001: 1953-1955.
- 61) Baig K., Mahon N., McKenna W. The Pathophysiology of Advanced Heart Failure. *Am Heart J*. 1998; 135 (6): 216-230.
- 62) Michael HC, John P. Crawford's Cardiology. 2001: 1100-1118
- 63) Monastero R, Caldarella R, Mannino M, Cafalu AB, Lopez G, Noto D. Lack Of Association Between Angiotensin Converting Enzyme Polymorphism And Sporadic Alzheimer's Disease. *Neurosci Lett*, 2002; 335:147-149.
- 64) Danser AJ, Schalekamp MH, Bax WA, Brink AM, Saxena PR, Riegger GJ. Angiotensin-Converting Enzyme In The Human Heart. *Circulation*, 1995; 92:1387-1388.
- 65) Hoekstra JW. Handbook Of Cardiovascular Emergencies. Lippincott Williams And Wilkins. Philadelphia, 2001;56-71.
- 66) Parlakpınar H, Yanılmaz M, Ağlamış S, Acet A. Kardiyovasküler Sistem ve Anjiyotensin II Tip 2 Reseptörü (AT2), İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2004; 11:49-52.

- 67) Kevney B, Mckenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Youngman L. Large-Scale Test Of Hypothesised Associations Between The Angiotensin-Converting- Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism And Myocardial Infarction İn About 5000 Cases And 6000 Controls. *Lancet*, 2000; 355:434-442.
- 68) Yüksel H. Kardiyovasküler Hastalıkların Tedavisinde Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri, *Türk Kardiyol Dern Arş*, 2004;32(3):188-196.
- 69) Keating MT, Olson MT. Definig The Molecular Genetic Bases Of Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med*. 1997;7:60-63.
- 70) Gök H. Klinik Kardiyoloji Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. İstanbul, 2002;13:23-45.
- 71) Braunwald E, Zipes DP, Libby P. Heart Disease. WB. Saunders Company. Philadelphia, 2001:1342-1398.
- 72) Hoekstra JW. Handbook Of Cardiovascular Emergencies (Second Ed). Lippincott Williams And Wilkins. Philadelphia, 2001;56-71.
- 73) Shimizu E, Hashimoto K, Kobayashi K, Mitsumori M, Ohgake S, Koizumi H. Lack Of Association Between Angiotensin I-Converting Enzyme Insertion/Deletion Gene Functional Polymorphism And Panic Disorder İn Humans. *Neurosci Lett*. 2004; 363 (1):81-83.
- 74) Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 2000; 342(15):1077-1161.
- 75) Legius E, Schollen E, Matthijs G, Fryns J-P. Fine Mapping of Noonan/cardiofacio-cutaneous syndrome in a large family. *Eur J Hum Genet* 1998; 6(1):32-39.
- 76) Vosberg H-P, McKenna WJ. Cardiomyopathies. In Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR. Principles and Practice of Medical Genetics, 4th ed. New York, Churchill Livingstone, 2002: 1342-1416.
- 77) Maeda M, Holder E, Lowes B, Valent S, Bies RD. Dilated cardiomyopathy associated with deficiency of the cytoskeletal protein metavinculin. *Circulation* 1997; 95(1):17-20.

- 78)** Jung M, Poepping I, Perrot A, et al: Investigation of a family autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22. *Am J Hum Genet* 65:1068, 1997.
- 79)** Vilarinho L, Santorelli FM, Rosas MJ, et al: The mitochondrial A3243G mutations presenting as severe cardiomyopathy. *J Med Genet* 34:607, 1997.
- 80)** Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 2002; 109: 307-320.
- 81)** Gachon F, Olela FF, Schaad O, Descombes P, Schibler U. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab.* 2006; 4: 25-36.
- 82)** Claudel T, Cretenet G, Saumet A, Gachon F. Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock. *FEBS Lett.* 2007; 581: 3626-3633.
- 83)** Lévi F, Okyar A, Dulong S, Innominato PF, Clairambault J. Circadian timing in cancer treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010; 50: 377-421.
- 84)** Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55: 3-29.
- 85)** Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42: 59-98.
- 86)** Ravna AW, Sager G. Molecular modeling studies of ABC transporters involved in multidrug resistance. *Mini Rev Med Chem.* 2009; 9: 186- 193
- 87)** Padowski JM, Pollack GM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Methods Mol Biol.* 2010; 596: 359-384.
- 88)** Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976; 455: 152-162.
- 89)** Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25: 423-429.

- 90) Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JH. Clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist*. 2007; 12: 927-941.
- 91) Ishikawa T, Müller M, Klünemann C, Schaub T, Keppler D. ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane. Role of the ATP-dependent transport system for glutathione S-conjugates. *J Biol Chem*. 1990; 265: 19279-19286.
- 92) Borst P, Zelcer N, van de Wetering K. MRP2 and 3 in health and disease. *Cancer Lett*. 2006; 234: 51-61.
- 93) Fardel O, Jigorel E, Le Vee M, Payen L. Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. *Biomed Pharmacother*. 2005; 59: 104-114.
- 94) Kees Nooter, Anne Marie Westerman, Marcel J. Flens, Guido J. R. Zaman, Rik J. Scheper, Kyra E. van Wingerden, Herman Burger, Robert Oostrum, Ton Boersma, Pieter Sonneveld, Jan Willem Gratama, Tjebbe Kok, Alexander M. M. Eggermont, Fre T. Bosman, and Gerrit Stoter. Expression of the Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) Gene in Human Cancers. *Clin Cancer Res*. 1995; 1(11):1301-1310.
- 95) Schneider E, Cowan KH, Bader H, Toomey S, Schwartz GN, Karp JE, Burke PJ, Kaufmann SH. Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed acute leukemia. *Blood*, 1995; 85(1): 186-193.
- 96) Shi NQ, Ye B, Makielski JC: 2005. Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 39(1):51-60.
- 97) Gibson NM, Quinn CJ, Pfannenstiel KB, Hydock DS, Hayward R. Effects of age on multidrug resistance protein expression and doxorubicin accumulation in cardiac and skeletal muscle. *Xenobiotica*. 2014; 44(5):472-479.
- 98) Wang Y, Tang L, Pan J, Li J, Zhang Q, Chen B. The recessive model of MRP2 G1249A polymorphism decrease the risk of drug-resistant in Asian Epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Epilepsy Res*. 2015; 112:56-63.

- 99)** Lazarowski AJ, Garcia Rivello HJ, Vera Janavel GL. Cardiomyocytes of chronically ischemic pig hearts express the MDR-1 gene-encoded P-glycoprotein. *J Histochem Cytochem* 2005;53(7) :845–850.
- 100)** Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J.* 1996; 314(2):433-437.
- 101)** Mattiello T, Guerriero R, Lotti LV, Trifirò E, Felli MP, Barbarulo A, Pucci B, Gazzaniga P, Gaudio C, Frati L, Pulcinelli FM. Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-mediated transport: evidence of a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(7):762-813.

EKLER
EK-1



T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

SAYI : 50400462/162
KONU: Tez çalışması hk.

TARİH :09/06/2015

GAYRETTEPE FLORENCE NIGHTINGALE HASTANESİ BAŞHEKİMLİĞİ'NE,

İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Şeyda ERCAN'ın "Dilate Kardiyomyopati Hastalarda MRP1 ve MRP2 Gen Ekspresyonlarının Analizi" başlıklı tez çalışmasını bünyenizde bulunan Genetik Hastalıklar ve Tanı Merkezi'nde gerçekleştirebilmesi için müsaadelerinizi saygılarımla rica ederim.


Prof. Dr. Vildan KARPUZ
Müdür

EK-2



GAYRETTEPE
FLORENCE NIGHTINGALE
HASTANESİ

Sayı: 2015/ 3454

09/06/2015

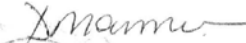
Konu: Tez Çalışması hk.

T.C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

İlgi:09/06/2015 tarih ve 50400462/162 sayılı yazınız.

İlgi yazınız ile , İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Şeyda ERCAN' ın "Dilate Kardiyompati Hastalarda MRP1 Ve MRP2 Gen Ekspresyonlarının Analizi" başlıklı tez çalışmasını hastanemiz bünyesinde bulunan Genetik Hastalıklar ve Tanı Merkezi' nde gerçekleştirmesi uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla arz ederim.


Dr. Dilek Leyla MAMÇU
Mesul Müdür

