



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**RANOLAZİNİN İNSAN KORONER ARTER ENDOTEL
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İN-VİTRO
ŞARTLARDA ARAŞTIRILMASI**

Selçuk ÖZTÜRK

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RANOLAZİNİN İNSAN KORONER ARTER ENDOTEL
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İN-VİTRO
ŞARTLARDA ARAŞTIRILMASI**

Selçuk ÖZTÜRK

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN**

**ANKARA
2019**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum **“Ranolazinin İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İn-vitro Şartlarda Araştırılması”** başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Selçuk ÖZTÜRK

Tarih: 10.01.2019

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda Selçuk ÖZTÜRK tarafından hazırlanan “Ranolazinin İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İn-vitro Şartlarda Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10.01.2019

İmza

Prof. Dr. Mahmut SELVİ

Gazi Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Klara DALVA

Ankara Üniversitesi

Raportör

İmza

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Ankara Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Koroner Arter Hastalığı	1
1.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji	1
1.1.2. Kardiyovasküler Hastalık Patofizyolojisi	2
1.1.3. Kardiyovasküler Hastalık Risk Faktörleri	4
1.1.4. Tanı Yöntemleri	8
1.1.5. Tedavi Yöntemleri	11
1.1.5.1. Tıbbi Tedavi	11
1.1.5.2. Perkütan Koroner Girişimler	12
1.1.5.3. Koroner Arter Bypass Cerrahisi	13
1.2. Kardiyovasküler Hastalıklarda Yenileyici Tıp Uygulamaları	13
1.2.1. Kök Hücre Uygulamaları	14
1.2.2. Doku ve Damar Mühendisliği Uygulamaları	18
1.2.3. Gen Tedavisi Uygulamaları	19
1.3. Ranolazin	20
1.3.1. Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması	20
1.3.2. Klinik Öncesi ve Klinik Çalışmalar	24
1.4. Endotel Hücre	26
1.4.1. Endotel Hücre Fizyolojisi, Fonksiyonları ve Disfonksiyonu	26
1.4.2. Endotel Hücre Kültürü	27
1.4.3. Endotel Hücre ve Anjiyogenez	29
1.5. Tezin Amacı	30
1.6. Tezin Hedefleri	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM	31
2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Solüsyonlar	31
2.1.1. İnsan Koroner Arter Endotel Hücre Hattı	31
2.1.2. Hücre Kültürü ve Pasajlanması Aşamasında Kullanılan Malzemeler	31
2.1.3. Hücre Kültürü ve Pasajlanması Aşamasında Kullanılan Cihazlar	33
2.1.4. Ranolazin Solüsyonun Hazırlanması	33
2.1.5. Proliferasyon ve Sitotoksite Analizi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	34
2.1.6. Matrijel Analizi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	34
2.1.7. VEGF Ölçümü İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	35
2.2. Tez Çalışmasında Uygulanan Yöntemler	36
2.2.1. İnsan Koroner Arter Endotel Hücrelerinin Kültürü	36

2.2.2. Ranolazin Solüsyonun Hazırlanması	37
2.2.3. Proliferasyon ve Sitotoksosite Testleri	37
2.2.4. Matrijel Tüp Formasyonu Testi	39
2.2.5. VEGF Miktarının Tayin Edilmesi	40
2.2.6. İstatiksel Analizler	42
3. BULGULAR	43
3.1. İnsan Koroner Arter Endotel Hücrelerinin Kültürü	43
3.2. Proliferasyon ve Sitotoksosite Testleri	44
3.3. Matrijel Tüp Formasyonu Test Analizleri	46
3.4. VEGF Miktarı Analizleri	55
4. TARTIŞMA	58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
ÖZET	70
SUMMARY	72
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	90

ÖNSÖZ

Tanı ve tedavi yöntemlerindeki ciddi ilerlemelere rağmen kardiyovasküler hastalıklar tüm Dünya’ da ve ülkemizde önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Miyokardiyal revaskülarizasyon yöntemleri ne kadar gelişmiş olursa olsun, bazı koroner arter hastaları tam olarak revaskülarize edilememekte ve angina ve kalp yetersizliği ile yaşamaya devam etmektedir. Bu hastalarda sağkalımı uzatmak için yenileyici tıp tedavi stratejilerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Ranolazin molekülü yakın zamanda bu hasta grubunda kullanım için onay almış, etki mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamış, vücutta farklı organlarda farklı etkiler gösteren yeni bir ilaçtır. Ayrıca mevcut literatür bilgileri ışığında, bu ilacın endotel hücrelerindeki etkisi ve anjiyogenezis sürecine herhangi bir katkısı olup olmadığı ve bu katkının olası mekanizmaları halen bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, ranolazinin insan koroner arter endotel hücreleri üzerindeki etkisinin ve anjiyojenik sürecin in-vitro olarak araştırılması ve elde edilecek sonuçların yenileyici tıp bilimi çerçevesinde tartışılması amaçlanmıştır.

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesinde ve tezimin her aşamasında değerli bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN’e,

Tez çalışmam süresince tezimi yapabilmek için ihtiyaç duyduğum bütün laboratuvar uygulamalarında bana destek sağlayan ve karşılaştığım sorunları çözebilmek için bana değerli vaktini ayıran Sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN’e,

Tez çalışması sürecinde tüm sorularımı cevaplayan ve benden yardımlarını esirgemeyen Elçin Lab ailesine ve değerli meslektaşlarıma,

Akademik kariyerimin başından sonuna kadar benim yanımda olan, her türlü kararında beni destekleyen aileme,

Sonsuz teşekkür ederim...

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKS	Akut Koroner Sendrom
DM	Diyabetes Mellitus
EKG	Elektrokardiyografi
ELISA	Enzim Bağlı İmmünoSorbent Assay
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
İKAEH	İnsan Koroner Arter Endotel Hücresi
İUVEH	İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresi
KAH	Koroner Arter Hastalığı
KKH	Koroner Kalp Hastalığı
KVH	Kardiyovasküler Hastalık
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Ranolazin molekülünün kimyasal yapısı.	20
Şekil 1.2. Ranolazinin antianjinal etki mekanizması (Özdemir M, 2016).....	23
Şekil 2.1. xCELLigence RTCA SP cihazı (A: Yazılımın bulunduğu bilgisayar sistemi, B: İnkübatörün içerisinde tutulan ve plaka bölgesinin içerisinde elektronik plaka bulunan analiz cihazı).....	39
Şekil 2.2. Wimasis Image Analysis programı aracılığıyla endotel hücrelerinin tüp oluşum kapasitesinin değerlendirilmesi örneği.....	40
Şekil 3.1. Pasaj 2 aşamasındaki insan koroner arter endotel hücrelerinin ekimden 6 gün sonraki invert mikroskop görüntüsü.	43
Şekil 3.2. Yeterli bolluğa ulaşmış insan koroner arter endotel hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü.....	44
Şekil 3.4. xCELLigence sistemi ile farklı dozlardaki ranolazin konsantrasyonlarının sitotoksikite çalışması.	46
Şekil 3.5. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 4. saatteki invert mikroskop görüntüsü (A: 0 μ M ranolazin, B: 50 μ M ranolazin, C: 200 μ M ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).	50
Şekil 3.6. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 4. saatteki invert mikroskop görüntülerinin Wimasis Image Analysis programı kullanılarak analizi (A: 0 μ M ranolazin, B: 50 μ M ranolazin, C: 200 μ M ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).	50
Şekil 3.7. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 8. saatteki invert mikroskop görüntüsü (A: 0 μ M ranolazin, B: 50 μ M ranolazin, C: 200 μ M ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).	51
Şekil 3.8. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 8. saatteki invert mikroskop görüntülerinin Wimasis Image Analysis programı kullanılarak analizi (A: 0 μ M ranolazin, B: 50 μ M ranolazin, C: 200 μ M ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).	51

Şekil 3.9. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 12. saatteki invert mikroskop görüntüsü (A: 0 µM ranolazin, B: 50 µM ranolazin, C: 200 µM ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).	52
Şekil 3.10. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 12. saatteki invert mikroskop görüntülerinin Wimasis Image Analysis programı kullanılarak analizi (A: 0 µM ranolazin, B: 50 µM ranolazin, C: 200 µM ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).	52
Şekil 3.11. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 16. saatteki invert mikroskop görüntüsü (A: 0 µM ranolazin, B: 50 µM ranolazin, C: 200 µM ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).	53
Şekil 3.12. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 16. saatteki invert mikroskop görüntülerinin Wimasis Image Analysis programı kullanılarak analizi (A: 0 µM ranolazin, B: 50 µM ranolazin, C: 200 µM ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).	53
Şekil 3.13. Çalışma gruplarındaki toplam tüp uzunluğunun piksel analiz sonuçları. * 50 µM ranolazin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.001$).	55
Şekil 3.14. Hesaplamalarda kullanılan, konsantrasyon ve absorbans arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren standart eğrisi.	56
Şekil 3.15. Farklı ranolazin dozu ve zamanlarda insan koroner arter endotel hücrelerinden salınan VEGF miktarları.	57

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Tez Çalışmasının İş-Zaman Çizelgesi	31
Çizelge 3.1. İnsan koroner arter endotel hücrelerinin matrijel membrandaki farklı durum ve zamanlarda oluşturdıkları toplam tüp uzunluklarının piksel analizi sonuçları	54
Çizelge 3.2. İnsan koroner arter endotel hücrelerinin matrijel membrandaki farklı durum ve zamanlarda oluşturdıkları tüplerin dallanma noktalarının sayısal analiz sonuçları	54
Çizelge 3.3. İnsan koroner arter endotel hücrelerinin matrijel membrandaki farklı durum ve zamanlarda oluşturdıkları tüplerin yüzdesel olarak alan analizi (%) sonuçları	54
Çizelge 3.4. İnsan koroner arter endotel hücrelerinin farklı ilaç dozu ve zamanlardaki VEGF salınımlarının miktar (pg/mL) analizi sonuçları	56

1. GİRİŞ

1.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Koroner Arter Hastalığı

1.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), kalbin ve kan damarlarının hastalıklarını içeren ve koroner kalp hastalığı (KKH), koroner arter hastalığı (KAH) ve akut koroner sendrom (AKS) olarak adlandırılan bir grup hastalığın ortak adını oluşturmaktadır. Bu dört terim sağlık profesyonelleri ve hastalar tarafından her ne kadar aynı hastalık olarak değerlendirilseler de aslında birbirlerinden farklı olgu tanımlamalarını içermektedir. AKS, KAH alt gruplarından birini oluşturmaktadır ve sıklıkla kalp krizi geçiren hastalar için kullanılan bir terimdir. KKH ise KAH neticesinde oluşan klinik durumlardan birisidir. KAH ise koroner arterlerde sıklıkla ateroskleroz neticesinde gelişen patolojik bir süreci ifade etmektedir (Sanchis-Gomar ve ark., 2016).

KAH, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir ölüm ve hastalık nedenidir (Roger VL, 2007). Son yıllarda tedavi imkanlarının yaygınlaşması ve seçeneklerin çoğalması neticesinde KAH ve KKH nedenli ölüm oranları Batı ülkelerinde azalma eğiliminde olsa da; halen otuz beş yaş ve üzeri ölümlerin yaklaşık üçte birinden KAH sorumludur (Go ve ark., 2013 ve Nichols ve ark., 2014). Amerikan Kalp Cemiyeti tarafından 2016 yılında yayınlanan Kalp Hastalığı ve İnme İstatistiği verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde yirmi yaş ve üzerindeki on beş buçuk milyon kişide KAH mevcuttur ve yaşlandıkça hastalığın görülme sıklığı hem kadın hem de erkek cinsiyette artmaktadır. Mevcut verilere göre, geçen her kırk iki saniyede, bir Amerikan vatandaşı kalp krizi geçirmektedir (Mozaffarian ve ark., 2016). KVH bağlı ölümler her ne kadar 1990'lı yıllardan sonra artış göstermiş olsa da yaş tanımlamalarının ve tüm dünyada ölüm sebeplerinin değişmesine bağlı olarak yaşa göre standartlaştırılmış ölüm oranı aynı dönemde yüzde 22 oranında azalmıştır

(Abubakar ve ark., 2015). 2009 yılında yayınlanan Ulusal Sağlık ve Gıda Araştırma Çalışması verilerine göre kalp krizi görülme sıklığı orta yaşlı erkek bireylerde (35-54 yaş) kadınlara göre daha fazladır. Fakat ilerleyen yaşlarda cinsiyetler arasındaki bu fark azalmakta ve kadın bireylerde kalp krizi erkek bireylere göre daha fazla görülmektedir (Towfighi ve ark., 2009). KVH bağlı ölümler ekonomik olarak ve sağlık hizmetleri açısından gelişmiş olan ülkelerde azalma eğilimi göstermekle birlikte, düşük ve orta gelir seviyesi olan ülkelerde, erişkinlerde en sık ölüm nedeni olmaya devam etmektedir (Lopez ve ark., 2006 ve Yusuf ve ark., 2001). Mevcut literatür bilgileriyle paralel olarak ülkemizde de KVH görülme sıklığı ve ölümler yüksek oranda seyretmektedir. Türkiye İstatistik Kurumu tarafından yayınlanan verilere göre 2017 yılında erişkin ölümlerinin en sık nedeni %39.7 oranıyla KVH bağlı ölümler olup bunun da en sık nedenini %39.7 oranıyla KKH oluşturmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2018).

1.1.2. Kardiyovasküler Hastalık Patofizyolojisi

KAH altında yatan temel patofizyolojik mekanizma koroner arterlerde aterosklerotik sürecin başlamasıdır. Çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi doğrudan ya da dolaylı olarak ateroskleroz başlangıcını ve gelişmesini etkiler. Bu sürecin klinik yansıması her ne kadar ilerleyen yaşlarda gözükse de ateroskleroz hayatın erken dönemlerinde hatta fetal gelişim aşamasında başlar. Ateroskleroz arter duvarlarında yağ, fibröz doku elementleri ve yangı moleküllerinin toplandığı sessiz başlangıçlı, ilerleyici, kronik bir hastalık olarak kabul edilir (Sayols-Baixeras ve ark., 2014). Bu süreç damar duvarındaki subendotelyal aralıkta küçük yoğunluktaki lipit partiküllerinin toplanmasıyla başlar. Subendotelyal aralıkta biriken bu kolesterol partikülleri değişik ajanlarla etkileşime girip okside olarak modifiye olur. Okside olmuş küçük kolesterol partikülleri, damar hücre adezyon molekülleri ve hücreler arası adezyon moleküllerini aktive eden güçlü kemotaktik moleküllerdir. Bu süreç bölgedeki monosit hücrelerinin subendotelyal bölgeye yapışması ve göçü ile devam eder. Subendotelyal aralıktaki bu monosit hücreleri makrofajlara farklılaşır (Libby ve ark., 2002). Yapılan çalışmalarda ateroskleroz bölgesindeki monosit hücrelerinin her

birinin farklı karakterde olduğu ve farklı işlevler gösterdiği bulunmuştur (Ghattas ve ark., 2013). Makrofajlar ise okside olmuş kolesterol partiküllerine bağlanıp köpük hücrelerini oluştururlar ve sitokin salımına sebep olarak proinflamatuvar etki gösterirler. Bu süreç yağlı çizgilenme olarak adlandırılan ilk aterosklerotik lezyonun oluşması ile devam eder (Glass ve Witztum, 2001).

Monosit ve makrofajlardan bağımsız olarak, aterosklerotik lezyon gelişiminde subendotelyal boşlukta lenfosit ve mast hücreleri de rol oynar ve buradaki hücreler arasında bir etkileşim bulunmaktadır. Bu etkileşim hücresel ve sistemik immün yanıtın aktive olmasına sebep olur ve bu süreç çeşitli proinflamatuvar moleküllerin salınımı ile birlikte kronik inflamatuvar bir sürecin aktive olmasına sebep olur (Libby ve ark., 2002; Sayols-Baixeras ve ark., 2014 ve Witztum ve Lichtman, 2014). Bu süreç, damar duvarındaki düz kas hücrelerinin media tabakasından intima tabakasına göç etmesi ile birlikte yağlı çizgilenmeden daha kompleks bir yapıya dönüşür (Sayols-Baixeras ve ark., 2014). Düz kas hücreleri intima tabakasına göç edince hücre dışı matriks molekülleri üreterek ilk başta oluşan yağlı çizgilenmeleri çepeçevre saran fibröz şapka yapısını oluştururlar. Fibröz şapka yapısı içindeki köpük hücreleri ölür ve lipidden zengin olan nekrotik çekirdek tabakasını oluştururlar. Bu süreç ikincil aterosklerotik lezyon olan fibröz plağın oluşmasına sebep olur (Tabas I, 2010).

Aterosklerotik plağın yapısını belirleyen en önemli etmen fibröz şapkanın kalınlığıdır. Stabil ve hassas plak olmak üzere iki tip plak formu mevcuttur. Stabil plaklar intakt ve kalın bir fibröz şapkaya sahiptirler ve tip 1 ve tip 3 kollajenden zengin matrikse sahiptirler (Finn ve ark., 2010). Bu şekildeki stabil bir plağın arter lümenine doğru genişlemesi akımı kısıtlayan bir darlığa ve iskemi ile birlikte sıklıkla stabil anginaya sebep olur. Hassas plaklar ise ince bir fibröz şapkaya sahip olup sıklıkla tip 1 kollajen içeren matrikse sahiptirler ve içeriğinde çok az düz kas hücresi barındırırlar. Bu tip plaklar makrofaj hücrelerinden, proinflamatuvar ve protrombotik moleküllerden zengin olup erozyona ve rüptüre olmaya yatkındırlar. Bu durum, aterosklerotik plağın çekirdek kısmının dolaşımda bulunan koagülasyon proteinlerine maruz kalmasına sebep olup pıhtılaşmayı tetikler ve damar lümenin ani tıkanmasına

ve AKS sebep olur (Libby ve ark., 2011 ve Sakakura ve ark., 2013). Plak içi kanama ise ateroskleroz patofizyolojisine katkıda bulunan süreçlerden birisidir ve damarın vasa vasorum tabakasının adventisyadan intimaya doğru tutulması ile gerçekleşir (Doyle ve Caplice, 2007).

1.1.3. Kardiyovasküler Hastalık Risk Faktörleri

KAH başlangıcına ve ilerlemesine sebep olabilecek bir çok risk faktörü mevcut olup bu risk faktörleri klinik açıdan kontrol edilip edilememesine göre iki gruba ayrılmaktadır: Değiştirilebilir risk faktörleri ve değiştirilemez risk faktörleri. Yüksek kan basıncı, yüksek kolesterol seviyeleri, sigara kullanımı, diyabet, kilo fazlalığı ve obezite, metabolik sendrom, fiziksel aktivite eksikliği, sağlıksız diyet ve stres değiştirilebilir yani kontrol edilebilir risk faktörlerini oluşturmaktadır. Fakat bazı risk faktörleri vardır ki bunları kontrol etmek ya da tersine çevirmek mümkün olmaz. Bunları yaşlanma, cinsiyet, aile öyküsü ve genetik faktörler oluşturmaktadır. Her ne kadar hastaların bir çoğunda bu risk faktörlerinden bir ya da birden fazlası bulunsa da hastalık yaygınlığı ve ilerlemesi her hastada benzer şekilde olmamaktadır (Hajar R, 2017 ve Kumar ve Cannon, 2009). Modifiye edilemeyen risk faktörlerine son yıllarda lipoprotein a, homosistein, trombotik ve inflamatuvar faktörler gibi yeni risk faktörleri eklenmiştir (Bugan B, 2013 ve Kumar ve Cannon, 2009).

KAH oluşumu ve AKS gelişimi açısından en güçlü bağımsız risk belirteçlerinden biri yaşlanmadır. Erkek cinsiyette her bir dekad artışında risk daha da artar. Menopoz öncesi dönemdeki kadınlar ile karşılaştırıldığında erkeklerde on yaş daha erken KAH ortaya çıkmaktadır. Menopoz sonrası dönemde ise risk kadın cinsiyet aleyhine artmaktadır fakat yaş grupları arasında değerlendirme yapıldığında toplam risk erkeklerde daha yüksek olarak seyretmektedir (Piepoli ve ark., 2016).

Sigara kullanımı KAH gelişimi açısından en önemli değiştirilebilir risk faktörüdür. Sigara sempatik sinir sistemini aktive eder, kan basıncını arttırır ve miyokart oksijen sunumunu azaltır. Bununla beraber sigara kullanımının ateroskleroz

ve tromboz gelişimi üzerinde etkileri mevcuttur. Sigara kullanımı damar duvarında düşük yoğunluklu kolesterol oluşumunu artırır ve endotel bağımlı vazodilatasyonu bozar. Bununla beraber sigara hemostatik ve inflamatuvar süreçte aktif rol oynayan C-reaktif protein, intersellüler adezyon molekülleri, fibrinojen ve homosistein seviyelerinde artışa sebep olur. Klinik açıdan değerlendirildiğinde sigara KAH gelişimi riskini 2-3 kat artırır ve diğer risk faktörlerinin varlığında bu risk katlanarak artar. Sigara içenlerde AKS ve ilişkili ölüm riski içmeyenlere göre erkeklerde yaklaşık üç kat ve kadınlarda yaklaşık beş kat daha fazladır. Sigara kullanımı bırakıldığında ise riskte azalma gözlenmektedir (Bazzano ve ark., 2003).

Hiperkolesterolemi ve KAH arasındaki ilişki uzun yıllardan beri bilinmektedir ve bu ilişki farklı toplumlarda yapılan klinik çalışmalarda ve hayvan modeli çalışmalarında gösterilmiştir (Pooling Project Research Group, 1978; O'Donnell ve Elosua, 2008 ve Stamler ve ark., 1986). Toplam plazma kolesterol seviyeleri KVH gelişme riskini öngörmek için günlük pratikte kullanılmaktadır. Bununla birlikte plazmadaki kolesterolün alt gruplarından biri olan ve kandaki temel taşıyıcı lipoprotein olan düşük yoğunluklu lipoprotein seviyeleri de KVH gelişimi ile ilişkilidir (Öztürk ve Öztürk, 2012 ve Piepoli ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada gençlik çağındaki düşük yoğunluklu lipoprotein seviyelerinin hayatın ilerleyen dönemlerindeki KVH gelişimiyle yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Klag ve ark., 1993). Ayrıca başka bir meta-analiz çalışmasında plazma toplam kolesterol seviyelerindeki %10 seviyesindeki bir azalmanın KAH insidansında %25 azalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca düşük yoğunluklu lipoprotein seviyelerinde 40 mg/dL' lik azalma kardiyovasküler olaylarda %20 azalma ile ilişkili bulunmuştur (Baigent ve ark., 2005). Düşük yoğunluklu lipoprotein içeren kolesterolden farklı olarak, plazmada dolaşan yüksek yoğunluklu lipoprotein içeren kolesterol partikülleri ise vücutta ateroskleroza karşı koruyucu etki gösterir. Yüksek yoğunluklu lipoprotein içeren kolesterol damar duvarındaki kolesterolü toplayıp katabolizmasını hızlandırarak plak oluşumunu engelleyici etki gösterir (Brewer J, 2004).

KVH' dan bağımsız olarak diyabetes mellitus (DM), sıklığı çok hızlı olarak artan ve bütün dünya nüfusunu etkileyen global bir sağlık problemidir. DM' nin en

önemli ve en sık komplikasyonu KVH gelişimidir. Tip 2 DM hastalığı bulunan bireyler olmayanlara göre 2-4 kat daha fazla KVH geliştirme riski taşırlar (Keskin ve Balcı, 2011). DM bağlı KVH gelişiminin patofizyolojik mekanizmaları kompleks olup birden çok faktörü içermektedir. DM hastalığında hiperglisemik tablo ileri glikolize son ürünlerin üretimini arttırarak arter duvarında inflamatuvar süreci tetikler. Diyabetik hastalarda endotel ve düz kas hücrelerindeki fonksiyon bozukluğuna ilave olarak lökositlerin endotele yapışmasında, trombosit hücrelerinin birleşmesinde, pıhtılaşma sisteminin aktivitesinde artış olmaktadır. Bu durumlar damar duvarında ateroskleroz gelişimini hızlandırır ve sonuç olarak yaygın vasküler tutulumu bağlı olarak KVH kliniği ortaya çıkar. Aşık DM oluşmadan önce bile mevcut insülin direnci KVH gelişime katkı sağlamaktadır (Gæde ve ark., 2003).

Hipertansiyon KAH yanında kalp yetersizliği, periferik damar hastalığı, serebrovasküler olaylar ve böbrek yetersizliği için de önemli bir risk faktörüdür. Bütün KVH olaylarının yaklaşık olarak %35' inden hipertansiyon sorumludur. Arter duvarı üzerinde kan basıncındaki artış endotel hücre fonksiyonlarında bozulmaya yol açar ve damar çeperinde ateroskleroz gelişimine katkıda bulunur. Yapılan çalışmalarda kan basıncı düzenlenmesi ile kardiyovasküler olaylardaki azalma arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu sebepten dolayı kan basıncının kontrol edilmesi KVH gelişimi için hem birincil hem de ikincil korumada önemli bir yere sahiptir (Mancia ve ark., 2013).

Metabolik sendrom, temel bileşenlerini abdominal obezite, insülin direnci, artmış kan basıncı ve lipid bozukluklarının oluşturduğu KVH ile yakından ilişkili bir bozukluktur (Reaven GM, 1988). Metabolik sendrom kökeninde temel olarak obezite, yağ dokusu bozuklukları ve insülin direnci bulunmaktadır. Bunların yanında vasküler, hepatik ve immünolojik kökenli inflamatuvar moleküllerde sendromun patofizyolojisinde rol oynamaktadır (Güven ve Gürlek, 2004). Metabolik sendrom KAH riskini 3 kat arttırmaktadır. Ayrıca metabolik sendrom olmayan hastalarda KVH bağlı ölüm %2 civarında seyrederken, metabolik sendromu olan hastalarda bu oran %10' un üzerindedir (Arslan ve ark., 2009).

Aile öyküsü ve genetik faktörler KAH gelişimi için aterosklerotik sürecin her basamağında etkili ve bağımsız risk faktörleridir. Yapılan çalışmalarda genetik faktörler ve KAH arasında ilişki bulunduğuna dair önemli kanıtlar elde edilmiştir. Kalıtsal faktörlerden dolayı gelişen KAH genellikle poligeniktir ve tek gen mutasyonları çok az hastada gözlenir. KAH patofizyolojisinde rol alan lipid ve apolipoprotein metabolizması, inflamatuvar aktivite, endotel fonksiyonları, platelet fonksiyonları, tromboz, fibrinoliz, homosistein metabolizması, insülin duyarlılığı ve kan basıncı idamesini içeren bir çok biyokimyasal süreç birden fazla gen tarafından kodlanan enzimler, reseptörler ve proteinler tarafından yönetilmektedir. Bu çoklu ve karmaşık mekanizmanın herhangi bir aşamasının herhangi bir basamağında kalıtsal hasar olabilir. Bunlara ilave olarak bu bileşenlerin çevresel veya genetik olarak etkilenmesi hastalık sürecine katkıda bulunabilir. Genetik faktörlerin KAH gelişimi ve ilerlemesine olan katkı ikizlerle yapılan çalışmalarda ve epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir. Literatürde KAH ve AKS gelişimi ile ilişkili olan birçok sorumlu gen tanımlanmış olsa da bu kanıtların birçoğunu olgu kontrol çalışmaları oluşturmaktadır ve çok az çalışmada KVH gelişimi ile ilgili net bir ilişkili bulunmuştur (Lusis ve ark., 2004a; Sayols-Baixeras ve ark., 2014 ve Scheuner MT, 2003). Klinik açıdan bakıldığında aile öyküsünün sorgulanması KAH için genetik şüpheyi değerlendirmede en önemli basamaklardandır. Birinci derece erkek akrabalarda 55 yaşından önce, birinci derece kadın akrabalarda 65 yaşından önce KAH gelişiminin olması, o kişide ateroskleroz gelişim riskini 2 kat arttırmaktadır (Lusis ve ark., 2004b ve Piepoli ve ark., 2016). Kalıtsal faktörlere ilave olarak son yıllarda biyokimya ve moleküler biyoloji bilimlerinin gelişmesi neticesinde yeni biyokimyasal risk faktörleri tanımlanmıştır. Hiperhomosisteinemi, ürik asit, C reaktif protein, fibrinojen ve lipoprotein-A bu belirteçlerden bazılarıdır (Bügan B, 2013; Tavlı ve Pekel, 2011).

Dünya’ da KVH risk faktörlerinin tanımlaması ile ilgili çalışmalar ilk olarak 1945 yılında Amerika Birleşik Devletleri başkanı Franklin D. Roosevelt’ in hipertansif kalp hastalığı ve inmeden dolayı ölümüyle başladı. Ardından Framingham Kalp Çalışması adı ile 1948 yılında başlayan epidemiyolojik çalışma bir kentte yaşayan nüfusun medikal kayıtlarını takip ederek KVH başlamasına ve

gelişmesine sebep olan ve günümüzde de kabul gören risk faktörlerini tanımladı. Çalışma araştırmacıları 1971 yılında ikinci jenerasyon nüfusu incelemeye başladı ve halen devam etmekte olan çalışma şu an üçüncü jenerasyon nüfusu incelemeye tabi tutmaktadır (Hajar R, 2017).

Framingham Kalp Çalışması KVH risk faktörleri tanımlanması ve tespit edilmesi açısından yapılmış ve halen devam etmekte olan en önemli çalışmadır. Bu çalışmadan elde edilecek yeni sonuçlar KVH risk faktörlerinin aydınlatılmasında klinik pratiğimize yeni ufuklar katacaktır. Benzer bir çalışma da ülkemizde, Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı (TEKHARF) çalışması adı altında Prof. Dr. Altan Onat ve arkadaşları öncülüğünde yapılmıştır. TEK HARF çalışması, Türk toplumundaki KVH sıklığını ve risk faktörlerini tanımlama, biyokimyasal ve genetik risk profillerini anlama noktasında ülkemizde yapılmış olan en büyük çalışma olup yaklaşık olarak 30 yıldır devam eden, tıp literatürüne önemli katkıları olmuş ve olmaya devam edecek bir çalışmadır (Onat AT, 2017).

1.1.4. Tanı Yöntemleri

KAH tanısı ve değerlendirmesi, risk faktörlerinin tespit edilmesi ve stres testi ve/veya koroner arter görüntülemelerini içeren klinik değerlendirmeden oluşmaktadır. Bu değerlendirmeler KAH şüphesi olan hastalarda iskemi tanısını doğrulamak, eşlik eden durumları ve tetikleyici faktörleri tespit etmek ve tedavi etkinliğini değerlendirmek için yapılır. Klinik uygulamalar sırasında tanı koymak amacıyla kullanılan bu testlerin birçoğu aynı zamanda hastalığın doğal süreci hakkında da bilgi verir. Tanı yöntemleri arasında elektrokardiyografi (EKG), transtorasik ekokardiyografi, eforlu EKG, miyokard perfüzyon sintigrafisi, stres ekokardiyografisi, kardiyak manyetik rezonans, bilgisayarlı tomografi ve invaziv koroner anjiyografi bulunmaktadır (Montalescot ve ark., 2013).

KAH açısından değerlendirilen her hastaya istirahat EKG' si çekilmelidir. Göğüs ağrısı sırasında çekilen bir EKG, dinamik değişikliklerin tespit edilmesi tanı

koymada ve ayırıcı tanının netleştirilmesinde faydalıdır. Bunların dışında EKG, sol ventrikül hipertrofisi, aritmi, ileti bozuklukları gibi başka anomalilerin tespit edilmesinde de fayda sağlayabilir (Montalescot ve ark., 2013).

Transtorasik ekokardiyografi kalp yapısı ve işlevleri hakkında iki boyut ve/veya üç boyut üzerinde fikir edinmemizi sağlar. Sol ventrikül üzerinde bölgesel duvar hareketlerinde anormallik olması KAH olasılığını artırır. Ayrıca kalp kapak hastalığı veya hipertrofik kardiyomiyopati gibi benzer şikayetlere sebep olabilecek nedenleri dışlamamıza yardımcı olur. Bunlara ilave olarak, transtorasik ekokardiyografi KAH olan hastalarda önemli bir prognostik belirteç olan global sol ventrikül işlevleri hakkında bilgi verir. Transtorasik ekokardiyografi üfürüm tespit edilen, daha önceden AKS geçirmiş veya kalp yetersizliği belirti ve bulguları olan hastalarda özellikle faydalıdır (Daly ve ark., 2003 ve Douglas ve ark., 2011).

Eforlu EKG testi, KAH tanısı ve değerlendirmesinde basit ve yaygın olarak kullanılabilen, on iki derivasyonlu elektrokardiyografi izlemi ile yapılan kullanışlı bir tetkiktir. Egzersiz, koşu bandı üzerinde ya da bisiklet üzerinde belli bir süre ve hızla yapılır. Hastanın dönen bir bant üzerinde yürümesi veya sabit bir bisiklet pedalını çevirmesi ile kalp hızı artar. Yürüyüşün hızı ve eğimi zamanla arttırılarak kalbin iş yükünün artması sağlanır. Test süresince oluşan EKG değişiklikleri işlem sonrasında yorumlanır ve hasta KAH tanısı açısından değerlendirilir. Ayrıca test sırasında elde edilen kalp hızı yanıtı, kan basıncı yanıtı, semptomlar ve ulaşılan iş yükü gibi parametreler hem tanısallık hem de prognostik bilgiler sağlar. Eforlu EKG ilaç tedavisinin etkinliğinin değerlendirilmesinde, revaskülarizasyon sonrasında veya semptomlar kontrol altına alındıktan sonra egzersiz önerisinde bulunmaya yardım etmek için de kullanılabilir (Mordi ve ark., 2017).

Miyokard perfüzyon sintigrafisi, radyofarmasötik işaretleyici ajanlar kullanılarak miyokard kan akımının görüntülenmesini sağlayan ve KAH tanısında kullanılan bir tetkiktir. Klinikte genellikle Teknesyum-99m (^{99m}Tc) veya Talyum 201 (²⁰¹Tl) radyofarmasötik ajanları kullanılır. Miyokard perfüzyon sintigrafisi testi KAH varlığını öngörmede değerli bir tetkiktir ve miyokardiyal stres, eforla veya

farmakolojik ajanlarla oluşturulur. Bu testte miyokard hipoperfüzyonu, stres sırasında istirahate göre işaretleyici tutulumunun daha az olması ile tanımlanır. Akciğerde miyokard perfüzyon ajanlarının tutulumunun artması, ciddi ve yaygın KAH olan hastalarda stresin tetiklediği sol ventrikül genişlemesini işaret eder. Geçici iskemik genişleme ve stres sonrasında sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda azalma ciddi KAH' ın önemli öngörücüleridir. Farmakolojik stres testi ile uygulanan perfüzyon sintigrafisi ise yeterli egzersiz yapamayan hastalarda uygulanır (Montalescot ve ark., 2013 ve Mordi ve ark., 2017).

Stres ekokardiyografi testi, egzersiz veya farmakolojik yöntemlerle uygulanan bir testtir. Egzersiz farmakolojik testlere göre daha fizyolojik bir ortam sağlar ve egzersiz süresi, iş yükü gibi ek fizyolojik bilgiler sağlar. İlave olarak kalp hızı, kan basıncı ve EKG değişiklikleri hakkında da bilgi verir. Farmakolojik stres ekokardiyografi testi eğer hasta egzersiz yapamayacaksa veya kalp duvar hareketlerinde kasılma bozukluğu varsa tercih edilir. Farmakolojik ajan olarak genellikle dobutamin tercih edilir. Stres ekokardiyografisi testinde miyokardda sunum-ihtiyaç arasındaki dengesizlikten kaynaklanan duvar kalınlaşma bozukluğu iskemi göstergesidir. Egzersiz ekokardiyografi testi KAH tanısına yardımcı olmanın ötesinde, egzersizin diyastolik kalp fonksiyonlarına, kalp kapak hastalıklarına, pulmoner hipertansiyona olan etkisini tespit etmek ve dispne etyolojisini araştırmak amacıyla klinik pratikte kullanılır (Senior ve ark., 2005 ve Sicari ve ark., 2003).

Koroner anatominin görüntülemesini sağlayan bilgisayarlı tomografi ve kardiyak manyetik rezonans testleri girişimsel olmayan tanı yöntemlerindendir (Montalescot ve ark., 2013). Bilgisayarlı tomografi ile görüntülemede radyasyon kullanımı ve dozu kaygı uyandırıcı bir durum olup yüksek dozlardan kaçınılması önerilmektedir. Görüntüleme aşamasında kontrast enjeksiyonu kullanmadan kalsiyum skorlaması yapılarak da ölçüm yapılabilir. Böbrek yetersizliği olan hastalar dışında koroner kalsiyum sadece ateroskleroz neticesinde oluşur ve kalsiyum miktarı kabaca koroner arterlerdeki ateroskleroz miktarı ile ilişkilidir. Diğer stres testlerinin bazı hasta gruplarında yanlış pozitif ve/veya negatif sonuç vermesi nedeniyle koroner bilgisayarlı tomografi anjiyografinin seçilmiş hasta gruplarında ilk basamakta

düşünülmesi faydalı olabilir (O’rourke ve ark., 2000). Kardiyak manyetik rezonans ve koroner manyetik rezonans anjiyografi ise hastayı iyonizan radyasyona maruz bırakmadan koroner arterlerin görüntülenmesini sağlar. Tekniğin avantajı tüm kardiyak anatomi ve işlevin aynı inceleme içerisinde değerlendirilebilmesidir. Ancak uzun görüntüleme süreleri, düşük alansal çözünürlük, operatör bağımlılığı, testin pahalı olması ve testin az sayıda merkezde yapılabilmesi tetkikin önemli sınırlılıklarındandır. Koroner manyetik rezonans anjiyografi tetkiki KAH tanısında rutin olarak önerilmemektedir (Montalescot ve ark., 2013 ve Mordi ve ark., 2017).

Girişimsel bir yöntem olan koroner anjiyografi KAH sürecinde koroner anatominin görüntülenmesi, tedavi yöntemlerinin değerlendirilmesi ve sağ kalımın tespit edilmesi amacıyla yapılır. Girişimsel olmayan testler her ne kadar KAH olasılığını kabul edilebilir ölçüde tespit etse de, fiziksel engel ya da eşlik eden hastalıkları olan bireylerde bu testler sonuç vermeyebilir. Ayrıca belirgin sol ventrikül ejeksiyon fraksiyon düşüklüğü ve tipik vasıfta göğüs ağrısı şikayeti olan hastalarda ve pilot, şoför gibi özel meslek gruplarında ilave bir test uygulamadan girişimsel koroner anjiyografi uygulanabilir. Koroner anjiyografi tıkalı KAH dışında koroner arter spazmı, koroner arter anomalileri, koroner arter anevrizmaları ve koroner arter diseksiyonu hakkında da bilgi verir. Koroner anjiyografi işlemi sırasında kullanılan yeni yöntemler ve kazanılan tecrübe sayesinde komplikasyon oranları çok azalmış olup hastanede yatış süreleri de oldukça kısalmıştır (Windecker ve ark., 2014 ve Noto Jr ve ark., 1991).

1.1.5. Tedavi Yöntemleri

1.1.5.1. Tıbbi Tedavi

KAH hastalarında tedavinin amacı semptom ve bulguların azaltılıp, sağ kalımın iyileştirilmesidir. KAH tedavisinde ilk basamağı yaşam tarzı değişiklikleri, risk faktörlerinin kontrolü, kanıta dayalı ilaç tedavisi ve hastanın eğitimi oluşturur.

Yaşam tarzı değişiklikleri ve risk faktörlerinin kontrolünü temel olarak sigara tüketiminin kesilmesi ve/veya azaltılması, sağlıklı bir diyet programının oluşturulması, kanıta dayalı fiziksel aktivite programlarının uygulanması, kilo yönetiminin sağlanması, dislipidemi, hipertansiyon, kronik böbrek yetersizliği ve DM gibi risk faktörlerinin düzen altına alınması, psikososyal faktörlerin kontrol altına alınması, kardiyak rehabilitasyon programlarının uygulanması ve influenza aşısının yıllık olarak uygulanması oluşturmaktadır (Montalescot ve ark., 2013).

KAH' da tıbbi tedavinin hedefi ise şikayetlerin düzelmesi ve kardiyovasküler olayların önlenmesidir. KAH tıbbi tedavisinde kullanılabilecek anti-iskemik ilaçlar nitratlar, beta reseptör bloke edici ajanlar, kalsiyum kanal blokerleri, ivabradin, nicorandil, trimetazidin, ranolazin, allopürinol ve molsidomindir. KAH hastalarında istenmeyen olayları önlemek için antitrombosit ajanlar (aspirin ve/veya P2Y12 reseptör blokerleri), lipit düşürücü ajanlar, renin-anjiyotensin aldosteron sistem blokerleri kullanılmaktadır (Montalescot ve ark., 2013).

1.1.5.2. Perkütan Koroner Girişimler

Perkütan koroner girişim ile revaskülarizasyon tedavisi ilk başlarda sadece tek damar hastalarında uygulanmaktaydı fakat artan tecrübe, stent teknolojisindeki gelişmeler (ilaç salımlı stentler, eriyebilir stent teknolojisi) ve adjuvan tedavilerdeki olumlu gelişmeler (glikoprotein 2b/3a inhibitörlerinin kullanımı, klopidoğrel) sayesinde çoklu damar hastalığı olan bireylerde ve kompleks lezyonlarda da yüksek başarı oranları ile uygulanabilen bir tedavi yöntemi haline gelmiştir. İşleme bağlı ölüm oranları çok düşük seyretmektedir. AKS hastalarında perkütan koroner girişim ile revaskülarizasyon tedavisi standart ve ivedilikle uygulanması gereken tedavi yöntemlerinden birisidir. Stabil KAH hastaları ile yapılan çalışmalarda ise perkütan koroner girişimin, tıbbi tedavi ile karşılaştırıldığında sağ kalıma belirgin bir faydası gösterilememiştir (Bucher ve ark., 2000). Ancak yaşam kalitesini bozan angina, nefes darlığı, hastaneye yatış gereksinimi, egzersiz kapasitesini düzeltme gibi

sonlanım noktalarında perkütan koroner girişim tıbbi tedaviye üstün bulunmuştur (Parisi ve ark., 1992).

1.1.5.3. Koroner Arter Bypass Cerrahisi

Koroner arter bypass cerrahisi, koroner ateroskleroz nedeniyle kanlanması bozulan kalp kası dokusunun arteriyel ve venöz greftler kullanılarak kanlanmasının, dolayısıyla beslenmesinin ve oksijenlenmesinin sağlanmasına yarayan cerrahi bir revaskülarizasyon yöntemidir. Bu tedavi yöntemiyle hastada iskemiye bağlı şikayetler giderilir, kalp krizi, ani ölüm gibi komplikasyonlar önlenir ve hastanın anginal yakınması olmadan günlük yaşamını sürdürmesi sağlanır (Üstündağ ve Aslan, 2011). Cerrahi yöntem ile revaskülarizasyona bağlı ölüm oranı %1-4 arasında değişmektedir. Arter greftlerinin 10 yıllık açık kalma oranı ven greftlerine göre daha üstün olduğu için sıklıkla arter greftlerin kullanılması önerilmektedir. Klinik pratikte ven greftlerinin kullanımı da sıktır. Koroner arter bypass cerrahisi, son yıllarda girişimsel kardiyolojideki gelişmelere bağlı olarak genellikle perkütan koroner girişimle açılması mümkün olmayan ve/veya işleme bağlı komplikasyon riski yüksek olan hastalarda uygulanan bir tedavi yöntemi haline gelmiştir (Montalescot ve ark., 2013).

1.2. Kardiyovasküler Hastalıklarda Yenileyici Tıp Uygulamaları

Yenileyici tıp; insan hücre, doku ve organlarının normal işlevlerini koruyabilmeleri ve/veya fonksiyonlarını sürdürebilmeleri amacıyla yerine konulması, yenilenmesi veya fonksiyonlarının kazandırılmasını tanımlayan disiplinler arası bir bilim dalıdır. Kök hücreler ise insan vücudundaki bütün hücrelerin ana kaynağı olup dokuların ve organların yapıtaşını oluşturmaktadır. Kök hücreler çok sayıda bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip olup özelleşmemiş yapıda bulunurlar fakat özelleşmiş hücrelere dönüşme özellikleri mevcuttur. Ayrıca simetrik olmayan bölünme özelliği gösterirler ve hasarlanmış olan

dokuyu tekrardan çoğaltarak eski fonksiyonunu geri kazandırabilme özelliğine sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı kök hücreler yenileyici tıp araştırmalarında çok büyük öneme sahiptir (Ateş U, 2016).

Kardiyovasküler hastalıkların tanı ve tedavi stratejisindeki önemli gelişmeler neticesinde bu hastalıklardan ölüm oranlarında ciddi bir azalma olmuştur. Fakat bu hastalıklardan etkilenen bireylerin sayısında ve hastalığın maliyetinin getirdiği ekonomik miktarlardaki önlenemez artış yıllardan beri katlanarak devam etmektedir (Mozaffarian ve ark., 2016 ve Piepoli ve ark., 2016). Tıbbi tedavi, görüntüleme yöntemleri ve revaskülarizasyon seçeneklerindeki bütün önemli gelişmelere rağmen bu hastaların birçoğu kalp yetmezliği ile yaşamlarını idame ettirmeye devam etmektedir ve beş yıllık ölüm oranları %50 civarında seyretmektedir (Minicucci ve ark., 2011). Ayrıca mevcut tedavi yöntemlerinin hiçbirisi hasarlanmış miyokard dokusundaki hücrelerin yenilenmesini ve sağlıklı hücrelere dönüşmesini sağlayamamaktadır. Bu konudaki başarılı olabilen tek tedavi yöntemi kalp nakli olsa da; birçok kısıtlılıktan dolayı bu tedavi yöntemi bu noktadaki ihtiyacı karşılayamamaktadır (Leong ve ark., 2017). Tıp camiasındaki kabul görmüş olan görüş kalp krizi geçirdikten ve/veya kalp hasarı geliştikten sonra miyokard dokusu kendini yenilemekte ve onarmakta başarılı değildir. Kalp kası hücreleri tekrarlayan mitoz bölünmelerle çoğalamamaktadır ve bu yüzden kalp kası hücreleri bölünemeyen hücreler olarak adlandırılmaktadır (Lader ve ark., 2017). Bu açıdan bakıldığı zaman kardiyovasküler hastalıklarda yenileyici tıp ve kök hücre uygulamaları bu hastalıkların tedavisi için yeni bir umut ışığı olmuştur.

1.2.1. Kök Hücre Uygulamaları

Kardiyovasküler hastalıklarda kök hücre tedavisi uygulamaları kalp kası dokusu tamiri ve yenilenmesi için uygulanmaktadır fakat nakil edilen hücrelerin bu onarımı hangi mekanizmalar üzerinden yaptığı bilinmemektedir. Genel olarak iki mekanizma üzerinde durulmaktadır: Nakil edilen hücrelerin kalp kası hücrelerine

farklılaşması ve/veya nakil edilen hücrelerin parakrin etki göstererek indirekt yollardan vücutta tamir mekanizmalarını başlatması (Cambria ve ark., 2017).

Kalp kası dokusunda onarıcı etki göstermesi amacıyla birçok farklı kök hücre tipi araştırılmıştır. İskelet kası hücreleri, tek çekirdekli kemik iliği hücreleri, hematopoietik kök hücreler, endotelial öncül hücreler, mezenkimal kök hücreler ilk jenerasyon hücrelerden olup ilk araştırmalar bu hücre tipleriyle yapılmıştır. Bu hücre tipleriyle yapılan klinik öncesi çalışmalarda başarılı sonuçlara rağmen klinik çalışmalarda sonuçlar klinik kullanım açısından tatmin edici olmamıştır. İlk nesil hücreler ile elde edilen başarısız sonuçlar neticesinde araştırmalar daha çok kardiyopoietik hücreler, kardiyak kök hücreler ve pluripotent kök hücreler üzerine yoğunlaşmıştır (Behfar ve ark., 2014).

İskelet kası hücreleri, kalp hasarı sonrası kalp kası yenilenmesi için araştırılan ilk hücre tipidir. İskelet kası hücreleri otolog olarak elde edilip laboratuvar şartlarında çoğaltılıp çok fazla sayıda elde edilebilerek klinik kullanıma hazır hale getirilebilir. Bunun yanında kas hasarına yanıt olarak in-vivo olarak aktive edilebilirler. İskelet kası hücreleri iskemiye karşı oldukça dirençli hücrelerdir (Menasché P, 2008). Küçük ve büyük hayvan modelleri ile yapılan ilk çalışmalar kalp kası oluşumu noktasında başarılı sonuçlar vermiştir (Murry ve ark., 1996). Fakat rodentler ile yapılan çalışmalarda iskelet kası hücrelerinin kalpte mevcut bulunan kardiyomiyositlerle elektrofizyolojik olarak bir bağlantı oluşturmadığı tespit edilmiştir. İlave olarak, nakil sonrasında N-cadherin ve connexin-43 ekspresyon seviyelerinde ciddi bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir (Reinecke ve ark., 2000). Ayrıca iskelet kası hücrelerinin rodentlerde kalp kası hücresine farklılaşma noktasında yetersiz kaldığı tespit edilmiştir (Reinecke ve ark., 2002) fakat koyunlarla yapılan çalışmalarda bu farklılaşma etkisi kısmen de olsa gözlemlenmiştir (Ghostine ve ark., 2002). Klinik öncesi çalışmalarda mevcut çelişkili sonuçlara rağmen AKS ve kalp yetersizliği hastalarında iskelet kası hücreleri ile klinik çalışmalar başlatıldı. Fakat yapılan klinik çalışmalarda görüldü ki otolog iskelet kası hücreleri mevcut kardiyomiyositlerle elektrofizyolojik bir bağlantı kuramadığı için aritmojenik bir potansiyel oluşturmaktaydı ve bu hücrelerin nakledildiği hastalarda ölümcül

ventrikül aritmileri gözleniyordu. Bu yüzden bu hücre tipi ile yapılan bir çok klinik çalışmaya son verildi (Menasché ve ark., 2008 ve Menasché ve ark., 2003).

İskelet kası hücreleri ile kalp kası farklılaşması çalışmalarının başarısız olması neticesinde araştırmalar kök hücreler ile direkt ve/veya indirekt yolla yenilenmenin indüklenmesi üzerine yoğunlaştı. İlgi odağı olan hücreler genellikle tek çekirdekli kemik iliği hücreleri ve onun alt grubu olan hematopoietik kök hücreler ve kemik iliğinden köken alan endotelial öncül hücrelerdi. Bu hücre tipleriyle yapılan klinik öncesi çalışmalar genellikle çelişkili sonuçlar verdi (Cambria ve ark., 2017). Rodentlerle yapılan ilk çalışmalarda kardiyomiyosit farklılaşması gözlemlendiği rapor edildi (Kudo ve ark., 2003 ve Orlic ve ark., 2001) fakat daha sonraki çalışmalarda böyle bir etki gözlemlenmedi (Murry ve ark., 2004). CD34+ hematopoietik kök hücrelerle yapılan bir hayvan çalışmasında kardiyomiyosit farklılaşması izlenmeyip, muhtemelen parakrin etkiler sonucu olduğu düşünülen artmış anjiyojenik aktivite izlendi (Zhang ve ark., 2007). Endotelial öncül hücrelerle yapılan klinik öncesi ve klinik çalışmalarda da genel olarak tutarsız sonuçlar izlendi (Cambria ve ark., 2017). Kemik iliği kökenli tek çekirdekli kök hücreler ile yapılan klinik çalışmaların bazıları kardiyak fonksiyonlarda anlamlı bir düzelme olduğunu gösterirken (Huikuri ve ark., 2008 ve Schächinger ve ark., 2004), bazıları bu hücreler ile nakil uygulamasının herhangi bir yararı olmadığını gösterdi (Perin ve ark., 2012 ve Tendera ve ark., 2009).

Mezenkimal kök hücreler multipotent, plastik yapışkan özelliği olan ve başta yağ dokusu, kondrosit ve osteosit olmak üzere birçok hücre tipine farklılaşma kapasitesi olan hücrelerdir. Bu hücre tipinin kardiyomiyositlere farklılaşma kapasitesi olduğu da bilinmektedir. İnsan mezenkimal kök hücreleri başta kemik iliği olmak üzere sinovyal doku, yağ dokusu, umbilikal kord ve periferik kan örneklerinden izole edilebilir. Mezenkimal kök hücrelerin sitokin sekresyonu ve hücre yüzey antijeni ekspresyon özelliklerinden dolayı immün yanıt düzenleme özellikleri mevcuttur. Mezenkimal kök hücrelerin kardiyovasküler yenilenme sürecindeki etkisi bir çok klinik öncesi ve klinik çalışmada değerlendirilmiştir (Cambria ve ark., 2017). İskemik kalp hastalığı mevcut olan bireylerle yapılan bir

klirik çalışmada otolog veya allojenik transendokardiyal mezenkimal kök hücre nakli güvenli bulunmuştur. Ayrıca tedavinin hastaların fonksiyonel kapasitesi, yaşam kalitesi ve ventrikül yeniden şekillenmesi üzerine olumlu katkıları olmuştur (Hare ve ark., 2012). Mezenkimal kök hücreler her ne kadar klinik kullanım açısından mit vaat etse de olumlu sonuçların farklı mezenkimal kök hücre tipleri, dozları, tedavi verilme yolları, hasta alt grupları ile karşılaştırmalı olarak teyit edilmesi gerekmektedir.

Kalp dokusunda yer alan kardiyak kök hücreler ilk kez 2003 yılında keşfedilmiştir (Beltrami ve ark., 2003). Kalp kasında blneabilen ve kendini yenileyebilen hücrelerin bulunması ve bu hücrelerin kas dokusuna farklılaşarak yenilenme sürecine katkıda bulunduğunun tespit edilmesi, kalp dokusu hücrelerinin sanılanın aksine bölünemeyen hücreler olduğu düşüncesini tersine çevirmiştir. Kardiyak kök hücrelerin hasarlı kalp dokusunu tamir edebilme kapasitesi klinik öncesi çalışmalarda denenmiştir (Tang ve ark., 2010). Daha sonra bu hücreler farklı klinik çalışmalarda farklı sonlanım noktalarıyla test edilmiştir ve kısmen de olsa olumlu sonuçlar alınmıştır (Bolli ve ark., 2011 ve Makkar ve ark., 2012). Fakat kardiyak kök hücrelerin klinik kullanıma girebilmesi için daha fazla ve daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır (ztrk ve Elçin, 2018).

Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler sınırsız proliferasyon kapasitesi ve her üç embriyonik tabakadaki hücrelere dönüşebilme kapasitesi olan kök hücre tipleridir. İnsan embriyonik kök hücreleri preimplantasyon aşamasındaki blastosistin i tabakasındaki hücrelerinden elde edilir. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ise somatik hücrelerin genetik olarak programlanması ile elde edilir. Bu iki kök hücre tipi de başarılı bir şekilde kardiyomiyosit, endotel hücresi ve vasküler düz kas hücrelerine farklılaşabilen kardiyovasküler öncül hücrelere dönüştürülebilir. Her ne kadar ciddi bir potansiyelleri olsa da, embriyonik kök hücrelerin klinik kullanımı etik ve yasal açıdan kısıtlılıklara sahiptir (Romagnuolo ve Laflamme, 2017). Fakat embriyonik kök hücrelerden üretilen kardiyak öncül hücrelerin doku mühendisliği uygulaması ile naklinin klinik çalışması başlamış olup ilk sonuçlar mit vaat etmektedir (Menasché ve ark., 2015).

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ise KVH’ da henüz klinik çalışmalarda test edilmemiştir (Romagnuolo ve Laflamme, 2017).

1.2.2. Doku ve Damar Mühendisliği Uygulamaları

Doku mühendisliğinin amacı, hasarlanmış veya fonksiyonunu kaybetmiş doku ve organların mevcut geometrisine uygun şekilde yeni doku iskeleleri üreterek vücut fizyolojisine uyumlu ve işlevsel yapay doku oluşturmaktır. Kardiyovasküler doku mühendisliği çalışmaları ise büyüme kapasitesine sahip, immünojenitesi olmayan ve doku ve organ işlevi ile benzer fonksiyon gören biyolojik yapıların oluşturulmasını hedeflemektedir. Başarılı bir doku mühendisliği uygulaması temel olarak üç bileşenden oluşur: Doku büyümesi için uygun üç boyutlu geometriyi sağlayan bir doku iskelesi, iskele üzerine ekilmiş hücre hattı, doku gelişimini yönlendiren ve yeniden şekillenmeye imkan veren biyolojik ve mekanik sinyaller. Kardiyovasküler doku mühendisliği çalışmaları genel olarak kalp damar hastalıkları, iskemik kalp hastalıkları, kalp kapağı hastalıkları ve kalp yetersizliği üzerine odaklanmıştır (Dogan ve ark., 2017; Erdal ve ark., 2017; Parmaksız ve ark., 2016 ve Elçin YM, 2004).

Damar doku mühendisliği son yıllarda kardiyovasküler yenileyici tıbbın önemli araştırma dallarından birisi haline gelmiştir ve yapılan çalışmalar gelecek için umut verici sonuçlar sunmaktadır. Damar doku mühendisliği genel olarak hücre içi, hücre dışı ve in situ olarak uygulanabilmektedir. Damar greftinin sahip olması gereken bazı özellikler vardır. Damar greftinin biyokompedansı yüksek olmalı, enfeksiyona karşı dirençli olmalı, toksik, trombojenik ve immünojenik olmamalıdır. Ayrıca mekanik olarak doğal damarlarla anastomoza uygun olmalı, anastomoz sonrasındaki basınca uyum sağlayabilmelidir. Damar doku mühendisliğinde farklılaşmış hayvan endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve kök hücreler, hücre kaynağı olarak kullanılabilir (Deniz ve ark., 2015 ve Elçin ve Elçin, 2006).

Mevcut doku mühendisliği uygulamalarına ilave olarak ekstrasellüler matriks kaynaklı kardiyak yenileyici tıp uygulamaları klinik kullanım için potansiyel teşkil etmektedir (Dogan ve ark., 2016). Mikroçipler üzerinde geliştirilen organ ve doku mühendisliği uygulamaları ve 3 boyutlu biyoyazıcı teknolojileri de halihazırda klinik kullanım açısından araştırılmakta olup, bu konudaki çalışmalar gelecek için umut vaad etmektedir (Elçin YM, 2017).

1.2.3. Gen Tedavisi Uygulamaları

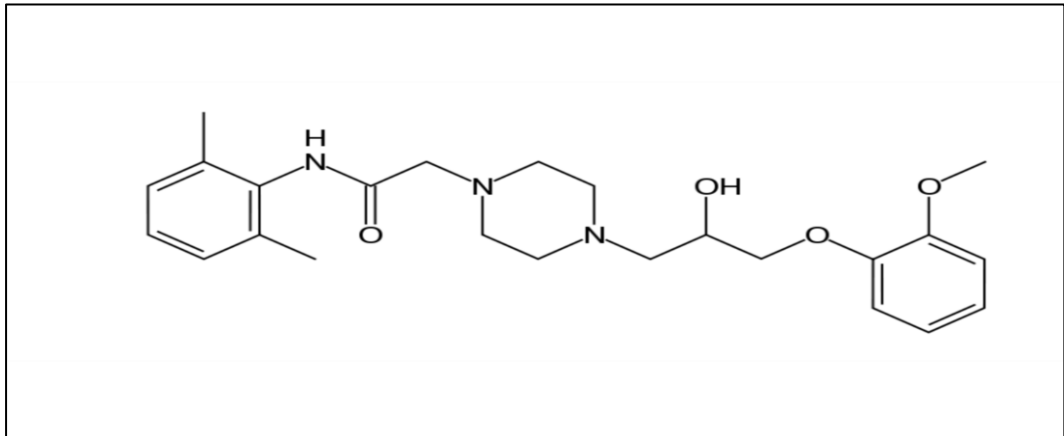
Kardiyovasküler hastalıklarda gen tedavisi uygulamaları, hastalığın tedavi edilmesi veya önlenmesi amacıyla doku içerisine bir vektör aracılığıyla rekombinant DNA molekülü verilmesi olarak tanımlanabilir. Kalp hastalıklarının patofizyolojisinde yer alan genetik eksiklikler ve/veya bozuklukların keşfedilmesi, bu bozuklukların yerine konularak veya düzeltilerek tedavi edilebileceği düşüncesini doğurmuştur. Gen tedavileri genel olarak KAH' da, kalp yetersizliğinde, aritmilerde araştırılmıştır (Wolfram ve Donahue, 2013).

KAH' da gen tedavisi uygulamaları sıklıkla kas dokusunun beslenmesini arttırmak amacıyla anjiyogenezis olarak adlandırılan yeniden damarlanma sürecine odaklanmıştır. Bu bağlamda anjiyogenezisten sorumlu olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi moleküllerin gen ekspresyonlarının artırılması ya da transferi araştırmaların ilgi odağı olmuştur. Özellikle VEGF gen transferi bir çok klinik öncesi ve klinik çalışmada araştırılmıştır. Fakat klinik çalışmaların sonuçları klinik kullanım açısından henüz tatmin edici seviyeye gelmemiştir (Rincon ve ark., 2015).

1.3. Ranolazin

1.3.1. Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması

Ranolazin ağız yoluyla kullanılan piperazin türevi olan bir ilaçtır. 2006 yılında ilk kez ABD’ de stabil KAH tedavisinde kullanım için onay almış olup, hem ABD hem de Avrupa kardiyoloji cemiyetlerinin kılavuzlarında tedavi için önerilmektedir (Özdemir M, 2016). Kimyasal formülü N-(2,6-dimetilfenil)-2-[4-[2-hidroksi-3-(2-metoksifenoksi)-propil]-piperazin-1-il] asetamid dihidroklorid (C₂₄H₃₃N₃O₄) olan ilacın molekül ağırlığı 427,537 g/mol’ dür. Kana emildikten sonra yaklaşık olarak %65’i plazma proteinlerine özellikle de α -1 asit glikoproteinine bağlanarak taşınır. Molekülün biyotransformasyonu ise çoğunlukla sitokrom P450 (CYP) 3A4 yoluyla üzerinden sağlanmaktadır (Jerling ve Abdallah, 2005). İlacın farmakokinetiği hayvan modeli çalışmalarında araştırılmıştır, doku ve plazma konsantrasyonlarının dişi ve erkek sıçanlarda farklı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ilacın yarılanma ömrünün de cinsiyete göre değiştiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2003). Ranolazin, insanlarda maksimum plazma konsantrasyon seviyesine genellikle 4-6 saat aralığında ulaşmaktadır ve 3 gün boyunca günde iki kez kullanıldığı zaman kararlı duruma geçmektedir (Chaitman ve ark., 2004).



Şekil 1.1. Ranolazin molekülünün kimyasal yapısı.

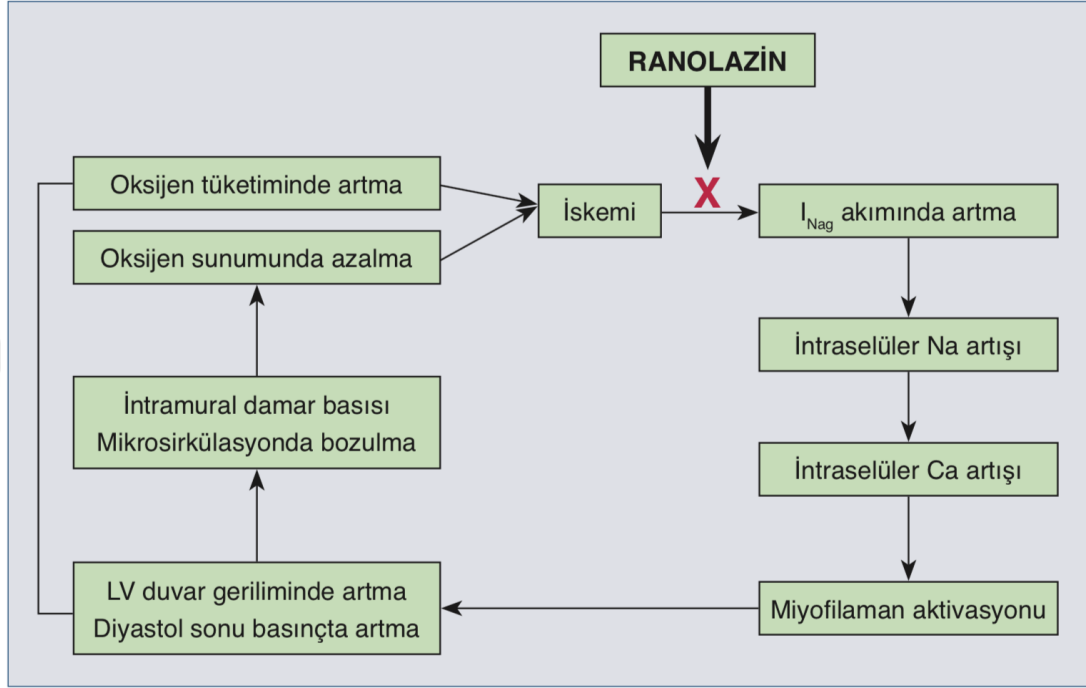
Ranolazin etki mekanizması itibariyle klasik antianginal ilaçlardan ayrılmaktadır. Klasik antianginal ilaçlar günlük kardiyoloji pratiğinde de sıklıkla kullanılan beta reseptör bloke edici ajanlar, nitratlar ve kalsiyum kanal blokerleridir. Bu ilaçların etki mekanizmaları birbirinden farklı olsa da temelde kalp kasında oksijen tüketimini azaltarak ve/veya vazodilatasyon yaparak kalp kasında gerilimi azaltıp kanlanmayı artırırlar. Bu etkileri oluştururken kalp hızı, kalp kası kasılması ve kan basıncı üzerinde değişikliklere sebep olurlar (Montalescot ve ark., 2013). Ranolazin ise etki mekanizması itibariyle klasik antianginal ilaçlardan ayrılmaktadır.

Tarihsel açıdan bakıldığında zaman ranolazin ilk başta ‘metabolik modulator’ olarak değerlendirildi. Fakat bu görüş daha sonradan yapılan çalışmalarla popülerliğini yitirdi. Kalp kasında enerji ihtiyacı üç yolla karşılanabilir: Anaerobik glikoliz, yağ asidi oksidasyonu ve glikoz oksidasyonu. Fizyolojik koşullarda baskın olan metabolik süreç yağ asidi oksidasyonudur. Anaerobik glikoliz ise iskemi durumunda etkinleşen bir süreçtir ve anaerobik glikolizin kalp kası hücreleri üzerinde olumsuz etkileri vardır. Glikoz oksidasyonu ise yağ asidi oksidasyonuna göre daha oksijen etkin bir süreçtir. Kalp kasında iskemi varlığında enerji üretim mekanizmasının yağ asidi oksidasyonundan glikoz oksidasyonu sürecine yönlendirilmesinin bir avantaj olabileceği düşünülmüştür ve ranolazinin etki mekanizması ilk başlarda bu şekilde açıklanmıştır. Yani ranolazin molekülü kalp kasında iskemi olduğunda yağ asitlerinin beta oksidasyonunu engelleyerek kalp kasının enerji üretimini glikoz oksidasyonu yönüne kaydırmakta ve bu sayede daha fazla oksijen etkin bir enerji üretim sürecine geçerek hücreleri iskemiden korumaktadır. Bu sayede kalp kasında daha az oksijenle daha fazla iş üretilir, kalp kasına zararlı olabilecek yağ asidi metabolit üretimi azalır, anaerobik glikolizin son ürünü olan pirüvik asidin trikarboksilik asit döngüsüne girişi artar, laktik asit üretimi azalır ve kalp laktik asit birikiminin olumsuz sonuçlarından korunmuş olur. Ranolazinin bu metabolik değişime hangi mekanizmalar üzerinden yol açtığı net değildir fakat ranolazinin yağ asidi beta oksidasyon sürecini inhibe etmesinin dolaylı olarak pirüvat dehidrojenaz enzimini aktive ettiği ve bu durumun da glikoz oksidasyonunu arttırdığı düşünülmektedir (Anderson ve Nawarskas, 2005 ve Tafreshi ve Fisher, 2006).

Ranolazinin mevcut metabolik etkileri terapötik aralığın çok üzerindeki (10 μ M) ve ranolazine fayda gösterilmiş klinik çalışmalardan çok daha yüksek seviyedeki ilaç düzeylerinde ortaya çıkmaktadır. Daha sonradan yapılan çalışmalarda, ranolazinin daha düşük konsantrasyon seviyelerinde (yaklaşık 6 μ M) geç sodyum akımını selektif ve kuvvetli olarak bloke ettiği gösterilmiştir (Makielski ve Valdivia, 2006). Bu durum da ranolazinin antianginal etkisinin asıl mekanizmasının geç sodyum akım blokajı olabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır. Bununla beraber, yapılan bazı hayvan çalışmalarında yağ asidi oksidasyonu inhibisyonunun iskemik korunmada asıl mekanizma olmadığı ortaya çıkarılmıştır (Wang ve ark., 2007).

Normal koşullarda kalp kası hücresinde iki adet sodyum akımı bulunur. İlki hızlı sodyum akımı olup aksiyon potansiyelinin hızlı çıkış fazından sorumludur. Aksiyon potansiyelinin plato fazında kaydedilen ikinci bir sodyum akımı daha vardır ve bu da geç sodyum akımı olarak adlandırılmaktadır. Fizyolojik koşullarda toplam sodyum akımının çok az kısmını geç sodyum akımı oluşturur. Fakat hipoksi, kalp yetersizliği, iskemi gibi durumlarda geç sodyum akımı artar. Mekanizması net olarak bilinmemekle birlikte laboratuvar koşullarında hipoksi mevcudiyetinde geç sodyum akımı 2-4 kat kadar artar (Belardinelli ve ark., 2006). Bu durumda hücre içinde sodyum miktarı artarken, bu süreç sodyum/kalsiyum değiştirici kanallarını aktive ederek sodyumu hücre dışına çıkarmaya çalışır ve hücre içerisinde kalsiyum birikimine neden olur. Kalp kası hücresinde hücre içi kalsiyum düzeyinin artması ile diyastolde miyofilaman aktivasyonu olur ve diyastolik duvar gerilimi ve diyastol sonu basıncı yükselir, intramural damarlar baskı altında kalır ve koroner damar akımı bozulur. Tüm bu süreçler hem kalp kası hücrelerinde oksijen talebinin artmasına hem de azalmış diyastolik akıma bağlı olarak oksijen sunumunun azalmasına sebep olur ve iskemi daha da şiddetlenir (Belardinelli ve ark., 2006). Ranolazin geç sodyum akımını bloke ederek kalp kası hücresinde sodyum ve kalsiyum birikimini engeller ve aşırı kalsiyum birikiminin sebep olduğu ve anginayı arttıran diyastolik gerilim artışını azaltır. Bunun sonucu olarak koroner kan akımı düzelir ve angina iyileşir (Stone ve ark., 2010 ve Özdemir M, 2016) (Şekil 1.2). Nitekim stabil koroner arter hastaları ile yapılan klinik çalışmalarda ranolazin tedavisi sonrası bu hastalarda

miyokart perfüzyon görüntülerindeki defekt boyutunun ve sol ventriküldeki dissenkroninin azaldığı gösterilmiştir (Venkataraman ve ark., 2009 ve Venkataraman ve ark., 2012).



Şekil 1.2. Ranolazinin antianjinal etki mekanizması (Özdemir M, 2016).

Ranolazin tarafından bloke edilen geç sodyum akımının fizyolojik koşullarda toplam sodyum akımının çok az bir kısmını oluşturduğu dikkate alınacak olursa, ilacın sadece iskemi durumuna özel bir etki mekanizması olduğu söylenebilir. Nitekim sağlıklı ve iskemiye maruz kalmamış miyositlerde terapötik plazma seviyelerinde ranolazinin kardiyovasküler performans üzerine dikkate değer bir etkisi yoktur (Chaitman BR, 2006). Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada ranolazinin vasküler düz kaslardaki ve sempatik sinir uçlarındaki voltaj kapılı sodyum kanallarını ve alfa-1 adrenerjik reseptörleri bloke ettiği ve bu vasküler etkilerin de ilacın antianginal etkinliğine katkı sağlayabileceği gösterilmiştir (Virsolvy ve ark., 2015).

1.3.2. Klinik Öncesi ve Klinik Çalışmalar

Ranolazinin kararlı angina hastalarında değerlendirildiği ilk klinik çalışmalar 1990' lı yılların başında yapılmıştır ve hasta sayısının az olması ve düşük doz kullanılması nedeniyle net bir klinik etki gözlemlenememiştir (Jain ve ark., 1990 ve Thadani ve ark., 1994). Ranolazin ile yapılan ilk randomize klinik çalışmada da hızlı salımlı tablet kullanılması neticesinde kesin bir klinik sonuç alınamamıştır (Pepine ve ark., 1999). Daha sonraki dönemlerde, yavaş salımlı tabletlerin geliştirilmesi neticesinde yapılan çalışmalardan ilki MARISA çalışmasıdır. MARISA çalışmasında, kronik stabil anginası olan 191 hastada tüm antianginal tedaviler kesilip ranolazin tedavisi ile plasebo karşılaştırılmıştır ve ranolazin grubunda egzersiz süresinde, angina ve 1 mm ST depresyonu gelişmesine kadar olan egzersiz süresinde plasebo tedaviye göre belirgin bir artış izlenmiştir. Bu çalışmada 2x500 mg, 2x1000 mg ve 2x1500 mg dozları kullanılmış ve doz arttıkça angina kadar olan egzersiz süresinde de paralel bir artış izlenmiştir. Fakat 2x1500 mg dozunda etkinlik çok fazla artmamasına rağmen yan etki insidansında artış görülmüştür (Chaitman ve ark., 2004a). Ranolazin ile yapılan ikinci çalışma olan CARISA çalışmasında tedavi altında olup anginası devam eden hastalar plasebo veya ranolazin gruplarına randomize edilmiştir ve 12 haftalık takiplerde ranolazin alan grupta plaseboya göre sonlanım noktalarında önemli iyileşmeler gözlenmiştir (Chaitman ve ark., 2004b). ERICA çalışmasında ise maksimum amlodipin dozu kullanmasına rağmen devam eden anginası olan hastalar ranolazin ve plasebo gruplarına randomize edilmiştir. Çalışma sonunda, ranolazin kullanan grupta haftalık angina sıklığı ve nitrogliserin kullanım sıklığı plaseboya göre anlamlı olarak azalmıştır (Stone ve ark., 2006). Bu üç çalışma neticesinde görülmüştür ki günde iki defa 500, 750 veya 1000 mg ranolazin, kronik kararlı anginası olan hastalarda bradikardi, hipotansiyon gibi hemodinamik yan etkilere yol açmadan güvenle tercih edilebilir.

Yakın zamanda yayımlanan TERISA çalışmasında DM ve kronik kararlı anginası olan hastalar plasebo ve ranolazin gruplarına randomize edilmiştir. Ranolazin verilen grupta primer sonlanım noktalarında anlamlı azalma görülmüştür.

Çalışmanın alt grup analizlerinde ise bu etkilerin HbA1c yüksek olan grupta daha belirgin olduğu tespit edilmiştir (Kosiborod ve ark., 2013). Ranolazin kullanımının etkinliği AKS hastalarında MERLIN-TIMI 36 çalışmasında test edilmiştir ve ranolazin verilen hasta grubunda iskemi ataklarında azalma tespit edilmiştir. Bu çalışma neticesinde ayrıca görülmüştür ki ranolazin kullanan grupta ventriküler taşikardi, supraventriküler taşikardi ve atriyal fibrilasyon sıklığında azalma mevcuttur ve bu çalışma neticesinde ilacın antiaritmik etkilerinin olabileceği düşünülmüştür (Morrow ve ark., 2007). MERLIN-TIMI 36 çalışmasının alt grup analizlerinde, ranolazin tedavisinin HbA1c seviyelerinde azalma sağladığı tespit edilmiştir (Morrow ve ark., 2009). MERLIN-TIMI 36 çalışmasından elde edilen sonuçlar neticesinde ilacın antianginal etkinliğinin yanısıra antidiyabetik ve antiaritmik etkilerinin olabileceği düşünülmeye başlanmıştır. Her ne kadar ilacın onaylanmış bir antidiyabetik ve antiaritmik kullanımı mevcut olmasa da, yapılan klinik çalışmalar ve yayımlanan olgu serilerinde ilacın antiaritmik özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (Pulford ve Kluger, 2016). Benzer şekilde, ilacın antihiperlipidemik ve olumlu metabolik etkileri yapılan klinik çalışmalar ve yayımlanan olgu serilerinde gösterilmiştir (Gilbert ve ark., 2018).

Klinik çalışmaların yanında, ilacın etki mekanizmalarını açıklamak ve olası diğer etkilerinin araştırılması amacıyla bir çok klinik öncesi çalışma yapılmıştır. İn-vivo olarak yapılan bir çalışmada, ranolazinin rat aortalarında vazodilatasyona yol açtığı ve bu etkinin endotel mevcudiyetinden bağımsız olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (Parades-Carbajal ve ark., 2013). Nieminen ve arkadaşları tarafından yapılan hayvan modeli çalışmasında, ranolazinin vazodilatasyon etkisinin alfa-1 reseptör blokajı üzerinden olduğu gösterilmiştir (Nieminen ve ark., 2011). Anti-diyabetik etkinliği araştırmak için yapılan bir in-vivo çalışmada, diyabetik farelerde ranolazinin pankreastaki beta hücrelerinin canlılıklarını korumaya yardımcı olduğu, apoptozisi inhibe ettiği ve insülin sekresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Yazarlar bu çalışmada, ranolazine bağlı anti-diyabetik etkinin potasyum kanal inhibisyonu üzerinden olabileceğini düşünmüşlerdir (Ning ve ark., 2011). Ranolazin molekülünün santral sinir sistemi hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir in-vitro çalışmada ranolazinin astrosit hücrelerinde canlılığı arttırdığı,

nekrozu ve apoptozisi önlediği, inflamatuvar süreci inhibe ettiği ve anti-inflamatuvar ve anti-oksidan proteinlerin salımını arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar ışığında çalışmanın yazarları ranolazinin santral sinir sisteminde nöroprotektif bir ajan olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (Aldasoro ve ark., 2016). Ranolazinin bazı genetik epilepsi türleri ve ailesel hemiplejik migren olgularında faydalı olabileceği yapılan klinik öncesi çalışmalarda gösterilmiştir (Anderson ve ark., 2014 ve Kahlig ve ark., 2010). Bu klinik öncesi çalışmalar göstermektedir ki ranolazin molekülünün kalp kası hücresinden farklı olarak başka hücre tiplerinde de farklı hastalık modellerinde değişik mekanizmalar üzerinden olumlu etkisi olabilir.

1.4. Endotel Hücresi

1.4.1. Endotel Hücre Fizyolojisi, Fonksiyonları ve Disfonksiyonu

Endotel hücreleri, mezodermden köken alan, morfolojik açıdan yassı epitel hücre karakterinde olan, fonksiyon olarak bağ dokusu hücrelerine benzeyen ve damar ve lenf bezlerinin lümenal yüzeylerini kapsayan oluşumlardır. Endotel hücresi 10-15 µm genişliğinde ve 20-25 mm uzunluğundadır. Endotel hücreleri yetişkin bir bireyde 1-7 m² alan kaplamaktadır. Hücre, lümene doğru yassı bir biçimde duran kabarık bir çekirdeğe sahiptir. Hücre içeriği, gelişmiş bir endoplazmik retikulum, mitokondri, ribozom, taşıyıcı veziküller, von Willebrand faktörü (faktör 7) içeren Weibel-Palade cisimciklerinden meydana gelmektedir (Yaylalı ve Küçükaslan, 2011). Hücre yüzeyi 55 Å kalınlığında olup glikoproteinler, glikozaminoglikanlar, proteoglikandan oluşan negatif yüklü glikokaliks tabakası ile örtülmüştür. Bu yapının içerisinde pıhtılaşmanın baskılanmasında rol alan heparan sülfat ve dermatan sülfat yer almaktadır. Bununla beraber glikokaliks tabakası hücrel ve makromoleküler trafiğin düzenlenmesinde bariyer görevi görmektedir (Gotlieb A, 1991 ve Mertens ve ark., 1992).

Endotel hücrelerinin vücutta önemli fizyolojik fonksiyonları mevcuttur. Endotel hücreleri kan dolaşımı ve damar duvarı arasında seçici geçirgen bir bariyer oluştururlar. Kan dolaşımında pıhtılaşmayı engelleyici bir yüzey vazifesi görürler. Çeşitli vazoaktif maddeler salgılayarak damar tonusunu düzenlerler. Damar düz kas hücrelerinde çoğalma ve göç etme aşamalarını düzenlerler. Pıhtılaşma süreci ve pıhtı eritme sürecindeki mekanizmaları düzenlerler. Yangısal ve bağışıklık olaylarında rolleri vardır ve lipid oksidasyonu gibi olaylarda metabolik aktiviteleri mevcuttur. Endotel hücrelerinin yeniden damarlanma olarak adlandırılan anjiyogenez sürecinde de önemli rolü mevcuttur. Endotel hücresi bu fonksiyonlarını vazokonstriktör, vazodilatör, antitrombotik, büyüme modülatörü, büyüme inhibitörü ajanlar, yangısal süreçte rol alan adhezyon molekülleri ve antijenler vasıtasıyla yerine getirir (Torun ve Bayram, 2004).

Endotel hücresi kaygan yapıda, parlak yüzeyli ve vazodilatasyona eğilimli bir oluşumdur. Ancak endotel hücrelerinin fonksiyonlarında görev alan ve endotelden sentezlenerek salınan moleküllerin sentezlenmesi ve metabolize edilmesi sürecinde bir bozukluk meydana geldiği zaman endotel disfonksiyonu gerçekleşir. Genel olarak endotel disfonksiyonu nitrik oksit üretimindeki bozulma, endotelin ve anjiyotensin gibi önemli vazokonstriktif ve vazodilatatif faktörlerin düzenlenmesindeki bozukluğu ifade eder. Endotel disfonksiyonu birçok kronik hastalığın ilerleme sürecinde, yangısal süreç oluşumunda ve seyrinde, ateroskleroz ve trombozis gibi patolojik süreçlerde aktif rol oynar. Endotel disfonksiyonu hipertansiyon, DM, obezite, KAH, kalp yetersizliği, hiperkolesterolemi, sigara içiciliği, hiperhomosisteinemi ve genetik yatkınlıkla yakın ilişkilidir (Davignon ve Ganz, 2004 ve Torun ve Bayram, 2004).

1.4.2. Endotel Hücresi Kültürü

Canlı bir organizmadaki bir veya birden fazla hücre grubunun dokuda bulunduğu yerden ayrıştırılarak laboratuvar ortamında yaşatılması ve çoğaltılması işlemine hücre kültürü denir. Hücreleri dokudan ayrıştırma, mekanik ya da enzimatik yöntemlerle olur. Hücre kültüründe incelenecek hücre ve/veya maddelerin

etkilenebilecekleri tüm olasılıklardan bağımsız olarak incelenebilme olanağının bulunması, ekonomik ve nispeten daha kolay olması, çevre şartlarını kontrol etme imkanının olması hücre kültürü çalışmalarının avantajlarından. Ayrıca hücre kültürü aşısı, monoklonal antikor, enzim ve hormon üretimi; DNA ve RNA araştırmaları; protein sentezi ve metabolizma araştırmaları; ilaç etkilerinin ve sinyal mekanizmalarının incelenmesinde de kullanılabilir (Can ve ark., 1997).

Endotel hücrelerinin kültür ortamında yaşayabilmeleri, çoğalabilmeleri ve yaşamsal fonksiyonlarını koruyabilmeleri için yaşayacakları ortamın şartları elverişli olmalıdır ve bu şartlar in-vivo ortamlarına yakın olmalıdır. Bu yüzden, kültüre edilen hücrelerin doğal ortamlarındaki gibi beslenmesini sağlayacak kültür medyumunu, fetal sığır serumu, büyüme faktörleri, hücrelerin kültür kabının yüzeyine yapışabilmesini sağlayan jelatin, kollajen veya fibronektin, yeterince çoğaldıklarında ise onların pasajlanmasına olanak sağlayacak tripsin ve EDTA ve olası enfeksiyonu engellemek için antibiyotikler gereklidir (Peters ve ark., 2005).

Vücutta görev aldığı birçok fonksiyonun tespit edilmesiyle gün geçtikçe daha da önem kazanan endotel hücrelerinin kültürü aslında 1970' li yıllara kadar mümkün değildi. Jaffe ve çalışma arkadaşları tarafından 1973 yılında yapılan ve geliştirilen araştırmalar neticesinde, endotel hücreleri ile in-vitro şartlarda çalışmak mümkün hale gelmiştir (Jaffe ve ark., 1973). Her ne kadar ilk yapılan çalışmalar insan umbilikal veni endotel hücreleri (İUEH) üzerine olsa da; endotel hücreleri koroner arter, aorta, beyin, akciğer ve karaciğerde dahil olmak üzere organizmanın birçok yerinde mevcut bulunan kan damarlarından elde edilebilir. İUEH kolay elde edilebilmesi, çoğaltılabilmesi ve in-vivo endotel tabakası için iyi bir model olması sebebiyle en çok çalışılan endotel hücre tipi olma özelliğini taşımaktadır (Yazır ve Dalçık, 2012).

1.4.3. Endotel Hücresi ve Anjiyogenez

Anjiyogenez mevcut kapillerden yeni kapiller damar oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Embriyonik gelişim sürecinden tümör büyümesine kadar fizyolojik ve patolojik olan birçok süreçte rol oynar ve genelde hipoksiye uyumsal bir cevap olarak meydana gelir. Anjiyogenez, hücre proliferasyonu ve hipertrofi süresince meydana gelen oksijen desteğini sağlamakta önemli bir role sahiptir. Anjiyogenez iki farklı mekanizma ile meydana gelir: Aktive olmuş endotel hücresinin kapiller damarın lümenal kısmından bölünerek iki yeni kapiller oluşturması olan kapiller bölünme ve endotel hücresinin etrafındaki matriks dokusuna doğru endotel zinciri oluşturup tomurcuklanarak yeni damarlar meydana getirmesi olan ve diğer mekanizmaya göre daha az görülen ve daha kompleks olan anjiyojenik tomurcuklanma. Anjiyogenez sürecinde endotel hücreleri ve çevrelerindeki ekstrasellüler çevrede kompleks bir etkileşim mevcuttur ve bu süreçte VEGF, FGF, anjiyopoetin gibi bir çok büyüme faktörü ve molekül rol oynamaktadır (Ucuzian ve Greisler, 2007; Elçin ve ark., 1996 ve Demirdögen ve ark., 2010).

Anjiyogenez çalışmalarının periferik ve koroner damar hastalıklarında, onkolojide, hematolojide, yara iyileşmesinde, dermatoloji ve oftalmolojide birçok klinik karşılığı bulunmaktadır. Anjiyojenik sürecin uyarılmasının, beslenemeyen iskemik dokularda faydalı terapötik etkilerinin olabileceği yapılan hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (Ucuzian ve Greisler, 2007 ve Elçin ve ark., 2001). Bu bağlamda, terapötik anjiyogenez beslenemeyen koroner damarların oksijenlenmesinin sağlanmasında alternatif bir tedavi yöntemi olarak düşünülmüştür. Bu konudaki çalışmalar daha çok anjiyojenik protein, gen veya hücre uygulamalarına odaklanmakla birlikte bu konuyla alakalı yapılan klinik çalışmaların başlangıcı yaklaşık yirmi yıl öncesine dayanmaktadır. Terapotik anjiyogenez ve yeni damar gelişimiyle ilgili mekanizmalar her ne kadar tam olarak aydınlatılmış olsa da, faz 2 ve 3 insan klinik çalışmalarında net bir klinik fayda gösterilememiştir (Ylä-Herttua ve Baker, 2017).

1.5. Tezin Amacı

Ranolazin kronik stabil KAH tedavisinde her ne kadar 2006 yılından beri kullanılmakta olsa da hücresele seviyedeki etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Birçok klinik ve klinik öncesi çalışmada ise antianginal etkinliğinin yanında molekülün antidiyabetik ve antiaritmik etkilerinin olabileceği gösterilmiştir. Molekülün endotel hücreleri üzerindeki etkisi ve anjiyogeneze sürecine olan katkısı ile ilgili literatürde herhangi bir bilgi mevcut değildir. Tez çalışması kapsamında, ranolazinin hücresele seviyedeki etkilerinin İKAEH üzerinde in-vitro koşullarda araştırılması amaçlanmıştır. Molekülün İKAEH üzerindeki etkisinin normoksik şartlarda farklı dozlar uygulanarak test edilmesi amaçlanmıştır.

1.6. Tezin Hedefleri

1. Ranolazinin İKAEH üzerindeki etkisinin farklı doz uygulamaları ile test edilmesi ve eğer varsa toksik dozun belirlenmesi
2. Ranolazinin İKAEH üzerinde anjiyogeneze sürecine olan etkisinin farklı dozlar ve farklı analiz yöntemleri kullanılarak test edilmesi
3. Ranolazin molekülünün revaskülarize edilemeyen KAH olan bireylerde terapötik anjiyogeneze amacıyla kullanılabilirliğinin öngörülmesi
4. Tez çalışmasından elde edilmesi hedeflenen bilgilerin ileri çalışmalar açısından değerlendirilmesi

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çizelge 2.1. Tez Çalışmasının İş-Zaman Çizelgesi.

İş Paketi No	İş Paketinin Tanımı	İş Paketinin Zamanı
1	Ticari açıdan mevcut olan İKAEH hücre hattı satın alındı. Bu hücre hattı çözülerek in-vitro kültür ortamına adapte olması sağlandı ve hücreler in-vitro kültür ortamında çoğaltıldı.	1-5. aylar
2	Eş zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak hücrelerin önceden belirlenmiş ranolazin dozlarındaki proliferasyon ve sitotoksisite yanıtı belirlendi.	5-7. aylar
3	Matrijel tüp oluşumu yöntemi ile İKAEH' nin önceden belirlenmiş ranolazin dozlarındaki tüp oluşturma kapasitesi belirlendi.	7-8. aylar
4	Enzim Bağlı İmmünoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile İKAEH' nin önceden belirlenmiş ranolazin dozlarındaki VEGF salım miktarları belirlendi.	8-10. aylar
5	Elde edilen bulgular farklı istatistik analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirildi.	10-12. aylar

2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Solüsyonlar

2.1.1. İnsan Koroner Arter Endotel Hücre Hattı

Tez çalışması için ticari olarak mevcut bulunan İKAEH hattı satın alındı. İKAEH hattı olarak Lonza CC-2585 temin edildi.

2.1.2. Hücre Kültürü ve Pasajlanması Aşamasında Kullanılan Malzemeler

- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (pH:7,4): Hücrelerin yıkanması amacıyla kullanıldı.
- Trypsin (Sigma-Aldrich Chemical Company, St. Louis, Missouri, ABD): Hücreleri yapıştıkları yüzeyden ayırmak ve pasajlama amacıyla kullanıldı.

- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma-Aldrich Chemical Company, St. Louis, Missouri, ABD): Hücreleri yapıştıkları yüzeyden ayırmak ve pasajlamak için kullanıldı.
- Steril hücre kültürü kapları (Corning Incorporated, Corning, New York, ABD): Hücrelerin ekim işlemi ve çoğaltılması sürecinde kullanıldı.
- Falkon tüp (Corning Incorporated, Corning, New York, ABD): Hücrelerin ekim işlemi ve pasajlanması sürecinde kullanıldı.
- EBM (Endothelial basal medium: EndoGo™ XF; Biological Industries, Cromwell, Connecticut, ABD): İnsan KAEH kültürünün çoğaltılması amacıyla kullanıldı.
- Heparin (Lonza, Allendale, New Jersey, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- Fetal Sığır Serumu (FBS, Sigma-Aldrich Chemical Company, St. Louis, Missouri, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- Askorbik asit (Lonza, Allendale, New Jersey, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- rhEGF (recombinant human Epidermal Growth Factor, Lonza, Allendale, New Jersey, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- Long R3-IGF-1 (Human Recombinant Insulin-like Growth Factor, Lonza, Allendale, New Jersey, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- Hidrokortizon (Lonza, Allendale, New Jersey, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.

- rhFGF (recombinant human Fibroblast Growth Factor, Lonza, Allendale, New Jersey, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.

- VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, Lonza, Allendale, New Jersey, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.

2.1.3. Hücre Kültürü ve Pasajlanması Aşamasında Kullanılan Cihazlar

- Laminer akışlı steril kabin
- CO₂ inkübatörü (Heracell 150i®, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD)
- Işık mikroskobu (Leica, Buffalo Grove, Illinois, ABD)
- Santrifüj cihazı (Beckman Coulter Allegra® X-15R, Atlanta, Georgia, ABD)

2.1.4. Ranolazin Solüsyonun Hazırlanması

- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)
- Ranolazin (Tocris Bioscience, Bristol, İngiltere)
- Hassas Terazî
- Steril enjektör filtresi

2.1.5. Proliferasyon ve Sitotoksisite Analizi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- xCELLigence RTCA SP (ACEA Biosciences, San Diego, California, ABD)
- Santrifüj cihazı (Beckman Coulter Allegra® X-15R, Atlanta, Georgia, ABD)
- Laminer akışlı steril kabin
- Invert mikroskop (ZEISS Primovert, Dublin, California, ABD)
- E-plate 96 (ACEA, ABD)
- CO2 inkübatörü (Heracell 150i®, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD)
- Hücre sayım cihazı (Bio-Rad TC-20TM, Hercules, California, ABD)
- EBM (Endothelial basal medium: EndoGo™ XF; Biological Industries, Cromwell, Connecticut, ABD)

2.1.6. Matrijel Analizi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- Matrijel bazal membran matriksi (Corning Incorporated, Corning, New York, ABD)
- -20 °C buzdolabı
- Laminer akışlı steril kabin

- CO₂ inkübatörü (Heracell 150i®, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD)
- Işık mikroskobu (Leica, Buffalo Grove, Illinois, ABD)
- Invert mikroskop (ZEISS Primovert, Dublin, California, ABD)
- Hücre sayım cihazı (Bio-Rad TC-20TM, Hercules, California, ABD)
- Santrifüj cihazı (Beckman Coulter Allegra® X-15R, Atlanta, Georgia, ABD)
- Kuru buz
- VEGF
- 48 kuyulu plak (Corning Incorporated, Corning, New York, ABD)
- EBM (Endothelial basal medium: EndoGo™ XF; Biological Industries, Cromwell, Connecticut, ABD)

2.1.7. VEGF Ölçümü İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- İnsan VEGF ELISA kiti (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD)
- Spektrofotometre cihazı (SpectraMax M5, San Jose, California, ABD)
- Steril endorff tüpleri 1,5 ml
- -80 °C dondurucu

- 4 °C buzdolabı
- Otoklav
- EBM (Endothelial basal medium: EndoGo™ XF; Biological Industries, Cromwell, Connecticut, ABD)

2.2. Tez Çalışmasında Uygulanan Yöntemler

2.2.1. İnsan Koroner Arter Endotel Hücrelerinin Kültürü

Bu tez çalışmasında, ticari açıdan hazır bulunan İKAEH hattı temin edildi ve kullanıldı. Satın alınan hücre hattı, standart hücre kültürü yöntemleri kullanılarak çoğaltıldı. Hücre kültürünün ilk aşamasında, sıvı azot tankında dondurularak saklanan endotel hücreleri, içerisinde 37 °C sıcaklıkta su bulunan bir beherin içerisine konuldu ve süspansiyon halindeki hücrelerin çözülmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu çözüldükten sonra içerisinde besiyeri bulunan 50 ml' lik falkon tüplerine aktarıldı ve 1500 devir/dakika olacak şekilde 11 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerin dibinde oluşan hücre pelleti gözlemlendi ve süpernatant atılarak uzaklaştırıldı. Ardından dipte kalan hücre pelleti bir miktar besiyeri içerisinde çözüldü. Çözülen hücre süspansiyonunun, T75 hücre kültürü kaplarına ekimi yapıldı ve hücreler 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem oranı içeren CO₂ inkübatöründe kültüre edildi. Kültüre edilen hücreler günlük olarak ışık mikroskopunda gözlemlendi ve yüzeye yapışamayan ve canlı olmadığı düşünülen hücreler kültür ortamından uzaklaştırıldı. Hücreler %80 bolluğa ulaşana kadar kültüre devam edildi ve hücrelerin besiyerleri gün aşırı olacak şekilde değiştirildi. Yeterli bolluğa ulaştıktan sonra hücreler tripsin ile muamele edildi ve yeniden pasajlandı. Pasajlanma aşamasında, önce kültür kabındaki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve daha sonra kültür kabı PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra her bir kültür kabına 5 mL %0,05 Trypsin-0,53 mM EDTA eklendi ve kültür kapları 10 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübatörde bekletilen kültür kaplarının yan

yüzeylerine hafifçe vurularak hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandı. Yüzeyden kalkan hücreler içerisinde 1 ml serum bulunan falkon tüplerine aktarıldıktan sonra 1500 devir/dakika olacak şekilde 11 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra supernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan pelet bir miktar besiyeri ile süspanse edildi. Elde edilen hücre süspansiyonundan 1 ml alındı ve içerisinde 7 ml besiyeri bulunan T75 hücre kültür kaplarına ekildi. Bu işlemten sonra kültür kapları yeniden 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem oranı içeren CO₂ inkübatörüne yerleştirildi ve hücreler %80 bolluğa ulaşmaya kadar kültüre edildi. Tez çalışması için istenen sayıda hücre elde edilene kadar hücre çoğaltma ve pasajlama işlemlerine devam edildi. Tez çalışması boyunca pasaj 3-5 arası olan hücreler kullanıldı.

2.2.2. Ranolazin Solüsyonun Hazırlanması

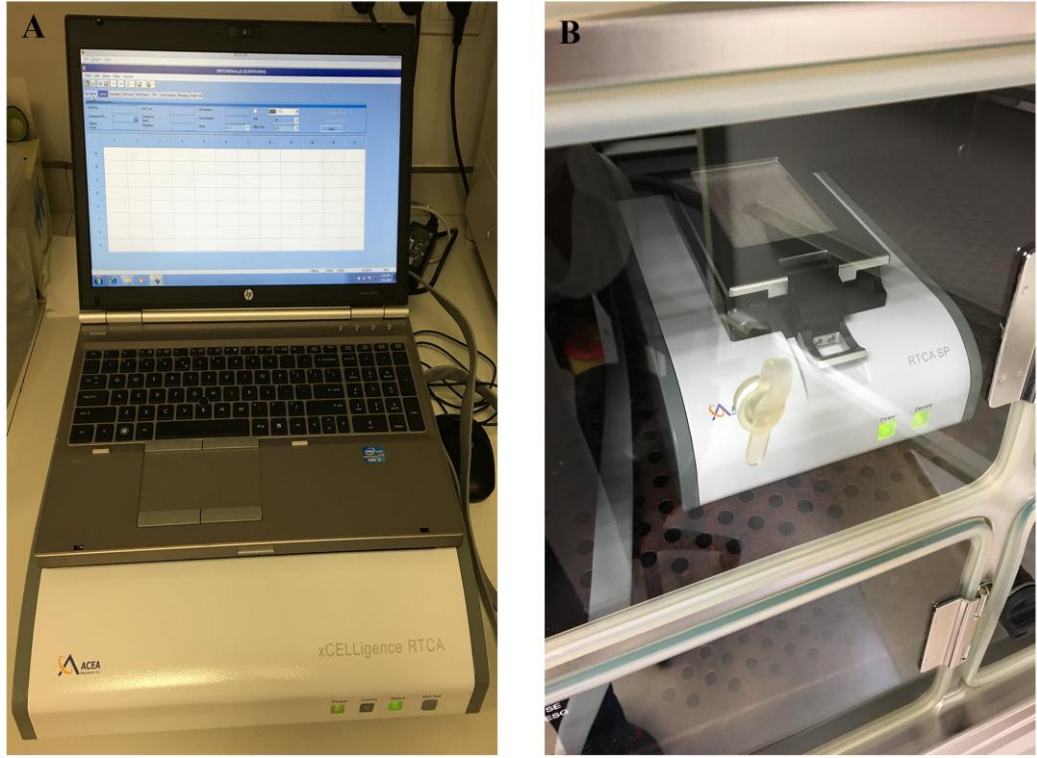
Ticari olarak satın alınan ranolazin, katı halde, oda sıcaklığında ve kutusunda muhafaza edildi. Solüsyon olarak hazırlanması aşamasında ranolazin PBS içerisinde çözüldü ve deney günlerinde taze olarak kullanıldı. İlk başta stok çözelti olarak hazırlanan ranolazin solüsyonu, daha sonra stok çözelti ve PBS kullanılarak seri dilüsyonlar halinde alt konsantrasyonlara bölündü.

2.2.3. Proliferasyon ve Sitotoksite Testleri

Proliferasyon ve sitotoksite testleri eş zamanlı hücre analizine imkan veren xCELLigence RTCA SP cihazı kullanılarak yapıldı (Şekil 2.1). Deneylere başlamadan önce cihazın doğrulama testleri yapıldı. Daha sonra proliferasyon çalışması için kuyucuk başına 100 µl hücresiz besiyeri eklenip kuyucukların bulunduğu elektronik plakalar (E-plaka) 30 dakika oda sıcaklığında laminar kabin içerisinde bekletildi. Ardından empedans (arka plan) ölçümü alındı ve tripsin işlemi ile hazırlanıp santrifüj edilmiş hücreler kuyucuk başına sırasıyla 100.000, 50.000, 25.000, 12.500, 6250, 3125, 1560 hücre olacak şekilde seri dilüsyonlar uygulanarak ekildi. Son kuyucuğa negatif kontrol olması amacıyla hücre eklemesi yapılmadı.

Plakalar tekrar 30 dk oda sıcaklığında laminar kabin içerisinde bekletildikten sonra ölçümler için cihaza yerleştirildi. Hücrelerin logaritmik proliferasyon durumları 15 dakikalık zaman aralıklarında RTCA analiz cihazı ile gözlendi. Hücrelerin logaritmik çoğalma eğrisine göre en uygun hücre sayısının kuyucuk başına 7500 hücre olduğu ve hücrelerin çoğalma hızının azalmaya başladığı evreye göre ortama ranolazin eklenmesi için en uygun zamanın logaritmik fazın bitiş kısmına karşılık gelen 16. saat olduğu değerlendirildi. Proliferasyon testleri iki tekrarlı olarak çalışıldı.

Ranolazinin İKAEH üzerindeki olası sitotoksitesini analiz etmek ve var ise toksik dozu belirlemek için kuyucuklara 100 µl hücresiz besiyeri eklenip 15-20 dakika oda sıcaklığında laminar kabin içerisinde bekletildi. Arka plan ölçümü alındıktan sonra E-plaka çıkarılıp kuyucuk başına 7500 hücre (80 µl) eklendi. Yarım saat tekrar oda sıcaklığında laminar kabin içerisinde bekletilen E-plaka tekrar cihaza yerleştirildi ve ölçümler başlatıldı. 16 saat sonra farklı dozlardaki 20 µl porsiyonlanmış ranolazin solüsyonları (Son konsantrasyonlar: 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM) kuyucuklara ilave edildi. Kontrol grubu olarak 20 µl ranolazin içermeyen PBS kontrol kuyucuklarına eklendi. Taze besiyeri değişimi amacıyla, 48 saat sonra E-plaka inkübatörden çıkarılıp kuyucuklardan 150 µl besiyeri boşaltıldı. Ardından 135 µl besiyeri ve 15 µl aynı dozlardaki ranolazin solüsyonları kuyucuklara ilave edildi. E-plaka tekrar cihaza yerleştirildi. Sitotoksite analizlerine 96 saat devam edildi ve 96. saatte deneye son verildi.



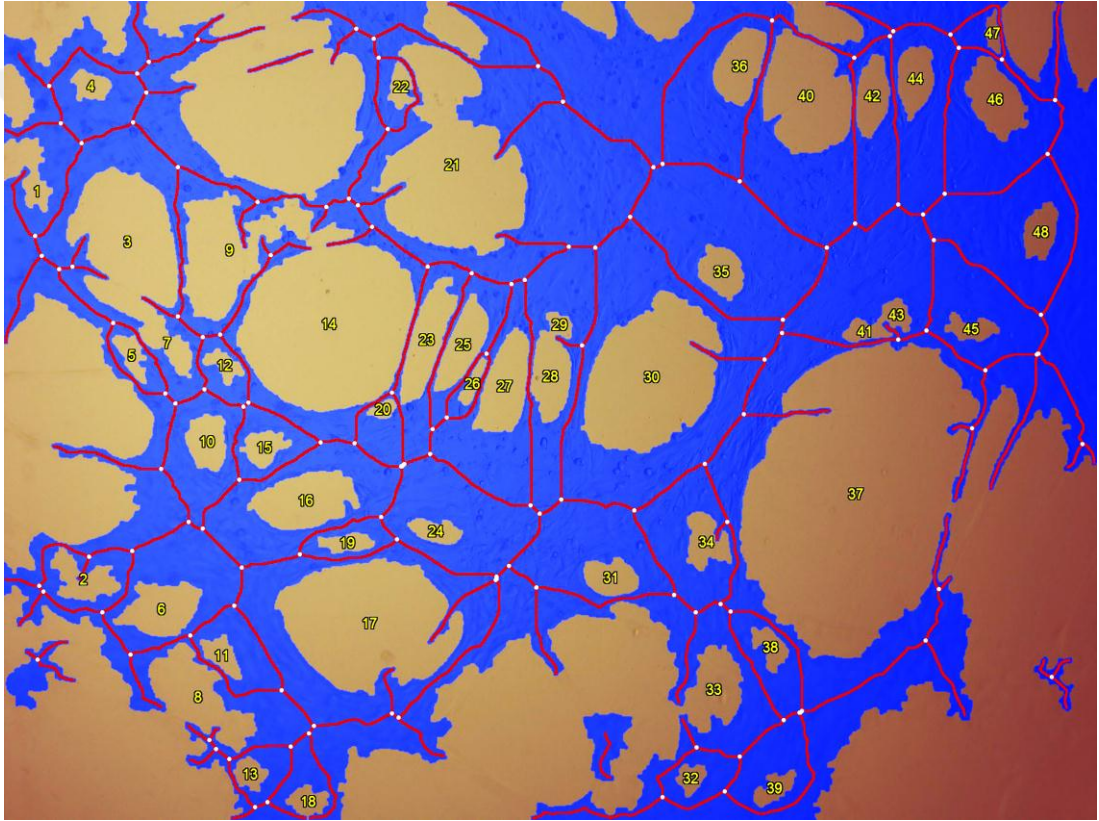
Şekil 2.1. xCELLigence RTCA SP cihazı (A: Yazılımın bulunduğu bilgisayar sistemi, B: Inkübatörün içerisinde tutulan ve plaka bölgesinin içerisinde elektronik plaka bulunan analiz cihazı).

2.2.4. Matrijel Tüp Formasyonu Testi

Anjiyogenez sürecinin in-vitro göstergesi olan tüp oluşum deneyleri için temin edilen matrijel bazal membran matriksi kullanılabildiği kadar -20°C ' deki buzdolabında muhafaza edildi. Deneyden bir gün önce matrijel bazal membran matriksin buz üzerinde 4°C ' de gece boyu tutularak çözülmesi ve sıvı hale geçmesi sağlandı. Deneyde kullanılacak 48 kuyucuklu plakalar ve pipetler de ön soğutma işlemine tabi tutuldu. Bazal membran matriksinin porsiyonlanması aşamasında da tüpler buz üzerinde bekletildi. Deneyin bütün aşamaları steril şartlarda gerçekleştirildi.

Her bir kuyucuğa $150\ \mu\text{l}/\text{cm}^2$ matrijel bazal membran matriksi eklendi. Kuyucuklara eklenen matriksin jel kıvamına gelebilmesi için oda sıcaklığındaki laminar kabinde 1 saat inkübe edilmesi sağlandı ve 1 saat sonunda jel oluşumu gözlemlendi. Ardından her bir kuyucuğa, deney sabahı tripsin işlemi ile hazırlanıp

santrifüj edilmiş hücreler kuyucuk başına 50000 hücre/cm² olacak şekilde 1125 µl serumsuz besiyeri içerisinde eklendi. Daha sonra kuyucuk başına 75 µl PBS içerisinde çözülmüş ve son konsantrasyonları 50 ve 200 µM olan ranolazin solüsyonları eklendi. Deney için pozitif kontrol olarak ortama 75 µl VEGF eklendi ve plaka 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem oranı içeren CO₂ inkübatörüne yerleştirildi. 4, 8, 12 ve 16 saat sonra plaka inkübatörden çıkarılarak invert ışık mikroskopunda 4x büyütmede resimler çekildi. Çekilen resimler Wimasis Image Analysis programı kullanılarak, endotel hücrelerindeki tüp oluşumu değerlendirildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Wimasis Image Analysis programı aracılığıyla endotel hücrelerinin tüp oluşum kapasitesinin değerlendirilmesi örneği.

2.2.5. VEGF Miktarının Tayin Edilmesi

Hücrelerden ortama salınan VEGF miktarının tayin edilmesi için katı faz sandiviç ELISA yöntemi kullanıldı. İnsan VEGF ELISA kiti temin edildikten sonra kullanım süresine kadar +4 °C buzdolabında muhafaza edildi.

Hücre vasatları boşaltıldıktan sonra hücreler PBS ve tripsin ile yıkandı. Daha sonra kültür kabına tripsin ilavesi yapılarak 10 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübatörde belirli süre bekletilen hücrelerin kültür kaplarının yan yüzeylerine hafifçe vurularak hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandı. Yüzeyden kalkan hücreler, içerisinde 1 ml serum bulunan falkon tüplerine aktarıldıktan sonra 1500 devir/dakika olacak şekilde 11 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra supernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan pelet bir miktar besiyeri ile süspanse edilip hücre sayımı yapıldı. Hücreler daha sonra 48 kuyucuklu plakaya, kuyucuk başına 100.000 hücre olacak şekilde ekildi ve hücreler 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem oranı içeren CO₂ inkübatöründe kültüre edildi. 24 saat sonra, hücreler ışık mikroskobu ile görüntülendi ve kuyucuklara yapışmış olarak değerlendirildi. Bunun üzerine kuyucuklara son konsantrasyonları 0, 50 ve 200 µM olacak şekilde ranolazin ilavesi yapıldı. Her bir kuyucuktan 12, 24 ve 48. saatlerde 150 µl besiyeri örneği alınıp steril ependorf tüplerine koyuldu ve alınan örnekler VEGF miktarının ölçülmesi amacıyla -80 °C dondurucuda deney gününe kadar muhafaza edildi.

Deney sabahı örnekler -80 °C dondurucudan çıkartıldı ve yıkama tamponu çözeltileri hazırlandı. Ardından standart örneklerin dilüsyonu yapıldı. Standart dilüsyon tampon çözeltilisine son konsantrasyonu 10.000 pg/ mL olacak şekilde insan VEGF eklendi ve nazikçe çalkalanarak homojenize olması sağlandı. 10 dakika beklendikten sonra 510 µl standart dilüsyon tampon çözeltisi içeren tüpe 90 µl standart VEGF çözeltisi eklendi. Daha sonra her bir tüpteki örnek 1:1 oranında seyreltilerek ardışık dilüsyonlar uygulandı ve bu şekilde standart numuneleri oluşturuldu. Ardından her bir kuyucuğa 50 µl inkübasyon tampon çözeltisi eklendi. Standart kuyucuklarına 100 µl standart örnekler eklendi. Örneklerin çalışılacağı kuyucuklara 50 µl standart dilüsyon tampon çözeltisi ve 50 µl örnek eklendi. Plakanın üzeri şeffaf plaka koruyucusu ile kapatıldıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Ardından kuyucuklardaki çözeltiler döküldü ve bütün kuyucuklar 4 kez yıkama tamponu çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl biotin işaretli anti-VEGF çözeltisi eklendi. Plakanın üzeri şeffaf plaka koruyucusu ile kapatılıp 1 saat oda sıcaklığında beklendi. Daha sonra kuyucuklardaki çözeltiler boşaltıldı ve bütün kuyucuklar 4 kez yıkama tamponu çözeltisi ile yıkandı.

Hazırlanan Streptavidin-HRP çözeltisi her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde ilave edildi. Plakanın üzeri şeffaf plaka koruyucusu ile kapatılıp yarım saat oda sıcaklığında bekletildi ve yarım saat sonunda kuyucuklar boşaltılıp 4 kez yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl stabilize olmuş kromojen solüsyonu eklenip plaka şeffaf koruyucu ile kapatıldı ve plaka yarım saat boyunca oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl durdurma çözeltisi eklenerek deney sonlandırıldı. Spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri elde edildi ve çıkan sonuçlar standartlar ile çizilen grafik üzerinden analiz edildi.

2.2.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmanın veri analizleri, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Inc, Chicago, IL, ABD) 22.0 programı ile yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde normal dağılıma uyan veriler Student-t testi ile, normal dağılıma uymayan veriler Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Çoklu grup analizlerinde, tek faktörlü varyans analizi testi (ANOVA) ile birlikte Dunnett testi kullanıldı. Nicel değişkenler tablolarda ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. Değişkenler %95 güven düzeyinde incelenmiş olup p değerinin 0,05' ten küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

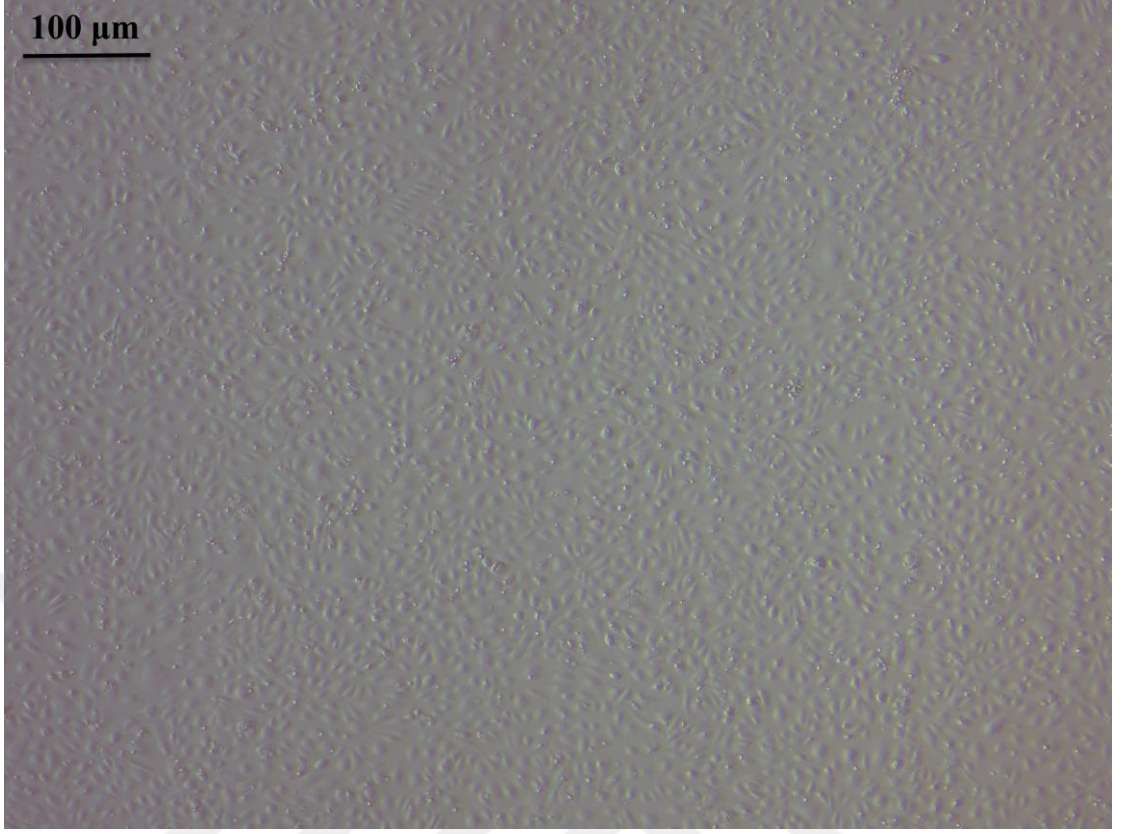
3. BULGULAR

3.1. İnsan Koroner Arter Endotel Hücrelerinin Kültürü

Ticari açıdan mevcut olan ve satın alınarak temin edilen İKAEH hattı standart hücre kültürü yöntemleri kullanılarak çoğaltıldı ve hücrelerin morfolojisi invert mikroskop aracılığıyla gözlemlenerek belirli zaman aralıklarıyla resimleri çekildi. Tez çalışması boyunca pasaj 3-5 arası olan hücreler kullanıldı. Kültürü yapılan endotel hücrelerinin 2. günden itibaren çoğalmaya başladıkları gözlemlendi. Çoğalma süreçlerinde ışık mikroskopunda gözlemlenen hücrelerin morfolojileri incelendiğinde henüz bolluğa ulaşmayan hücrelerin daha çok ince, uzun yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1). Yeterli bolluğa ulaştıklarında ise hücrelerin uzun yapılarının azalarak kaldırım taşına benzer yapıda poligonal bir şekil aldığı gözlemlendi (Şekil 3.2).



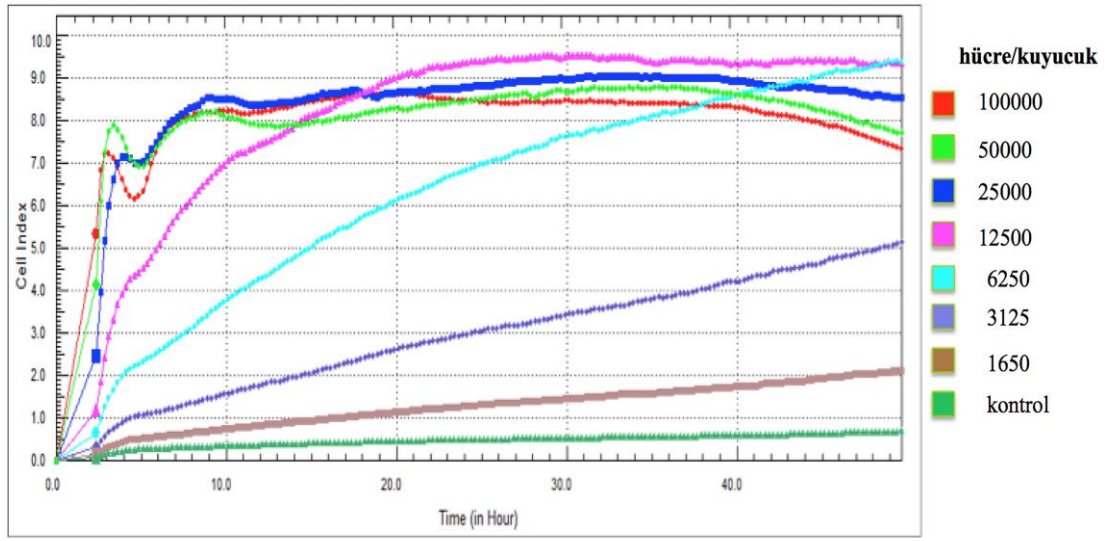
Şekil 3.1. Pasaj 2 aşamasındaki insan koroner arter endotel hücrelerinin ekimden 6 gün sonraki invert mikroskop görüntüsü.



Şekil 3.2. Yeterli bolluğa ulaşmış insan koroner arter endotel hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü.

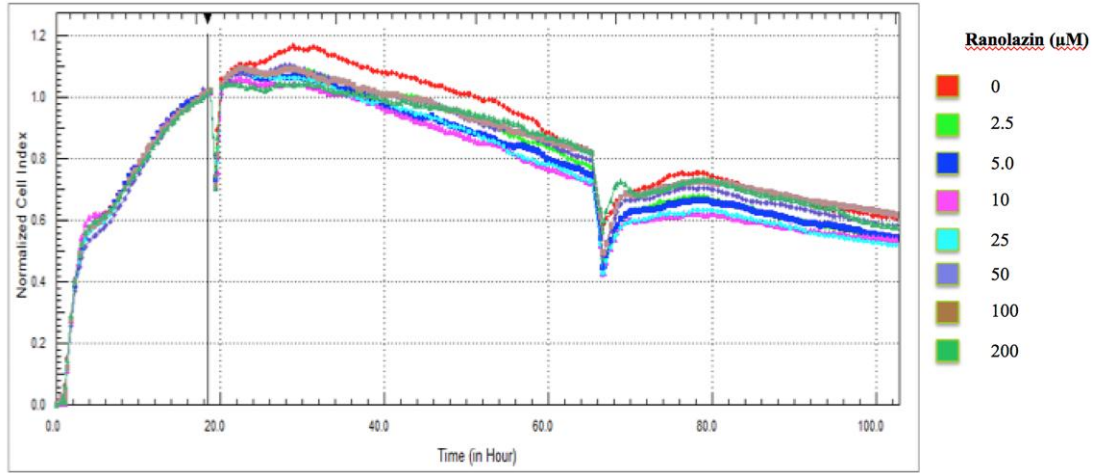
3.2. Proliferasyon ve Sitotoksisite Testleri

Tez çalışmasında çalışılması planlanan proliferasyon ve sitotoksisite testleri eş zamanlı hücre analizine imkan veren xCELLigence RTCA SP cihazı kullanılarak yapıldı. İlk olarak farklı yoğunluklarda kuyucuklara ekilen İKAEH' nin lag, log ve plato fazları belirlendi (Şekil 3.3). İKAEH' leri ekilme yoğunlukları ile uyumlu olacak şekilde büyüme eğrileri çizdiler. Yüksek yoğunlukta ekilen hücreler log ve plato fazlarına genel olarak daha erken ulaştılar.



Şekil 3.3. xCELLigence sistemi ile yapılan proliferasyon çalışması.

Proliferasyon çalışmasından sonra kuyucuk başına 7500 hücre olacak şekilde İKAEH ekimi yapıldı ve 16 saat sonra kuyucuklara son konsantrasyonları 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 μ M olacak şekilde ranolazin ilavesi yapıldı. Kontrol grubu olarak 20 μ l ranolazin içermeyen PBS kontrol kuyucuklarına eklendi. 48 saat sonra besiyeri değişimi yapıldı. Canlılık ve sitotoksosite analizlerine 96 saat devam edildi. Farklı dozlarda ranolazin uygulanan İKAEH' nin sitotoksosite analizlerinin hiçbir dozunda proliferatif ve/veya sitotoksik etki tespit edilmedi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. xCELLigence sistemi ile farklı dozlardaki ranolazin konsantrasyonlarının sitotoksikite çalışması.

3.3. Matrijel Tüp Formasyonu Test Analizleri

İKAEH' nin in-vitro koşullarda ranolazin ile muamele edilmesinden sonra tüp oluşturma kapasitesindeki değişiklik matrijel tüp oluşum testi ile değerlendirildi. Farklı dozlarda (50 ve 200 μM) ranolazin ile muamele edilen İKAEH' lerinin, ranolazin ile muamele edilmeyen hücrelerin ve pozitif kontrol olarak VEGF ile muamele edilen hücrelerin 4, 8, 12 ve 16. saatlerde invert mikroskop aracılığıyla 4x büyütmede resimleri çekildi (Şekil 3.5, Şekil 3.7, Şekil 3.9, Şekil 3.11) ve Wimasis Image Analysis programı kullanılarak kapiller benzeri tüp oluşum süreci değerlendirildi (Şekil 3.6, Şekil 3.8, Şekil 3.10, Şekil 3.12).

Besiyeri ortamına ranolazin ilave edilmeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 4. saatte gözlemlenen tüp uzunluğunun piksel olarak miktarı 50 μM ranolazin, 200 μM ranolazin ve VEGF içeren pozitif kontrol grubunda daha yüksekti (4168 ± 559 , 7402 ± 201 , 42492 ± 1896 , 42111 ± 8798 , sırasıyla, $p < 0.001$) (Çizelge 3.1). 50 ve 200 μM ranolazin içeren hücre grupları 4. saatteki tüp oluşumu açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μM ranolazin içeren grupta tüp oluşumu daha fazlaydı ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur (7402 ± 201 ,

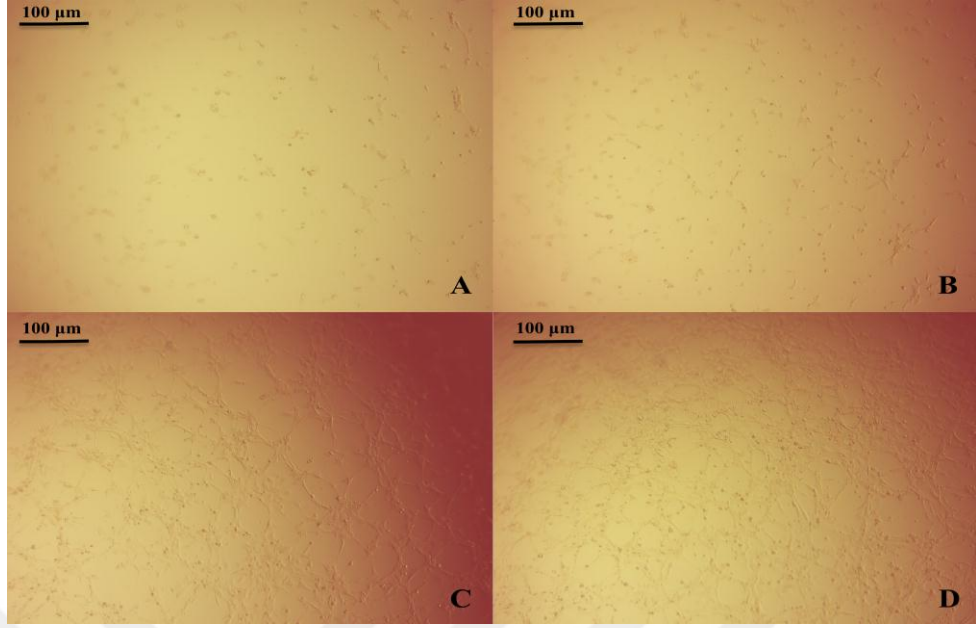
42492±1896, sırasıyla, $p<0.001$). Hücre gruplarının 4. saatte oluşturduğu tüp oluşumlarının dallanma noktalarının sayısı ranolazin içermeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti (2.5±0.7, 15.5±4.9, 211±5.6, 208±35.3, sırasıyla, $p<0.001$) (Çizelge 3.2). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları 4. saatteki dallanma noktalarının sayısı açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp yapılarındaki dallanma noktalarının miktarı daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (15.5±4.9, 211±5.6, sırasıyla, $p<0.001$). Tüp oluşumlarının 4. saatteki yüzdesel olarak alan analizleri besiyeri ortamına ranolazin ilave edilmeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti (2.3±0.2, 4.1±0.4, 34±3.1, 36.6±20.6, sırasıyla, $p=0.05$) (Çizelge 3.3). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları yüzdesel alan olarak kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp yapılarının alanı sayısal olarak daha fazlaydı (4.1±0.4, 34±3.1, sırasıyla, $p=0.1$).

Besiyeri ortamına ranolazin ilave edilmeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 8. saatte gözlemlenen tüp uzunluğunun piksel olarak miktarı 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (9075±1934, 13672±2019, 40872±1037, 39465±5393, sırasıyla, $p<0.001$) (Çizelge 3.1). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları 8. saatteki tüp oluşumu açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp oluşumu daha fazlaydı ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur (13672±2019, 40872±1037, sırasıyla, $p<0.001$). Hücre gruplarının 8. saatte oluşturduğu tüp oluşumlarının dallanma noktalarının sayısı ranolazin içermeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti (9.6±4.0, 41±6.5, 183±4.6, 161.3±19.0, sırasıyla, $p<0.001$) (Çizelge 3.2). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları 8. saatteki dallanma noktalarının sayısı açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp yapılarındaki dallanma noktalarının miktarı daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (41±6.5, 183±4.6, sırasıyla, $p<0.001$). Tüp oluşumlarının 8. saatteki yüzdesel olarak alan analizleri besiyeri

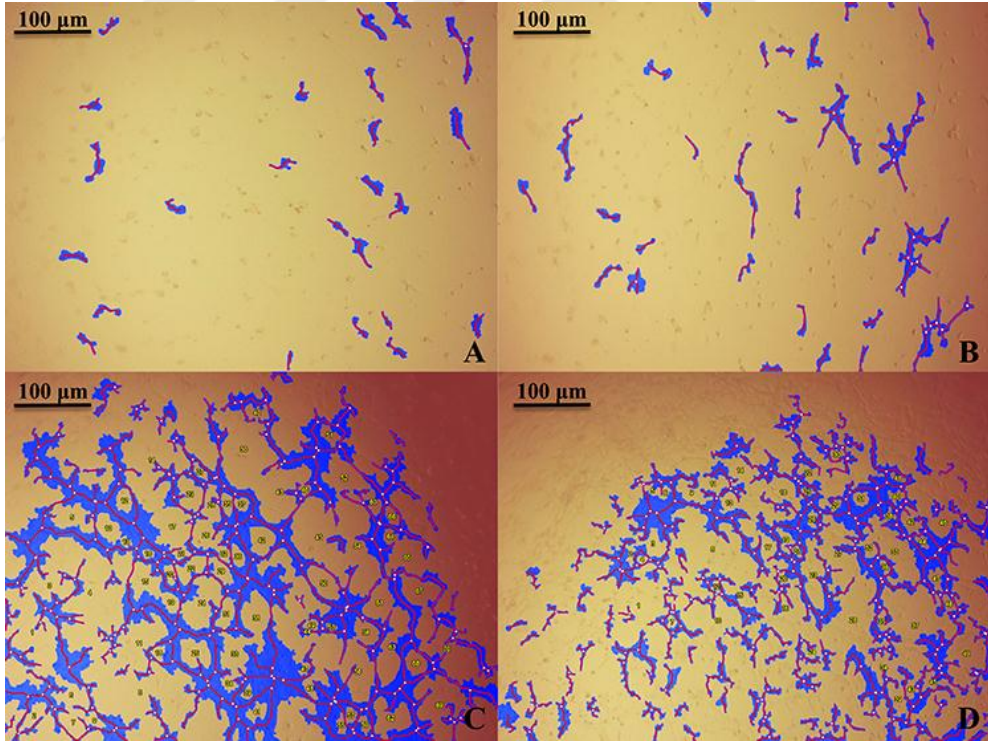
ortamına ranolazin ilave edilmeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti (4.2 ± 0.7 , 6.8 ± 0.9 , 42.9 ± 0.9 , 47.3 ± 23.8 , sırasıyla, $p=0.001$) (Çizelge 3.3). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları yüzdesel alan olarak kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp yapılarının yüzdesel olarak alanı daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (6.8 ± 0.9 , 42.9 ± 0.9 , sırasıyla, $p=0.006$).

Besiyeri ortamına ranolazin ilave edilmeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 12. saatte gözlemlenen tüp uzunluğunun piksel olarak miktarı 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (9504 ± 653 , 15330 ± 603 , 35721 ± 586 , 38928 ± 2112 , sırasıyla, $p<0.001$) (Çizelge 3.1). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları 12. saatteki tüp oluşumu açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp oluşumu daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (15330 ± 603 , 35721 ± 586 , sırasıyla, $p<0.001$). Hücre gruplarının 12. saatte oluşturduğu tüp oluşumlarının dallanma noktalarının sayısı ranolazin içermeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti (16.6 ± 0.5 , 52.5 ± 0.7 , 124.0 ± 7.0 , 160.0 ± 18.0 , sırasıyla, $p<0.001$) (Çizelge 3.2). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları 12. saatteki dallanma noktalarının sayısı açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp yapılarındaki dallanma noktalarının miktarı daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (52.5 ± 0.7 , 124.0 ± 7.0 , sırasıyla, $p=0.001$). Tüp oluşumlarının 12. saatteki yüzdesel olarak alan analizleri besiyeri ortamına ranolazin ilave edilmeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti (4.2 ± 0.5 , 8.1 ± 0.2 , 49.5 ± 1.4 , 49.1 ± 16.4 , sırasıyla, $p=0.002$) (Çizelge 3.3). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları yüzdesel alan olarak kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp yapılarının yüzdesel olarak alanı daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (8.1 ± 0.2 , 49.5 ± 1.4 , sırasıyla, $p=0.006$).

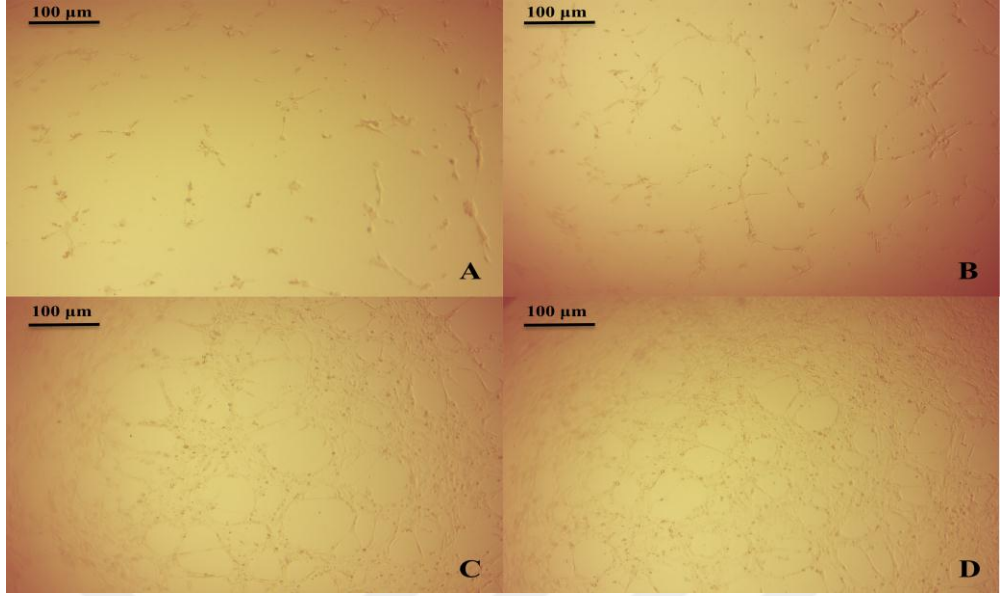
Besiyeri ortamına ranolazin ilave edilmeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 16. saatte gözlemlenen tüp uzunluğunun piksel olarak miktarı 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (10052 ± 536 , 11160 ± 1124 , 32330 ± 2991 , 30216 ± 3887 , sırasıyla, $p < 0.001$) (Çizelge 3.1). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları 16. saatteki tüp oluşumu açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp oluşumu daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (11160 ± 1124 , 32330 ± 2991 , sırasıyla, $p < 0.001$). Hücre gruplarının 16. saatte oluşturduğu tüp oluşumlarının dallanma noktalarının sayısı ranolazin içermeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti (22.6 ± 2.0 , 30.3 ± 9.0 , 107.0 ± 6.0 , 103.0 ± 31.0 , sırasıyla, $p < 0.001$) (Çizelge 3.2). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları 16. saatteki dallanma noktalarının sayısı açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp yapılarındaki dallanma noktalarının miktarı daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (30.3 ± 9.0 , 107.0 ± 6.0 , sırasıyla, $p = 0.001$). Tüp oluşumlarının 16. saatteki yüzdesel olarak alan analizleri besiyeri ortamına ranolazin ilave edilmeyen hücre grubu ile kıyaslandığında 50 μ M ranolazin, 200 μ M ranolazin ve pozitif kontrol grubunda daha yüksekti (4.8 ± 0.3 , 5.7 ± 0.9 , 48.0 ± 8.1 , 43.3 ± 23.9 , sırasıyla, $p = 0.003$) (Çizelge 3.3). 50 ve 200 μ M ranolazin içeren hücre grupları yüzdesel alan olarak kendi aralarında karşılaştırıldığında 200 μ M ranolazin içeren grupta tüp yapılarının yüzdesel olarak alanı daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (5.7 ± 0.9 , 48.0 ± 8.1 , sırasıyla, $p = 0.008$).



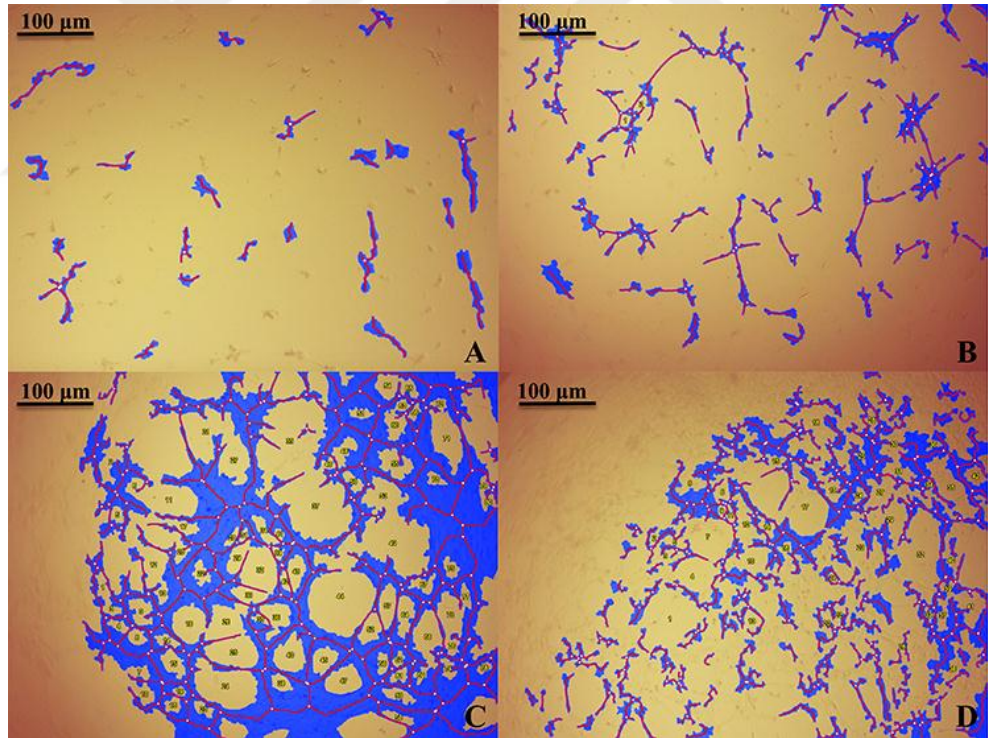
Şekil 3.5. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 4. saatteki invert mikroskop görüntüsü (A: 0 μ M ranolazin, B: 50 μ M ranolazin, C: 200 μ M ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).



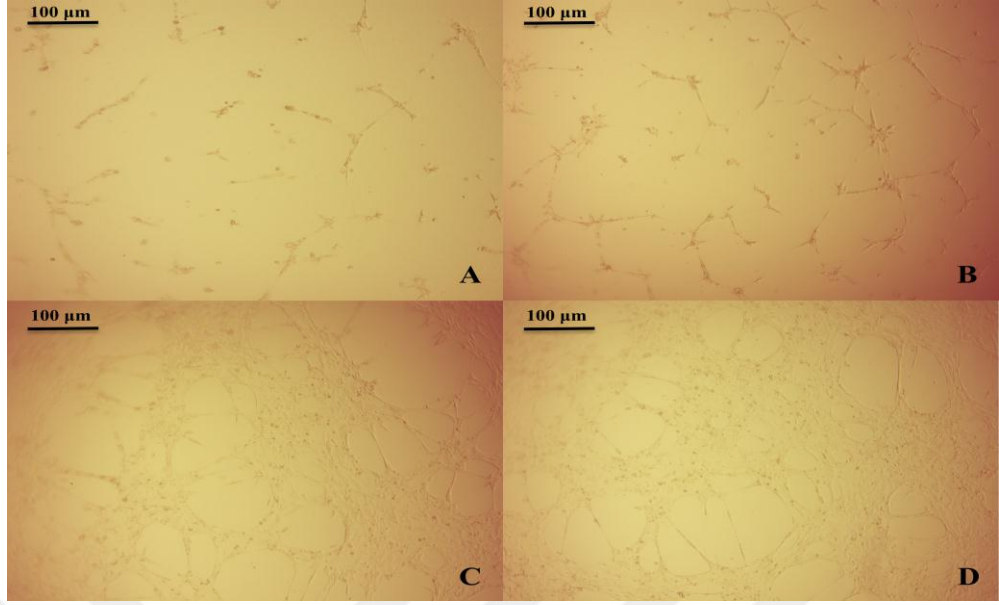
Şekil 3.6. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 4. saatteki invert mikroskop görüntülerinin Wimasis Image Analysis programı kullanılarak analizi (A: 0 μ M ranolazin, B: 50 μ M ranolazin, C: 200 μ M ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).



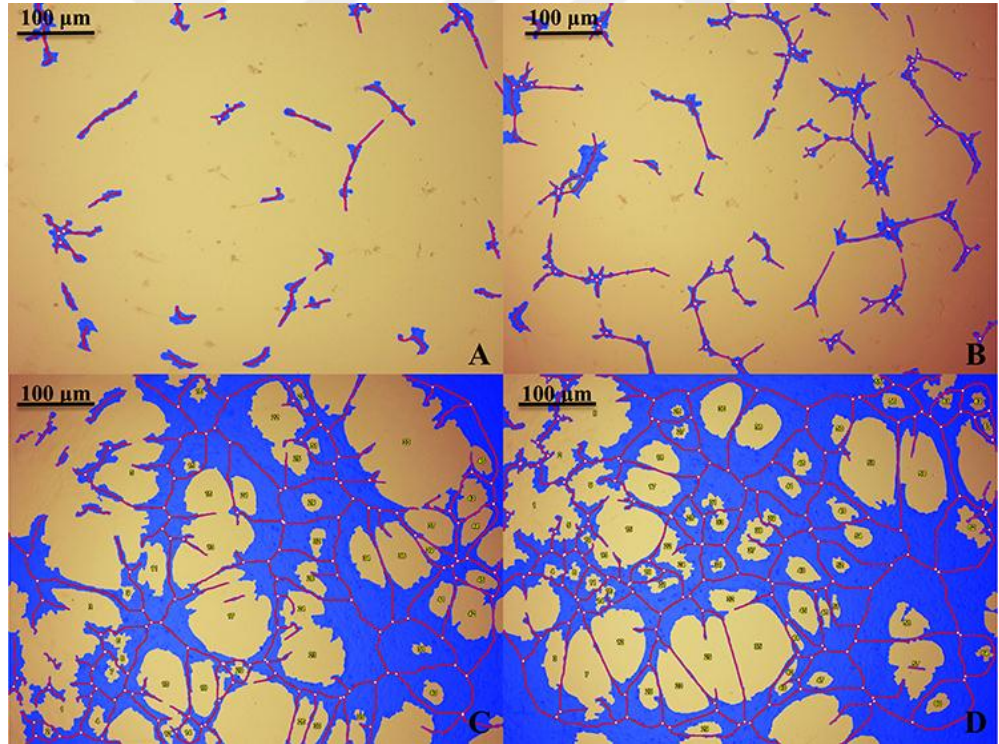
Şekil 3.7. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 8. saatteki invert mikroskop görüntüsü (A: 0 μM ranolazin, B: 50 μM ranolazin, C: 200 μM ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).



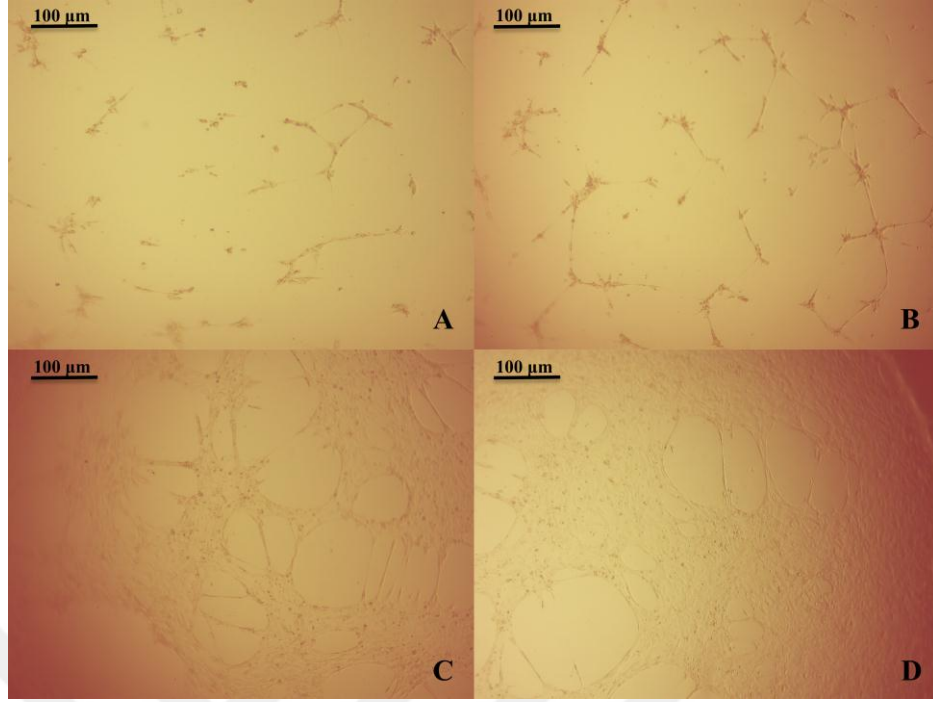
Şekil 3.8. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 8. saatteki invert mikroskop görüntülerinin Wimasis Image Analysis programı kullanılarak analizi (A: 0 μM ranolazin, B: 50 μM ranolazin, C: 200 μM ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).



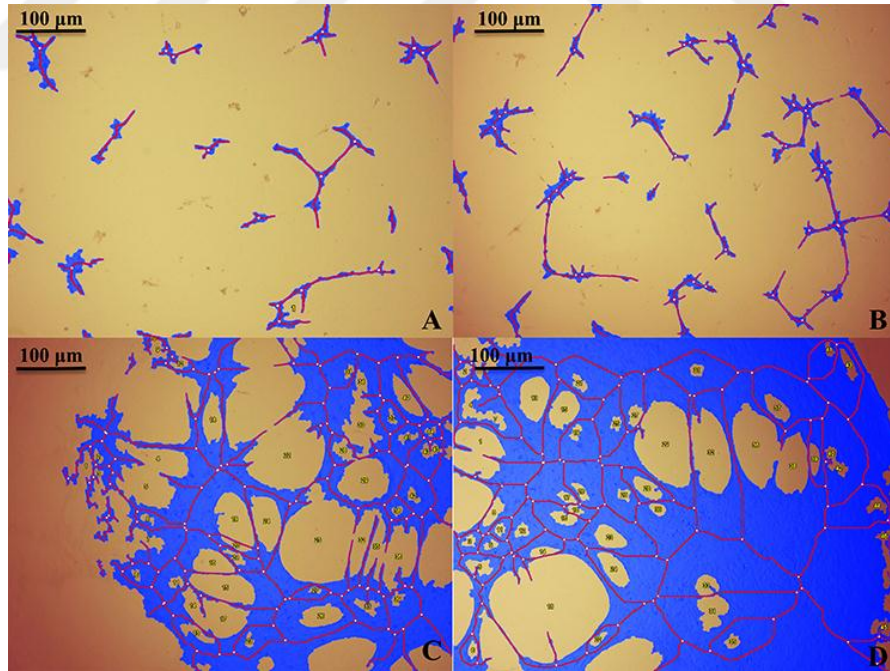
Şekil 3.9. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 12. saatteki invert mikroskop görüntüsü (A: 0 μ M ranolazin, B: 50 μ M ranolazin, C: 200 μ M ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).



Şekil 3.10. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 12. saatteki invert mikroskop görüntülerinin Wimasis Image Analysis programı kullanılarak analizi (A: 0 μ M ranolazin, B: 50 μ M ranolazin, C: 200 μ M ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).



Şekil 3.11. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 16. saatteki invert mikroskop görüntüsü (A: 0 µM ranolazin, B: 50 µM ranolazin, C: 200 µM ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).



Şekil 3.12. Matrijel membranında inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin 16. saatteki invert mikroskop görüntülerinin Wimasis Image Analysis programı kullanılarak analizi (A: 0 µM ranolazin, B: 50 µM ranolazin, C: 200 µM ranolazin, D: VEGF zengin pozitif kontrol grubu).

Çizelge 3.1. İnsan koroner arter endotel hücrelerinin matrijel membrandaki farklı durum ve zamanlarda oluşturdıkları toplam tüp uzunluklarının piksel analizi sonuçları.

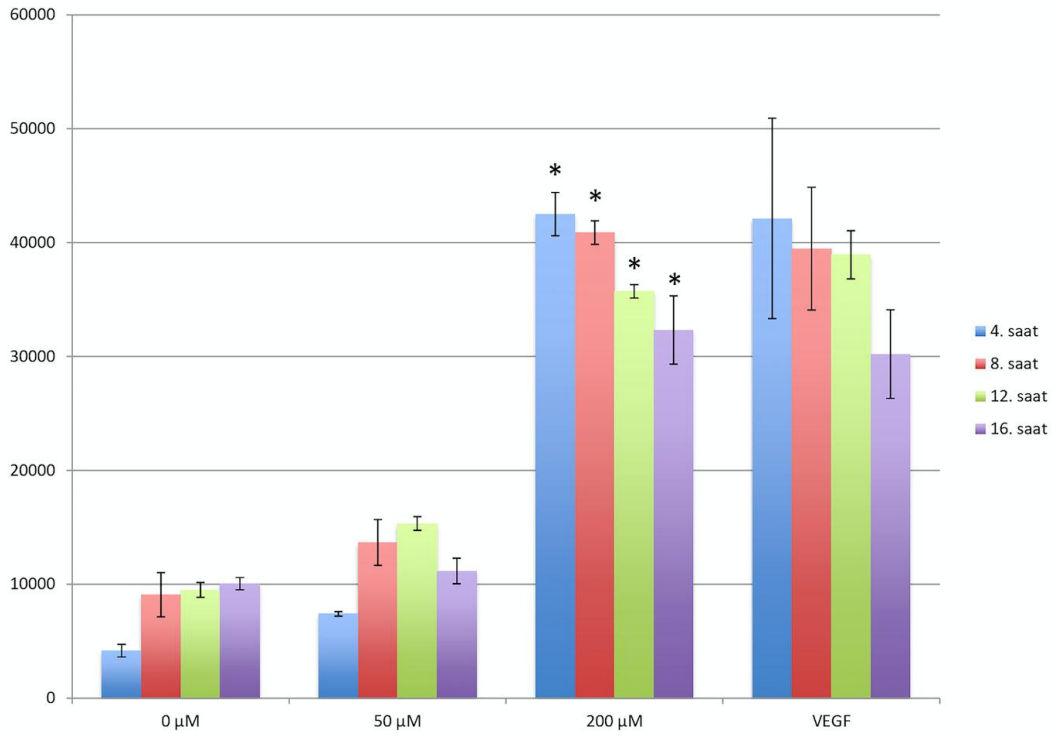
	0 μ M	50 μ M	200 μ M	VEGF	p değeri
4. saat	4168 $\pm$ 559	7402 $\pm$ 201	42492 $\pm$ 1896	42111 $\pm$ 8798	<0.001
8. saat	9075 $\pm$ 1934	13672 $\pm$ 2019	40872 $\pm$ 1037	39465 $\pm$ 5393	<0.001
12. saat	9504 $\pm$ 653	15330 $\pm$ 603	35721 $\pm$ 586	38928 $\pm$ 2112	<0.001
16. saat	10052 $\pm$ 536	11160 $\pm$ 1124	32330 $\pm$ 2991	30216 $\pm$ 3887	0.003

Çizelge 3.2. İnsan koroner arter endotel hücrelerinin matrijel membrandaki farklı durum ve zamanlarda oluşturdıkları tüplerin dallanma noktalarının sayısal analiz sonuçları.

	0 μ M	50 μ M	200 μ M	VEGF	p değeri
4. saat	2.5 $\pm$ 0.7	15.5 $\pm$ 4.9	211.0 $\pm$ 5.6	208.0 $\pm$ 35.3	<0.001
8. saat	9.6 $\pm$ 4.0	41.0 $\pm$ 6.5	183.0 $\pm$ 4.6	161.3 $\pm$ 19.0	<0.001
12. saat	16.6 $\pm$ 0.5	52.5 $\pm$ 0.7	124.0 $\pm$ 7.0	160.0 $\pm$ 18	0.001
16. saat	22.6 $\pm$ 2.0	30.3 $\pm$ 9.0	107.0 $\pm$ 6.0	103.0 $\pm$ 31	<0.001

Çizelge 3.3. İnsan koroner arter endotel hücrelerinin matrijel membrandaki farklı durum ve zamanlarda oluşturdıkları tüplerin yüzdesel olarak alan analizi (%) sonuçları.

	0 μ M	50 μ M	200 μ M	VEGF	p değeri
4. saat	2.3 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.4	34 $\pm$ 3.1	36.6 $\pm$ 20.6	0.05
8. saat	4.2 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.9	42.9 $\pm$ 0.9	47.3 $\pm$ 23.8	0.001
12. saat	4.2 $\pm$ 0.5	8.1 $\pm$ 0.2	49.5 $\pm$ 1.4	49.1 $\pm$ 16.4	0.002
16. saat	4.8 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.9	48.0 $\pm$ 8.1	43.3 $\pm$ 23.9	0.003



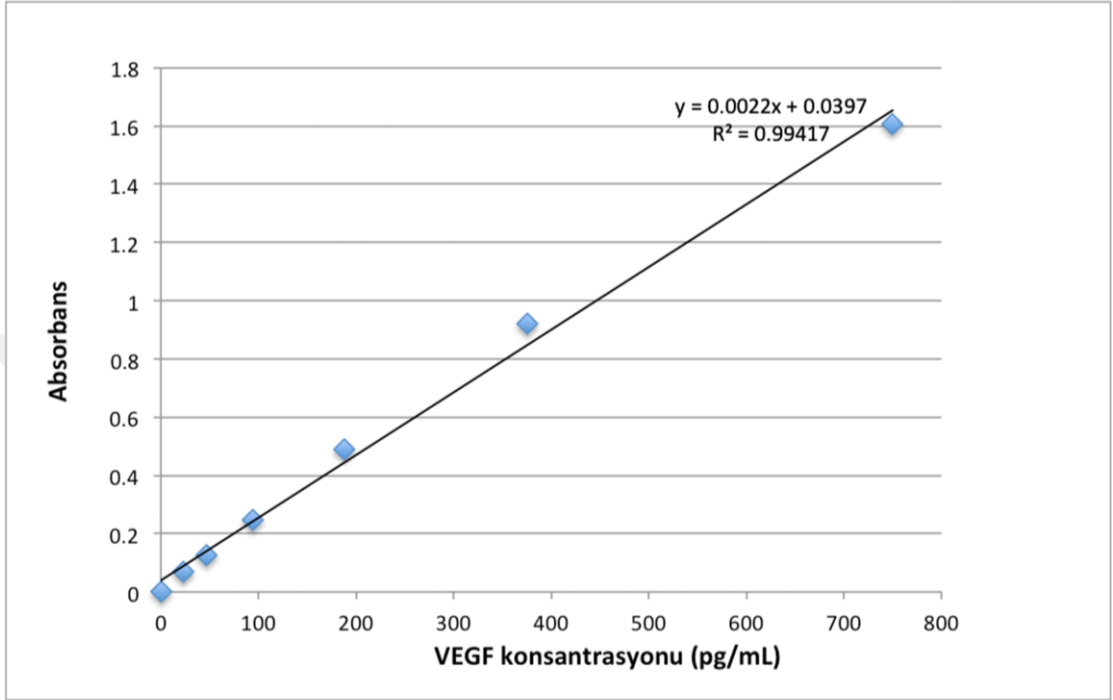
Şekil 3.13. Çalışma gruplarındaki toplam tüp uzunluğunun piksel analiz sonuçları. * 50 µM ranolazin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0.001$).

3.4. VEGF Miktarı Analizleri

İKAEH' nin farklı dozlardaki ranolazin ile muamelesi neticesinde değişen anjiyogenik aktivitenin biyokimyasal göstergesi olan VEGF seviyesi ölçümleri ELISA yöntemi kullanılarak yapıldı. Konsantrasyon-absorbans standart eğrisi çizildikten sonra (Şekil 3.14), hücrelerden salınan VEGF miktarları hesaplandı (Çizelge 3.4, Şekil 3.15).

Kontrol grubu olarak değerlendirilen 0 µM ranolazin içeren hücre grubunda 12, 24 ve 48. saatlerde alınan besiyeri örneklerinde düşüş mevcuttu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (50.0 ± 0.6 , 26.9 ± 1.4 , 14.5 ± 0.4 , sırasıyla, $p < 0.001$). Aynı şekilde, 50 µM ranolazin içeren hücre grubunda da 12, 24 ve 48. saatlerde alınan besiyeri örneklerinde düşüş mevcuttu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (37.8 ± 0.1 , 24.5 ± 0.9 , 14.6 ± 0.9 , sırasıyla, $p < 0.001$). Diğer analizlere

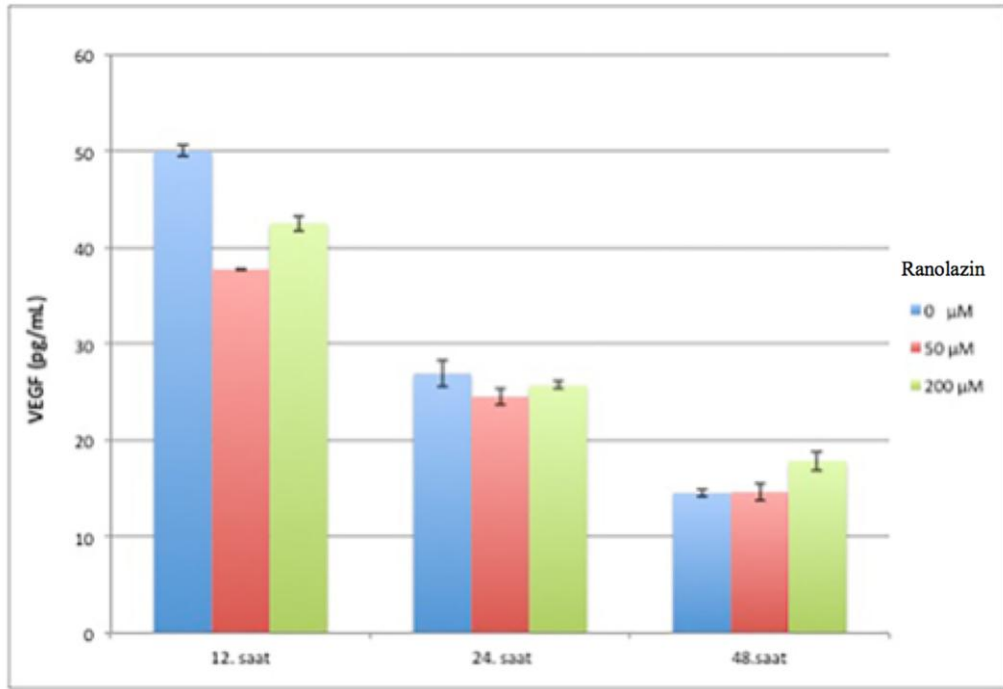
benzer şekilde, 200 µM ranolazin içeren hücre grubunda da 12, 24 ve 48. saatlerde alınan besiyeri örneklerinde düşüş mevcuttu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (42.5 ± 0.8 , 25.7 ± 0.4 , 17.8 ± 1.0 , $p < 0.001$) (Çizelge 3.4).



Şekil 3.14. Hesaplamalarda kullanılan, konsantrasyon ve absorbans arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren standart eğrisi.

Çizelge 3.4. İnsan koroner arter endotel hücrelerinin farklı ilaç dozu ve zamanlardaki VEGF salınımlarının miktar (pg/mL) analizi sonuçları.

	12. saat	24. saat	48. saat	p değeri
0 µM	50.0 ± 0.6	26.9 ± 1.4	14.5 ± 0.4	< 0.001
50 µM	37.8 ± 0.1	24.5 ± 0.9	14.6 ± 0.9	< 0.001
200 µM	42.5 ± 0.8	25.7 ± 0.4	17.8 ± 1.0	< 0.001



Şekil 3.15. Farklı ranolazin dozu ve zamanlarda insan koroner arter endotel hücrelerinden salınan VEGF miktarları.

4. TARTIŞMA

KVH gerek sebepleri gerek sonuçları açısından tüm Dünya’ da önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bunun yanında KVH tüm Dünya’ da en önemli ölüm sebebidir. Hastalığın tedavisi ve takibi ile ilgili son yıllarda önemli gelişmeler olmuştur. Koroner yoğun bakım ünitelerinin açılması, ilaç tedavisi seçeneklerinin genişlemesi, girişimsel ve cerrahi tedavi yöntemlerindeki gelişmeler ölüm oranlarında önemli oranda iyileşmeye sebep olmuştur. Fakat mevcut tedavi yöntemlerinden hiçbirisi kalp kasında hasar oluştuktan sonra ölen hücrelerin yerinde sağlıklı ve fonksiyonel bir kalp dokusu oluşturmamıştır (Romagnuolo ve Laflamme, 2017). Nitekim yapılan çalışmalar göstermektedir ki kalp dokusunun hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda yenilenme kapasitesi çok kısıtlıdır ve kalp kasındaki yenilenme sürecini aktive edecek mekanizmalar net olarak bilinmemektedir (Li ve ark., 2018 ve Vagnozzi ve ark., 2018). Bu bağlamda değerlendirildiğinde iskemik kalp hastalığından sağ olarak kurtulabilen bir hasta uygun bir şekilde tedavi imkanı almış olsa dahi kalpte yeterli miktarda canlı ve fonksiyonel doku kalmadığı için kalp yetmezliği ile yaşamını idame ettirmesi gerektirmektedir ve kalp yetmezliğinin ölüm oranları tedavi imkanlarındaki tüm ilerlemelere rağmen yüksek olarak seyretmektedir (Minicucci ve ark., 2011).

Kalp dokusunun yenilenme kapasitesinin zayıf olması nedeniyle kardiyovasküler yenileyici tıp biliminde çok önemli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların birçoğu kök hücreleri kullanarak kalp dokusunu yenileme sürecine odaklanmıştır. Nitekim klinik öncesi aşamadaki birçok kök hücre çalışmasında başarılı sonuçlar rapor edilmiştir (Tompkins ve ark., 2018). Klinik öncesi çalışmalarda başarılı sonuçlar, kök hücrelerin klinik seviyede kullanımını gündeme getirmiştir fakat günümüze kadar gerek kemik iliğinden elde edilen gerekse erişkin vücut dokusundan elde edilen kök hücrelerle yapılan klinik çalışmalarda etkinlik açısından başarılı sonuçlar elde edilememiştir (Cambria ve ark., 2017). Kök hücre klinik çalışmalarından elde edilen başarısız sonuçlar araştırmacıları kök hücrelere

alternatif olabilecek kardiyovasküler yenileyici tıp araştırmalarına yönlendirmiştir (Ercan ve ark., 2018).

KKH bulunan bazı hasta alt grupları hiç bir revaskularizasyon yönteminden ve ilaç tedavisinden fayda görmemektedir. Örneğın, angina tanısıyla koroner anjiyografi yapılan hastalardan revaskularizasyon şansı olmayan hastaların oranı Avrupa’da %10 (Mannheimer ve ark., 2002) ve Amerika Birleşik Devletleri’nde %12 (Mukherjee ve ark., 1999) civarındadır. Bu hastalar için alternatif tedavi yöntemlerinden birisi de koroner kollateral damar gelişimini indükleyerek iskemik miyokart dokusunda perfüzyonun sağlanması amacıyla terapötik anjiyogenezin uyarılmasıdır (Rubanyi GM, 2013). Koroner kollateral damarlar miyokard dokusunun beslenmesi bozulduğı zaman tıkanıklığın distalinde miyokard perfüzyonunun sağlanması amacıyla o bölgeyi besleyen koroner arterin kendisinden ve/veya diğerkoroner arterlerden köken alan uyum sağlayıcı damarsal yapılar olarak tanımlanmaktadır (Cohen MV, 1978). İnsan ve hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda görülmüştür ki koroner arterlerdeki tıkanıklık sonrası ortaya çıkan miyokard iskemisi koroner kollateral dolaşımı arttırmaktadır. Koroner kollateral arterler anjiyogenez ve/veya arteriyogenez süreci ile oluşmaktadır (Kersten ve ark., 1999). Yapılan çalışmalar kronik stabil KAH hastalarının kollateral damar gelişiminden fayda gördüklerini, lakin gelişen kollateral damarların AKS hastalarında dokuyu beslemekte yetersiz kalabildiğini göstermiştir (Kurtul ve Ozturk, 2017). Koroner kalp hastalıklarında kollateral damar gelişimini indüklemek ve beslenemeyen dokunun beslenmesini sağlamak amacıyla terapötik anjiyogenezin uyarılması kardiyovasküler yenileyici tıp çalışmalarında test edilmiştir. Bu konu ile ilgili çalışmaların tarihçesi yaklaşık yirmi yıl öncesine dayanmaktadır ve sıklıkla VEGF, FGF gibi anjiyojenik protein, gen veya hücre uygulamalarına odaklanmıştır (Rubanyi GM, 2016). Terapötik anjiyogenez ve arteriyogenez gelişimi ile ilgili mekanizmalar günümüzde net olarak aydınlatılmıştır fakat yapılan bir çok klinik çalışmada etkinlik açısından herhangi bir fayda tespit edilememiştir (Ylä-Herttuala & Baker, 2017). Bu açıdan bakıldığında zaman, her ne kadar anjiyojenik süreçle ilgili birçok mekanizma aydınlatılmış olsa da mevcut moleküler ve hücresel mekanizmalar üzerinden geliştirilen ve potansiyel teşkil edebilecek gen, protein ve/veya hücre tedavilerinin klinik uygulanabilirlik

açısından kardiyovasküler yenileyici tıp bilimine katkısı çok fazla olmayacak gibi gözükmektedir. Bu yüzden, KAH hastalarında kollateral damar gelişimini sağlamak ve beslenemeyen dokunun beslenmesini sağlamak amacıyla kardiyovasküler yenileyici tıp bilimi ışığında yeni moleküllerin ve ajanların keşfedilmesi gerekmektedir.

Ranolazin molekülü ilk kez 2006 yılında İKH' da anginayı gidermek için onay almış piperazin türevi bir molekül olup, çok kısa sürede kardiyoloji kılavuzları tarafından önerilen güncel bir ilaç haline gelmiştir. Etki mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte yapılan son çalışmalar ışığında gösterilmiştir ki ilaç düşük konsantrasyonlarda (6 μ M) kardiyomiyositlerde geç sodyum kanal blokajı, yüksek konsantrasyonlarda ise (>10 μ M) ise yağ asidi oksidasyon inhibisyonu yapmaktadır (Makielski ve Valdivia, 2006 ve Özdemir M, 2016). Bunun yanında klinik çalışmalarda görülmüştür ki ilacın antianginal etkisinin yanında antidiyabetik etkinliği de mevcuttur (Morrow ve ark., 2009). Bu bilgilere ilave olarak, yapılan birçok çalışmada ilacın geç sodyum kanallarında inhibisyon yapmasına bağlı olabileceği düşünülen antiaritmik etkisi de bulunmaktadır (Pulford ve Kluger, 2016). İlacın prematüre ventriküler kompleks ve ventriküler taşikardi sıklığını azaltmadaki etkisi Yeung ve arkadaşları tarafından yapılan hasta serisi çalışmasında gösterilmiştir. Prematüre ventriküler kompleksleri olan altı hastada ranolazin aritmi sıklığını azaltmıştır. Ventriküler aritmiye bağlı kardiyomiyopatisi olan iki hastada ejeksiyon fraksiyonunda düzelme gözlenmiştir. Klas 3 antiaritmik tedaviye rağmen süregelen ventriküler taşikardileri olan iki hastada ranolazin ventriküler taşikardileri düzeltmiştir (Yeung ve ark., 2014). Kalp dokusu üzerindeki birbirinden bağımsız ve farklı mekanizmalar üzerinden seyreden bu farklı etkiler ranolazin molekülünün farklı dokularda gözlemlenebilir farklı etkilerinin olabileceği düşüncesine yol açmıştır. İn vivo olarak yapılan bir çalışmada, ranolazinin rat aortalarında vazodilatasyona sebep olduğu ve bu etkininin endotel mevcudiyetinden bağımsız olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (Paredes-Carbajal ve ark., 2013). Ranolazin molekülünün antidiyabetik etkinliğini araştırmak için yapılan bir in-vivo çalışmada, diyabetik farelerde ranolazinin pankreastaki beta hücrelerinin canlılıklarını korumaya yardımcı olduğu, apoptozisi inhibe ettiği ve insülin

sekresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Yazarlar bu çalışmada, ranolazine bağlı antidiyabetik etkinin potasyum kanal inhibisyonu üzerinden olabileceğini savunmuşlardır (Ning ve ark., 2011). Ranolazin molekülünün santral sinir sistemi hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir in-vitro çalışmada, ranolazinin astrosit hücrelerinde canlılığı arttırdığı, nekrozu ve apoptozisi önlediği, inflamatuvar süreci inhibe ettiği ve antiinflamatuvar ve antioksidan proteinlerin salınımını arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, çalışmanın yazarları ranolazinin santral sinir sisteminde nöroprotektif bir ajan olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (Aldasoro ve ark., 2016). Meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada 300 µM ranolazinin meme kanseri hücrelerinin invazyonunu sodyum kanal blokajı yaparak engellediği gösterilmiştir (Djamgoz ve Onkal, 2013). Ranolazinin bazı genetik epilepsi türleri ve ailesel hemiplejik migren olgularında faydalı olabileceği yapılan klinik öncesi çalışmalarda gösterilmiştir (Anderson ve ark., 2014 ve Kahlig ve ark., 2010). Ayrıca in-vivo olarak yürütülen bir çalışmada, farelere yüksek doz ranolazin (30 mg/kg) uygulanması neticesinde neoplastik lezyonların geliştiği saptanmıştır (Suckow ve ark., 2004). Mevcut literatür bilgileri ışığında, ranolazinin gerek kalpteki etki mekanizması gerekse diğer dokulardaki etkisi açısından değerlendirildiğinde molekül halen gizemini koruyan bir ajandır. Ayrıca literatürde molekülün endotel hücreleri üzerindeki etkisini araştıran in-vitro ve/veya in-vivo temelli çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber molekülün anjiyogenez üzerindeki etkisi hakkında literatürde hiçbir bilgi bulunmamaktadır. Böyle bir etkinin gösterilmesi, kalp hastalarında bu ilacın antianginal amaçlı kullanımının yanında anjiyogenik bir ajan olarak kullanılabileceği yönünde fikir verecektir. Bu bağlamda, tez çalışmasında ranolazinin İKAEH üzerindeki etkisini ve anjiyogenik süreci in-vitro şartlarda araştırmayı amaçladık. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre ranolazinin İKAEH' lerinde klinik kullanım için onay almış dozlarda ve klinikte kullanılan dozlardan çok daha yüksek dozlarda herhangi bir sitotoksik etkisi bulunmamaktadır. Bununla beraber, ranolazin molekülü artan konsantrasyonlarla paralel olarak matrijel membranda hücrelerin tüp oluşumunu arttırmaktadır fakat yapılan biyokimyasal analizlerde hücrelerin VEGF salınımında herhangi bir artış tespit edilememiştir.

Tez çalışmasında test edilmesi planlanan ranolazin dozlarına literatürde daha önce çalışılmış ranolazin dozları araştırılarak karar verilmiştir. Ranolazinin hücre içerisinde metabolik modülatör olmasından ziyade farklı etkileri olabileceğine dair sonuçlar belirten ilk çalışmada ratlardan elde edilen kardiyomiyositlerde, ranolazin 0.1-300 μ M aralığında değişen dozlarda çalışılmıştır (MacInnes ve ark., 2003). Teruzzi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ranolazinin iskelet kası hücrelerinde farklılaşma süreci ve oksidatif parametreler üzerine etkisi araştırıldı. Çalışma için yapılan ön hazırlık çalışmalarında, in-vitro tedavi için 10 μ M ranolazin dozu efektif olarak bulundu ve iskelet kası hücreleri 10 μ M ranolazin ile muamele edildi. Çalışma sonucunda ranolazinin kalsiyum sinyal yolağı üzerinden iskelet kası hücrelerinde miyogenezi stimule ettiği ve oksidatif stresi/inflamasyonu azalttığı gösterildi (Teruzzi ve ark., 2017). Strege ve arkadaşları, ranolazinin atriyal kardiyomiyosit elektrofizyolojisi üzerindeki etkilerini araştırmak için bu çalışmalarda ana model olan HL-1 hücre hattını kullandılar. Çalışma öncesinde bir doz çalışması yapmadılar. Ama daha önceki yapılan benzer çalışmaları göz önünde bulundurarak, 50 μ M ranolazinin HL-1 hücrelerinde aksiyon potansiyelindeki akım stresine bağlı oluşan değişiklikleri inhibe ettiğini in-vitro olarak gösterdiler (Strege ve ark., 2012). Beyder ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, ranolazinin voltaj bağımlı sodyum kanallarının mekanosensitivitesine olan etkisini miyosit ve HEK hücrelerinde in-vitro koşullarda araştırdılar. Bu çalışmada ranolazinin voltaj bağımlı sodyum kanallarında mekanik etkilere olan duyarlılığı inhibe ettiğini gösterdiler. 10, 50, 100 ve 300 μ M ranolazin dozlarında yapılan potens çalışmasında 53.6 μ M dozun en duyarlı doz olduğunu gösterdiler. Yazarlara göre bu doz, molekülün kabul edilen plazma konsantrasyonundan beş kat daha fazla ve bu durumun iki tane sebebi olabilir. İlki kanalların in situ ortamdaki gerçek çevresini bilmememiz ve ikincisi ise molekülün membran konsantrasyonun plazma konsantrasyonundan farklı olabileceğidir (Beyder ve ark., 2012). Astrositler ve nöronların primer kültürü sonrası yapılan bir başka çalışmada, ranolazin 0.1, 1 ve 10 μ M dozlarında çalışıldı. Araştırmacılar çalışmaya başlarken bir doz-yanıt çalışması yapmadılar lakin bu dozlar genel olarak literatürde çalışılan dozlardan ve ranolazinin klinik kullanım onayı almış dozlarından düşük seviyededir (Aldasoro ve ark., 2016). El-Battrawy ve arkadaşları, hiperterminin sodyum kanal blokajı yapan ilaçlara olan etkisini

insandan izole edilmiş uyarılmış pluripotent kök hücrelerinden elde edilen kardiyomiyositler üzerinde çalıştılar. Çalışmada belirtilen bir doz çalışması olmamasına rağmen araştırmacılar ranolazin için 10 ve 100 μM dozlarını seçtiler (El-Battrawy ve ark., 2016). Tavşan ventrikülünden elde edilen kardiyomiyositlerle yapılan in-vitro çalışmada, ranolazinin 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100, 300 ve 900 μM dozlarındaki kanal blokajı etkisine bakılmış olup 6 μM dozunda geç sodyum, 12 μM dozunda potasyum, 50 μM dozunda geç kalsiyum, 91 μM dozunda sodyum ve kalsiyum, 296 μM dozunda ise kalsiyum kanal blokajı yaptığı gösterilmiştir (Antzelevitch ve ark., 2004). Paylaşılan mevcut literatür bilgileri ışığında biz de tez çalışmasında, ranolazinin İKAEH üzerindeki olası sitotoksik etkisini değerlendirebilmek amacıyla çok geniş bir doz aralığında çalışmaya karar verdik ve 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 μM ranolazin konsantrasyonlarının İKAEH' leri üzerindeki etkisini test ettik. Proliferasyon ve sitotoksikite çalışmalarından sonra matrijel tüp oluşumu testi ve VEGF seviyelerinin analiz edilmesi deneylerinde ise 50 ve 200 μM ranolazin dozları ile çalışmayı planladık.

Tez çalışmasında, İKAEH' nin ranolazin ile muamele edildikten sonra proliferasyon kapasitesini ve ranolazinin olası sitotoksik etkisini analiz etmek için eş zamanlı hücre analizine imkan veren xCELLigence RTCA SP sistemi kullanıldı. xCELLigence sistemi ile hücre işaretlemesine gerek olmadan elektronik plakaların zeminine yerleştirilmiş mikroelektrolatlar sayesinde elektriksel empedans ölçümü yapılır. Empedans ölçümü ile hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil olmak üzere hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif veri elde edilir. Bu yöntemin avantajları arasında hücresel değişimleri eş zamanlı izleme imkanı vermesi, işaretleyici bir boyaya ya da moleküle gerek olmaması, standart hata, minimum ve maksimum konsantrasyonu, %50 inhibisyon konsantrasyonu gibi değerler hakkında bilgi vermesi bulunmaktadır. Süspansiyon kültürlerinde etkili bir yöntem olmaması, elektronik plakaların tek kullanımlık ve pahalı olması sistemin kısıtlılıklarından bazılarıdır (Ke ve ark., 2011). Günümüzde proliferasyon ve sitotoksikiteyi değerlendiren yöntemlerin birçoğu plazma membranındaki permabilite değişikliklerini esas alarak ve/veya hücrelerin tetrazolyum tuzu ile muamele edilmesi neticesinde kolorimetrik ve spektrofotometrik ölçüm yapılması

esaslarına dayanmaktadır. Bu yöntemler her ne kadar literatürde sıklıkla kullanılsa da bu testlerde hücreler başlangıç aşamasında zarar gördüğü için tek bir değerlendirme yapılabilir ve hücreler tekrar kullanılamaz. Ayrıca hücre zarının özelliklerinden etkilenmesi, analizlerin belirli zaman aralıklarında yapılabilmesi ve hücre canlılığın erken dönemde değerlendirilememesi bu yöntemlerin kısıtlılıklarındandır. Diğer yöntemlerdeki var olan bu kısıtlılıklar ve xCELLigence sisteminin avantajları da göz önünde bulundurularak tez çalışmasında hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksite analizleri için xCELLigence sisteminin kullanılması planlandı.

Anjiyogenez deneylerinde yüksek spesifitesi nedeniyle önemli bir yer tutan matrijel bazal membran matriks tüp oluşum deneyi, hücre dışı matriks proteinlerinden zengin bir tümör olan fare sarkomalarından elde edilen bir maddedir. Ana bileşenlerini genel olarak kollajen 4, heparan sülfat proteoglikanları, entaktin ve nidojen oluşturur. Ayrıca matrijel matriksi tümör büyüme faktörü- β , FGF, doku plazminojen aktivatorü gibi büyüme faktörlerinden zengindir. Matrijel bazal membran matriks tüp oluşum deneyi anjiyogenezin en önemli in-vitro göstergesi olmasına rağmen fibroblast gibi endotel dışı hücrelerinde tüp oluşturma kapasitesi göstermesi deneyin en önemli kısıtlılıklarından biridir (Auerbach ve ark., 2003). Biz de tez çalışmasında ranolazinin İKAEH üzerindeki anjiyogenik sürece etkisini değerlendirmek için matrijel tüp oluşum deneyini yaptık ve hücrelerin artan dozlarla uyumlu olarak tüp oluşturma sürecinde artış tespit ettik. Fakat bu sonuçları ELISA deneyinde VEGF salınım miktarları ile doğrulayamadık. Bu sebepten dolayı tez çalışmasındaki mevcut sonuçlarla ranolazinin endotel hücrelerinde anjiyogenik bir etkisi olduğunu söylemek mümkün olamamaktadır.

Kardiyovasküler farmakoloji araştırmalarında anjiyogenez önemli bir yer tutmaktadır ve kardiyovasküler ilaçların anjiyogenik süreçlere olan etkisi hem endotel hücrelerinde hem de başka hücre tiplerinde yapılan literatür çalışmalarında gösterilmiştir. Bununla beraber, bazı ajanların anjiyogenez inhibe edici özellik göstermesi kardiyovasküler alanda kullanılan bazı ilaçların tümör büyümesini engelleme amacıyla kullanımını gündeme getirmiştir. Selektif olmayan bir beta bloker olan propranololun, in-vitro koşullarda İÜVEH'lerinde doz bağımlı olarak

proliferasyonu, kemotaktik motiliteyi ve matrijel membranda kapiller benzeri tüp oluşturma kapasitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada yazarlar kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir yeri olan propranololun anjiyogenezis ile seyreden hastalıklarda kullanılabileceğini önermişlerdir (Lamy ve ark., 2010). Beyin mikrovasküler endotel hücreleri ile yapılan bir başka in-vitro çalışmada, propranololun matrijel membranda tüp oluşturma kapasitesini ve matriks metalloproteinaz protein-9 sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Anabi ve ark., 2009). İn-vitro koşullarda yapılan bu çalışmalar, propranololun kanser hastalarında antianjiyogenik bir ajan olarak kullanılabilecek bir ajan olduğunu düşündürmektedir. Nitekim kanser hücrelerindeki bu antianjiyogenik etki literatürde farklı beta bloker tipleri ve farklı kanser hücreleri üzerinde gösterilmiştir (Ding ve ark., 2015; Hajighasemi ve Hajighasemi, 2009 ve Pasquier ve ark., 2013). Beta bloker ajanların in-vitro anjiyogenik etkisinin yanında in-vivo koşullardaki anjiyogenik aktivitesi yapılan hayvan modeli çalışmalarında araştırılmıştır. Selektif bir beta bloker ajan olan atenololun, MI geçirmiş ratlarda koroner arteriol gelişimini arttırtarak kan akımını arttırdığı yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Dedkov ve ark., 2005). MI geçirmiş ratlarla yapılan bir başka çalışmada da bir önceki çalışmaya benzer olarak kalp hızını düşüren metoprolol ve ivabradin gibi ajanların kalpte anjiyogenez sürecini hızlandırdığı, Ulu ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Ulu ve ark., 2009). Le ve arkadaşları tarafından yapılan kronik iskemik kardiyomiyopatili tavşan modeli çalışmasında, karvedilol metoprolole göre daha fazla antiinflamatuvar ve anjiyogenik etki gösteren bir ajan olarak bulunmuştur (Le ve ark., 2013). Kalsiyum kanal blokeri olan ve klinikte antihipertansif ajan olarak kullanılan nifedipinin İKAEH'lerinde tüp oluşumunu arttırdığını ve bunun artan VEGF sentezinin KDR/Flk-1/NO yolağını aktive etmesi sonucu oluştuğu gösterilmiştir (Miura ve ark., 2005). İKAEH ile yapılan başka bir in-vitro çalışmada ise oksidasyona uğramış düşük yoğunluklu kolesterolün, düşük konsantrasyonlarda anjiyogenezi indüklediği ve PI3K/Akt/eNOS yolağı üzerinden nitrik oksit sentezini aktive ettiği gösterilmiştir (Yu ve ark., 2011). İUVEH hattı ile yapılan bir in-vitro çalışmada, voltaj bağımlı sodyum kanallarının anjiyogenez fonksiyonunu sürdürmede önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Andrikopoulos ve ark., 2011). Daha önceki yapılan çalışmalardan bilinmektedir ki düşük dozlardaki ranolazin, kardiyomiyositlerde geç sodyum

kanalları üzerinde selektif ve kuvvetli bir blokaj aktivitesi göstermektedir fakat ranolazinin hücre içerisinde farklı dozlarda farklı etkileri de mevcuttur. Fakat ranolazinin anjiyogenik sürece olan etkisine dair literatürde yayımlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, ranolazinin İKAEH hattı üzerinde proliferasyon, sitotoksosite ve anjiyogeneze üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmalar göstermektedir ki ranolazin doz bağımlı olarak ve 12. saate kadar İKAEH' lerinde tüp oluşum sürecini arttırmıştır. Fakat biyokimyasal ölçümlerde, hücre besiyerlerinde VEGF miktarının zamanla artmaktan ziyade azaldığı tespit edilmiştir. Her ne kadar matrijel bazal membran matriks deneyinde tüp oluşumunda artış gözlenmiş olsa da bu sonuçların artmış anjiyogenik aktivite lehine yorumlanması mevcut bulgularla uygun gözükmemektedir. Nitekim matrijel tüp oluşumu çalışmalarında bilinmektedir ki fibroblast gibi endotel dışı hücreler dahi tüp oluşumu gösterebilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir yeri olan ranolazin molekülünün farklı dozlarda İKAEH hattı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ranolazin KKH' da kullanılmak amacıyla geçmiş yıllarda kullanım onayı almış yeni bir antianginal ajandır. Hücresel seviyedeki etki mekanizmasında doz bağımlı çeşitlilik olması, farklı dokularda alınan farklı lokal ve sistemik yanıtlar ranolazin molekülünü daha da ilgi çekici hale getirmiştir. İlacın kardiyovasküler hastalıklarda sonlanım noktalarını düzeltmesinin yanında klinik öncesi hayvan deneylerinde ve insan çalışmalarında gösterilmiş bir antidiyabetik ve antiaritmik etkinliği mevcuttur. Ayrıca sinir hücrelerinde ve pankreas dokusunda gösterilmiş antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkisi mevcuttur. Bununla beraber, ilacın bazı migren ve epilepsi türlerinde faydası olabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır. Fakat ilacın yenileyici tıp biliminde kullanım alanı kısıtlı olup bu konu ile ilgili bugüne kadar yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda bu tez çalışması literatürde bulunan bir açığın kapatılmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca literatürde, ranolazinin endotel hücreleri üzerindeki etkisiyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla tez çalışmasında ranolazin molekülünün İKAEH üzerindeki etkisinin araştırılması planlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında öncelikle ticari olarak temin edilen İKAEH hattı kültüre edilerek yeterli sayıda çoğaltıldı. Ticari olarak temin edilen ranolazin molekülü, çalışılması planlanan konsantrasyonlarda seyreltilerek porsiyonlara ayrıldı. Tez çalışmasında araştırılması planlanan ranolazin konsantrasyonlarına literatürde bulunan önceki çalışmalar değerlendirilerek karar verilmiştir. Tez çalışmasında ranolazinin İKAEH üzerindeki proliferasyon ve sitotoksikite yanıtını değerlendirmek amacıyla eş zamanlı hücre analizine imkan veren xCELLigence RTCA sistemi kullanıldı. Test edilen hiç bir dozda (0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM) ranolazinin hücrelere sitotoksik bir etkisinin bulunmadığı gösterildi ve hücrelerin çoğalma kapasitesi farklı dozlarda değişmedi.

Matrijel tüp oluşumu testi in-vitro anjiyogenezin en önemli göstergelerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Bu amaçla tez çalışmasında, İKAEH' leri matrijel membrana ekildi ve belirlenmiş iki dozda (50 ve 200 μ M) ranolazin ortama eklenerek hücreler 16 saat boyunca gözlemlendi. Belirli zaman aralıklarında ışık mikroskopuyla hücrelerin resmi çekildi. Bulgular yorumlandığında 50 μ M ve 200 μ M ranolazinin endotel hücrelerinde negatif kontrol grubuna kıyasla tüp oluşum kapasitesinde artışa sebep olduğu tespit edildi. Ayrıca bu etki 200 μ M ranolazin içeren hücre grubunda 50 μ M ranolazin grubuna göre anlamlı olarak daha fazlaydı. Ranolazinin İKAEH' lerinde tüp oluşturma kapasitesinde artışa sebep olması yani anjiyogenez sürecini arttırması ilk defa yapılan tez çalışması ile gösterilmiştir.

Anjiyogenezin biyokimyasal olarak en önemli göstergesi VEGF molekülüdür. Tez çalışmasında hücre besiyerlerine salınan VEGF miktarı ELISA yöntemi kullanılarak belirlendi. Matrijel tüp oluşumu deneyi ile uyumlu olması için aynı dozlar çalışıldı. Ranolazin ile kültüre edilen hücrelerden 12, 24 ve 48. saatlerde örnekler alındı ve ELISA metodu ile VEGF seviyeleri çalışıldı. Bulgular yorumlandığında, ranolazin molekülünün İKAEH' lerinde dozlardan bağımsız olarak VEGF salımını arttırmadığı tespit edildi.

Ranolazin molekülünün İKAEH hattı üzerinde çok yüksek dozlarda dahi toksik etkisi bulunmamaktadır. Matrijel membranda her ne kadar tüp oluşturma kapasitesinde artış gözlemlense de VEGF seviyelerinde bir artış gözlemlenmemiş olması ilacın anjiyogenezis etkisi bulunabileceğine dair yorum yapılmasını destekleme noktasında yetersiz kalmaktadır. Bu bilgiler ışığında gelecekte yapılması planlanan diğer çalışmalar ve öneriler bir alt başlık altında aşağıda tartışılmıştır.

1. Tez çalışması kapsamında ranolazin etkisi araştırılan İKAEH' lerinin, hipoksiye veya hiperglisemiye maruz bırakılarak hücrelerin patolojik koşullardaki ranolazin yanıtının değerlendirilmesi planlanmaktadır.

2. Anjiyogenik aktiviteyi değerlendirmek için çalışılan ranolazin dozlarının genişletilerek daha geniş bir doz spektrumunda ve büyüme faktörü azaltılmış matrijel matriks membran üzerinde yanıtın incelenmesi planlanmaktadır.

3. Endotel hücre kültürü için standart olarak kabul edilen İUVEH hattında ve kök hücrelerde ranolazinin etkilerinin araştırılması hedeflenmektedir.

4. Proliferasyon ve sitotoksisite analizlerinin yanında hücre içi yangı ve programlı ölüm süreçlerinin araştırılması hedeflenmektedir.

5. Anjiyogenez süreci ile ilgili biyokimyasal analizlerin FGF, HGF gibi faktörlerin de araştırılarak genişletilmesi planlanmaktadır.

6. İn-vitro çalışmalarda elde edilen sonuçların in-vivo çalışmalarla desteklenerek ranolazinin anjiyogenezi uyarmak amaçlı olası bir klinik kullanım potansiyelinin araştırılması planlanmaktadır.

ÖZET

Ranolazinin İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İn-vitro Şartlarda Araştırılması

Kardiyovasküler hastalıklar, tüm dünyada ve Türkiye’ de önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Tanısal süreçte ve tedavi noktasında ciddi gelişmeler olsa da bu hastaların birçoğu kronik stabil angina pectoris ve kalp yetmezliği ile yaşamlarını idame ettirmeye devam etmektedir. Yaşam kalitesini bozan ve ölüm riskini arttıran bu durumu düzeltmek için değişik mekanizmalar üzerinden etki eden antianginal ilaçlar sıklıkla kullanılmaktadır. İlaç kullanımının yanında, bu hastalar için araştırma aşamasında olan alternatif hücresel tedavi yöntemlerinden birisi de koroner kollateral damar gelişimini uyararak iskemik miyokard dokusunda terapotik anjiyogenezi uyarmaktır. Bu konudaki çalışmalar daha çok anjiyojenik protein, gen veya hücre uygulamalarını içerse de bu konu ile ilgili yapılmış klinik çalışmalarda net bir klinik fayda gösterilememiştir. Oral yoldan etkili olan ranolazin, kronik stabil angina pectoris hastalarının kullanımı için ilk kez 2006 yılında kullanım onayı almıştır. Molekülün etki mekanizmasına dair yapılan çalışmalarla, molekülün miyokard hücresi içinde yağ asidi oksidasyonunu inhibe ettiğini göstermiş ve bu yüzden geçmişte ‘metabolik modölatör’ olarak değerlendirilmiştir. Fakat daha sonradan yapılan in-vitro ve in-vivo çalışmalar göstermiştir ki ilacın antianginal etkisi hücre içindeki metabolik değişimden ziyade iskemi sırasında daha da aktifleşen geç sodyum kanallarının inhibisyonu ile olmaktadır. Molekül, terapotik aralığın üzerindeki dozlarda hücre içinde yağ asidi oksidasyonunu inhibe ederek metabolik modölatör aktivite sergilemekte, terapotik sınırdaki dozlarda ise geç sodyum kanal akımında selektif ve kuvvetli bir inhibisyon etkisi göstermektedir. Yapılan klinik çalışmalarda, ilacın antianginal etkinlik göstermesinin yanında hastalarda diyabet parametrelerinde düzelme gösterilmiştir. Bu etki klinik çalışmaların yanında hem in-vitro hem de in-vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Bunun yanında, klinik çalışmalarda gösterilmiş olan anti-aritmik bir etki de mevcuttur. İlacın hem ventriküler hem de atriyal aritmileri iyileştirdiğine dair literatürde yapılmış birçok çalışma ve olgu serileri mevcuttur. Ayrıca ilacın pankreas hücrelerinde ve sinir hücrelerinde anti-inflamatuar ve anti-apoptotik bir etkinliği olduğu gösterilmiştir. Fakat literatürde ilacın endotel hücreleri üzerindeki etkinliği ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ranolazinin in-vitro koşullarda insan koroner arter endotel hücreleri (İKAEH) üzerindeki etkisi araştırılması amaçlandı.

Bu çalışmada öncelikle İKAEH in-vitro kültür ortamında çoğaltıldı. Çoğaltılan hücreler xCELLigence RTCA sistemi kullanılarak son konsantrasyonları 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM olacak şekilde ranolazin ile muamale edildi ve hücrelerin proliferasyon ve sitotoksite yanıtları 96 saat boyunca gözlemlendi. Ardından in-vitro anjiyogenezi test etmek için matrijel tüp formasyonu testi yapıldı. İKAEH matrijel membrana ekildikten sonra son konsantrasyonları 50 ve 200 µM olacak şekilde ranolazin ile muamale edildi ve 4, 8, 12 ve 16. saatlerde invert mikroskop kullanılarak resimleri çekildi. Faz-kontrast görüntüleri Wimasis Image Analysis programı kullanılarak değerlendirildi. Anjiyogenezin biyokimyasal göstergesi olarak vasküler endotelyal growth faktör (VEGF) seviyeleri ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Son konsantrasyonları 50 ve 200 µM olacak şekilde inkübe edilen insan koroner arter endotel hücrelerinin besiyerlerinden 12, 24 ve 48. saatlerde örnek alındı ve ELISA yöntemi ile VEGF miktarları tespit edildi.

Çalışmanın sonucunda test edilen hiçbir ranolazin dozunda proliferasyonda artış ve/veya sitotoksik etki gözlemlenmedi. Ranolazin içermeyen hücre grubuna kıyasla ranolazin içeren hücre grubunda tüp oluşum kapasitesinde artış tespit edildi. Tüp oluşum kapasitesi 200 µM ranolazin içeren grupta 50 µM ranolazin içeren gruba göre anlamlı olarak daha yüksekti. ELISA testinde ise 12, 24 ve 48. saatlerdeki VEGF ölçümlerinde herhangi bir artış tespit edilmedi. Sonuç olarak bu tez çalışmasında gösterilmiştir ki ranolazin molekülünün endotel hücreleri üzerinde çok yüksek dozlarda dahi toksik etkisi bulunmamaktadır. Matrijel membranda her ne kadar tüp oluşturma kapasitesinde artış gözlemlense de, VEGF seviyelerinde bir artış gözlemlenmemiş olması ilacın İKAEH' de anjiyogenez etkisi bulunabileceğine dair yorum yapılmasını destekleme noktasında yetersiz kalmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Ranolazin, İnsan Koroner Arter Endotel Hücresi, Anjiyogenez



SUMMARY

The Investigation of The Effects of Ranolazine on Human Coronary Artery Endothelial Cells Under In-vitro Conditions

Cardiovascular diseases continue to be an important health problem both in the whole world and Turkey. Although there are serious developments in the diagnostic processes and treatment modalities, most of these patients keep on to suffer from chronic stabile angina pectoris and heart failure. Antianginal medications, which have different mechanisms of action, are widely used to ameliorate this situation, which disrupts quality of life and increases risk of mortality. In addition to medical therapies, there are alternative approaches under investigation to help these patients such as therapeutic angiogenesis, which aims to facilitate the growth of coronary collateral vessels in the ischemic myocardium. These approaches mainly include angiogenic protein, gene and cell therapies although no clinical benefit has been shown in the clinical trials until today. Ranolazine, which is orally effective, has been approved for clinical usage in chronic stabile angina patients first in 2006. Studies aiming to investigate the mechanism of action showed that ranolazine inhibits free fatty acid oxidation in the cytoplasm of cardiomyocyte and the drug has been considered as a 'metabolic modulator' at that time. Subsequently in-vitro and in-vivo studies showed that, the antianginal mechanism of the drug is the inhibition of the late sodium channels, which are more activated during ischemia, instead of a metabolic ex-change in the cytoplasm. Molecule inhibits free fatty acid oxidation above the therapeutic doses but inhibits late sodium currents very strongly and specifically within therapeutic limits. In the clinical trials performed, it has been shown that the drug has anti-diabetic effects in addition to its antianginal effects. This effect has also been proven in in-vitro and in-vivo studies. In addition, there is an antiarrhythmic effect, which has been demonstrated in the clinical trials. There are a lot of studies and case series in the literature demonstrating the effectiveness of the drug on atrial and ventricular arrhythmias. Besides, ranolazine has been found to demonstrate anti-inflammatory and anti-apoptotic activity in neural and pancreatic cells. But there is no study in the literature about the effects of the drug on endothelial cells. In this study, it is aimed to investigate the effects of ranolazine on human coronary artery endothelial cells (HCAECs) under in-vitro conditions.

In this study, firstly HCAECs were expanded under in-vitro conditions. By xCELLigence RTCA system, expanded cells were treated with a final concentration of 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 μ M ranolazine to evaluate the potential effects on proliferation and cytotoxicity and cells were observed for 96 hours. Then matrigel tube formation test was applied to test the in-vitro angiogenesis. After HCAECs were embedded to matrigel membrane, cells were treated with a final concentration of 50 and 200 μ M ranolazine and at 4th, 8th, 12th and 16th hours pictures were obtained by inverted microscope. Phase-contrast micrographs were evaluated by WImasis Image Analysis program. As a biochemical indicator of angiogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF) levels were quantified by ELISA method. From the medium of cells treated with a final concentration of 50 and 200 μ M ranolazine, samples were taken at 12th, 24th and 48th hours and VEGF levels were evaluated by ELISA method.

As a result of the study, there was no increase in the proliferation and/or cytotoxic effect of ranolazine at all tested concentrations. Compared to cells without ranolazine, there was an increase in the tube formation capacity of cells treated with ranolazine. Tube forming

capacity was higher in cells treated with 200 μ M ranolazine compared to cells treated with 50 μ M ranolazine. In the ELISA analysis, there was no increase in VEGF levels at 12th, 24th and 48th hours. As a result, it was demonstrated in this study that ranolazine molecule does not have cytotoxic effects on endothelial cells even in very high doses. Although there was an increase in the tube forming capacity of cells in matrigel membrane assay, the fact that there was no increase in VEGF levels limits the support the suggestion that the drug may have angiogenic effects on HCAECs.

Keywords: Ranolazine, Human Coronary Artery Endothelial Cell, Angiogenesis



KAYNAKLAR

- ABUBAKAR I, TILLMAN T, BANERJEE A (2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, **385**: 117-171.
- ALDASORO M, GUERRA-OJEDA S, AGUIRRE-RUEDA D, MAURICIO MD, VILA JM, MARCHIO P, IRADI A, ALDASORO C, JORDA A, OBRADOR E, VALLES SL (2016). Effects of ranolazine on astrocytes and neurons in primary culture. *PLoS One*, **11**: e0150619.
- ANDERSON JR, NAWARSKAS JJ (2005). Ranolazine*: A Metabolic Modulator for the Treatment of Chronic Stable Angina. *Cardiology in Review*, **13**: 202-210.
- ANDERSON LL, THOMPSON CH, HAWKINS NA, NATH RD, PETERSOHN AA, RAJAMANI S, BUSH WS, FRANKEL WN, VANOYE CG, KEARNEY JA, GEORGE AL (2014). Antiepileptic activity of preferential inhibitors of persistent sodium current. *Epilepsia*, **55**: 1274-1283.
- ANDRIKOPOULOS P, FRASER SP, PATTERSON L, AHMAD Z, BURCU H, OTTAVIANI D, DISS JKJ, BOX X, ECCLES SA, DJAMGOZ MB (2011). Angiogenic functions of voltage-gated Na⁺ channels in human endothelial cells: modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signalling. *Journal of Biological Chemistry*, **286**: 16846-16860.
- ANNABI B, LACHAMBRE MP, PLOUFFE K, MOUMDJIAN R, & BELIVEAU R (2009). Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacological research*, **60**: 438-445.
- ANTZELEVITCH C, BELARDINELLI L, ZYGMUNT AC, BURASHNIKOV A, DI DIEGO JM, FISH JM, CORDEIRO JM, THOMAS G (2004). Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation*, **110**: 904-910.
- ARSLAN M, ATMACA A, AYVAZ G, BAŞKAL N, BEYHAN Z, BOLU E, ... & DEMIRAĞ NG (2009). METABOLİK SENDROM KILAVUZU.
- ATEŞ U (2016). Kök hücreyi tanıyalım. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi*, **1**: 19-28.
- AUERBACH R, LEWIS R, SHINNERS B, KUBAI L, AKHTAR N (2003). Angiogenesis assays: a critical overview. *Clinical chemistry*, **49**: 32-40.
- BAIGENT C, KEECH A, KEARNEY PM, BLACKWELL L, BUCK G, POLLICINO C, KIRBY A, SOURJINA T, PETO R, ... & CHOLESTEROL TREATMENT

- TRIALISTS COLLABORATORS (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *The Lancet*, **366**: 1267-1278.
- BAZZANO LA, HE J, MUNTNER P, VUPPUTURI S, WHELTON PK (2003). Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Annals of Internal Medicine*, **138**: 891-897.
- BEHFAR A, CRESPO-DIAZ R, TERZIC A, GERSH BJ (2014). Cell therapy for cardiac repair—lessons from clinical trials. *Nature Reviews Cardiology*, **11**: 232-246.
- BELARDINELLI L, SHRYOCK J, FRASER H (2006). Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart*, **92**: 6-14.
- BELTRAMI AP, BARLUCCHI L, TORELLA D, BAKER M, LIMANA F, CHIMENTI S, ... & ANVERSO P (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, **114**: 763-776.
- BEYDER A, STREGE PR, REYES S, BERNARD CE, TERZIC A, MAKIELSKI J, ACKERMAN MJ, FARRUGIA G (2012). Ranolazine decreases mechanosensitivity of the voltage-gated sodium ion channel NaV1. 5: a novel mechanism of drug action. *Circulation*, **125**: 2698-2706.
- BOLLI R, CHUGH AR, D'AMARIO D, LOUGHRAN JH, STODDARD MF, IKRAM S, BEACHE GM, WAGNER SG, LERI A, ... & ANVERSO P (2011). Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*, **378**: 1847-1857.
- BREWER HB (2004). Increasing HDL cholesterol levels. *New England Journal of Medicine*, **350**: 1491-1494.
- BUCHER HC, HENGSTLER P, SCHINDLER C, GUYATT GH (2000). Percutaneous transluminal coronary angioplasty versus medical treatment for non-acute coronary heart disease: meta-analysis of randomised controlled trials. *Bmj*, **321**: 73-77.
- BUGAN B (2013). Risk factors for coronary artery disease. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, **5**: 159-163.
- CAMBRIA E, PASQUALINI FS, WOLINT P, GÜNTER J, STEIGER J, BOPP A, HOERSTRUP SP, EMMERT MY (2017). Translational cardiac stem cell therapy: advancing from first-generation to next-generation cell types. *NPJ Regenerative medicine*, **2**: 17.
- CAN Z, ADANALI G, YILMAZ S (1997). Doku kültürü. *Türkiye Tıp Dergisi*, **4**: 53-57.
- CHAITMAN BR (2006). Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions. *Circulation*, **113**: 2462-2472.

- CHAITMAN BR, PEPINE CJ, PARKER JO, SKOPAL J, CHUMAKOVA G, KUCH J, WOLFF AA, CARISA INVESTIGATORS (2004). Effects of ranolazine with atenolol, amlodipine, or diltiazem on exercise tolerance and angina frequency in patients with severe chronic angina: a randomized controlled trial. *Jama*, **291**: 309-316.
- CHAITMAN BR, SKETTINO SL, PARKER JO, HANLEY P, MELUZIN J, KUCH J, PEPINE CJ, WANG W, NELSON JJ, HEBERT DA, WOLFF AA, MARISA INVESTIGATORS (2004). Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina. *Journal of the American College of Cardiology*, **43**: 1375-1382.
- COHEN MV (1978). The functional value of coronary collaterals in myocardial ischemia and therapeutic approach to enhance collateral flow. *Am Heart J*, **95**: 396-404.
- DALY C, NORRIE J, MURDOCH DL, FORD I, DARGIE HJ, FOX K, & TIBET STUDY GROUP (2003). The value of routine non-invasive tests to predict clinical outcome in stable angina. *European heart journal*, **24**: 532-540.
- DAVIGNON J, GANZ P (2004). Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, **109**: 27-32.
- DEDKOV EI, CHRISTENSEN LP, WEISS RM, TOMANEK RJ (2005). Reduction of heart rate by chronic β 1-adrenoceptor blockade promotes growth of arterioles and preserves coronary perfusion reserve in postinfarcted heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **288**: 2684-2693.
- DEMİRDÖĞEN B, ELÇİN AE, ELÇİN YM (2010). Neovascularization by bFGF releasing acid-gelatin microspheres: in-vitro and in-vivo studies. *Growth Factors*, **28**:426-436.
- DENİZ GÇ, GÜMÜŞ F, AKAR AR, DURDU S (2015). Damar Doku Mühendisliği. *Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics*, **8**: 49-54.
- DING Q, TIAN X, LI Y, WANG Q, ZHANG C (2015). Carvedilol may attenuate liver cirrhosis by inhibiting angiogenesis through the VEGF-Src-ERK signaling pathway. *World Journal of Gastroenterology*, **21**: 9566-9576.
- DJAMGOZ MB, ONKAL R (2013). Persistent current blockers of voltage-gated sodium channels: a clinical opportunity for controlling metastatic disease. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, **8**: 66-84.
- DOGAN A, PARMAKSIZ M, ELÇİN AE, ELÇİN YM (2016). Extracellular matrix and regenerative therapies from cardiac perspective. *Stem Cell Reviews*, **12**: 202-213.
- DOGAN A, ELCIN AE, ELCIN YM (2017). Translational applications of tissue engineering in cardiovascular medicine. *Current pharmaceutical design*, **23**: 903-914.

- DOUGLAS PS, GARCIA MJ, HAINES DE, LAI WW, MANNING WJ, PATEL AR, PICARD MH, POLK DM, RAGOSTA M, WARD RP, WEINER RB (2011). ACCF/AHA/ASNC/HFSA/HRS/SCAI/SCCM/SCCT/SCMR 2011 appropriate use criteria for echocardiography: a report of the American College of Cardiology Foundation Appropriate Use Criteria Task Force, American Society of Echocardiography, American Heart Association, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Failure Society of America, Heart Rhythm Society, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Critical Care Medicine, Society of Cardiovascular Computed Tomography, and Society for Cardiovascular Magnetic Resonance Endorsed by the American College of Chest Physicians. *Journal of the American College of Cardiology*, **57**: 1126-1166.
- DOYLE B, CAPLICE N (2007). Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, **49**: 2073-2080.
- EL-BATTRAWY I, LANG S, ZHAO Z, AKIN I, YÜCEL G, MEISTER S, TÜLÜMEN E, LIEBE V, TIBURCY M, ... & ZHOU XB (2016). Hyperthermia influences the effects of sodium channel blocking drugs in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PloS one*, **11**: e0166143.
- ELÇİN AE, ELÇİN YM (2006). Localized angiogenesis induced by human vascular endothelial growth factor-activated PLGA sponge. *Tissue Engineering*, **12**: 959-968.
- ELÇİN YM, DIXIT V, GITNICK G (2001). Extensive in-vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. *Artificial Organs*, **25**: 558-565.
- ELÇİN YM (2004). Stem cells and tissue engineering. *Advances in experimental medicine and biology*, **553**: 301-316.
- ELÇİN YM (2017). Special issue: Organs-on-chips & 3D-bioprinting technologies for personalized medicine. *Stem Cell Reviews*, **13**: 319-320.
- ELÇİN YM, DIXIT V, GITNICK G (1996). Controlled release of endothelial cell growth factor from chitosan-albumin microspheres for localized angiogenesis: in-vitro and in-vivo studies. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, **24**: 257-271.
- ERCAN H, DURKUT S, KOC-DEMİR A, ELÇİN AE, ELÇİN YM (2018). Clinical applications of injectable biomaterials. *Advances in experimental medicine and biology*, **1077**: 163-182.
- ERDAL Y, SEÇKİN UD, KILIÇ KD, ERBAŞ O (2017). Kardiyovasküler doku mühendisliği: Yaklaşımlar ve klinik öncesi uygulamalar. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi*, **2**: 74-78.

- FINN AV, NAKANO M, NARULA J, KOLODZIE FD, VIRMANI R (2010). Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **30**: 1282-1292.
- GÆDE P, VEDEL P, LARSEN N, JENSEN GV, PARVING HH, PEDERSEN O (2003). Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, **348**: 383-393.
- GHATTAS A, GRIFFITHS HR, DEVITT A, LIP GY, SHANTSILA E (2013). Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now? *Journal of the American College of Cardiology*, **62**: 1541-1551.
- GHOSTINE S, CARRION C, SOUZA LC, RICHARD P, BRUNEVAL P, VILQUIN JT, POUZET B, SCHWARTZ K, MENASCHE P, HAGÈGE AA (2002). Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation*, **106**:131-136.
- GILBERT BW, SHERARD M, LITTLE L, BRANSTETTER J, MEISTER A, HUFFMAN J (2018). Antihyperglycemic and Metabolic Effects of Ranolazine in Patients With Diabetes Mellitus. *The American journal of cardiology*, **15**: 509-512.
- GLASS CK, WITZTUM JL (2001). Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*, **104**: 503-516.
- GO AS, MOZAFFARIAN D, ROGER VL, BENJAMIN EJ, BERRY JD, BORDEN WB, ... & AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS COMMITTEE AND STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE (2013). Heart disease and stroke statistics—2013 update a report from the American Heart Association. *Circulation*, **127**: 6-245.
- GOTLIEB A (1991). Biology of disease. Structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Lab Invest*, **65**: 123-137.
- GÜVEN GS, GÜRLEK A (2004). Metabolik sendrom ve insülin direnci. *Acta Medica*, **35**: 96-99.
- HAJAR R (2017). Risk factors for coronary artery disease: Historical perspectives. *Heart views*, **18**: 109-114.
- HAJIGHASEMI F, HAJIGHASEMI S (2009). Effect of propranolol on angiogenic factors in human hematopoietic cell lines in-vitro. *Iranian Biomedical Journal*, **13**: 223-228.
- HARE JM, FISHMAN JE, GERSTENBLITH G, VELAZQUEZ DLD, ZAMBRANO JP, SUNCION VY, TRACY M, ... & LARDO A (2012). Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *Jama*, **308**: 2369-2379.

- HUIKURI HV, KERVINEN K, NIEMELÄ M, YLITALO K, SÄILY M, KOISTINEN P, SAVOLAINEN ER, UKKONEN H, ... & FINCELL INVESTIGATORS (2008). Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. *European heart journal*, **29**: 2723-2732.
- JAFFE EA, NACHMAN RL, BECKER CG, MINICK CR (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation*, **52**: 2745-2756.
- JAIN D, DASGUPTA P, HUGHES L, LAHIRI A, RAFTERY E (1990). Ranolazine (RS-43285): a preliminary study of a new anti-anginal agent with selective effect on ischaemic myocardium. *European journal of clinical pharmacology*, **38**: 111-114.
- JERLING M, ABDALLAH H (2005). Effect of renal impairment on multiple-dose pharmacokinetics of extended-release ranolazine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **78**: 288-297.
- KAHLIG KM, LEPIST I, LEUNG K, RAJAMANI S, GEORGE AL (2010). Ranolazine selectively blocks persistent current evoked by epilepsy-associated NaV1. 1 mutations. *British journal of pharmacology*, **161**: 1414-1426.
- KE N, WANG X, XU X, ABASSI YA (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol*, **740**: 33-43.
- KERSTEN JR, PAGEL PS, CHILIAN WM, WARLTIER DC (1999). Multifactorial basis for coronary collateralization: a complex adaptive response to ischemia. *Cardiovasc Res*, **43**: 44-57.
- KESKIN Ö, BALCI B (2011). Diabetes Mellitus ve Kardiovasküler Komplikasyonlar. *Kafkas Tıp Bilimleri Dergisi*, **1**: 81-85.
- KLAG MJ, FORD DE, MEAD LA, HE J, WHELTON PK, LIANG KY, LEVINE DM (1993). Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, **328**: 313-318.
- KOSIBOROD M, ARNOLD SV, SPERTUS JA, MCGUIRE DK, LI Y, YUE P, ... & CHAITMAN BR (2013). Evaluation of ranolazine in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic stable angina: results from the TERISA randomized clinical trial (Type 2 Diabetes Evaluation of Ranolazine in Subjects With Chronic Stable Angina). *Journal of the American College of Cardiology*, **61**: 2038-2045.
- KUDO M, WANG Y, WANI MA, XU M, AYUB A, ASHRAF M (2003). Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **35**: 1113-1119.
- KUMAR A, CANNON CP (2009). Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clinic Proceedings*, **84**: 917-938.

- KURTUL A, OZTURK S (2017). Prognostic value of coronary collaterals in patients with acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis*, **28**: 406-412.
- LADER J, STACHEL M, BU L (2017). Cardiac stem cells for myocardial regeneration: promising but not ready for prime time. *Curr Opin Biotechnol*, **47**: 30-35.
- LAMY S, LACHAMBRE MP, LORD-DUFOUR S, BÉLIVEAU R (2010). Propranolol suppresses angiogenesis in-vitro: inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascular pharmacology*, **53**: 200-208.
- LE DE, PASCOTTO M, LEONG-POI H, SARI I, MICARI A, KAUL S (2013). Anti-inflammatory and pro-angiogenic effects of beta blockers in a canine model of chronic ischemic cardiomyopathy: comparison between carvedilol and metoprolol. *Basic research in cardiology*, **108**: 384.
- LEONG YY, NG WH, ELLISON-HUGHES GM, TAN JJ (2017). Cardiac stem cells for myocardial regeneration: They are not alone. *Front Cardiovasc Med*, **4**: 47.
- LI, Y., HE, L., HUANG, X., BHALOO, S. I., ZHAO, H., ZHANG, S., ... & ZHOU, B (2018). Genetic Lineage Tracing of Nonmyocyte Population by Dual Recombinases. *Circulation*, **138**: 793-805.
- LIBBY P, RIDKER PM, HANSSON GK (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, **473**: 317-325.
- LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, **105**: 1135-1143.
- LIU X, XIE L, LIANG Y, LI L, LU T (2003). Gender difference in ranolazine pharmacokinetics in rats. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, **28**: 119-123.
- LOPEZ AD, MATHERS CD, EZZATI M, JAMISON DT, MURRAY CJ (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet*, **367**: 1747-1757.
- LUSIS AJ, FOGELMAN AM, FONAROW GC (2004). Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation*, **110**: 1868-1873.
- LUSIS AJ, FOGELMAN AM, FONAROW GC (2004). Genetic basis of atherosclerosis: Part II clinical implications. *Circulation*, **110**: 2066-2071.
- MACINNES A, FAIRMAN DA, BINDING P, RHODES JA, WYATT MJ, PHELAN A, HADDOCK PS, KARRAN EH (2003). The antianginal agent trimetazidine does not exert its functional benefit via inhibition of mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circulation research*, **93**: 26-32.

- MAKIELSKI JC, VALDIVIA CR (2006). Ranolazine and late cardiac sodium current—a therapeutic target for angina, arrhythmia and more? *British journal of pharmacology*, **148**: 4-6.
- MAKKAR RR, SMITH RR, CHENG K, MALLIARAS K, THOMSON LE, BERMAN D, CZER LS, MARBAN L, MENDIZABAL A, JOHNSTON PV, RUSSELL SD, SCHULERI KH, LARDO AC, GERSTENBLITH G, MARBAN E (2012). Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *The Lancet*, **379**: 895-904.
- MANCIA G, FAGARD R, NARKIEWICZ K, REDON J, ZANCHETTI A, BÖHM M, ... & ZANNAD F (2013). 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Blood pressure*, **22**: 193-278.
- MANNHEIMER C, CAMICI P, CHESTER MR, COLLINS A, DEJONGSTE M, ELIASSON T, FOLLATH F, HELLEMANS I, HERLITZ J, LÜSCHER T, PASIC M, THELLE D (2002). The problem of chronic refractory angina. Report from the ESC Joint Study Group on the Treatment of Refractory Angina. *European heart journal*, **23**: 355-370.
- MENASCHÉ P (2008). Skeletal myoblasts and cardiac repair. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **45**: 545-553.
- MENASCHÉ P, ALFIERI O, JANSSENS S, MCKENNA W, REICHENSPURNER H, TRINQUART L, VILQUIN JT, MAROLLEAU JP, LARGHERO J, LAKE S, CHATELLIER G, SOLOMON S, DESNOS M, HAGEGE AA (2008). The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*, **117**: 1189-1200.
- MENASCHÉ P, HAGEGE AA, VILQUIN JT, DESNOS M, ABERGEL E, POUZET B, BEL A, SARATEANU S, SCORSIN M, SCHWARTZ K, BRUNEVAL P, BENBUNAN M, MAROLLEAU JP, DUBOC D (2003). Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, **41**: 1078-1083.
- MENASCHÉ P, VANNEAUX V, HAGÈGE A, BEL A, CHOLLEY B, CACCIAPUOTI I, PAROUCHEV A, BENHAMOUDA N, TACHDIJAN G, ... & LARGHERO J (2015). Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *European heart journal*, **36**: 2011-2017.
- MERTENS G, CASSIMAN JJ, VAN DEN BERGHE H, VERMYLEN J, DAVID G (1992). Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. *Journal of Biological Chemistry*, **267**: 20435-20443.

- MINICUCCI MF, AZEVEDO PS, POLEGATO BF, PAIVA SA, ZORNOFF LA (2011). Heart failure after myocardial infarction: clinical implications and treatment. *Clin Cardiol*, **34**: 410-414.
- MIURA S, FUJINO M, MATSUO Y, TANIGAWA H, SAKU K (2005). Nifedipine-induced vascular endothelial growth factor secretion from coronary smooth muscle cells promotes endothelial tube formation via the kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase-1/NO pathway. *Hypertension research*, **28**: 147-153.
- MONTALESCOT G, SECHTEM U, ACHENBACH S, ANDREOTTI F, ARDEN C, BUDAJ A, BUGIARDINI R, CREA F, CUISSET T, ... & ZAMORANO JL (2013). 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *European heart journal*, **34**: 2949-3003.
- MORDI IR, BADAR AA, IRVING RJ, WEIR-MCCALL JR, HOUSTON JG, LANG CC (2017). Efficacy of noninvasive cardiac imaging tests in diagnosis and management of stable coronary artery disease. *Vascular health and risk management*, **13**: 427-437.
- MORROW DA, SCIRICA BM, CHAITMAN BR, MCGUIRE DK, MURPHY SA, KARWATOWSKA-PROKOPCZUK E, MCCABE CH, BRAUNWALD E & MERLIN-TIMI 36 INVESTIGATORS (2009). Evaluation of the glycometabolic effects of ranolazine in patients with and without diabetes mellitus in the MERLIN-TIMI 36 randomized controlled trial. *Circulation*, **119**: 2032-2039.
- MORROW DA, SCIRICA BM, KARWATOWSKA-PROKOPCZUK E, MURPHY SA, BUDAJ A, VARSHAVSKY S, WOLF AA, SKENE A, MCCABE CH, BRAUNWALD E & MERLIN-TIMI 36 INVESTIGATORS (2007). Effects of ranolazine on recurrent cardiovascular events in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: the MERLIN-TIMI 36 randomized trial. *Jama*, **297**: 1775-1783.
- MOZAFFARIAN D, BENJAMIN EJ, GO AS, ARNETT DK, BLAHA MJ, CUSHMAN M, DAS SR, ... & AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS COMMITTEE, STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE (2016). Executive summary: heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, **133**: 447-454.
- MUKHERJEE D, BHATT DL, ROE MT, PATEL V, ELLIS SG (1999). Direct myocardial revascularization and angiogenesis--how many patients might be eligible? *The American journal of cardiology*, **84**: 598-600.
- MURRY CE, SOONPAA MH, REINECKE H, NAKAJIMA H, NAKAJIMA HO, RUBART M, ... & FIELD LJ (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, **428**: 664-668.
- MURRY CE, WISEMAN RW, SCHWARTZ SM, HAUSCHKA SD (1996). Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *The Journal of clinical investigation*, **98**: 2512-2523.

- NICHOLS M, TOWNSEND N, SCARBOROUGH P, RAYNER M (2014). Cardiovascular disease in europe 2014: epidemiological update. *European heart journal*, **35**: 2950-2959.
- NIEMINEN T, TAVARES CA, PEGLER JR, BELARDINELLI L, VERRIER RL (2011). Ranolazine injection into coronary or femoral arteries exerts marked, transient regional vasodilation without systemic hypotension in an intact porcine model. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, **4**: 481-487.
- NING Y, ZHEN W, FU Z, JIANG J, LIU D, BELARDINELLI L, DHALLA AK (2011). Ranolazine increases β -cell survival and improves glucose homeostasis in low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **337**: 50-58.
- NOTO JR TJ, JOHNSON LW, KRONE R, WEAVER WF, CLARK DA, KRAMER JR JR, WETROVEC GW (1991). Cardiac catheterization 1990: a report of the Registry of the Society for Cardiac Angiography and Interventions (SCA&I). *Catheterization and cardiovascular diagnosis*, **24**: 75-83.
- O'DONNELL CJ, ELOSUA R (2008). Cardiovascular risk factors. Insights from framingham heart study. *Revista Espanola de Cardiologia*, **61**: 299-310.
- O'ROURKE RA, BRUNDAGE BH, FROELICHER VF, GREENLAND P, GRUNDY SM, HACHAMOVITCH R, POHOST GM, SHAW LJ, WINTERS WL (2000). American College of Cardiology/American Heart Association Expert Consensus document on electron-beam computed tomography for the diagnosis and prognosis of coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, **36**: 326-340.
- ONAT AT (2017). Tıp Dünyasının Kronik Hastalıklara Yaklaşımına Öncülük. *İstanbul: Logos Yayıncılık*, 2017, 180.
- ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, **410**: 701-705.
- ÖZDEMİR M (2016). Ranolazin'in antianginal etki mekanizması. *Türk Kardiyol Dern Ars*, **44**: 8-12.
- ÖZTÜRK S, ÖZTÜRK S (2012). Kardiyovasküler risk faktörü olarak dislipidemilere yaklaşım. *Abant Medical Journal*, **1**: 89-93.
- ÖZTÜRK S, ELÇİN YM (2018). Cardiac stem cell characteristics in physiological and pathological conditions. *Current Pharmaceutical Design*, **24**: 3101-3112.
- PAREDES-CARBAJAL MC, MONSALVO I, HERNÁNDEZ-DÍAZ C, REGLA I, DEMARE P, MASCHER D. (2013). Effects of ranolazine on vasomotor responses of rat aortic rings. *Archives of medical research*, **44**: 8-12.

- PARISI AF, FOLLAND ED, HARTIGAN P (1992). A comparison of angioplasty with medical therapy in the treatment of single-vessel coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*, **326**: 10-16.
- PARMAKSIZ M, DOGAN A, ELÇİN AE, ELÇİN YM (2016). Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomedical Materials*, **11**: 022003.
- PASQUIER E, STREET J, POUCHY C, CARRE M, GIFFORD A, MURRAY J, NORRIS MD, TRAHAIR T, ANDRE N, KAVALLARIS M (2013). β -blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *British journal of cancer*, **108**: 2485-2494.
- PEPINE CJ, WOLFF AA (1999). A controlled trial with a novel anti-ischemic agent, ranolazine, in chronic stable angina pectoris that is responsive to conventional antianginal agents. *The American journal of cardiology*, **84**: 46-50.
- PERIN EC, WILLERSON JT, PEPINE CJ, HENRY TD, ELLIS SG, ZHAO DX, SILBA GV, LAI D, THOMAS JD, KRONENBERG MW, MARTIN AD, ANDERSON RD, TRAVERSE JH, ... & CARDIOVASCULAR CELL THERAPY RESEARCH NETWORK (2012). Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *Jama*, **307**: 1717-1726.
- PETERS SC, REIS A, NOLL T (2005). Preparation of endothelial cells from microand macrovascular origin. In: Dhein S., Mohr F.W., Delmar M. Ed: Practical methods in cardiovascular research. Springer, Berlin, Heidelberg. 610-629.
- PIEPOLI MF, HOES AW, AGEWALL S, ALBUS C, BROTONS C, CATAPANO AL, COONEY MT, CORRA U, COSYNS B, ... & ESC SCIENTIFIC DOCUMENT GROUP (2016). 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*, **37**: 2315-2381.
- POOLING PROJECT RESEARCH GROUP (1978). Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and ECG abnormalities to incidence of major coronary events: final report of the Pooling Project. *Journal of chronic diseases*, **31**: 201-306.
- PULFORD BR, KLUGER J (2016). Ranolazine therapy in cardiac arrhythmias. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, **39**: 1006-1015.
- REAVEN GM (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, **37**: 1595-1607.

- REINECKE H, MACDONALD GH, HAUSCHKA SD, MURRY CE (2000). Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle: implications for infarct repair. *The Journal of cell biology*, **149**: 731-740.
- REINECKE H, POPPA V, MURRY CE (2002). Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **34**: 241-249.
- RINCON MY, VANDENDRIESSCHE T, CHUAH MK (2015). Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovascular research*, **108**: 4-20.
- ROGER VL (2007). Epidemiology of myocardial infarction. *Medical Clinics of North America*, **91**: 537-552.
- ROMAGNUOLO R, LAFLAMME MA (2017). Programming cells for cardiac repair. *Current opinion in biotechnology*, **47**: 43-50.
- RUBANYI GM (2013). Mechanistic, technical, and clinical perspectives in therapeutic stimulation of coronary collateral development by angiogenic growth factors. *Molecular Therapy*, **21**: 725-738.
- RUBANYI GM (2016). Angiogenic gene therapy for refractory angina. *Expert Opin Biol Ther*, **16**: 303-315.
- SAKAKURA K, NAKANO M, OTSUKA F, LADICH E, KOLODGIE FD, VIRMANI R (2013). Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart, Lung and Circulation*, **22**: 399-411.
- SANCHIS-GOMAR F, PEREZ-QUILIS C, LEISCHIK R, LUCIA A (2016). Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Annals of translational medicine*, **4**: 256.
- SAYOLS-BAIXERAS S, LLUÍS-GANELLA C, LUCAS G, ELOSUA R (2014). Pathogenesis of coronary artery disease: focus on genetic risk factors and identification of genetic variants. *The application of clinical genetics*, **7**: 15-32.
- SCHÄCHINGER V, ASSMUS B, BRITTEN MB, HONOLD J, LEHMANN R, TEUPE C, ABOLMAALI ND, VOGL TJ, HOFMANN WK, MARTIN H, DIMMELER S, ZEIHNER AM (2004). Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *Journal of the American College of Cardiology*, **44**: 1690-1699.
- SCHEUNER MT (2003). Genetic evaluation for coronary artery disease. *Genetics in medicine*, **5**: 269-285.
- SENIOR R, MONAGHAN M, BECHER H, MAYET J, NIHOYANNOPOULOS P. (2005). Stress echocardiography for the diagnosis and risk stratification of patients with

suspected or known coronary artery disease: a critical appraisal. Supported by the British Society of Echocardiography. *Heart*, **91**: 427-436.

SICARI R, PASANISI E, VENNERI L, LANDI P, CORTIGIANI L, PICANO E (2003). Stress echo results predict mortality: a large-scale multicenter prospective international study. *Journal of the American College of Cardiology*, **41**: 589-595.

STAMLER J, WENTWORTH D, NEATON JD (1986). Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? findings in 356 222 primary screenees of the multiple risk factor intervention trial (mrfit). *Jama*, **256**: 2823-2828.

STONE PH, CHAITMAN BR, STOCKE K, SANO J, DEVAULT A, KOCH GG (2010). The anti-ischemic mechanism of action of ranolazine in stable ischemic heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, **56**: 934-942.

STONE PH, GRATSIANSKY NA, BLOKHIN A, HUANG IZ, MENG L & ERICA INVESTIGATORS (2006). Antianginal efficacy of ranolazine when added to treatment with amlodipine: the ERICA (Efficacy of Ranolazine in Chronic Angina) trial. *Journal of the American College of Cardiology*, **48**: 566-575.

STREGE P, BEYDER A, BERNARD C, CRESPO-DIAZ R, BEHFAR A, TERZIC A, ACKERMAN M, FARRUGIA G (2012). Ranolazine inhibits shear sensitivity of endogenous Na⁺ current and spontaneous action potentials in HL-1 cells. *Channels*, **6**: 457-462.

SUCKOW MA, GUTIERREZ LS, RISATTI CA, WOLTER WR, TAYLOR RE, POLLARD M, NAVARI RM, CASTELLINO FJ, PAONI NF (2004). The anti-ischemia agent ranolazine promotes the development of intestinal tumors in APC(Min/+) mice. *Cancer Lett*, **209**: 165-169.

TABAS I (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature Reviews Immunology*, **10**: 36-46.

TAFRESHI MJ, FISHER E (2006). Ranolazine: a new approach to management of patients with angina. *Annals of Pharmacotherapy*, **40**: 689-693.

TANG XL, ROKOSH G, SANGANALMATH SK, YUAN F, SATO H, MU J, DAI S, LI C, CHEN N, PENG Y, DAWN B, HUNT G, LERI A, KAJSTURA J, TIWARI S, SHIRK G, ANVERSA P, BOLLI R (2010). Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*, **121**: 293-305.

TAVLI T, PEKEL N (2011). Koroner Arter Hastalığında Risk Faktörleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Cardiology Special Topics*, **4**: 16-20.

- TENDERA M, WOJAKOWSKI W, RUŻYLŁO W, CHOJNOWSKA L, KEPKA C, TRACZ W, ... & REGENT INVESTIGATORS (2009). Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+ CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *European heart journal*, **30**: 1313-1321.
- TERUZZI I, MONTESANO A, SENESI P, VACANTE F, BENEDINI S, LUZI L (2017). Ranolazine promotes muscle differentiation and reduces oxidative stress in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrine*, **58**: 33-45.
- THADANI U, EZEKOWITZ M, FENNEY L, CHIANG YK (1994). Double-blind efficacy and safety study of a novel anti-ischemic agent, ranolazine, versus placebo in patients with chronic stable angina pectoris. Ranolazine Study Group. *Circulation*, **90**: 726-734.
- TOMPKINS BA, BALKAN W, WINKLER J, GYÖNGYÖSI M, GOLIASCH G, FERNÁNDEZ-AVILÉS F, HARE JM (2018). Preclinical Studies of Stem Cell Therapy for Heart Disease. *Circulation research*, **122**: 1006-1020.
- TORUN E, BAYRAM F (2004). Endokrin bir organ olarak endotel ve endotelinin hipertansiyondaki rolü. *Erciyes Tıp Dergisi*, **26**: 126-131.
- TOWFIGHI A, ZHENG L, OVBIAGELE B (2009). Sex-specific trends in midlife coronary heart disease risk and prevalence. *Archives of internal medicine*, **169**: 1762-1766.
- TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU (2018). Ölüm Nedeni İstatistikleri. Erişim Adresi: <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24572>. Erişim Tarihi: 6/7/2018.
- UCUZIAN AA, GREISLER HP (2007). İn-vitro models of angiogenesis. *World journal of surgery*, **31**: 654-663.
- ULU N, HENNING RH, GORIS M, SCHOEMAKER RG, VAN GILST WH (2009). Effects of ivabradine and metoprolol on cardiac angiogenesis and endothelial dysfunction in rats with heart failure. *Journal of cardiovascular pharmacology*, **53**: 9-17.
- ÜSTÜNDAĞ H, ASLAN FE (2011). Koroner Arter Bypass Graft Cerrahisi Uygulanan Hastanın Bakımı ve Konforu. *Yoğun Bakım Hemşireliği Dergisi*, **15**: 22-28.
- VAGNOZZI RJ, MOLKENTIN JD, HOUSER SR (2018). New Myocyte Formation in the Adult Heart: Endogenous Sources and Therapeutic Implications. *Circ Res*, **123**: 159-176.
- VENKATARAMAN R, BELARDINELLI L, BLACKBURN B, HEO J, ISKANDRIAN AE (2009). A study of the effects of ranolazine using automated quantitative analysis of serial myocardial perfusion images. *JACC: Cardiovascular Imaging*, **2**: 1301-1309.

- VENKATARAMAN R, CHEN J, GARCIA EV, BELARDINELLI L, HAGE FG, HEO J, ISKANDRIAN AE (2012). Effect of ranolazine on left ventricular dyssynchrony in patients with coronary artery disease. *The American journal of cardiology*, **110**: 1440-1445.
- VIRSOLVY A, FARAH C, PERTUIT N, KONG L, LACAMPAGNE A, REBOUL C, AIMOND F, RICHARD S (2015). Antagonism of Na⁺ v channels and α 1-adrenergic receptors contributes to vascular smooth muscle effects of ranolazine. *Scientific reports*, **5**: 17969.
- WANG P, FRASER H, LLOYD SG, MCVEIGH JJ, BELARDINELLI L, CHATHAM JC (2007). A comparison between ranolazine and CVT-4325, a novel inhibitor of fatty acid oxidation, on cardiac metabolism and left ventricular function in rat isolated perfused heart during ischemia and reperfusion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **321**: 213-220.
- WINDECKER S, KOLH P, ALFONSO F, COLLET JP, CREMER J, FALK V, FILIPPATOS G, HAMM C, HEAD SJ, JÜNI P, ... & WITKOWSKI A (2014). 2014 ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization: the Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *European heart journal*, **35**: 2541-2619.
- WITZTUM JL, LICHTMAN AH (2014). The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **9**: 73-102.
- WOLFRAM JA, DONAHUE JK (2013). Gene therapy to treat cardiovascular disease. *Journal of the American Heart Association*, **2**: e000119.
- YAYLALI YT, KÜÇÜKASLAN M (2011). Endotel disfonksiyonu. *Pamukkale Tıp Dergisi* **3**: 152-157.
- YAZIR Y, DALÇIK H (2012). Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç: Endotel Hücre Kültürü. *Koşuyolu Kalp Dergisi*, **15**: 137-142.
- YEUNG E, KRANTZ MJ, SCHULLER JL, DALE RA, HAIGNEY MC (2014). Ranolazine for the suppression of ventricular arrhythmia: a case series. *Ann Noninvasive Electrocardiol*, **19**: 345-350.
- YLÄ-HERTTUALA S, BAKER AH (2017). Cardiovascular gene therapy: past, present, and future. *Molecular Therapy*, **25**: 1095-1106.
- YU S, WONG SL, LAU CW, HUANG Y, YU CM (2011). Oxidized LDL at low concentration promotes in-vitro angiogenesis and activates nitric oxide synthase through PI3K/Akt/eNOS pathway in human coronary artery endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **407**: 44-48.

YUSUF S, REDDY S, ÔUNPUU S, ANAND S (2001). Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation*, **104**: 2855-2864.

ZHANG S, GE J, ZHAO L, QIAN J, HUANG Z, SHEN L, SUN A, WANG K, ZOU Y (2007). Host vascular niche contributes to myocardial repair induced by intracoronary transplantation of bone marrow CD34+ progenitor cells in infarcted swine heart. *Stem Cells*, **25**: 1195-1203.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Selçuk
Soyadı : Öztürk
Doğum yeri ve tarihi : Sakarya/Türkiye 04.01.1985
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
İletişim adresi : selcukozturk85@hotmail.com
Telefon : +90 553 537 66 13

II- Eğitimi

2016-..... Yüksek Lisans, Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp
Anabilim Dalı Ankara/Türkiye

Tez: Ranolazinin İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İn-
vitro Şartlarda Araştırılması

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Mezuniyet Ortalaması: 3.78/4.00

2009-2014 Uzmanlık Eğitimi, Kardiyoloji

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji ABD Bolu/Türkiye

2003-2009 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara/Türkiye

Mezuniyet Ortalaması: 2.47/4.00

Yabancı Diller:

İngilizce – 2016 YDS: 82.5/100

III- Ünvanları

Uzman Doktor: Kardiyoloji

IV- Mesleki Deneyimi

Aralık 2009- Eylül 2014 Abant İzzet Baysal Üniversitesi Kardiyoloji ABD

Eylül 2014- Haziran 2016 İzzet Baysal Devlet Hastanesi Kardiyoloji Kliniği

Temmuz 2016-... Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Kliniği

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Kardiyoloji Derneği

Avrupa Kardiyoloji Derneği

Vasküler ve Moleküler Kardiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Kardiyoloji, Girişimsel Kardiyoloji, Yenileyici Tıp, Kök Hücreler, Moleküler Kardiyoloji, Anjiyogenez

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı Burslar : -

Ödüller : -

Projeler : -

Seminerler : Mayıs 2017 Yüksek Lisans Semineri: Kardiyak Kök Hücreler

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim Programı Haricinde Alınan Kurslar:

2015 Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası- Abant İzzet Baysal Üniversitesi

2017 Temel Bilimler Yaz Okulu- Avrupa Kardiyoloji Derneği

Eğitim Seminerleri: -

Organizasyona Katkıda Bulunduğu Bilimsel Toplantılar:

03.11.2018-04.11.2018 Vasküler ve Moleküler Kardiyoloji Kongresi- Organizasyon Komitesi Adana/Türkiye