



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZOLE SIÇAN KALBİNDE İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDA TRPC KANALLARININ ROLÜ

Cansu USTA

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. İsmail MERAL

Ocak, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 31.01.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Doç. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



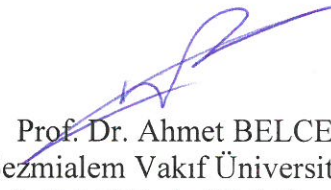
Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Berrak YEĞEN
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Ahmet BELCE
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 6.2016/8 numaralı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, TRPC kanal blokeri SKF-96365'in Langendorff izole kalp sistemi ile sıçan kalbine uygulanması sonucunda, TRPC kanallarının iskemik kalp üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN'e teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmam süresince, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak, araştırma laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan ve tezin başarılı bir şekilde sonuçlanmasını sağlayan ikinci danışman hocam Prof. Dr. İsmail MERAL'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresince, değerli bilgileriyle beni aydınlatan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım, gelecekteki mesleki hayatımda örnek alacağım ve bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım kıymetli hocam Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL'e, hayatımdaki varlığından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen,engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren ve tezimde büyük emeği olan sayın hocam Öğr. Gör. Dr. Savaş ÜSTÜNOVA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak, desteğini esirgemeyen hocalarım; Prof. Dr. Kadriye AKGÜN DAR'a, Yard. Doç. Dr. Nadim YILMAZER'e, Yard. Doç. Dr. Mehmet ÜYÜKLÜ'ye, Araş. Gör. Dr. Aslı KANDİL'e, Araş. Gör. Dr. Cenk GÜREVİN'e ve Araş. Gör. Dr. Ayşegül KAPUCU'ya teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanma süresince her türlü yardımlarını ve desteklerini gördüğüm, Araş. Gör. Aysu KILIÇ, Uzman Biyolog Deniz EROL KUTUCU ve Biyolog Şeyma EREN'e; tezimin biyokimyasal analizleri sırasında yardımını esirgemeyen Uzman Biyolog Huri BULUT'a ve çalışmam boyunca desteğini eksik etmeyip her zaman yanımda olan tüm değerli dostlarıma teşekkür ederim.

Beni bugünlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen annem Nihal USTA başta olmak üzere, bu hayattaki en büyük şansım olan aileme sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2018

Cansu USTA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xiii
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	2
2.1.KALSİYUM VE FİZYOLOJİK ÖNEMİ	3
2.1.1.Voltaj Kapılı Ca^{+2} Kanalları (VGCCs).....	7
2.1.2.Reseptöre Duyarlı Ca^{+2} Kanalları (ROCCs).....	7
2.1.3.Mekanik Olarak Aktive Olan Ca^{+2} Kanalları (MACCs)	7
2.1.4.Depo Kontrollü Ca^{+2} Kanalları (SOCCs)	7
2.2.GEÇİCİ RESEPTÖR POTANSİYEL (TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL=TRP) KATYON KANALLARI.....	8
2.2.1.TRPC Kanalları	9
2.2.1.1.TRPC1.....	9
2.2.1.2.TRPC2.....	9
2.2.1.3.TRPC3.....	9
2.2.1.4.TRPC4 ve TRPC5	11
2.2.1.5.TRPC6.....	11
2.2.1.6.TRPC7.....	11
2.2.2.TRPC Kanallarının Aktivasyonu.....	11
2.2.3.TRPC Kanalları ve Negatif Geri Besleme Mekanizmaları	13
2.3.KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR VE TRPC KANALLARI	15
2.4.İSKEMİ/REPERFÜZYON (İR) HASARI.....	17
2.5.KALPTE İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARININ KALSİYUM VE TRPC KANALLARI İLE İLİŞKİSİ	19
2.6.TRPC KANALLARININ İNHİBİSYONU	21

3. MALZEME VE YÖNTEM.....	24
3.1.DENEY DÜZENEGİ	26
3.2.KARDİYODİNAMİK ANALİZLER	26
3.3.BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR.....	28
3.3.1.Gereçler	28
3.3.2.Total Protein Ölçümü	29
3.3.3.Kreatin Kinaz-MB (CK-MB) ve Kardiyak Troponin T (cTnT) Düzeylerinin Belirlenmesi	29
3.3.4.Miyeloperoksidaz (MPO), Laktat Dehidrogenaz (LDH), Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx) ve ENKUR Düzeylerinin Belirlenmesi	30
3.3.5.Malondialdehit (MDA) ve Angiotensin II (Ang II) Düzeylerinin Belirlenmesi	31
3.3.6.TRPC1, TRPC3 ve TRPC6 Düzeylerinin Belirlenmesi	32
3.3.7.Total Oksidan Kapasite (TOS), Total Antioksidan Kapasite (TAS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI)'nin Hesaplanması.....	32
3.3.7.1.Total Oksidan Kapasite (TOS).....	32
3.3.7.2.Total Antioksidan Kapasite (TAS)	33
3.3.7.3.Oksidatif Stres İndeksi (OSI) 'nin Hesaplanması	34
3.4.İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1.KARDİYODİNAMİK BULGULAR.....	35
4.1.1.Perfüzyon Basıncı.....	35
4.1.2.Sistolik Basınç	35
4.1.3.Son Diyastolik Basınç (SDB)	36
4.1.4.Sol Ventrikül İçi Basınç Değişimi (SVBD)	37
4.1.5.Kalp Vurumu	38
4.1.6.Max dP/dt	39
4.1.7.Kasılma İndeksi	39
4.1.8.Rate Pressure Product (RPP).....	40
4.2.BİYOKİMYASAL BULGULAR	41
4.2.1.Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Kreatin Kinaz-MB (CK-MB) ve Kardiyak Troponin T (cTnT) Düzeyleri	43
4.2.2.Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Miyeloperoksidaz (MPO), Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve Malondialdehit (MDA) Düzeyleri.....	44
4.2.3.Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzeyleri	46
4.2.4.Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Angiotensin II (Ang II) Düzeyleri.....	48

4.2.5.Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda TRPC1, TRPC3, TRPC6 ve ENKUR Düzeyleri.....	48
4.2.6.Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Total Oksidan Kapasite (TOS), Total Antioksidan Kapasite (TAS) Düzeyleri ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI).....	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR.....	71
EKLER	83
Ek1. Etik Kurul Karar Metni	
ÖZGEÇMİŞ	84



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1.1:** Hücre içi Ca^{+2} döngüsünün genel şeması. Ca^{+2} , Ca^{+2} kanalları ve bazı durumlarda Na^{+} - Ca^{+2} değiştiricisi (NCX) yoluyla hücre içine girebilir. Ca^{+2} , sarkoplazmik/endoplazmik retikulumdan (SR/ER), rıyanodin reseptörleri ve inositol (1,4,5) trisfosfat reseptörlerini içeren Ca^{+2} salan kanallar vasıtasıyla salınabilir. Ca^{+2} , sitosolden SR/ER Ca^{+2} -ATPaz (SERCA), sitolemmal Ca^{+2} -ATPaz, Na^{+} - Ca^{+2} değişimi ve mitokondriyal uniporter ile uzaklaştırılır (Wang ve diğ., 2002).....4
- Şekil 2.1.2:** Plazma zarı boyunca düzenlenmiş Ca^{+2} giriş yolları. Kalsiyum, voltajla çalışan kanallar (VOC), ikinci haberciler yardımıyla çalışan kanallar (SMOC), depo kontrollü çalışan kanallar (SOC) ve reseptör ile çalışan kanallar (ROC) başta olmak üzere pek çok kanal aracılığı ile hücrelere girebilir. VOC'ler membran depolarizasyonu ile aktive edilirken, SMOC'ler, inositol fosfatlar, siklik nükleotidler ve lipitten türetilmiş haberciler (diacilgliserol ve araşidonik asit ve metabolitleri) gibi ikinci haberci moleküller tarafından aktive edilirler. SOC'ler, hücre içi Ca^{+2} depolarının boşalmasıyla aktive olurlarken, ROC'ler, bir nörotransmitter veya hormon gibi agonistlerin (Ag) doğrudan bağlanmasıyla aktive olurlar. Buna ek olarak, Ca^{+2} bazı koşullar altında ters yönde çalışan $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ değiştirici kanalları (NCX) aracılığı ile hücrelere girebilir (Parekh ve Putney, 2005).6
- Şekil 2.2.1.1:** TRPC kanallarının aracılık ettiği Ca^{+2} akış mekanizmaları. A: Reseptör aracılı Ca^{+2} girişi (ROCE; Receptor Operated Calcium Entry). G proteinine bağlı reseptörlere (GPCR) agonist bağlanması, zarı bulunduran fosfoinositol bifosfat (PIP_2)'ın, IP_3 ve DAG moleküllerine ayrılmasını aktive eden PLC'yi uyarır. IP_3 , ER/SR'de bulunan IP_3R 'lere bağlanarak Ca^{+2} 'un sitoplazma içine salınmasına neden olur. DAG ise, TRPC3, TRPC6 ve TRPC7 kanallarını doğrudan etkileyerek, plazma membranı üzerinden hücre içine Ca^{+2} girişini sağlar. B: GPCR'nin uyarılmasını takiben değişen, ER/SR'den Ca^{+2} salınımı kaynaklı fazik artış ve ROCE kaynaklı değişen hücre içi Ca^{+2} seviyelerinin zamana bağlı durumu. C: Depo kontrollü Ca^{+2} girişi (SOCE; Store Operated Calcium Entry). ER/SR'de Ca^{+2} 'un tükenmesi, ER/SR zarına yakın konumlanan stromal etkileşim molekülü 1 (Stromal Interaction Molecule 1=STIM1)'in uyarılmasına neden olur. STIM1, Ca^{+2} akışını arttırmak için plazma membranında Orai1 ile etkileşir. TRPC1, TRPC4 ve TRPC5 kanalları, bağımsız olarak veya STIM1/Orai1 ile bağlantılı olarak SOCE'ye katılabilir. D: Tipik bir SOCE deneyi örneği. Ca^{+2} içermeyen koşullar altında, hücreler SERCA inhibitörü ile muamele edilir. SERCA inhibitörü olan Thapsigargin, Ca^{+2} 'un ER/SR'den sitoplazmaya sızmasına neden olur. Deney ortamına tekrar Ca^{+2} ilavesi, SOCE'ye neden olarak ER/SR depolarının yeniden dolmasını sağlar (Earley ve Brayden, 2015).10
- Şekil 2.2.2.1:** TRPC3'ün aktivasyonunda yer alan sinyal yolları. G proteinine bağlı reseptör (GPCR), fosfolipaz C'yi (PLC) aktive eder ve IP_3 ve diacilgliserol (DAG)

üretir. IP₃, SR/ER'den Ca⁺² salınmasına ve SR/ER Ca⁺² deposunun tükenmesine yol açan reseptörünü (IP₃R) aktive eder. Depodaki Ca⁺² değişikliği, STIM1 sensörü tarafından algılanabilir ve bu ER Ca⁺² sensörü TRPC3 kanalları aracılığıyla depo kontrollü Ca⁺² girişine (SOCE) neden olabilir. Bir diğer olasılık DAG'ın TRPC3'ü doğrudan aktive edebilmesi ve reseptöre duyarlı Ca⁺² girişine (ROCE) neden olmasıdır (Ju ve diğ., 2015).	12
Şekil 2.2.2.2: STIM1 ve Orai'nin rolleri. Bir plazma membran reseptörünün (R) agonist (Ag) ile aktivasyonu, IP₃ reseptörünü (IP₃R) harekete geçirerek, endoplazmik retikulumda depolanmış Ca⁺²'un boşalmasına neden olur. Kalsiyum, STIM1'deki EF el motifini ters olarak bağlar; depodaki Ca⁺²'un boşalması, STIM1'in endoplazmik retikulum içinden plazma zarında bulunan Orai kanallarına doğru yeniden şekillenmesine neden olur. STIM1 daha sonra Ca⁺²'a geçirgen olan Orai kanallarını aktive eder (Putney, 2007).	13
Şekil 2.2.3.1: Kardiyak hipertrofide TRPC3/6/7'nin rolü. Zar basıncı ve/veya ligandı olan Ang II ile uyarılan angiotensin tip I (AT1) reseptörü, PIP₂ hidrolizine yol açar. Ardından DAG doğrudan plazma zarındaki TRPC3/6/7 kanallarını aktive eder. TRPC3'ün ayrıca IP₃ reseptörleri ile fiziksel olarak etkileşime girdiği gösterilmiştir. Kalsineurin'in Ca⁺² kalmodulin ile aktivasyonu, NFAT'ı defosforile eder. TRPC kanalları kaveollerde lokalizedir ve kaveolinler ile etkileşir (Naeini ve diğ., 2010).	14
Şekil 2.2.3.2: TRPC kanalları ve ilişkili sinyal yolları (Eder ve Molckentin, 2011).	15
Şekil 3.1: Langendorff izole kalp sistemi.	25
Şekil 3.2: Langendorff izole kalp sistemindeki kalp.	25
Şekil 3.1.1: Çalışmada takip edilen deney protokolü.	27
Şekil 3.2.1: Langendorff izole kalp sisteminde kaydedilen kardiyodinamik parametreler; sol ventrikül içi basıncı (LVP), sıcaklık (°C), perfüzyon basıncı (mmHg), pompa akımı (ml/dak), sistolik basınç (mmHg), diyastolik basınç (mmHg) ve kalp vurumu (vurum/dakika).	27
Şekil 3.3.3.1: Biyokimyasal reaksiyonun mavi renkten sarı renge dönüşümü.	30
Şekil 4.1.1.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında perfüzyon basıncının yüzde değişimleri (*P<0.05, **P<0.01; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; +P<0.05, ++P<0.01; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).	36
Şekil 4.1.2.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında sistolik basıncın yüzde değişimleri (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ++P<0.01, +++P<0.001; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).	37
Şekil 4.1.3.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında son diyastolik basıncın (SDB) yüzde değişimleri (*P<0.05, **P<0.01; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; +P<0.05, ++P<0.01; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).	37

Şekil 4.1.4.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında sol ventrikül içi basınç değişiminin (SVBD) yüzde değişimleri (***P<0.001; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; *P<0.05, ***P<0.001; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).	38
Şekil 4.1.5.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında kalp vurumunun yüzde değişimleri (*P<0.05; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	39
Şekil 4.1.6.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında Max dP/dt değerlerinin yüzde değişimleri (***P<0.001; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; *P<0.05, ***P<0.001; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	40
Şekil 4.1.7.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında kasılma indeksi değerlerinin yüzde değişimleri (**P<0.01, ***P<0.001; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; **P<0.01, ***P<0.001; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).	40
Şekil 4.1.8.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında RPP değerlerinin yüzde değişimi (***P<0.001; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; **P<0.01, ***P<0.001; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	41
Şekil 4.2.1.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait CK-MB düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	43
Şekil 4.2.1.2: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait cTnT düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	44
Şekil 4.2.2.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait MPO düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	45
Şekil 4.2.2.2: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait LDH düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	45
Şekil 4.2.2.3: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait MDA düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	46
Şekil 4.2.3.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait SOD düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	47
Şekil 4.2.3.2: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait GPx düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	47

Şekil 4.2.4.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait Ang II düzeyleri (*P<0.05, ***P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	48
Şekil 4.2.5.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait TRPC1 düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	49
Şekil 4.2.5.2: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait TRPC3 düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; +P<0.05, +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	50
Şekil 4.2.5.3: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait TRPC6 düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	50
Şekil 4.2.5.4: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait ENKUR düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	51
Şekil 4.2.6.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait TOS düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	52
Şekil 4.2.6.2: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait TAS düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	53
Şekil 4.2.6.3: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait OSI değerleri (***P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	53

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.2.1: Kalp dokusundan elde edilen süopernatantlarda CK-MB, cTnT, MPO, LDH, MDA, SOD, GPx, Ang II, TRPC1, TRPC3, TRPC6, ENKUR, TOS, TAS ve OSI ortalama $\pm$ standart hata değerleri (*P<0.05, ***P<0.001; Kontrol (K) grubuna göre; +P<0.05, +++P<0.001; İskemi/Reperfüzyon (IR) grubuna göre istatistiksel anlamlılık).....	42
---	----



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
2-APB	: 2-Aminoetoksidifenil borat
ACE	: Angiotensin dönüştürücü enzim
ADPR	: Adenozin difosfat riboz
Ag	: Agonist
Ang II	: Angiotensin II
ANP	: Atriyal natriüretik peptit
AT1	: Angiotensin tip 1 reseptörü
AT2	: Angiotensin tip 2 reseptörü
ATP	: Adenozin trifosfat
BNP	: Beyin natriüretik peptit
BTP-2	: Benzodiazepin-2
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum klorür dihidrat
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CK-MB	: Kreatin kinaz-MB
CsA	: Siklosporin-A
cTnT	: Kardiyak troponin T
DAG	: Diaçilgliserol
ELISA	: Enzime-bağılı bağışıklık deneyi (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ENKUR	: Enkurin adaptör protein
ER/SR	: Endoplazmik retikulum/sarkoplazmik retikulum
ET-1	: Endotelin-1
Gd ⁺³	: Gadolinyum
GdCl ₃	: Gadolinyum (III) klorür
GPCR	: G proteinine bağlı reseptör
GPx	: Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HRP	: Horseradish peroksidaz
IP ₃	: İnositol trifosfat

IP₃R	: İnositol trifosfat reseptörü
IR	: İskemi/reperfüzyon
IR+SKF-96365	: İskemi/reperfüzyon + SKF-96365 grubu
K	: Kontrol grubu
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
La⁺³	: Lantanum
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LVP	: Sol ventrikül içi basıncı
MACCs	: Mekanik olarak aktive olan Ca ⁺² kanalları (Mechanically Activated Ca ⁺² Channels)
Max dP/dt	: Sol ventrikül içi basınç artışının, artış süresince geçen zamana oranı
MDA	: Malondialdehit
MgSO₄.7H₂O	: Magnezyum sülfat heptahidrat
mL/dak	: Mililitre/dakika
mM	: Milimolar
mmHg	: Milimetre civa
MPO	: Miyeloperoksidaz
Na⁺	: Sodyum
Na⁺/K⁺-ATPaz	: Sodyum/potasyum-ATPaz
NAADP	: Nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO₃	: Sodyum hidrojen karbonat
NCX	: Sodyum/kalsiyum değiştiricisi
NFAT	: Aktive olmuş T-hücre nuklear faktörü (Nuclear Factor of Activated T-Cells)
ng/g	: Nanogram/gram
ng/L	: Nanogram/litre
ng/mL	: Nanogram/mililitre
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
OSI	: Oksidatif stres indeksi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
pg/mg	: Pikogram/miligram
PIP₂	: Fosfoinositol bifosfat

PKC	: Protein kinaz C
PKG	: Protein kinaz G
PLC	: Fosfolipaz C
PMCA	: Plazma zarı Ca^{+2} -ATPaz
PMNL	: Polimorf nüveli lökositler
Pyr-3	: Pirazol-3, TPRC3 kanal blokeri
ROC	: Reseptör ile çalışan kanallar (Receptor Operated Channels)
ROCCs	: Reseptöre duyarlı Ca^{+2} kanalları (Receptor Operated Ca^{2+} Channels)
ROCE	: Reseptör aracılı Ca^{+2} girişi (Receptor Operated Ca^{2+} Entry)
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPP	: Rate pressure product
RyR	: Riyanodin reseptörü
SDB	: Son diyastolik basınç
SERCA	: Sarko/endoplazmik retikulum- Ca^{+2} ATPaz
SMOC	: İkinci haberciler yardımıyla çalışan kanallar (Second Messenger Operated Channels)
SOC	: Depo kontrollü çalışan kanallar (Store Operated Channels)
SOCCs	: Depo kontrollü Ca^{+2} kanalları (Store Operated Ca^{2+} Channels)
SOCE	: Depo kontrollü Ca^{+2} girişi (Store Operated Ca^{2+} Entry)
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikali
SR	: Sarkoplazmik retikulum
SR/ER	: Sarkoplazmik retikulum/endoplazmik retikulum
STIM1	: Stromal etkileşim molekülü 1 (Stromal Interaction Molecule 1)
SVB	: Sol ventriküler basınç
SVBD	: Sol ventrikül içi basınç değişimi
SVSB	: Sol ventrikül sistolik basıncı
TAS	: Total antioksidan kapasite
TOS	: Total oksidan kapasite
TQ	: Timokinon
TRP	: Geçici reseptör potansiyel (Transient Receptor Potential)
TRPA	: Geçici reseptör potansiyel ankirin (Transient Receptor Potential Ankirin)
TRPC	: Geçici reseptör potansiyel kanonikal (Transient Receptor Potential Canonical)

TRPM	: Geçici reseptör potansiyel melastatin (Transient Receptor Potential Melastatin)
TRPML	: Geçici reseptör potansiyel mukolipin (Transient Receptor Potential Mucolipin)
TRPP	: Geçici reseptör potansiyel polisistin (Transient Receptor Potential Polycystin)
TRPV	: Geçici reseptör potansiyel vanilloid (Transient Receptor Potential Vanilloid)
U/L	: Ünite/litre
U/mg	: Ünite/miligram
VGCCs	: Voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları (Voltage Gated Ca^{2+} Channels)
VOC	: Voltajla çalışan kanallar (Voltage Operated Channels)
VPO	: Vaskular peroksidaz

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZOLE SIÇAN KALBİNDE İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINDA TRPC KANALLARININ ROLÜ

Cansu USTA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN

II. Danışman : Prof. Dr. İsmail MERAL

Kalp fonksiyonlarının yerine getirilmesinde hücre içi ve dışı iyonlar oldukça büyük bir öneme sahiptirler. Bunlardan, özellikle kalsiyum (Ca^{+2}) kardiyovasküler elektrofizyolojinin düzenlenmesinde etkili bir rol oynar. TRPC kanal ailesi üyeleri, pek çok dokuda anlatımı yapılan ve Ca^{+2} iyonlarına geçirgen olan membran proteinleridir. İskemi/reperfüzyon (IR) hasarında kalp kası hücrelerindeki TRPC kanallarının aşırı anlatımı çeşitli kalp hastalıklarıyla ilişkilidir. TRPC kanallarının inhibisyonu ile ilgili çalışmalar, bu kalp hastalıklarının tedavisinde oldukça önem taşımaktadır. Ancak, TRPC kanal blokerlerinin iskemik kalp rahatsızlıkları üzerindeki etkilerini kapsayan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

İzole perfüze sıçan kalbi (Langendorff) modelini kullandığımız bu çalışmamızda, bir TRPC kanal blokeri olan SKF-96365'in normal ve iskemik kalplere uygulanması ile IR hasarındaki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmış ve TRPC kanallarının kalp hastalıklarındaki rolleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Çalışmada 32 adet 3 aylık, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar kontrol, IR, SKF-96365 (5 μ M) ve IR+SKF-96365 olarak dört gruba ayrılmıştır. Kalpler, Langendorff izole kalp sistemine *in situ* kanülasyon yöntemi ile asılmış ve kardiyodinamik parametreler (sol ventrikül içi basıncı, perfüzyon basıncı, sistolik basınç, diyastolik basınç ve kalp vurumu) deney boyunca kaydedilmiştir. Ayrıca, deney sonunda

kalpler biyokimyasal analizler için alınmış ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

İzole edilen sıçan kalplerinde, IR'den kaynaklanan hasarlar deney boyunca düzelmezken, SKF-96365 uygulanması ile kardiyodinamik parametrelerde kısmi bir geri dönüş gözlenmiştir. Hücresel hasarı göstermek için kullanılan kreatin kinaz-MB ve kardiyak troponin T, inflamasyon belirteci olarak miyeloperoksidaz, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak malondialdehit, nekrozun belirteci olarak laktat dehidrogenaz düzeylerinde, IR grubunda anlamlı bir artış belirlenirken, bloker uygulanan tüm gruplarda bu artışın azaldığı gösterilmiştir. Hücresel endojen antioksidan düzeylerinin tespit edilmesi için ölçülen glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz düzeylerinin IR grubunda anlamlı derecede düşük, bloker uygulanan tüm gruplarda ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, IR grubunda total oksidan kapasite ve oksidatif stres indeksinin yükseldiği; SKF-96365 uygulamasının bu düzeylerde belirgin bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. IR grubunda düşük olan total antioksidan kapasitenin ise SKF-96365 uygulanan gruplarda arttığı belirlenmiştir. Kontrol ve SKF-96365 uygulanan gruplarda TRPC1, TRPC3, TRPC6, Angiotensin II ve TRPC kanalları ile etkileşime giren ve bir adaptör protein olarak işlev gösteren ENKUR düzeylerinde önemli bir fark gözlenmezken, bu parametrelerin IR uygulaması ile arttığı, IR+SKF-96365 uygulanan grupta ise azaldığı belirlenmiştir. TRPC kanal ailesinden kalpte en fazla anlatımı yapılan TRPC3'ün IR hasarındaki anlatımının TRPC1 ve TRPC6'ya göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, kardiyodinamik veriler değerlendirildiğinde, IR hasarının miyokardiyal fonksiyon bozukluğuna neden olduğu, SKF-96365 uygulamasının bu hasara karşı kısmen kalbi koruyucu rolünün olduğu ve bu etkisinin kalpte özellikle TRPC3 kanallarının inhibisyonuna dayandığı belirlenmiştir. Biyokimyasal olarak hasar belirteçleri analiz edildiğinde, IR'nin kalp dokusunda hücresel hasara yol açtığı, bloker uygulaması yapılan gruplarda bu hasarın azaldığı, antioksidan enzimlerin ise arttığı ve TRPC kanallarının kardiyak fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu sonucuna varılmıştır.

Ocak 2018, 105 sayfa.

Anahtar kelimeler: TRPC kanalları, SKF-96365, Langendorff metodu, izole sıçan kalbi, iskemi/reperfüzyon hasarı

SUMMARY

M.Sc. THESIS

ROLE of TRPC CHANNELS in ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY in ISOLATED RAT HEART

Cansu USTA

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN

Co-Supervisor : Prof. Dr. İsmail MERAL

The intra and extracellular ions have a great impact in performing cardiac functions. Of these, particularly calcium (Ca^{2+}) plays an effective role in the regulation of cardiovascular electrophysiology. Members of the TRPC channel family are membrane proteins, which are expressed in most tissues and especially permeable to Ca^{2+} ions. The over-expression of TRPC channels in cardiomyocytes during ischemia/reperfusion (IR) injury are related to several heart diseases. Studies concerning the inhibition of TRPC channels are of great importance in the treatment of these heart diseases. However, studies on the effects of TRPC channel blockers on ischemic heart diseases are limited.

In our study employing the isolated perfused rat heart (Langendorff) model, we aimed to determine the effects of SKF-96365, a TRPC channel blocker, in IR injury, and to reveal the roles of TRPC channels in heart diseases, by applying it to healthy and ischemic hearts.

In the study, 32 male Wistar albino rats, 3 months old and weighing between 250-300 g, were used. They were separated into four groups as control, IR, SKF-96365 (5 μM) and IR+SKF-96365. The hearts were attached to Langendorff isolated heart system by employing *in situ* cannulation method, and cardiodynamic parameters (left ventricular pressure, perfusion pressure, systolic pressure, diastolic pressure and heart rate) were recorded during the

experiment. Besides, at the end of experiment, hearts were retained for biochemical analysis, and all data were statistically evaluated.

While IR injury was not recovered during the experiment in isolated rat hearts, a partial recovery of cardiodynamic parameters was observed with the administration of SKF-96365. A significant increase in creatine kinase-MB and cardiac troponin T indicating cellular injury, inflammatory enzyme myeloperoxidase, malondialdehyde as a lipid peroxidation marker and lactate dehydrogenase for detection of necrosis was detected in IR group, whereas all groups treated with the blocker exhibited lower increase. Levels of glutathione peroxidase and superoxide dismutase to detect cellular endogenous antioxidant level were significantly lower in IR group, but higher in the groups treated with the blocker. Furthermore, total oxidant capacity and oxidative stress index which were elevated in IR group were lowered with the administration of SKF-96365. However, total antioxidant capacity increased in the groups received SKF-96365, while it declined in IR group. Concerning the levels of TRPC1, TRPC3, TRPC6, Angiotensin II, and ENKUR, which interacts with TRPC channels and functions as an adaptor protein, there was no significant difference between the control and SKF-96365-treated groups, while these parameters increased with IR application, and decreased in IR+SKF-96365 group. Of the TRPC family, the expression of TRPC3, the most expressed in the heart, was determined to be higher than TRPC1 and TRPC6 in IR injury.

As a result, considering cardiodynamic parameters, it was determined that IR injury caused myocardial dysfunction, and treatment of SKF-96365 partly played a cardioprotective role against that injury, and its effect was based on especially inhibition of TRPC3 channels in the heart. When biochemical injury markers were evaluated, it was concluded that IR caused cellular injury in the heart tissue, and this injury was decreased in the groups treated with the blocker, whereas antioxidant enzymes were increased, and TRPC channels had important roles in the regulation of cardiac functions.

January 2018, 105 pages.

Keywords: TRPC channels, SKF-96365, Langendorff method, isolated rat heart, ischemia/reperfusion injury

1. GİRİŞ

Bu çalışma, Langendorff izole kalp sistemi ile sıçan kalbine uygulanan TRPC kanal blokeri SKF-96365'in, sağlıklı ve iskemik kalp üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmanın “Genel Kısımlar” bölümünde; kardiyovasküler sistemin önemi, kalsiyum (Ca^{+2}) ve fizyolojik önemi, TRPC kanalları ailesi ve bu kanalların çeşitli alt tipleri, kardiyovasküler hastalıklar ve TRPC kanalları ile ilişkisi, iskemi/reperfüzyon (IR) hasarı ve TRPC kanalları ile ilişkisi, TRPC kanal blokerleri ve SKF-96365 blokeri hakkında genel bilgiler verilmiştir. İskemi/reperfüzyonun neden olduğu miyokardiyal hasar ve bu hasarın önlenmesinde TRPC kanallarının fizyolojik rolü çeşitli çalışmalarla desteklenerek ele alınmıştır. TRPC kanal blokeri SKF-96365'in iskemi/reperfüzyon hasarına karşı olası koruyucu etkileri ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.

“Malzeme ve Yöntem” bölümünde; çalışmada kullanılan hayvan sayısı, özellikleri ve deney grupları belirtilmiş, yapılan kardiyodinamik ve biyokimyasal analizler hakkında bilgi verilmiştir.

“Bulgular” kısmında; elde edilen veriler kardiyodinamik ve biyokimyasal olarak değerlendirilerek, istatistiksel olarak ilişkilendirilmiştir.

“Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, çalışmadan elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bu veriler, şimdiye kadar yapılan ilgili çalışmalardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılıp tartışılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

Kardiyovasküler sistem, vücutta iki önemli işleve sahiptir. Bunlardan birincisi; vücut dokularına besinleri, oksijenlenmiş kanı ve hormonları taşımak; ikincisi ise, karbondioksit ve diğer metabolizma ürünlerini dokulardan alarak, vücuttan atılmaları için akciğerlere, böbreklere ve karaciğere ulaştırmaktır. Tüm vücut fonksiyonlarının ve sağlıklı bir yaşamın devamlılığı için kardiyovasküler sistemin bu görevlerini eksiksiz ve düzenli bir şekilde yerine getirmesi gerekir. Bu nedenledir ki, kardiyovasküler hastalıklar büyük oranda sakatlığa, yaşam kalitesinin düşmesine, buna bağlı olarak kişisel ve toplumsal düzeyde üretim ve maliyet kaybına yol açmaktadır (Ford ve diğ., 2012).

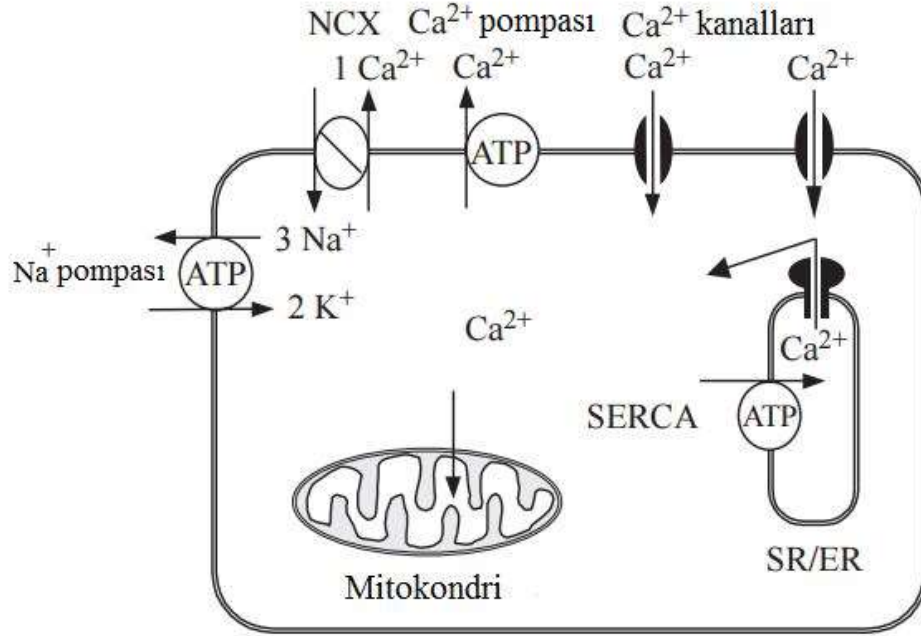
Dünyanın önde gelen sağlık sorunlarından biri olan kardiyovasküler hastalıklar, tüm dünyada hastalığa bağlı hasarların ve ölümün başta gelen nedenleri arasında yer almaktadır (Rowell ve diğ., 2010). Son yıllarda, kardiyovasküler hastalıklar konusunda farkındalığın artması ve risk faktörleri ile mücadele etmede çeşitli aşamalar kaydedilmesine rağmen, bu hastalıklar halen hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde en önemli ölüm nedeni olarak görülmektedir. Son yirmi yıl içinde, kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm oranları yüksek gelirli ülkelerde düşmüş olsa da, düşük ve orta gelirli ülkelerde hastalık ve ölüm oranları hızlı bir şekilde artmıştır (Mendis ve diğ., 2011). Kardiyovasküler hastalıkların kontrolü ve önlenmesindeki sağlık politikaları, geleneksel olarak risk faktörlerinin kontrolüne dayanmaktadır. Kardiyovasküler risk faktörleri iyi bilindiğinde, bu ölümlerin çoğu önlenebilmektedir. Bu amaçla, tüm dünyada her yıl bu hastalıkların teşhisine ve tedavisine yönelik yüzlerce çalışma yapılmaktadır. Bunların büyük bir kısmı ise doğrudan kalp ve kardiyak fonksiyonlar üzerine yapılan çalışmalardır (Mendis ve diğ., 2011).

Kalp, kardiyovasküler sistemin en önemli bileşenidir ve çalışmasının düzenliliği ve devamı kardiyovasküler sistemin görevlerini uygun bir şekilde sürdürebilmesi için zorunludur. Şüphesiz ki, kardiyak fonksiyonların yerine getirilmesi için en önemli etkenlerden biri hücre içi ve hücre dışı iyonlardır. Özellikle kalsiyum (Ca^{+2}), kardiyovasküler elektrofizyolojinin düzenlenmesinde ve kasılma fonksiyonunda önemli rol oynayan bir elementtir. Hücre içine girdikten sonra membran depolarizasyonunu başlatma ve değiştirme kapasitesinin yanı sıra, sitosoldeki kalsiyum bağlayıcı proteinler (kalp kası hücresinde troponin C) için de ikincil habercidir (Hulot ve diğ., 2011).

2.1.KALSIYUM VE FİZYOLOJİK ÖNEMİ

Kalsiyum; kas kasılması, gen transkripsiyonu, hormon salınımı, hafıza, öğrenme, hücre farklılaşması ve gelişmesi, nekroz ve apoptoz ile hücre ölümü gibi birçok hücresel cevapta rol oynayan önemli bir hücre içi ikincil habercidir. İstirahat halindeki bir hücrede, hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonu yaklaşık olarak 50-100 nM civarındadır. Birçok fizyolojik olayda rol oynayan Ca^{+2} iyonlarının hücre içi konsantrasyonları oldukça önemlidir. Hücrelerde var olan Ca^{+2} 'un en önemli kaynağı hücre dışı sıvılardır. Hücre zarında bulunan iyon kanalları Ca^{+2} 'un hücre dışı sıvıdan hücre içine girişine izin vermektedirler. Hücre içi Ca^{+2} seviyeleri, iyon kanallarının açılıp kapanmasına bağlı olarak artabilmekte veya azalabilmektedir (Berridge ve diğ., 2003).

Depolarizasyon, hormon aktivasyonu vb. olaylar hücredeki Ca^{+2} artış mekanizmalarını tetikler ve Ca^{+2} konsantrasyonu 1-3 μM seviyesine yükselebilir. Kalsiyumun sinyal üretimine yönelik fonksiyonu sitosolik miktarının artması ile doğru orantılıdır (Berridge ve diğ., 2000). Bu artış, nukleustan sızma yolu ile olabileceği gibi sadece mitokondriden de olabilir (Montero ve diğ., 2000). Hücre içerisindeki Ca^{+2} konsantrasyonu, eş zamanlı olarak birçok ters yönlü etkileşim neticesinde artabilmekte veya azabilmektedir. Kalsiyum konsantrasyonunun artışı, hücre zarına yerleşik bulunan ve sarkoplazmik retikulum/endoplazmik retikulum (SR/ER) yüzeyindeki iyon kanalları aracılığı ile gerçekleşmektedir. Ayrıca dolaylı olarak önce hücre içi sodyum (Na^{+}) miktarı artabilir daha sonra da $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ değiştiricisi ($\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ exchanger, NCX) aktive olur ve Na^{+} iyonları hücre dışına verilirken, Ca^{+2} iyonları hücre içine alınır. Hücre içine Ca^{+2} girişini sağlayan bu kanallar, sitoplazmik serbest Ca^{+2} konsantrasyonunu artırır. Buna zıt olarak Ca^{+2} konsantrasyonunun azaltılması, NCX'in ters yönde çalışması ve sarkoplazmik/endoplazmik retikulumda bulunan Ca^{+2} -ATPaz (SERCA)'lar gibi birtakım mekanizmalar tarafından sağlanır (Jeffs ve diğ., 2006) (Şekil 2.1.1).



Şekil 2.1.1: Hücre içi Ca^{+2} döngüsünün genel şeması. Ca^{+2} , Ca^{+2} kanalları ve bazı durumlarda Na^{+} - Ca^{+2} değiştiricisi (NCX) yoluyla hücre içine girebilir. Ca^{+2} , sarkoplazmik/endoplazmik retikulumdan (SR/ER), ryanodin reseptörleri ve inositol (1,4,5) trisfosfat reseptörlerini içeren Ca^{+2} salan kanallar vasıtasıyla salınabilir. Ca^{+2} , sitosolden SR/ER Ca^{+2} -ATPaz (SERCA), sitolemmal Ca^{+2} -ATPaz, Na^{+} - Ca^{+2} değişimi ve mitokondriyal uniporter ile uzaklaştırılır (Wang ve diğ., 2002).

Kalsiyum seviyesinin düzenlenmesinde mitokondri önemli rol oynar. Mitokondri, Ca^{+2} 'a düşük ilgi göstermesine karşılık, çok fazla oranda depolama kapasitesine sahiptir. Bu özelliği sayesinde Ca^{+2} miktarını azaltmada, dolayısı ile de hücresel cevap oluşumunda etkin rol oynamaktadır. Hücre içi Ca^{+2} sinyali, Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişimlerin büyüklüğü, lokalizasyonu ve devam süresine bağlı olarak iletilir ve etkinliğini gösterir (Castaldo ve diğ., 2009). Aynı zamanda kalsiyum iyonları; miyokard, arter ve ven duvarı düz kası kasılmasında ve kalbin iletim sisteminde önemli bir katyondur. Kalsiyum, hücreye yavaş akımlı Ca^{+2} kanallarından, membran aksiyon potansiyelinin “repolarizasyon faz 2” yani plato döneminde girer. Miyokard hücrelerinin kasılması için, ekstrasellüler ortamdan hücre içine bir miktar Ca^{+2} iyonu girmesi gerekir. Hücre içine giren bu Ca^{+2} , sarkoplazmik retikulumdaki (SR) internal depolardan Ca^{+2} 'un sitoplazmaya salgılanmasına neden olur. Böylece, hücre dışından gelen Ca^{+2} ile SR'den gelen Ca^{+2} , kasılma için gereken kritik düzeye ulaşır. Hücre içindeki Ca^{+2} böyle bir düzeye erişince, hücre dışından Ca^{+2} 'un girişi durur. Kritik düzeye ulaşmış Ca^{+2} , miyofibrillerin kasılma ve gevşemesini düzenleyen bir regülatör protein olan troponin ile birleşerek aktin filamentleri üzerinde yer alan diğer bir regülatör protein olan tropomiyozini çeker. Böylece, aktin filamentleri üzerinde miyozin filamentlerinin bağlanacağı yerler serbest

kalır. Miyozin filamentleri, aktin filamentleri ile birleşir. Aktin filamentleri, miyozin filamentleri üzerinden rölatif olarak kayarken, sarkomer kısalır ve kasılma gerçekleşir (Spivack ve diğ., 1983; Zelis ve Flaim, 1981).

Normal miktardaki Ca^{+2} 'un, miyokard hücrelerinin hayati fonksiyonlarını yürütmesindeki önemli rolüne karşın, hücreye fazla miktarda Ca^{+2} girmesi miyokard hasarı ve nekrozuna yol açabilir. İskemi, miyokard hücresi içine fazla miktarda Ca^{+2} girmesinden sorumlu etkenlerin başında yer alır (Jenning ve Ganóte, 1976). İskemi, Ca^{+2} iyonlarına karşı hücre membran geçirgenliğini artırır ve hücre içine fazla miktarda Ca^{+2} girmesine neden olur. Hücre içine girmiş fazla miktardaki Ca^{+2} hücre sitoplazmasında, hücrenin enerji kaynağı olan mitokondride birikir. Mitokondride şişme ve fonksiyon kaybı sonucunda adenozin trifosfat (ATP) yapımı inhibe olur. Bir yandan ATP yapımının bozulması, diğer yandan fazla Ca^{+2} 'un hücre dışına atılması için, fazla miktarda ATP kullanılması sonucu, ATP depoları boşalır. Kalsiyum iyonlarının hücre dışına atılımı bozulur (Castaldo ve diğ., 2009).

Hücre içine kalsiyum girişinin transmembran geçirgenliği yoluyla artmasının yanında, iskemik durumda, hücre içinde hidrojen ve sodyum iyonları birikiminin neden olduğu asidozis de hücre içine Ca^{+2} girişini arttırır. Yine iskemide, hücre içinden hücre dışına fazla miktarda potasyum iyonlarının atılımı sonucu ekstrasellüler ortamda yükselen potasyum iyonları, sempatik sinir uçlarını uyarmak suretiyle noradrenalin sekresyonunu artırır. Noradrenalin, hücre içine Ca^{+2} girişini artıran bir diğer etkindir. Böylece hipoksi sırasında, birçok faktör bir arada çalışarak hücre içine Ca^{+2} iyonu girişini hızlandırır. Kalsiyum iyonlarına duyarlı ATPaz aktivasyonu ile ATP kullanımının artması ve yine Ca^{+2} 'a duyarlı proteazların aktivasyonu sonucu sitoplazmada biriken kalsiyum iyonlarının doğrudan etkisi ile hücrede yapı ve fonksiyon bozukluğu meydana gelir. Fazla kalsiyumlu ortamda; mitokondriyal şişme ve nekroz, hücre membranında ve kontraktıl proteinlerde hasar oluşur (Henry ve diğ., 1977).

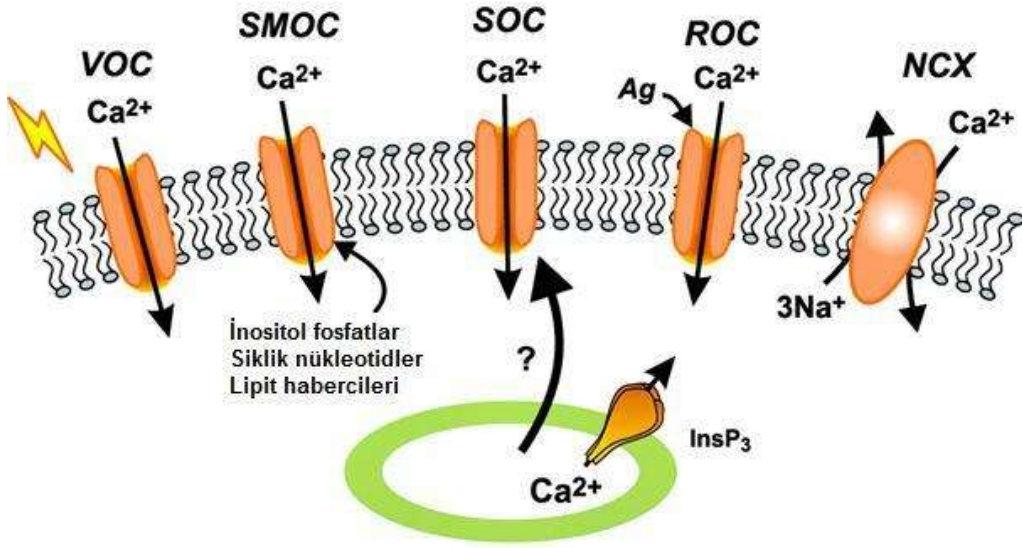
Kalp kası gibi damar düz kası kontraksiyonları için de Ca^{+2} önemli bir katyondur. Damarların vazokonstriktör tonusları Ca^{+2} ile sağlanır. Koroner arterlerde hem anginanın (istirahatte geçici göğüs ağrısı ile karakterize bir angina tipi) bir tipinde hem de kronik anginanın (egzersiz veya stres dönemlerinde öngörülebilir hastalık belirtileriyle karakterizedir) seyrinde, bazen miyokard enfarktüsüne varan spazmlara rastlanır (Mascari ve diğ., 1978). Kalsiyumun yavaş akımlı kanallardan hücre içine girişi, sinoatriyal ve atriyoventriküler düğümlerin ve iletim yollarının fonksiyonlarında da önemli rol oynar (Sabourin ve diğ., 2012).

Sonuç olarak, hücre dışı ortamda bulunan Ca^{+2} , sinyal mekanizmalarında önemli rol oynamaktadır. Hücre içine Ca^{+2} girişi, büyük bir elektrokimyasal konsantrasyon farklılığının olması durumunda gerçekleşir (Berridge ve diğ., 2003). Hücreler, Ca^{+2} 'un hücre içersine girmesine neden olabilecek aktivasyon mekanizmalarına göre farklı tipte kanallardan faydalanırlar.

Bu kanallar;

- Voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları (Voltage Gated Ca^{+2} Channels, VGCCs),
- Reseptöre duyarlı Ca^{+2} kanalları (Receptor Operated Ca^{+2} Channels, ROCCs)
- Mekanik olarak aktive olan Ca^{+2} kanalları (Mechanically Activated Ca^{+2} Channels, MACCs)
- Depo kontrollü Ca^{+2} kanalları (Store Operated Ca^{+2} Channels, SOCCs), başlıkları altında sınıflandırılabilirler (Şekil 2.1.2).

Plazma Membranı Boyunca Düzenlenmiş Kalsiyum Girişinin Yolları



Şekil 2.1.2: Plazma zarı boyunca düzenlenmiş Ca^{+2} giriş yolları. Kalsiyum, voltajla çalışan kanallar (VOC), ikinci haberciler yardımıyla çalışan kanallar (SMOC), depo kontrollü çalışan kanallar (SOC) ve reseptör ile çalışan kanallar (ROC) başta olmak üzere pek çok kanal aracılığı ile hücrelere girebilir. VOC'ler membran depolarizasyonu ile aktive edilirken, SMOC'ler, inositol fosfatlar, siklik nükleotidler ve lipitten türetilmiş haberciler (diasilgliserol ve araşidonik asit ve metabolitleri) gibi ikinci haberci moleküller tarafından aktive edilirler. SOC'ler, hücre içi Ca^{+2} depolarının boşalmasıyla aktive olurlarken, ROC'ler, bir nörotransmitter veya hormon gibi agonistlerin (Ag) doğrudan bağlanmasıyla aktive olurlar. Buna ek olarak, Ca^{+2} bazı koşullar altında ters yönde çalışan $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ değiştirici kanalları (NCX) aracılığı ile hücrelere girebilir (Parekh ve Putney, 2005).

2.1.1.Voltaj Kapılı Ca^{+2} Kanalları (VGCCs)

Kas ve sinir hücrelerinde, aksiyon potansiyeli ile plazma zarının depolarizasyonu sonucu aktive olabilen ve uyarılabilen hücre tiplerinde bulunurlar. Farmakolojik özellikleri ve fonksiyonlarına göre L, P/Q, N, R ve T olmak üzere farklı tipleri bulunmaktadır. L, P/Q, N ve R-tipi kanalların aktivasyonları kuvvetli bir depolarizasyon gerektirirken, T-tipi kanallar daha zayıf depolarizasyonlar ile aktive olabilirler. T-tipi Ca^{+2} kanalları istirahat potansiyelindeki küçük sapmalara duyarlı olduğundan, özellikle kardiyomiyositlerde pacemaker aktivitesinde fonksiyoneldirler. Buna ek olarak L-tipi kanalların da kalpte önemli fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir. P/Q, N ve R-tipi kanallar ise genellikle nöronlarda bulunurlar (Zamponi, 2005).

2.1.2.Reseptöre Duyarlı Ca^{+2} Kanalları (ROCCs)

Bu tip Ca^{+2} kanalları, yapısal ve fonksiyonel olarak farklılık gösteren salgı hücreleri ve sinir sonlarında sıkça rastlanan bir dizi kanaldan oluşmuşlardır. Bu kanallar agonistlerin, nörotransmitterlerin veya hormonların hücre zarındaki ilgili reseptörlerine bağlanması sonucu açılmakta ve hücre dışında 10.000-20.000 katı fazla bulunan Ca^{+2} iyonlarının hücre içine girmesine neden olmaktadır. En iyi bilinen ROCC'lar nikotinik asetilkolin ve N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörlerini içerirler. ROCC'lar hücre yüzeyinde bulunan özel alana agonistin bağlanması ile aktive olurlar. Farklı tipteki ROCC'lar çok geniş bir agonist yelpazesi içerisinde çeşitlilik gösterirler (örn: ATP, serotonin, glutamat ve asetilkolin) (McFadzean ve Gibson, 2002).

2.1.3.Mekanik Olarak Aktive Olan Ca^{+2} Kanalları (MACCs)

Birçok hücre tipinde bulunan bu kanallar, stres ve şekil değişikliği durumunda bilgi iletilmesinde görev alırlar. İşitme ve dengedeki rollerinin yanı sıra kardiyovasküler düzenlemede, ozmotik homeostazide ve hücre deformasyonuna karşı cevap oluşturulmasında da görev alırlar (Boitano ve diğ., 1992; Martinac, 2004).

2.1.4.Depo Kontrollü Ca^{+2} Kanalları (SOCCs)

Bu kavram ilk kez 1986 yılında Putney (1986) tarafından ileri sürülmüştür. Depo kontrollü Ca^{+2} kanalları, hücre içi Ca^{+2} depolarının boşalmasına cevap olarak ya da farmakolojik bir ajan veya fizyolojik olarak Ca^{+2} 'u hareketlendirecek haberciler tarafından aktive olabilirler (Putney ve

diğ., 2001). Hücre içi Ca^{+2} seviyesi belirli bir düzeye ulaştığında SOCC'ler açılır ve bu kanallar aracılığıyla hücre dışından içeriye Ca^{+2} iyonu girer. Depoların dolu olduğu koşullarda hücre içine Ca^{+2} girişi görülmezken, depolar boşaldığında Ca^{+2} girişi gerçekleşir. Hücre içi Ca^{+2} derişimi artar ve boşalan depolar yeniden doldurulur. Kalsiyum depolarının patlatılmasından kaynaklanan Ca^{+2} girişi artmasının birçok hücre tipinde görülmesinden dolayı, SOCCs'ler hücre zarındaki en yaygın Ca^{+2} kanal alt tipi olabilirler (Bootman ve diğ., 2001). Bu kanallar elektrofizyolojik olarak çalışılmış ve hücre tipine göre farklılık gösterdiği görülmüştür. Bu da, her bir hücre tipinin farklı tipte SOCC kanalına sahip olduğunu göstermektedir. Günümüzde, SOCC'lerin en iyi örneği geçici reseptör potansiyel (Transient Receptor Potential=TRP) olarak adlandırılan homolog yapıdaki proteinlerdir (Katz ve Minke, 2009).

2.2.GEÇİCİ RESEPTÖR POTANSİYEL (TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL=TRP) KATYON KANALLARI

İlk defa 1986 yılında meyve sineği *Drosophila melanogaster*'in görme sisteminde tespit edilen TRP proteinleri (Putney, 1986) birçok farklı hücre tipinde yer alan ve özellikle Ca^{+2} homeostazisinde son derece önem taşıyan katyon kanalları ailesidir. TRP kanalları, hücre içi ve hücre dışı habercilerin reseptörlerine bağlanmaları, kimyasal veya mekanik stresler gibi birçok uyaran tarafından aktive olabilirler. Buna ek olarak, bazı TRP kanalları sürekli açık halde bulunurken, bazıları hücre içi Ca^{+2} depolarının boşalmasını takiben aktifleşirler (Nilius, 2004).

TRP katyon kanalları amino asit benzerliklerine göre; TRPC (kanonikal), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin) ve TRPA (ankirin) şeklinde sınıflandırılabilirler (Clapham ve diğ., 2001). TRPM4 ve TRPM5 kanalları dışında karakterize edilmiş tüm işlevsel TRP kanalları Ca^{+2} için oldukça geçirgendirler. Bu durum, sadece Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonlar için değil, aynı zamanda bir değerlikli katyonlar için de geçerlidir. Örneğin; TRP kanallarının birçoğu daha fazla seçici olmakla birlikte Na^{+} iyonlarının geçişine izin verirler. Bununla birlikte, TRPV1, TRPML1 ve TRPP3 kanalları da H^{+} iyonları için oldukça geçirgendirler (Clapham, 2003).

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişimlerin olası fizyolojik sonuçları göz önüne alındığında, tüm bu TRP kanallarından "TRP Canonical (TRPC)" alt ailesinin oldukça önem taşıdığı düşünülmektedir.

2.2.1. TRPC Kanalları

TRPC kanalları, pek çok dokuda anlatımı yapılan ve özellikle Ca^{+2} iyonlarına geçirgen olan membran proteinleridir. Kanalların Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarına geçirgenlik oranları alt tiplerine göre farklılıklar gösterir. Memelilerde toplam 7 adet TRPC proteini belirlenmiştir. TRPC ailesi, dizi ve işlevsel benzerliklerine göre; TRPC1, TRPC4/5, TRPC3/6/7 ve TRPC2 şeklinde 4 alt gruba ayrılabilir (Clapham ve diğ., 2001).

TRPC kanalları, hücre dışı bir agonistin G proteinine bağlı reseptörlere (GPCR) bağlanması ile uyarılan fosfolipaz C (PLC) sinyal yolağı ile aktive olurlar. Bu yolda üretilen diasilgliserol (DAG), direkt olarak TRPC3, TRPC6 ve TRPC7 kanallarını aktive ederken, inositol trifosfat (IP3) SOCC'leri aktive etmek için depoların boşalmasını sağlar (Şekil 2.2.1.1). Bu mekanizmalar, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun TRPC kanalları aracılığı ile düzenlenmesinde oldukça önemlidirler (Nilius ve diğ., 2007).

2.2.1.1. TRPC1

Yaygın doku dağılımı gösteren bir proteindir ve bu kanal için birçok aktivasyon mekanizması ile fizyolojik rol ileri sürülmüştür. Hücre zarının gerimi gibi mekanik stresler ve hücre içi Ca^{+2} depolarının boşalması sonucunda direkt olarak aktive olabilirler (Maroto ve diğ., 2005). TRPC1'in düz kas, beyin, kalp, testis, ovaryum, endotel hücreleri ve salgı bezlerinde yüksek miktarlarda anlatımı yapılmaktadır. TRPC1, damar düz kas hücrelerinde kasılmada ve proliferasyonda önemli rol oynamaktadır (Bergdahl ve diğ., 2005).

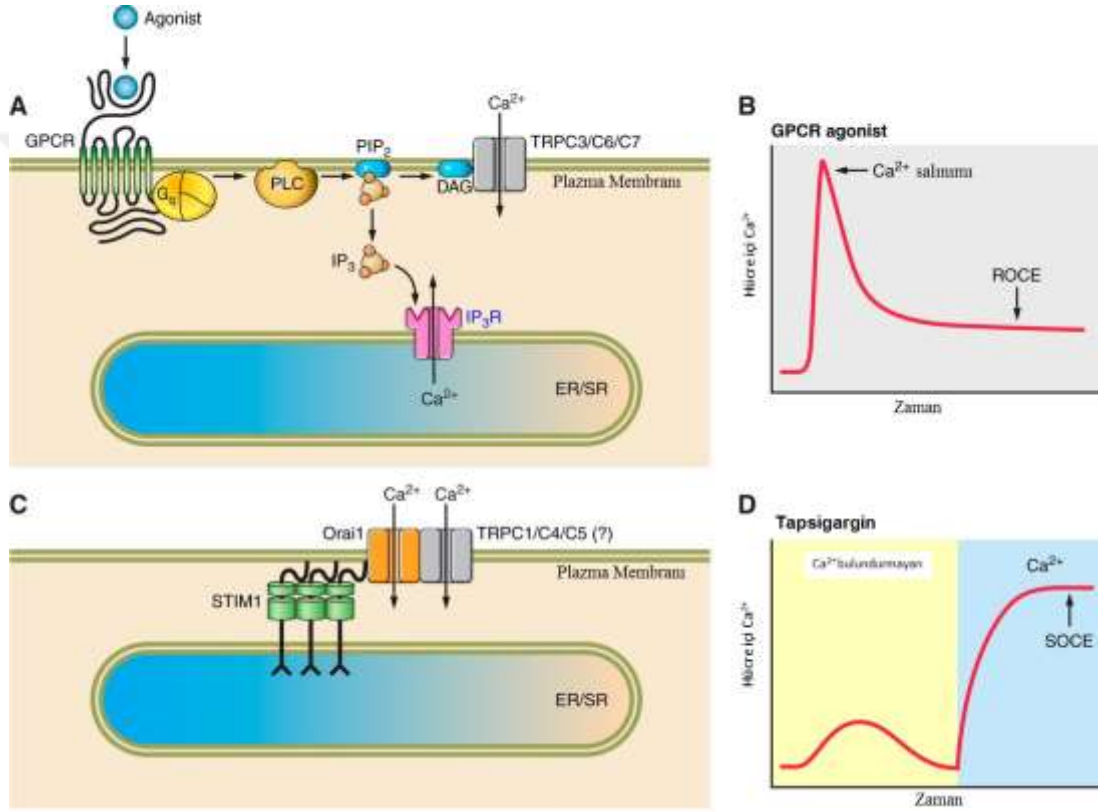
2.2.1.2. TRPC2

TRPC2 kanalı ile ilgili yeterli bilgiye sahip olunmamasına rağmen, fare ve sıçanda vomeronasal organda feromon duyargası olarak işlev gören bir protein olduğu bilinmektedir. Bu proteini kodlayan gen insan genomunda prematüre sonlanma bölgesi içerdiğinden, yalancı gen olarak tanımlanır (Hofmann ve diğ., 2000). Ayrıca, TRPC2'nin fertilizasyon sırasında fare spermine Ca^{+2} girişinin sürdürülmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (Jungnickel ve diğ., 2001).

2.2.1.3. TRPC3

TRPC3, hücre membranında bulunan ve DAG aracılığıyla aktive olan kanallardan biridir. Bu kanallar, özellikle Ca^{+2} iyonlarına karşı fazlaca geçirgen olmakla birlikte, Na^{+} iyonlarının da

hücreye girişini sağlarlar (Hofmann ve diğ., 1999). Esas olarak beyin, düz kas ve kalp kası hücrelerinde anlatımı yapılmaktadır. TRPC3 kanallarının yüksek miktardaki anlatımları ve buna bağlı olarak Ca^{+2} 'un hücre içine girişindeki artış, vazokonstriksiyonu ve kan basıncını artırmaktadır (Liu ve diğ., 2009). Bu kanalın hipertansiyon ve kardiyak hipertrofide patofizyolojik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Ohba ve diğ., 2007). Aynı zamanda, TRPC3 aracılığıyla düzenlenen depo kontrollü Ca^{+2} girişinin, kardiyomiyositlerde apoptozu artırdığı da bildirilmektedir (Shan ve diğ., 2008).



Şekil 2.2.1.1: TRPC kanallarının aracılık ettiği Ca^{+2} akış mekanizmaları. A: Reseptör aracılı Ca^{+2} girişi (ROCE; Receptor Operated Calcium Entry). G proteinine bağlı reseptörlere (GPCR) agonist bağlanması, zarda bulunan fosfoinositol bifosfat (PIP_2)'in, IP_3 ve DAG moleküllerine ayrılmasını aktive eden PLC'yi uyarır. IP_3 , ER/SR'de bulunan IP_3R 'lere bağlanarak Ca^{+2} 'un sitoplazma içine salınmasına neden olur. DAG ise, TRPC3, TRPC6 ve TRPC7 kanallarını doğrudan etkileyerek, plazma membranı üzerinden hücre içine Ca^{+2} girişini sağlar. B: GPCR'nin uyarılmasını takiben değişen, ER/SR'den Ca^{+2} salınımı kaynaklı fazık artış ve ROCE kaynaklı değişen hücre içi Ca^{+2} seviyelerinin zamana bağlı durumu. C: Depo kontrollü Ca^{+2} girişi (SOCE; Store Operated Calcium Entry). ER/SR'de Ca^{+2} 'un tükenmesi, ER/SR zarına yakın konumlanan stromal etkileşim molekülü 1 (Stromal Interaction Molecule 1=STIM1)'in uyarılmasına neden olur. STIM1, Ca^{+2} akışını arttırmak için plazma membranında Orai1 ile etkileşir. TRPC1, TRPC4 ve TRPC5 kanalları, bağımsız olarak veya STIM1/Orai1 ile bağlantılı olarak SOCE'ye katılabilir. D: Tipik bir SOCE deneyi örneği. Ca^{+2} içermeyen koşullar altında, hücreler SERCA inhibitörü ile muamele edilir. SERCA inhibitörü olan Thapsigargin, Ca^{+2} 'un ER/SR'den sitoplazmaya sızmasına neden olur. Deney ortamına tekrar Ca^{+2} ilavesi, SOCE'ye neden olarak ER/SR depolarının yeniden dolmasını sağlar (Earley ve Brayden, 2015).

2.2.1.4. TRPC4 ve TRPC5

TRPC4 ve TRPC5 kanalları, tirozin kinaz aktivitesi gösteren reseptörler aracılığıyla aktive olurlar (Otsuguro ve diğ., 2008). TRPC4, damar düz kas hücrelerinin düzenlenmesinde görev alır ve endotel ile çeşitli düz kas hücrelerinde anlatımı yapılır (Watanabe ve diğ., 2008). TRPC5'in ise vasküler hastalıklardaki rolü tam olarak bilinmezken, insan kalp yetmezliğinde anlatımının önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, TRPC1 kanalının hücre membranına translokasyonu için TRPC4 ve TRPC5 ile etkileşim halinde olduğu belirlenmiştir (Guinamard ve Bois, 2007).

2.2.1.5. TRPC6

TRPC6 kanalı da TRPC3 gibi DAG tarafından aktive edilen bir katyon kanalıdır. Bu kanallar, hücre membranının altındaki vesiküllerde tutulur ve reseptör aktivasyonuna yanıt olarak hızla hücre zarına taşınırlar (Cayouette ve diğ., 2004). TRPC4/5 alt gurubu gibi bunların da TRPC3 ve TRPC7 ile bir küme oluşturduğu düşünülmektedir. Örneğin; TRPC6 geni olmayan farelerde, TRPC3 kanal anlatımının ve buna bağlı olarak damar düz kas kasılması ve kan basıncının arttığı gösterilmiştir (Dietrich ve diğ., 2005).

2.2.1.6. TRPC7

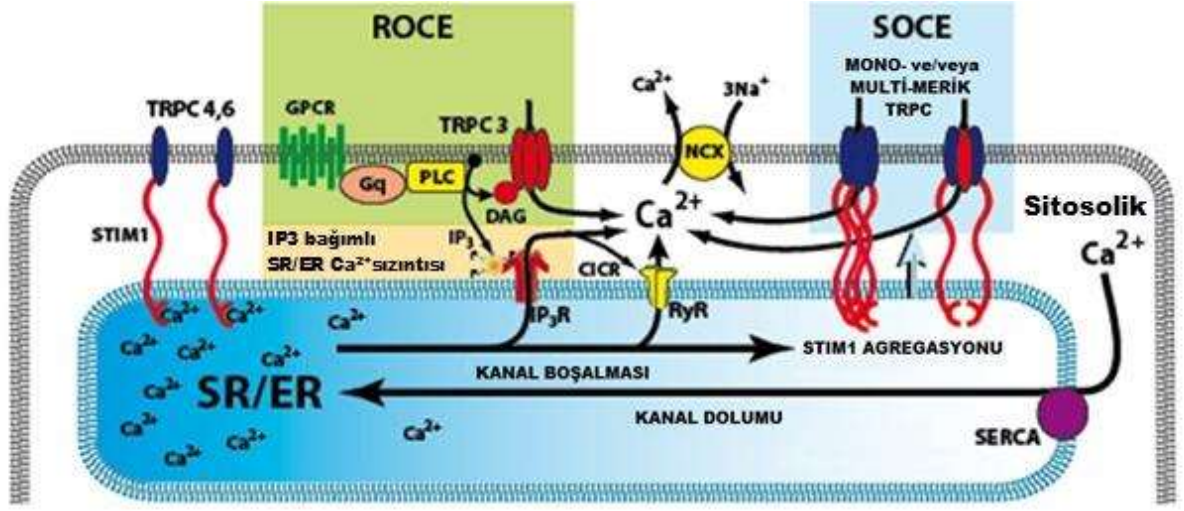
TRPC7, DAG ile aktive olan ve hücre içine Ca^{+2} girişine izin veren kanallardan biridir. Bu kanalların endotelial hücreler ve kalp hücrelerinde anlatımları yapılmaktadır. TRPC7'nin patofizyolojik rolü tam olarak anlaşılmamasına rağmen, kalp yetmezliğini takiben oluşan kardiyak hipertrofide önemli olduğu ve apoptozda artışa yol açtığı bildirilmektedir (Guinamard ve Bois, 2007).

2.2.2. TRPC Kanallarının Aktivasyonu

TRPC'ler ile ilgili önemli konularından biri, bu kanalların aktivasyon mekanizmalarıdır. TRPC kanalları hem depo kontrollü olarak hem de reseptör aktivasyonu ile hücre içine Ca^{+2} alınmasında fonksiyoneldirler. Depo kontrollü Ca^{+2} girişi membranda bulunan ve önceleri TRPC denilen fakat daha sonra Orail olarak isimlendirilen kanallar tarafından gerçekleştirilir.

Deponun boşalması ile SOCC'ların açılışı arasındaki ilişkinin anlaşılmasında çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür (Bezzerides ve diğ., 2004; Rosado, 2006). Ancak son yıllarda

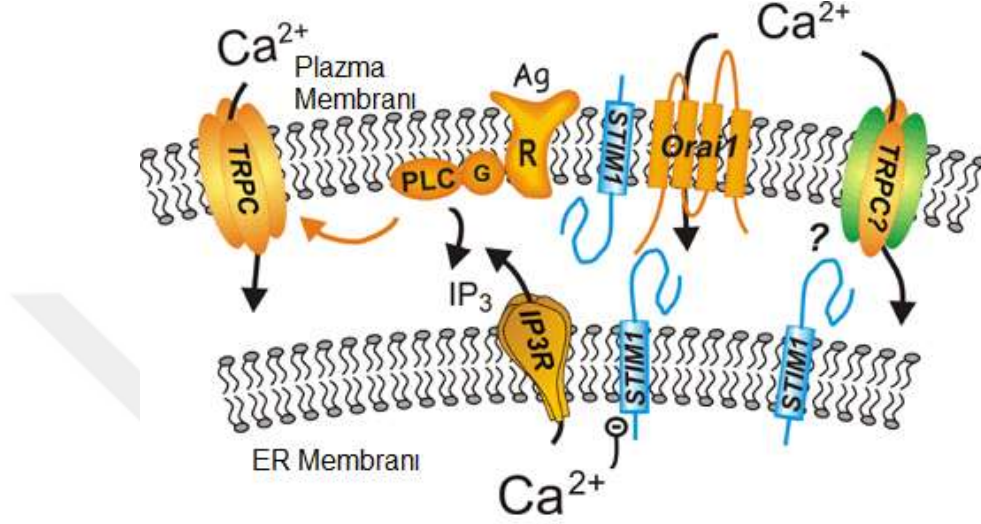
yapılan çalışmalarda, ER zarında bulunan bir transmembran protein olan STIM1'in, depo kontrollü Ca^{+2} girişinde önemli işlevleri olduğu bildirilmiştir (Spassova ve diğ., 2006; Liao ve diğ., 2008; Hulot ve diğ., 2011). STIM1, sahip olduğu Ca^{+2} bağlayıcı bölgesi aracılığıyla deponun Ca^{+2} oranını algılar ve hücre zarında konumlanmış Orai1 ile etkileşime geçer (Collins ve diğ., 2013). Aynı zamanda çeşitli hücre tiplerinde STIM1, TRPC kanalları ile etkileşim halinde bulunur (Huang ve diğ., 2006) (Şekil 2.2.2.1 ve Şekil 2.2.2.2).



Şekil 2.2.2.1: TRPC3'ün aktivasyonunda yer alan sinyal yolları. G proteinine bağlı reseptör (GPCR), fosfolipaz C'yi (PLC) aktive eder ve IP₃ ve diaçilgliserol (DAG) üretir. IP₃, SR/ER'den Ca^{+2} salınmasına ve SR/ER Ca^{+2} deposunun tükenmesine yol açan reseptörünü (IP₃R) aktive eder. Depodaki Ca^{+2} değişikliği, STIM1 sensörü tarafından algılanabilir ve bu ER Ca^{+2} sensörü TRPC3 kanalları aracılığıyla depo kontrollü Ca^{+2} girişine (SOCE) neden olabilir. Bir diğer olasılık, DAG'ın TRPC3'ü doğrudan aktifleştirebilmesi ve reseptöre duyarlı Ca^{+2} girişine (ROCE) neden olmasıdır (Ju ve diğ., 2015).

STIM1'in TRPC kanalları ile ilişkili olarak kasılma fonksiyonu üzerine de etkileri vardır. Özellikle kalpteki etkileri çok az biliniyor olmasına rağmen, yapılan bir çalışmada STIM1 aktivasyonunun kardiyomiyositlerde hipertrofiye neden olduğu ve anlatımının baskılanması durumunda kalbin hipertrofidan korunduğu bildirilmiştir (Hulot ve diğ., 2011). STIM1'in Orai'lerden ziyade TRPC kanalları ile neden etkileşim içinde olduğu konusuna henüz tam olarak açıklık getirilememiştir (Yuan ve diğ., 2007). Bunlara ek olarak, TRPC kanalları hücrel mekanik streslere de duyarlıdır. Bu durum, damarların yapısında ve kasılma fonksiyonlarında bozulmalar ile hemodinamik değişimlere neden olduğundan, özellikle kardiyovasküler sistem için çok önemlidir. Özetle, TRPC kanallarının aktivasyonları; bulundukları hücre tipleri, anlatım seviyeleri, hücre içi lokalizasyonları gibi birçok faktör tarafından belirlenebilir ve mekanizmaları oldukça karmaşıktır. Kanalların düzenlenmesindeki

bu karmaşıklık TRPC kanallarının yer değiştirmelerinden kaynaklanabilir. Hücre membranının altında, vesiküller içinde tutulan TRPC proteinlerinin agonist bir molekülün uyarısıyla membrana yerleştikleri ve etkilerini bu şekilde gösterdikleri ileri sürülmektedir (Singh ve diğ., 2004).

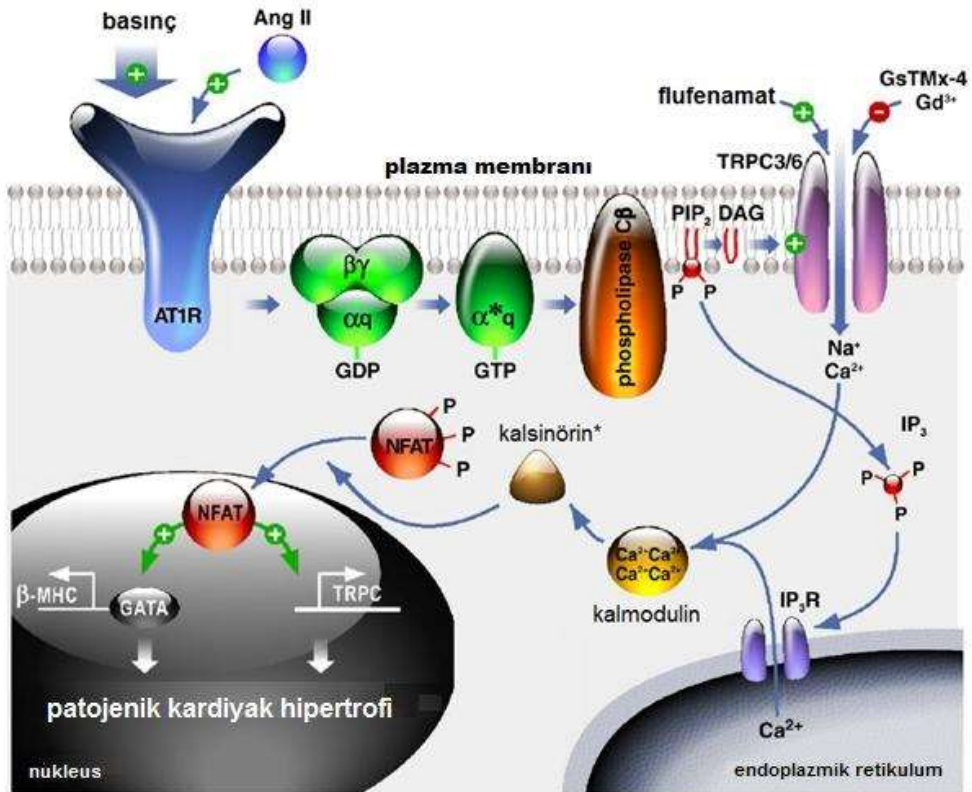


Şekil 2.2.2.2: STIM1 ve Orai'nin rolleri. Bir plazma membran reseptörünün (R) agonist (Ag) ile aktivasyonu, IP₃ reseptörünü (IP₃R) harekete geçirerek, endoplazmik retikulumda depolanmış Ca²⁺'un boşalmasına neden olur. Kalsiyum, STIM1'deki EF el motifini ters olarak bağlar; depodaki Ca²⁺'un boşalması, STIM1'in endoplazmik retikulum içinden plazma zarında bulunan Orai kanallarına doğru yeniden şekillenmesine neden olur. STIM1 daha sonra Ca²⁺'a geçirgen olan Orai kanallarını aktive eder (Putney, 2007).

2.2.3. TRPC Kanalları ve Negatif Geri Besleme Mekanizmaları

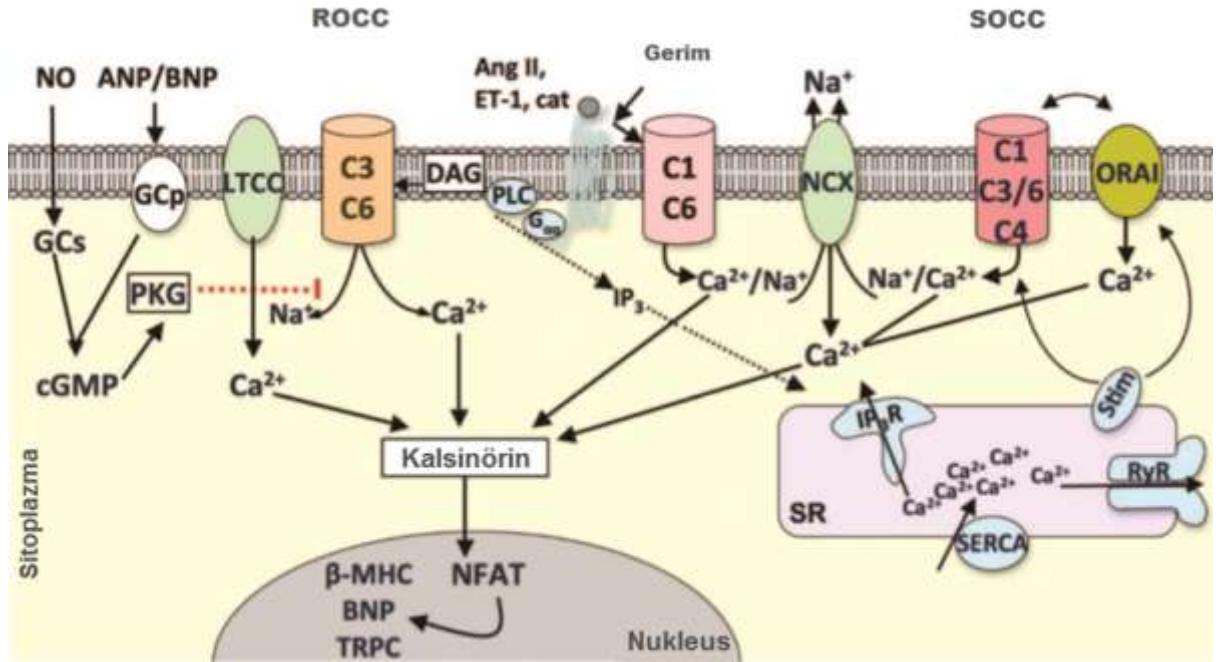
Protein Kinaz G (PKG) ve Protein Kinaz C (PKC)'ye bağlı sinyal yolları, TRPC kanal aktivasyonlarının negatif geri besleme mekanizmaları olarak görev yaparlar. TRPC3 ve TRPC6'nın aktiviteleri PKG ile katalizlenen fosforilasyon sonucu büyük ölçüde zayıflatılır (Nishida ve Kurose, 2008). PKG, her biri kardiyak hipertrofiyi negatif yönde düzenleyen nitrik oksit (NO) ya da atriyal natriüretik peptit (ANP)-siklik guanizin monofosfat (cGMP) sinyal yollarının son ürünüdür. TRPC6, ANP/BNP-cGMP-PKG (Atriyal Natriüretik Peptit/Beyin Natriüretik Peptit-Siklik Guanozin Monofosfat-Protein Kinaz G), antihipertrofik sinyal yolunun direkt hedefidir ve bu sinyal yolunun TRPC6 kanal aktivitesini inhibe ederek kardiyak hipertrofiyi engellediği gösterilmiştir (Koitabashi ve diğ., 2010). Benzer şekilde, TRPC3'ün aşırı anlatımı NO tarafından inhibe edilebilir ve TRPC6 da PKG ile düzenlenen fosforilasyon bölgelerine sahip olduğundan, NO tarafından benzer düzenlemelere maruz kalabilir (Chen ve diğ., 2009). Sonuçta yüksek PKG aktivitesi hücre içine Ca²⁺ girişini azaltırken (Nishida ve diğ.,

2010), cGMP-PKG sinyalinin azalması TRPC kanal aktivitesini artırarak kardiyak hipertrofiye neden olabilir. Aynı zamanda ANP'nin, angiotensin II (Ang II) gibi agonistler aracılığıyla aktive olan TRPC kanalları boyunca ventriküler miyositlere Ca^{+2} girişini inhibe ettiği de gösterilmiştir (Kinoshita ve diğ., 2010). Angiotensin II ile uyarılan hipertrofik büyüme, NFAT (Aktive Edilmiş T-Hücrelerinin Nüklear Faktörü=Nuclear Factor of Activated T cells) tarafından gerçekleşir. Kardiyomiyositlerde NFAT aktivasyonu için temel mekanizma, depo kontrollü Ca^{+2} girişi ile ilişkilidir. STIM1/Orai1 etkileşimi sonucunda hücre içine giren Ca^{+2} , NFAT'ı aktive eder (Zhang ve diğ., 2005; Hulot ve diğ., 2011). Angiotensin II ve NFAT aktivasyonu ile gerçekleşen hipertrofik cevaplar, Ca^{+2} salınımının düzenli olarak tekrarlanmasına ihtiyaç duyar. Düzenli Ca^{+2} salınımı, TRPC kanallarının aktivasyonu ile L-tipi Ca^{+2} kanallarının uyarılması ve sonuçta oluşan membran depolarizasyonu aracılığıyla tetiklenir (Wilkins ve Molckentin, 2004; Woodcock ve Matkovich, 2005). Angiotensin II; TRPC3 ve TRPC6 kanallarının aktivasyonu ile uyarılan NFAT ve hipertrofik cevaplar ile korelasyon içindedir (Onohara ve diğ., 2006) (Şekil 2.2.3.1).



Şekil 2.2.3.1: Kardiyak hipertrofide TRPC3/6/7'nin rolü. Zar basıncı ve/veya ligandı olan Ang II ile uyarılan angiotensin tip I (AT1) reseptörü, PIP_2 hidrolizine yol açar. Ardından DAG doğrudan plazma zarındaki TRPC3/6/7 kanallarını aktive eder. TRPC3'ün ayrıca IP_3 reseptörleri ile fiziksel olarak etkileşime girdiği gösterilmiştir. Kalsinörin'in Ca^{+2} kalmodulin ile aktivasyonu, NFAT'ı defosforile eder (Naeini ve diğ., 2010).

TRPC kanalları; Ang II, endotelin-1 (ET-1), katekolaminler gibi agonistler ya da membran gerimi ile PLC'nin aktivasyonu sonucu uyarılırlar. DAG, reseptöre duyarlı Ca^{+2} kanallarını (ROCC) aktive ederken, IP₃ depo kontrollü Ca^{+2} kanallarını (SOCC) aktive etmek için depoların boşalmasını sağlar. TRPC kanalları, gerim ile de aktive olurlar. STIM1 depo kontrollü Ca^{+2} girişi için TRPC'leri uyarır. TRPC kanalları da Orai'ler ile fonksiyonel olarak etkileşime geçer. Doğrudan TRPC kanallarının aktivasyonu, dolaylı olarak da L-tipi Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu ve NCX'in ters yönde çalışması ile hücre içine giren Ca^{+2} , kalsinörini aktive eder. Kalsinörin de hipertrofik genler ile BNP'yi düzenlemek ve TRPC gen anlatımını artırmak için NFAT'ı uyarır. TRPC kanalları, NO-cGMP ya da ANP/BNP-cGMP sinyal yolları ile uyarılan PKG ile inhibe edilir. Riyanodin reseptörlerinden (RyR) Ca^{+2} salınımı sonucunda da PKG fosforilasyonu gerçekleşir ve TRPC kanalları inhibe edilir (Eder ve Molkenin, 2011) (Şekil 2.2.3.2).



Şekil 2.2.3.2: TRPC kanalları ve ilişkili sinyal yolları (Eder ve Molkenin, 2011).

2.3.KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR VE TRPC KANALLARI

Kalsiyum sinyali sistemi, hücrel işleyişin devamını sağlayan farklı birçok yolu kontrol etmektedir. Kalpte, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu kalbin kasılması ve gevşemesi açısından kritik rol oynar. Kalsiyum sinaptik aralıkta mikrosaniyeler içerisinde ekzositozu tetiklerken, diğer tarafta dakikalar hatta saatlerce süren gen transkripsiyonu ve hücrel farklılaşma

olaylarını kontrol eder (Bootman ve Roderick, 2008). Hücre içi Ca^{+2} deposu olarak görev yapan ER veya kaslardaki SR Ca^{+2} salınımı, Ca^{+2} 'un kendisi veya inositol 1,4,5-trifosfat, adenozin difosfat riboz (ADPR), nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat (NAADP) ve Sfingosin-1 fosfatın da aralarında bulunduğu geniş bir haberci grubu tarafından hücre içi depolar üzerinde bulunan salınım kanallarının uyarılması veya düzenlenmesi ile kontrol edilmektedir. Hücre içi organellerden özellikle endoplazmik retikulum, IP3 reseptörleri bakımından zengin Ca^{+2} serbest bırakan organeldir. Bunlar kardiyomiyositlerde bulunmaktadır. Kalbin kasılıp gevşemesinde başlıca Ca^{+2} kaynağı olan ilgili ryanodin reseptörlerinin miktarından az olmasına rağmen kardiyomiyositlerde bulunmaktadır (Berridge ve diğ., 2003). IP3 reseptörleri her ne kadar aktivasyon için inositol trifosfata mutlak ihtiyaç duysalar da, sitosolik Ca^{+2} , inositol trifosfat reseptörleri üzerine ryanodin reseptörleri üzerindeki etkiye benzer bir etki gösterdiklerinden, voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları olarak değerlendirilebilirler. Kardiyomiyositlerdeki baskın inositol trifosfat reseptörü, tip 2 reseptörlerdir (Györke ve diğ., 2007). Ancak bu reseptörlerin kalpteki rolleri hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Aksiyon potansiyelinin sonlanmasıyla Ca^{+2} iyonları, plazma zarı Ca^{+2} -ATPaz (PMCA) pompasıyla hücre içinden dışına pompalanır. Bunun yanında Ca^{+2} , SERCA yardımıyla hücre içindeki Ca^{+2} depolarına gönderilir. Ek olarak Ca^{+2} hücre içi bileşikler sarkoplazmik retikulum gibi SERCA pompası aktivasyonu ile gönderilir (Gomes ve diğ., 2008).

Kalsiyum sinyal yolağının uyarılması, kalp hastalıklarında önem taşıyan sistolik/diyastolik fonksiyon bozukluklarına ve miyokardiyal apoptoz gelişimine neden olur (Kang ve Izumo, 2003). TRPC kanallarının aktivasyonu, Ca^{+2} bağımlı sinyal yolağını uyararak, patolojik kardiyak yeniden yapılanmaya, hipertrofiye ve proapoptotik etkilere neden olur (Eder ve Molckentin, 2011). TRPC3 ve TRPC6 benzer özelliklere sahip olduğundan, ventriküler miyositlerde TRPC6 anlatımının, olası kardiyak hipertrofiyi ve kalp hastalıklarını artırdığı da bilinmektedir (Feng ve diğ., 2011).

İzole kalpteki IR hasarında TRPC kanallarına yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda, sitosolik Ca^{+2} artışının IR hasarı sonucu hücre ölümünde önemli bir rol oynadığı, ayrıca depo kontrollü Ca^{+2} girişinin IR hasarını takip eden kardiyomiyosit apoptozunda etkili olduğu belirtilmiştir. TRPC kanalları bloke edildiğinde, apoptozda ve miyokard enfarktüsünde önemli derecede azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Normal koşullarda, kalpte oldukça düşük olan TRPC3 ve TRPC6 kanallarının anlatımları, kalp hastalıklarında belirgin bir artış

göstermiştir (Eder ve Molkentin, 2011). Ayrıca, bu kanalların birlikte delesyonlarının, kardiyak bozukluklar üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Wu ve diğ., 2010).

2.4.İSKEMİ/REPERFÜZYON (İR) HASARI

İskemi, arteriyel ya da venöz kan akımının bozulmasına bağlı olarak, organların ve dokuların yetersiz perfüzyonuna yol açar ve oksijenden yoksun kalmalarına neden olur. İskemi, hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açar (Zimmerman ve Granger, 1992). Kısa iskemik periyotlarda kalp kasında, kontraktıl fonksiyonda bozulmalar gözlenebilirken, uzamış iskemide nekroza kadar giden hasar oluşur (Kloner ve diğ., 1998; Kloner ve Jennings, 2001). Hücrelerin rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenmesi için iskemik dokuya yeniden kan akımı gerekir. İskemiye maruz kalan doku ya da organların yeniden kanlanması ve oksijenlenmesi olayına reperfüzyon denir (Damjanov ve Linder, 1995). İskemik dokunun reperfüzyonu, iskemi ile oluşandan daha fazla doku hasarına neden olur (Zimmerman ve Granger, 1992). Reperfüzyon hasarı, iskemiden sonra yeniden kanlanma sürecinde doku ya da organlarda meydana gelen hasar olarak tanımlanır. Hücrelerin yeniden kanlanması sürecinde, hücre içine giren moleküler oksijenlerin hızlı bir şekilde serbest oksijen radikal (SOR) türevlerini oluşturması olayı başta olmak üzere birçok mekanizma reperfüzyon hasarında rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına karşı proteinler, zar lipidleri, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleri oldukça hassastır (Wilhelm, 1990).

İskemiye maruz kalan hücrelerde yapısal ve metabolik değişiklikler meydana gelir. İskemi sırasında kan akımının kesilmesi ile dokularda oldukça önem arz eden, hücrel oksidatif fosforilasyon, adenozin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfatların sentezleri azalır (Jennings ve Reimer, 1991). Hücrelerin enerji kaynağı olan bu moleküllerin giderek azalması sonucu, hücre zarında bulunan sodyum/potasyum-ATPaz (Na^+/K^+ -ATPaz) pompası çalışamaz hale gelir. Sonuçta hücre içinde bulunan Na^+ ve Ca^{+2} iyonları hücre dışına pompalanamayıp, bu iyonların hücre içi konsantrasyonları artmaya başlar (Green ve diğ., 1989). Özellikle hücre içinde artan Ca^{+2} konsantrasyonu, hücre için oldukça sitotoksik bir etki meydana getirir (Orrenius ve diğ., 1992).

İskemi/reperfüzyon hasarının zararlı fizyolojik etkilerinden sorumlu çeşitli faktörlerin olduğu belirtilmiştir. Bu faktörlerden; serbest oksijen radikalleri, kompleman sistemi ve endotel

hücreleri ile polimorf nüveli lökositler (PMNL) iskemik hasarın nedenleri arasında yer almaktadır (Homer-Vanniasinkam ve diğ., 1997; Monsinjon ve diğ., 2001).

Kalpde, IR hasarını takiben miyokardiyal fonksiyon bozuklukları, miyokardiyal sersemleme, reperfüzyon aritmileri, koroner endotelial ve mikrovasküler fonksiyon bozuklukları ve miyositlerde nekroz görülebilir (Kloner ve diğ., 2001). Miyokardiyal reperfüzyon hasarı, reperfüzyon sırasında henüz sağlam olan miyositlerin reperfüzyonla tetiklenen metabolik, fonksiyonel ve yapısal olaylar zinciri sonucunda hasar görmesi olarak tanımlanabilir. Kısa süreli iskemilerde miyokard fonksiyonları genellikle hızla düzelirken, uzun süreli ve ağır iskemilerde düzelme saatler ya da günler alabilir (Bolli, 1990). Hücre hasarının artışı, kalpte geri dönülemez olayların başlangıcı da olabilir (Ku, 1982; Lucchesi, 1990).

İskemi/reperfüzyon döneminde farklı mekanizmalarla gelişen kontraktür gözlenebilir. Miyokardiyal kontraktür, kalp kası hücrelerinin kasılmasına yol açan aktin ve miyozin arasında çapraz bağlanmanın geri dönüşümsüz hale gelmesiyle ortaya çıkar. Miyokardiyal kontraktür, Ca^{+2} bağımlı ve rigor tip olmak üzere ikiye ayrılır:

Ca⁺²-bağımlı kontraktür: İskemik hücrelerde, Ca^{+2} düzeylerini dengeleyen fonksiyonlarda bozulmalar görülür. Bu hasar sonucunda hücre dışından ve hücre içi depolardan Ca^{+2} akımının artışı ile sitoplazmadaki Ca^{+2} miktarı, reperfüzyon döneminde toksik düzeylere çıkabilir. Sitoplazmik Ca^{+2} düzeylerinin aşırı yüksekliği miyofibrillerin duyarlılığını azaltarak, kontraktür gelişimine yol açar. Mitokondrinin ATP sentezini sürdürme yeteneği, iskemik periyot sırasında ciddi hasar görmezse, reperfüzyon sürecinde enerji üretim mekanizmasının hızla geri kazanılmasına yol açar. ATP'nin tekrar sentezlenebilmesi, kardiyomiyositlerde sitosolik katyon dengesini yeniden sağlarken, iskemiden sonra hasar gören kasılma mekanizmasını da yeniden etkinleştirir (Piper ve diğ., 2003).

Rigor tip kontraktür: İskemi periyodunun uzaması, hücrelerin yeniden oksijenlenme döneminde enerji üretim yeteneğini kısıtlar veya ortadan kaldırır. Bu dönemdeki ATP düzeylerinin düşüklüğü rigor tipi kontraktür gelişimini tetikler. Kontraktürün oluşumu Ca^{+2} 'dan bağımsızdır. Her iki kontraktür tipi de mekanik güçsüzlüğe, doku nekrozuna ve global iskeminin bütün kalbi etkilemesiyle görülen katılaşmış kalp fenomenine yol açabilir (Piper ve diğ., 2003).

İskemi/reperfüzyon döneminde harekete geçen tüm mekanizmaların sonucu olarak kalp hücrelerinde nekroz gelişimi de görülür (Piper ve diğ., 2003). Aynı zamanda miyokard enfarktüsü geçiren hastaların miyositlerinde apoptoz da görülebilir (Singal ve diğ., 1998). *In vitro* çalışmalar ve hayvan modellerinde IR, miyokard enfarktüsü ve kronik basınç yüklenmesi (hipertansiyon) gibi durumların oksidatif stres oluşturarak apoptoz yoluyla miyosit kaybına neden olduğu gösterilmiştir (Benjamin ve Schneider, 2005; Giordano, 2005).

İskemi/reperfüzyon hasarında serbest radikallerin rolü ortaya konmuş ve bunun sitosolden sarkoplazmik retikuluma Ca^{+2} transportunun azalması sonucu olduğu gösterilmiştir (Hess ve diğ., 1983). Post-iskemik reperfüzyon, miyokardiyal ve koroner endotel fonksiyon bozukluğuna yol açar. Miyokardiyal iske mi sırasında, intrasellüler asidozis iyonik pompalarla Ca^{+2} ile yer değiştiren Na^{+} 'un sitosolik konsantrasyonundaki artışına yol açarak, hücrenin aşırı Ca^{+2} yüklenmesine, miyofilamentlerin Ca^{+2} 'a duyarlılığını azaltarak neden olur (Tani ve Neely, 1989).

2.5.KALPTE İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARININ KALSİYUM VE TRPC KANALLARI İLE İLİŞKİSİ

Kalp, normal fonksiyonunu sürdürebilmek için devamlı olarak oksijene gereksinim duyar. Miyokardlarda oksijen tüketiminin yaklaşık %80'i kasılma sırasında gerçekleşen elektromekanik işlerde kullanılır (Segal, 1962). İskemide çalışan bir kalp, arrestteki kalpten daha fazla enerjiye gereksinim gösterir. Koroner arter kanı miyokarddan her geçtiğinde, kalbe sunulan oksijenin %75'i harcanır. Buradan anlaşılacağı gibi kalp, oksijen temininde meydana gelecek kısıtlamalara karşı oldukça duyarlıdır (Brover ve diğ., 1983). İskemi sırasında oluşan zararlı değişimlerin reperfüzyonla daha da şiddetli ve belirgin hale gelmesi ile kendini gösteren tablo, hücre içinde Ca^{+2} birikmesi, geri dönüşümsüz hasar görmüş miyositlerin nekrozunun hızlanması, miyokardiyal ödemin artışı ve oksijen içeriği normale döndüğü zaman oksijeni kullanamama ile karakterizedir (Buckberg, 1987).

Kalsiyum içermeyen bir perfüze ile kalbin kısa süreyle perfüze edilmesinden sonra, Ca^{+2} içeren bir perfüzyon uygulandığında, yaygın doku yıkımı, enzim açığa çıkması, kontraktür gelişimi ve yüksek enerjili fosfat depolarında önemli düşüşe neden olmaktadır. Bu tablo Zimmerman ve diğ. (1967) tarafından kalsiyum paradoksu olarak tanımlanmıştır. Reperfüzyon sırasında Ca^{+2} aşırı biçimde hücre içine girmekte ve hücre içi sıvı dengesini düzenleyen mekanizmalar

bozulmaktadır. Kalsiyumun artışı serbest radikallerin oluşumunu tetikler ve sarkolemmaya hasar verebilir. Sitoplazmik Ca^{+2} 'un azalmasının sonucunda, reperfüzyon sırasında Ca^{+2} pasif difüzyonla hücre içine geçer. Hücre içine Ca^{+2} geçişinin azaltılması, kalbin mekanik fonksiyonlarında belirgin düzelmeler yaratır (Shine ve Douglas, 1983). Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişimlerin, TRPC kanalları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Onohara ve diğ., 2006; Doleschal ve diğ., 2012). İskemik ventriküler kardiyomiyositlerde TRPC kanalları aktif hale gelerek, hücre depolarizasyonuna, hücre içine fazla miktarda Ca^{+2} alınımına ve aritmiye neden olur (Sabourin ve diğ., 2012). TRPC kanallarına bağlı olarak değişen hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu da, kardiyomiyositlerde fizyolojik açıdan oldukça önem taşımaktadır (Shan ve diğ., 2008). İskemi sonrası gelişen miyokard enfarktüsünden sonra TRPC kanallarının anlatımında artış olduğu bilinmektedir. Miyokard enfarktüsünden sonra TRPC kanal anlatımının artmasıyla birlikte Ca^{+2} akışındaki artışın, miyositlerin kasılmasında ve hipertrofik sinyallerde değişikliğe yol açtığı keşfedilmiştir. Ca^{+2} iyonlarının bu kanallardan hücre içine doğru geçişinin sonucunda, patolojik hipertrofinin gelişmesi, kalbin kasılma düzenin bozulması ve bununla birlikte kanı vücuda pompalayamaması gibi kalp rahatsızlıkları görülmektedir. Kalpte miyokard enfarktüsünden sonra TRPC kanallarının inhibe edilerek fonksiyonunun durdurulmasının kalp için faydalı olabileceği fikri desteklenmektedir (Makarewich ve diğ., 2014). Kalbi koruma ve akut miyokard enfarktüsünde, iskemik ataklar sırasında nekroza giden hücre sayısını azaltmak amacıyla, kalsiyum antagonistleri kullanılabilir. Akut miyokard enfarktüsünde, kalsiyum antagonistleri; çevresel damar direncini azaltması, kalp debisinin artırılması, koroner damarları genişleterek iskemik dokunun daha iyi kanlanması ve metabolik yıkım ürünlerinin hızla uzaklaştırılması yoluyla, nekroz alanlarını küçültür veya nekrozu önler (Kalogeris ve diğ., 2012). Tüm bu veriler göz önüne alındığında, kalp dokusunda iskemi/reperfüzyon hasarını takiben değişen hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonlarının, kalp kasılmasında çok önemli olduğu da göz önünde bulundurularak, bu katyonların geçişinde ve buna bağlı olarak pek çok kalp rahatsızlığında rol oynayan TRPC kanallarının bloke edilmesi, kalpte olumlu gelişmelere ve iyileştirici etkilere neden olabilir.

Kardiyomiyositlerde iskemi/reperfüzyon hasarı esnasında TRPC'lerin anlatımının ve buna bağlı olarak hücre içi Ca^{+2} miktarının artışı, kardiyak bozukluklara yol açarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Yüksek Ca^{+2} konsantrasyonuna bağlı olarak gelişen kardiyak hastalıkların tedavisinde TRPC kanallarının inhibisyonları ve bu alanda yapılan çalışmalar önemlidir. Bu bilgilerin ışığında, kardiyak TRPC kanallarının oldukça önem taşıdığı ve bu yapıların birlikte

bloke edildiği farmakolojik çalışmaların daha da geliştirilmesi ile kalp hastalıklarının tedavi edilmesi için kullanışlı bir terapötik ajan oluşturabileceği düşünülmektedir. İskemik kalp rahatsızlıklarıyla TRPC kanallarının ilişkisi ve bu kanalların durdurulmasında bir takım ajanların uygulanması ile oluşacak etkileri oldukça dikkat çekicidir (Shan ve diğ., 2008; Chen ve diğ., 2015).

2.6. TRPC KANALLARININ İNHİBİSYONU

Kardiyovasküler hastalıkların tedavisine yönelik olarak TRPC kanallarının inhibe edilmesi amacıyla uzun süreden beri çalışmalar yapılmış ve birçok bloker geliştirilmiştir. Kalpte yüksek Ca^{+2} konsantrasyonun yol açtığı hasarların incelenmesinde TRPC kanallarının inhibisyonlarına dayalı çalışmalar oldukça önem taşımaktadır (Islam, 2011).

TRPC kanallarını bloke etmek için iki temel yöntem vardır. Bu yöntemlerden ilkinde kanal yapısı değiştirilirken, ikincisinde kanal porları tıkanır. Por blokerleri tipik olarak hücre içine iyon alımını azaltırken, kanal yapısını değiştiren blokerler iyonların hücre içine giriş zamanını değiştirirler (Suchyna ve diğ., 2004).

TRPC kanallarının inhibisyonuna yönelik yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılan GsMTx-4, Pirazol-3 (Pyr-3) ve SKF-96365 blokerlerinin yanı sıra 2-Aminoetoksidifenil borat (2-APB), Gadolinyum (Gd^{+3}), Lantanum (La^{+3}) ve Benzodiazepin-2 (BTP-2)'nin de inhibitör etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Islam, 2011).

GsMTx-4, ligand kapılı kanalların yapısını değiştiren bir inhibitördür (Jung ve diğ., 2006). GsMTx-4'ün, ventriküler miyositlerde varlığı bilinen TRPC1 ve TRPC6 kanallarını bloke ederek hücre içine Ca^{+2} alımını durdurduğu (Ward ve diğ., 2008) ve 5 μ M GsMTx-4'ün ligand kapılı kanalların yapısını değiştirerek TRPC1 kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Bowman ve diğ., 2007). Aynı zamanda 170 nM GsMTx-4, kardiyomiyositlerde dilatasyonun uyarılması ile atriyal fibrilasyonu engellemektedir. Bu durum, diyastolik basınçta ve tüm basınç düzeylerinde fibrilasyonun daha kısa sürmesi için koruyucu bir etki sağlamaktadır (Bode ve diğ., 2001). Bu bilgiler, kalp hastalıklarında TRPC1 ve TRPC6 kanal anlatımlarının artması sonucu gerçekleşen hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışın GsMTx-4 ile engellenerek koruyucu etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir.

Aynı zamanda, TRPC3 kanallarının seçici ve direkt inhibisyonunda Pirazol-3 (Pyr-3) bileşiğinin biyolojik aktivitesi araştırılmıştır. Pyr-3 blokerinin, por tıkayıcı özelliği ile özgül olarak TRPC3 kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Pyr3, TRPC3 anlatımının yapıldığı hücrelerde Ca^{+2} akışını inhibe ederken (Kiyonaka ve diğ., 2009), 10 μ M Pyr-3'ün diyastolik Ca^{+2} seviyesindeki artışı önemli derece baskıladığı bilinmektedir (Doleschal ve diğ., 2012). Aynı zamanda Pyr-3'ün 10 μ M'ının TRPC3 kanallarını bloke ettiği, 30 μ M'ının ise maksimum inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur (Zhang ve diğ., 2014).

SKF-96365, TRPC kanallarının seçici olmayan blokeridir ve TRPC kanallarının inhibisyonunda sıklıkla kullanılır (Wolkowicz ve diğ., 2011; Sabourin ve diğ., 2012). SKF-96365'in Orai'leri STIM1'i, VGCC'leri ve K^{+} kanallarını bloke ettiği bilinmektedir, ancak 10 μ M'a kadar olan konsantrasyonun özgül olarak TRPC'leri bloke ettiği belirtilmiştir (Islam, 2011). SKF-96365, genellikle TRPC kanallarının kardiyovasküler sistemdeki potansiyel fonksiyonlarını tanımlamak amacıyla bir antagonist olarak kullanılmaktadır ve bu antagonistin kardiyak sinyal iletimini azalttığı bildirilmektedir. Bununla beraber SKF-96365'in yaklaşık 1 μ M'a kadar olan konsantrasyonunun, sıçan ventriküler miyositlerinde Na^{+} girişini durdurduğu tespit edilmiştir (Chen ve diğ., 2015). SKF-96365, fare kalbinde TRPC3 ve TRPC6 kanallarının anlatımlarındaki artışa bağlı olarak gelişen erken ve geç depolarizasyonları ve ventriküler taşikardiye azaltmaktadır (Hirose ve diğ., 2011, Sabourin ve diğ., 2016).

Sıçan miyositleri ile yapılan bir çalışmada, 10 μ M SKF-96365 kullanılarak TRPC kanallarının bloke edilmesi sonucunda, hücrede Ang II aracılığıyla artan Ca^{+2} konsantrasyonunun önemli derecede azaltıldığı gösterilmiştir. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun düzenlenmesinde görev alan TRPC kanallarının Ang II ile aktive olabildiği ve bu nedenle SKF-96365'in hücrelere Ang II aracılı Ca^{+2} girişini baskıladığı belirtilmektedir (Zhang ve diğ., 2016). Bu nedenle kardiyak elektriksel aktivitelerin düzenlenmesinin hedeflendiği çalışmalarda, SKF-96365 bir TRPC kanal blokeri olarak değerlendirilmelidir (Chen ve diğ., 2015).

İzole edilmiş sıçan kalplerinde yapılan bir çalışmada, TRPC inhibitörü olan SKF-96365 ile muameleden sonra TRPC mRNA'sının ve hücre içinde sürdürülen yüksek Ca^{+2} konsantrasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Feng ve diğ., 2011). Bir diğer çalışmada 0,5 M SKF-96365 inhibitörü uygulanan hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla IR'yi takiben hücresel canlılık oranının önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. SKF-96365 aynı zamanda apoptozu da önemli ölçüde azaltmıştır (Shan ve diğ., 2008).

Bu bilgilerin ışığında, iskemik kalp hasarında TRPC kanallarının inhibisyonuna dayalı çalışmaların sınırlı olduğu gözlemlenmiş ve çalışmamızda, TRPC kanallarının seçici olmayan blokeri olan SKF-96365'in uygulanması ile izole perfüze sıçan kalbinde iskemi/reperfüzyon hasarındaki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda, TRPC kanallarının kalp hastalıklarındaki rolleri tespit edilmeye çalışılmıştır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada deney hayvanı olarak 32 adet yetişkin 3 aylık, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanların her biri deney öncesinde ve deney süresince plastik kafeslerde tutularak, su ve yem kısıtlaması olmadan beslendi. Çalışma için, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Tarih: 21.11.2014, Sayı: 2014/171).

Sıçanlar, 75 mg/kg sodyum pentobarbital (Pantal Sodyum, IE Ulagay, İstanbul, TR) ile operasyondan yaklaşık 20 dakika önce anestezi edildi. Anestezi altındaki hayvanlara trakeostomi yapılarak ventilatör aracılığı ile düzenli soluk almaları sağlandı. Toraksın açılması ve intravenöz heparin (150 IU) uygulanmasının ardından, aortaya *in situ* kanülasyon yapıldı ve kalbin kesilip çıkarılmasından önce perfüzyon başlatıldı. Langendorff sistemindeki (PowerLab ML870B2) (Şekil 3.1) izole kalpler (Şekil 3.2), başlangıç perfüzyon basınçları 75-80 mmHg olacak şekilde, sabit akım ile 37 °C'de perfüze edildiler.

Perfüzat olarak kullanılan Krebs-Henseleit solüsyonu, %95 O₂-%5 CO₂ gaz karışımı ile birlikte, 118 mM sodyum klorür (NaCl), 4,7 mM potasyum klorür (KCl), 2,25 mM kalsiyum klorür dihidrat (CaCl₂.2H₂O), 1,2 mM magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO₄.7H₂O), 25 mM sodyum hidrojen karbonat (NaHCO₃), 1,2 mM potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), substrat olarak ise 11 mM glikoz içermektedir.

Son diyastolik basınç (SDB), sol ventrikül içindeki balon aracılığı ile, 5-10 mmHg olacak şekilde belirlendi. Langendorff perfüzyonunun ilk 20 dakikası süresince kardiyodinamik değerlerin stabilizasyonundan sonra kalpler gruplara göre çalışıldı.



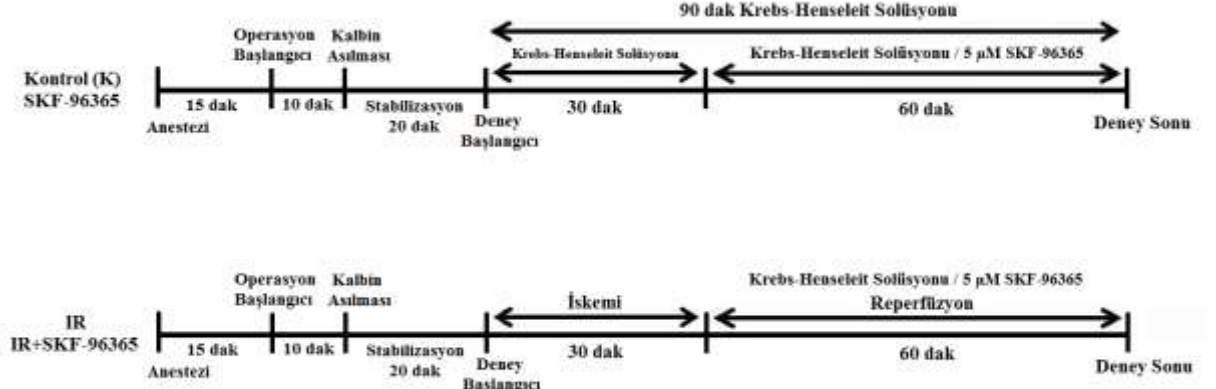
Şekil 3.1: Langendorff izole kalp sistemi.



Şekil 3.2: Langendorff izole kalp sistemindeki kalp.

3.1.DENEY DÜZENİ

Çalışmada kullanılan sıçanlar 4 gruba ayrılarak, kontrol ve IR gruplarının yanında, kontrol ve IR gruplarına, 5 μ M seçici olmayan TRPC blokeri SKF-96365 (Abcam, ab120280)'in uygulandığı gruplar oluşturuldu (Şekil 3.1.1).



Şekil 3.1.1: Çalışmada takip edilen deney protokolü.

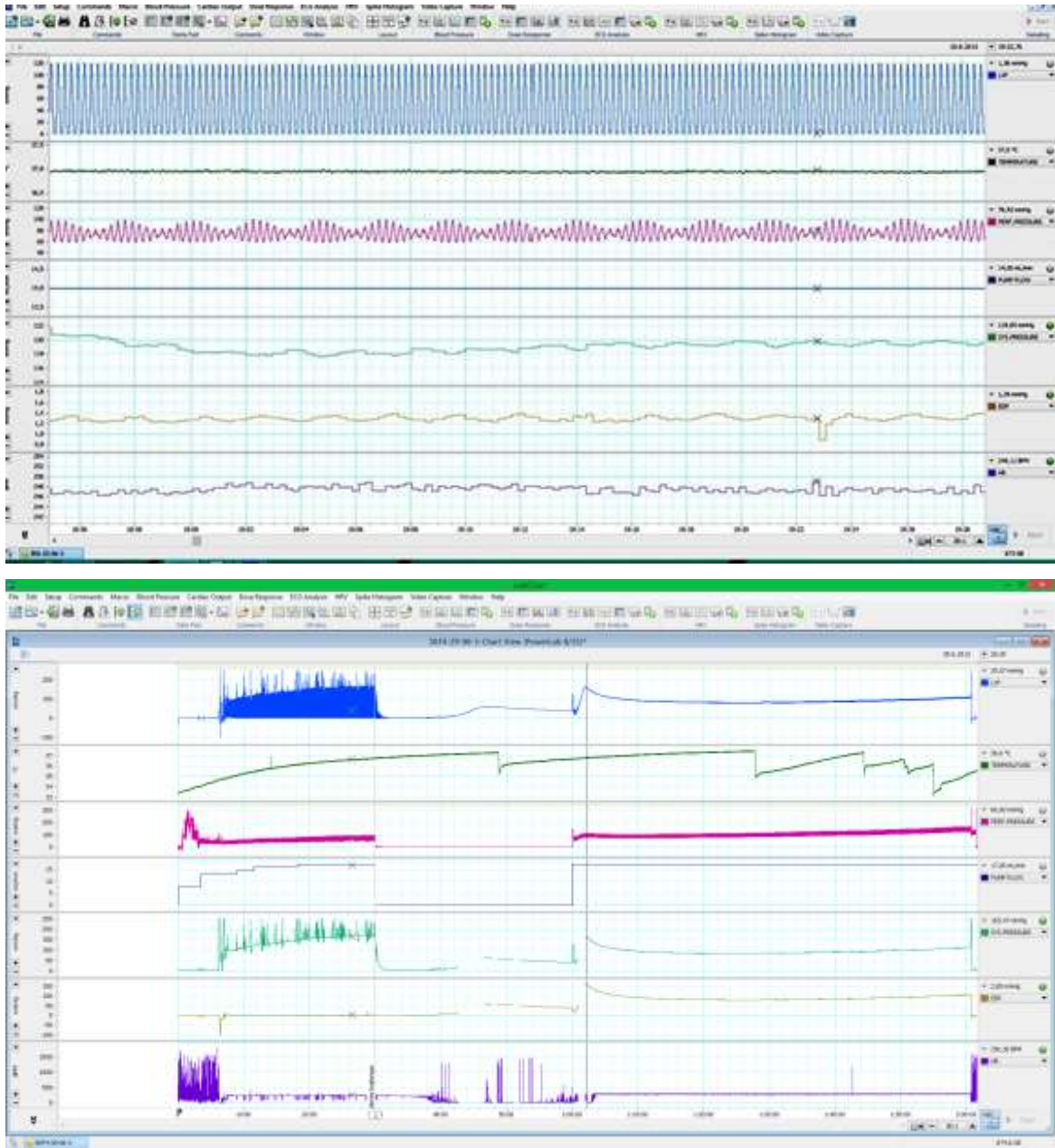
Deney gruplarına uygulanan yöntem, aşağıda ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

- 1. Kontrol (K) Grubu (n=8):** Stabilizasyondan sonra, 90 dakika modifiye Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüzyon uygulanan grup,
- 2. SKF-96365 Grubu (n=8):** Stabilizasyondan sonra, 30 dakika modifiye Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüzyon, 60 dakika 5 μ M SKF-96365 ile reperfüzyon uygulanan grup,
- 3. İskemi/Reperfüzyon (IR) Grubu (n=8):** Stabilizasyondan sonra, 30 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulanan grup,
- 4. İskemi/Reperfüzyon + SKF-96365 Grubu (IR+SKF-96365) (n=8):** Stabilizasyondan sonra 30 dakika iskemi ve 60 dakika 5 μ M SKF-96365 ile reperfüzyon uygulanan grup.

3.2.KARDİYODİNAMİK ANALİZLER

Sol ventrikül içine yerleştirilen balon katater ve buna bağlı olan fizyolojik basınç transdüseri (MLT844, ADInstruments, Sydney, AUS) aracılığı ile sistolik-diyastolik basınçlar, sol ventrikül içi basınç ve kalp vurumu; sisteme bağlı olan ikinci bir fizyolojik basınç transdüseri ile de perfüzyon basıncı PowerLab 8/30 veri kazanım ünitesi (ADInstruments, Sydney, AUS)

yardımları ile kayıt edildi (Şekil 3.2.1). Elde edilen kayıtlar LabChart8 (ADInstruments, Sydney, AUS) programında incelendi ve belirli zaman noktalarındaki (T0, T1, T2, T3) değerler daha ileri analizler için kullanıldı. Bu parametrelerin analiz edilmesi ile perfüzyon basıncı, son diyastolik basınç (SDB), sol ventrikül içi basınç değişimi (SVBD), kalp vurumu, koroner damar direnci, Max dP/dt (sol ventrikül içi basınç artışının, artış süresince geçen zamana oranı) ve miyokardiyal oksijen tüketiminin dolaylı bir göstergesi olan “Rate Pressure Product” (RPP) değerleri hesaplanarak, elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 3.2.1: Langendorff izole kalp sisteminde kaydedilen kardiyodinamik parametreler; sol ventrikül içi basıncı (LVP), sıcaklık (°C), perfüzyon basıncı (mmHg), pompa akımı (ml/dak), sistolik basınç (mmHg), diyastolik basınç (mmHg) ve kalp vurumu (vurum/dakika).

3.3.BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Deney sonunda alınan kalpler, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (0.01 M, pH: 7.4) içinde homojenize edildi. Doku homojenizasyonu, 15 mL hacimli borosilikat cam içerisinde, teflon pistonlu homojenizatör (Sartorius Potter S, Goettingen, Germany) ile yapıldı. Daha sonra elde edilen homojenatlar mikrotüplere alındı ve +4 °C’de, 12000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenerek pelet ve süpernatant olmak üzere 2 farklı fraksiyon elde edildi. Elde edilen süpernatantlar yeni mikrotüplere aktarıldı. Tüm doku örneklerinde total protein miktarı Bradford metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Biyokimyasal analizler, sıçan kalp dokusunda çalışmaya uygun kitler kullanılarak Enzime-bağlı bağışıklık deneyi (ELISA) yöntemiyle plak okuyucusunda (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) yapıldı. Kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda miyokardiyal hasarı göstermek için kreatin kinaz-MB (CK-MB) (Elabscience, Katalog No: E-EL-R1327) ve kardiyak troponin T (cTnT) (Elabscience, Katalog No: E-EL-R0151), inflamasyon belirteci olarak miyeloperoksidaz (MPO) (SunRed Biological Technology, Katalog No: 201-11-0575), nekrozun belirteci olarak laktat dehidrogenaz (LDH) (SunRed Biological Technology, Katalog No: 201-11-0531), lipid peroksidasyonunun gösterilmesi için malondialdehit (MDA) (Elabscience, Katalog No: E-EL-0060), hücrel endojen antioksidan düzeylerinin tespit edilmesi için süperoksit dismutaz (SOD) (SunRed Biological Technology, Katalog No: 201-11-0169) ve glutatyon peroksidaz (GPx) (SunRed Biological Technology, Katalog No: 201-11-1705) düzeyleri ölçüldü. Ayrıca, TRPC1 (MyBioSource, Katalog No: MBS9338839), TRPC3 (MyBioSource, Katalog No: MBS9340484), TRPC6 (MyBioSource, Katalog No: MBS102143), TRPC kanalları ile etkileşime giren ve bir adaptör protein olarak işlev gösteren Enkurin adaptör protein (ENKUR) (SunRed Biological Technology, Katalog No: 201-11-3012), Angiotensin II (Elabscience, Katalog No: E-EL-R1430) seviyeleri belirlendi. Total oksidan kapasite (TOS) (Rel Assay, Turkey, Katalog No: RL0024), total antioksidan kapasite (TAS) (Rel Assay, Turkey, Katalog No: RL0017) ve oksidatif stres indeksi (OSI) belirlenerek, tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.3.1.Gereçler

- Distile Su Cihazı (Nüve Water Distiller-ND 112, Turkey)
- Homojenizatör (Sartorius Potter S, Goettingen, Germany)

- Santrifüj (Nüve NF 1200R, Turkey)
- -80 °C Derin Dondurucu (New Brunswick Scientific, C54285, USA)
- Etüv (Nüve Cooled Incubator, ES 120, Turkey)
- Vorteks (BioCote Voortex Mixer SA8, Bibby Scientific, UK)
- Orbital Karıştırıcı (Biosan, OS-20, EU)
- Manyetik Karıştırıcı (Stuart Heat Stir, CB162, Bibby Scientific, UK)
- ELISA Okuyucusu (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA)
- ELISA Yıkayıcısı (Thermo Scientific WellWash Microplate Washer, 2011-08, USA)
- 8 Kanallı Multipipet (Gilson, USA)
- Mikropipet Seti (1000, 500, 200, 100, 10 µl'lik, Gilson, USA) ve pipet uçları

3.3.2.Total Protein Ölçümü

Sıçanlardan alınan kalp dokusu homojenatlarındaki total protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi. Buna göre;

1. Hazırlanan standartlar ve örneklerden 10'ar µL alınarak, 96 kuyucuklu mikroyağa eklendi.
2. Tüm kuyucuklara 300 µL Coomassie Reaktifi'nden eklendi ve mikroyak 30 saniye boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.
3. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilen mikroyak, 10 dakika içerisinde 595 nm dalga boyuna ayarlı plak okuyucuya (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) yerleştirildi ve absorbans değerleri okundu.
4. Standartların absorbansı belirlenerek x ekseninde absorbans, y ekseninde konsantrasyon olacak şekilde lin-lin grafik elde edilip, sonuçlar mg/mL şeklinde ifade edildi.

3.3.3.Kreatin Kinaz-MB (CK-MB) ve Kardiyak Troponin T (cTnT) Düzeylerinin Belirlenmesi

1. Örnekler ve kitler çalışmaya başlamadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Kitlere ait standartlar, CK-MB için 2000 pg/mL ve cTnT için 1000 pg/mL'lik stok standardın seri olarak sulandırılması ile elde edildi.
3. Antikor ile kaplı mikroyak kuyucuklarına, hazırlanan standartlardan ve örneklerden 100'er µL eklendi ve 37 °C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Tüm kuyucuklara 100 µL "Biyotinle İşaretlenmiş Antikor" eklendi ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.

5. Kit içerisinde bulunan 25X'lik yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra, mikrolaklar ELISA plak yıkayıcıda her seferinde 350 μ L solüsyon uygulayarak 3 kez yıkandı.
6. Tüm kuyucuklara 100 μ L "Horseradish Peroksidaz (HRP) Konjugat" eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
7. Ardından mikrolaklar, yıkama solüsyonu ile her seferinde 350 μ L solüsyon uygulayarak 3 kez yıkandı.
8. Tüm kuyucuklara 90 μ L "Substrat Belirteci" eklendi ve 37 °C'de 15 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
9. Tüm kuyucuklara 50 μ L "Durdurma Solüsyonu" ilave edildi ve renk hızla maviden sarıya dönüştü (Şekil 3.3.3.1).



Şekil 3.3.3.1: Biyokimyasal reaksiyonun mavi renkten sarı renge dönüşümü.

10. Mikrolak bekletilmeden, 450 nm dalga boyuna ayarlı plak okuyucuya (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) yerleştirildi ve absorbans değerleri okundu.
11. Elde edilen absorbans değerleri, standartlara ait absorbans ve konsantrasyon değerleri ile çizilen lin-lin grafiğe yerleştirilerek, örneklere ait konsantrasyon değerleri belirlendi. Sonuçlar, pg/mg protein şeklinde ifade edildi.

3.3.4.Miyeloperoksidaz (MPO), Laktat Dehidrogenaz (LDH), Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx) ve ENKUR Düzeylerinin Belirlenmesi

1. Örnekler ve kitler çalışmaya başlamadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Kitlere ait standartlar, kitin içerisinden çıkan, MPO için 64 ng/mL, LDH için 640 U/L, SOD için 128 ng/mL, GPx için 240 ng/mL ve ENKUR için 3200 ng/L'lik stok standardın seri olarak sulandırılması ile elde edildi.
3. Antikor ile kaplı mikrolak kuyucuklarına, hazırlanan standartlardan 50 μ L, örneklerden 40 μ L eklendi. Ardından örnek kuyucuklarına 10 μ L her bir parametreye özgül antikor ve

50 µL Streptavidin-HRP ilave edilerek, mikropalaklar 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. Kit içerisinde bulunan 30X’lik yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra, mikropalaklar ELISA plak yıkayıcıda her seferinde 350 µL solüsyon uygulayarak 3 kez yıkandı.
5. Tüm kuyucuklara 50 µL “Kromojen Solüsyonu A”, hemen ardından 50 µL “Kromojen Solüsyonu B” eklendi ve 37 °C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi.
6. Tüm kuyucuklara 50 µL “Durdurma Solüsyonu” ilave edildi ve renk hızla maviden sarıya dönüştü.
7. Mikropalak bekletilmeden, 450 nm dalga boyuna ayarlı plak okuyucuya (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) yerleştirildi ve absorbans değerleri okundu.
8. Elde edilen absorbans değerleri, standartlara ait absorbans ve konsantrasyon değerleri ile çizilen lin-lin grafiğe yerleştirilerek, örneklere ait konsantrasyon değerleri belirlendi. Sonuçlar; MPO, SOD ve GPx için ng/mg protein, LDH için U/mg protein, ENKUR için ng/g protein şeklinde ifade edildi.

3.3.5.Malondialdehit (MDA) ve Angiotensin II (Ang II) Düzeylerinin Belirlenmesi

1. Örnekler ve kitler çalışmaya başlamadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Kitlere ait standartlar, kitin içerisinde bulunan, MDA için 2000 ng/mL, angiotensin II için 1000 pg/mL’lik stok standardın seri olarak sulandırılması ile elde edildi.
3. Antikor ile kaplı mikropalak kuyucuklarına, hazırlanan standartlardan ve örneklerden 50’şer µL eklendi. Ardından tüm kuyucuklara 50 µL “Biyotinle İşaretlenmiş Antikor” ilave edilerek, mikropalaklar 37 °C’de 45 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Kit içerisinde bulunan 25X’lik yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra, mikropalaklar ELISA plak yıkayıcıda her seferinde 350 µL solüsyon uygulayarak 3 kez yıkandı.
5. Tüm kuyucuklara 100 µL “HRP Konjugat” eklendi ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
6. Ardından mikropalaklar, yıkama solüsyonu ile her seferinde 350 µL solüsyon uygulayarak 3 kez yıkandı.
7. Tüm kuyucuklara 90 µL “Substrat Belirteci” eklendi ve 37 °C’de 15 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
8. Tüm kuyucuklara 50 µl “Durdurma Solüsyonu” ilave edildi ve renk hızla maviden sarıya dönüştü.
9. Mikropalak bekletilmeden, 450 nm dalga boyuna ayarlı plak okuyucuya (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) yerleştirildi ve absorbans değerleri okundu.

10. Elde edilen absorbans değerleri, standartlara ait absorbans ve konsantrasyon değerleri ile çizilen lin-lin grafiğe yerleştirilerek, örneklere ait konsantrasyon değerleri belirlendi. Sonuçlar, MDA için ng/mg protein ve Angiotensin II için pg/mg protein şeklinde ifade edildi.

3.3.6. TRPC1, TRPC3 ve TRPC6 Düzeylerinin Belirlenmesi

1. Örnekler ve kitler çalışmaya başlamadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Kitlere ait standartlar, kitin içerisinden çıkan, TRPC1 için 40 ng/mL, TRPC3 için 8 ng/mL ve TRPC6 için 2000 pg/mL'lik stok standardın seri olarak sulandırılması ile elde edildi.
3. Antikor ile kaplı mikropalak kuyucuklarına, hazırlanan standartlardan ve örneklerden 50'şer µL eklendi. Ardından tüm kuyucuklara 100 µL HRP Konjugat eklendi ve 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Kit içerisinde bulunan yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra, mikropalaklar ELISA plak yıkayıcıda her seferinde 350 µL solüsyon uygulayarak 3 kez yıkandı.
5. Tüm kuyucuklara 50 µL "Kromojen Solüsyonu A", hemen ardından 50 µL "Kromojen Solüsyonu B" eklendi ve 37 °C'de 15 dakika karanlıkta inkübe edildi.
6. Tüm kuyucuklara 50 µL "Durdurma Solüsyonu" ilave edildi ve renk hızla maviden sarıya dönüştü.
7. Mikropalak bekletilmeden, 450 nm dalga boyuna ayarlı plak okuyucuya (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA) yerleştirildi ve absorbans değerleri okundu.
8. Elde edilen absorbans değerleri, standartlara ait absorbans ve konsantrasyon değerleri ile çizilen lin-lin grafiğe yerleştirilerek, örneklere ait konsantrasyon değerleri belirlendi. Sonuçlar, TRPC1 ve TRPC3 için ng/mg protein, TRPC6 için pg/mg protein şeklinde ifade edildi.

3.3.7. Total Oksidan Kapasite (TOS), Total Antioksidan Kapasite (TAS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI)'nin Hesaplanması

3.3.7.1. Total Oksidan Kapasite (TOS)

Prensip: Örnekte bulunan oksidanlar, ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol oranj ile renkli bir kompleks oluştururlar.

Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür.

1. Çalışma gününde, daha önce -80 °C’de saklanan doku örnekleri oda sıcaklığına getirildi.
2. Standart ve örneklerden 15 µL alınarak, mikropolağa eklendi.
3. Ardından, üzerlerine 100 µL R1 reaktifi ilave edildikten sonra 530 nm’de ilk absorbans ölçümü mikropalak okuyucuda (Thermo Scientific Multiscan FC, 2011-06, USA) yapıldı.
4. Tüm kuyucuklara 5 µL R2 reaktifi eklendi ve mikropalak 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyonun ardından 530 nm’de ikinci absorbans ölçümü alındı.
6. Sonuçlar, aşağıdaki formül doğrultusunda hesaplandı.

$$(\Delta \text{Absorbans Örnek} / \Delta \text{Absorbans Standart 2}) \times 20 \text{ (Standart 2)}$$

$$\Delta \text{Absorbans Örnek} = (\text{Örneğin İkinci Absorbansı} - \text{Örneğin Birinci Absorbansı})$$

$$\Delta \text{Absorbans Standart 2} = (\text{Standart 2'nin İkinci Absorbansı} - \text{Standart 2'nin Birinci Absorbansı})$$

$$\text{Standart 2 Değeri} = 20 \text{ µmol H}_2\text{O}_2 \text{ Eşdeğeri/L}$$

7. Standart olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanıldı. Sonuçlar, µmol H₂O₂ Eşdeğeri/L olarak ifade edildi.

3.3.7.2. Total Antioksidan Kapasite (TAS)

Prensip: Fe²⁺-o-dianisidine kompleksi, hidrojen peroksit (H₂O₂) ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek düşük pH’da renksiz o-dianisidin molekülü ile reaksiyona girerek, sarı-kahverengi dianisidin radikallerini oluştururlar. Dianisidin radikalleri, ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu artırmaktadırlar. Ancak, örneklerdeki antioksidanlar, bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar.

1. Çalışma gününde, daha önce -80 °C’de saklanan doku örnekleri oda sıcaklığına getirildi.
2. Standart ve örneklerden 6 µL alınarak, mikropolağa eklendi.
3. Ardından, üzerlerine 100 µL R1 reaktifi ilave edildikten sonra 660 nm’de ilk absorbans ölçümü mikropalak okuyucuda (Thermo Scientific Multiscan FC, 2011-06, USA) yapıldı.
4. Tüm kuyucuklara 15 µL R2 reaktifi eklendi ve mikropalak 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyonun ardından 660 nm’de ikinci absorbans ölçümü alındı.

6. Sonuçlar aşağıdaki formül doğrultusunda hesaplandı.

$$\frac{(\Delta\text{Absorbans Standart 1}) - (\Delta\text{Absorbans Örnek})}{(\Delta\text{Absorbans Standart 1}) - (\Delta\text{Absorbans Standart 2})} \quad (3.2)$$

$\Delta\text{Absorbans Standart 1} = (\text{Standart 1'in İkinci Absorbansı} - \text{Standart 1'in Birinci Absorbansı})$
 $\Delta\text{Absorbans Standart 2} = (\text{Standart 2'nin İkinci Absorbansı} - \text{Standart 2'nin Birinci Absorbansı})$
 $\Delta\text{Absorbans Örnek} = (\text{Örneğin İkinci Absorbansı} - \text{Örneğin Birinci Absorbansı})$

7. Standart kalibrasyonu olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı.
 Sonuçlar, Trolox Eşdeğeri/L olarak ifade edildi.

3.3.7.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)'nin Hesaplanması

TAS ve TOS değerleri belirlendikten sonra, sonuçlar aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.
 Sonuçlar, Arbitrary Unit olarak ifade edildi.

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSI)} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eşdeğeri/L})}{\text{TAS } (\mu\text{mol Trolox Eşdeğeri/L})} \times 100 \quad (3.3)$$

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışma sonunda elde edilen tüm veriler Instat İstatistiksel Paket Programı (Instat GraphPad Software, San Diego, CA, USA) aracılığı ile analiz edildi. Grupların dağılımının, normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben, doku homojenati örneklerine ait sonuçlar tek yönlü varyans analizi uygulanarak Benforroni'nin çoklu karşılaştırma testi ile, kardiyodinamik parametrelere ait sonuçlar ise çift yönlü varyans analizi uygulanarak Benforroni'nin çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Değerler, $\pm$ standart hata olarak verildi. Tüm analizlerde $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1.KARDİYODİNAMİK BULGULAR

Kontrol (K) ve iskemi/reperfüzyon (IR) grupları ile SKF-96365'in uygulandığı grupların (SKF-96365 ve IR+SKF-96365) perfüzyon basıncı, sistolik basınç, son diyastolik basınç (SDB), sol ventrikül içi basınç değişimi (SVBD), kalp vurumu ve kasılma indeksi değerlerinin yüzde değişimleri, tüm gruplarda deney başlangıcında (0. dakika), iskemi sonrasında (30. dakika) ve reperfüzyonun 30 ve 60. dakikalarında (deneyin 60 ve 90. dakikaları), kontrol ve IR gruplarıyla karşılaştırılarak değerlendirildi. Ayrıca, kalbin kasılabilme yeteneğinin belirlenmesinde kullanılan özel bir indeks olan Max dP/dt değerleri ile miyokardiyal oksijen tüketiminin dolaylı bir göstergesi olan RPP (Rate Pressure Product) (Kalp vurumu X SVBD)'nin yüzde değişimleri belirlendi.

4.1.1.Perfüzyon Basıncı

Verilerin alındığı zaman noktalarında, grupların perfüzyon basıncı değerlerinin yüzde değişimleri incelendiğinde, deneyin 30. dakikasında IR ve IR+SKF-96365 gruplarının perfüzyon basınçlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ($P<0.05$). Deneyin 60. dakikasında kontrol grubu ile SKF-96365 grubunun; IR grubu ile IR+SKF-96365 grubunun perfüzyon basıncı değerlerinin birbirine yakın olduğu belirlendi. Deney sonu olan 90. dakikada, SKF-96365 uygulanan kontrol grubunun perfüzyon basıncı değerinin, kontrol ($P<0.01$), IR ($P<0.01$) ve IR+SKF-96365 ($P<0.05$) gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi (Şekil 4.1.1.1).

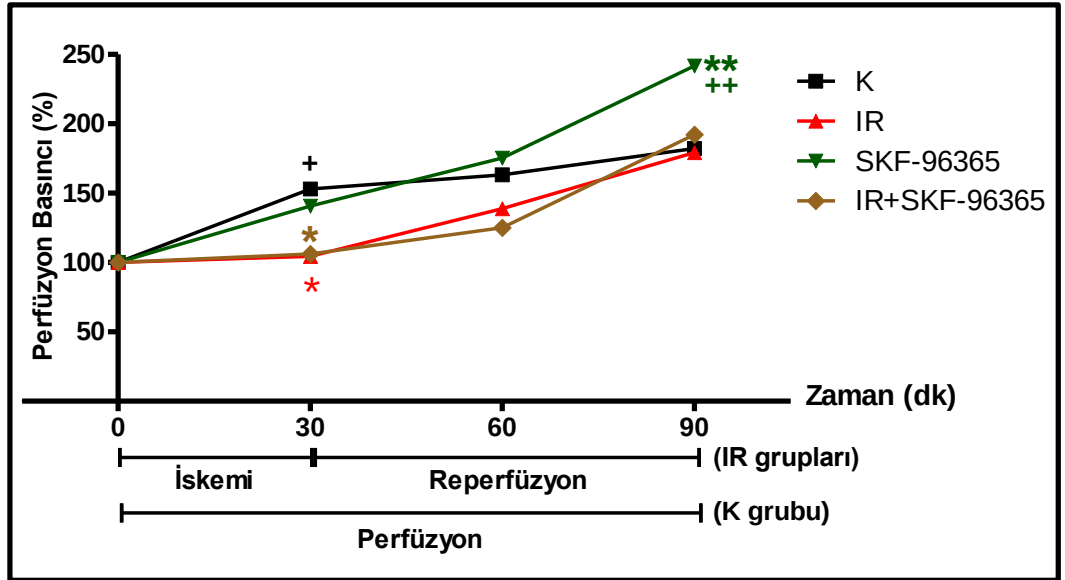
4.1.2.Sistolik Basınç

Grupların veri alınan zaman noktalarındaki sistolik basınçlarına ait yüzde değişimleri incelendiğinde, deneyin 30. dakikasında K ve IR gruplarına ait değerlerin birbirlerine çok yakın olduğu, SKF-96365 ve IR+SKF-96365 gruplarının sistolik basınç değerlerinin ise kontrol (SKF-96365, $P<0.01$; IR+SKF-96365, $P<0.001$) ve IR (SKF-96365, $P<0.01$; IR+SKF-96365, $P<0.001$) gruplarına göre anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi. Deneyin 60. dakikasındaki sistolik basınç değerlerinin, 30. dakika verileri ile benzer şekilde, SKF-96365 uygulaması yapılan her 2 grupta da, hem kontrol (SKF-96365, $P<0.05$; IR+SKF-96365, $P<0.01$) hem de IR (SKF-96365, $P<0.01$; IR+SKF-96365, $P<0.001$) gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı tespit

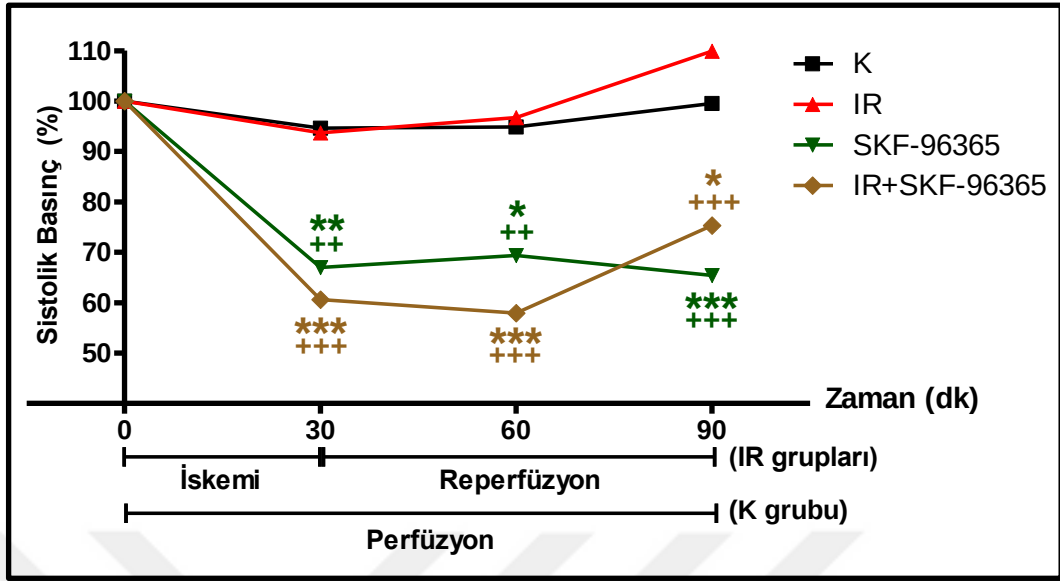
edildi. Ancak bu azalma, sadece SKF-96365 uygulanan kontrol grubuna göre, IR uygulaması yapılan SKF-96365 grubunda çok daha belirgindi. Deney sonu olan 90. dakikada, yine SKF-96365 uygulanan her 2 grubun sistolik basınç değerlerinde hem kontrol (SKF-96365, $P<0.001$; IR+SKF-96365, $P<0.05$) hem de IR (SKF-96365, $P<0.001$; IR+SKF-96365 $P<0.001$) grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi. İskeminin ardından SKF-96365 uygulanan grubun sistolik basınç değerlerinin, diğer zaman noktalarına göre deney sonunda sadece SKF-96365 uygulanan gruptan daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.1.2.1).

4.1.3.Son Diyastolik Basınç (SDB)

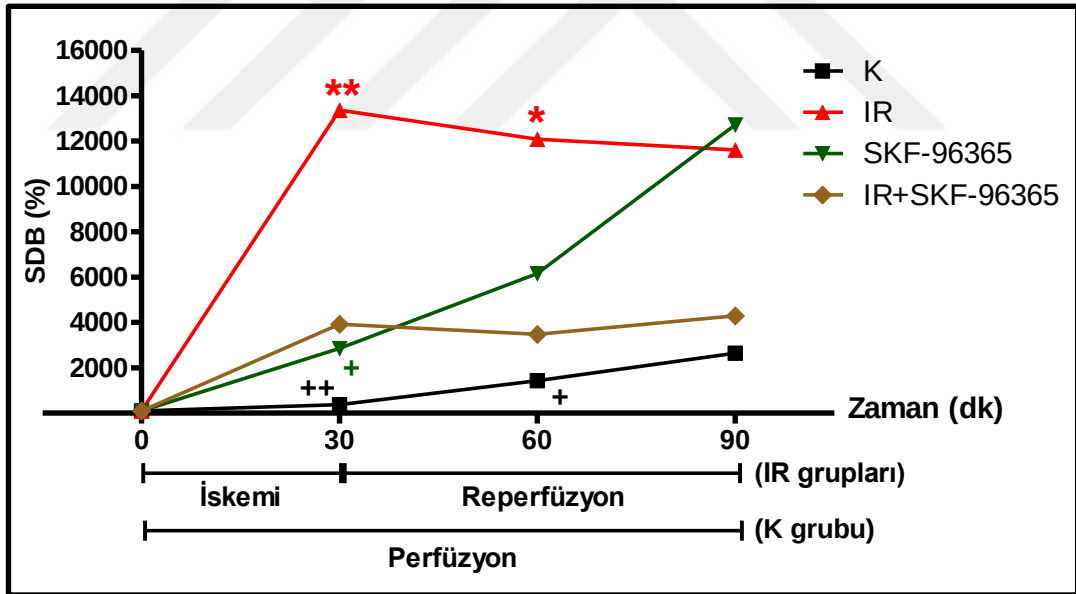
Deney gruplarının veri alınan zaman noktalarındaki son diyastolik basınçlarına (SDB) ait yüzde değişimleri incelendiğinde, deney süresince tüm grupların kontrol grubuna göre yüksek, 90. dakikada SKF-96365 uygulanan kontrol grubu hariç IR grubuna göre düşük SDB değerlerinin olduğu belirlendi. IR grubu ile karşılaştırıldığında belirlenen bu azalma, deneyin 30. dakikasında SKF-96365 grubunda ($P<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı iken, IR+SKF-96365 grubunda anlamlı değildi. Deneyin 60 ve 90. dakikalarında IR+SKF-96365 grubunun SDB değerlerinin kontrol grubuna yaklaştığı belirlendi (Şekil 4.1.3.1).



Şekil 4.1.1.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında perfüzyon basıncının yüzde değişimleri (* $P<0.05$, ** $P<0.01$; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; * $P<0.05$, ** $P<0.01$; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).



Şekil 4.1.2.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında sistolik basıncın yüzde değişimleri (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

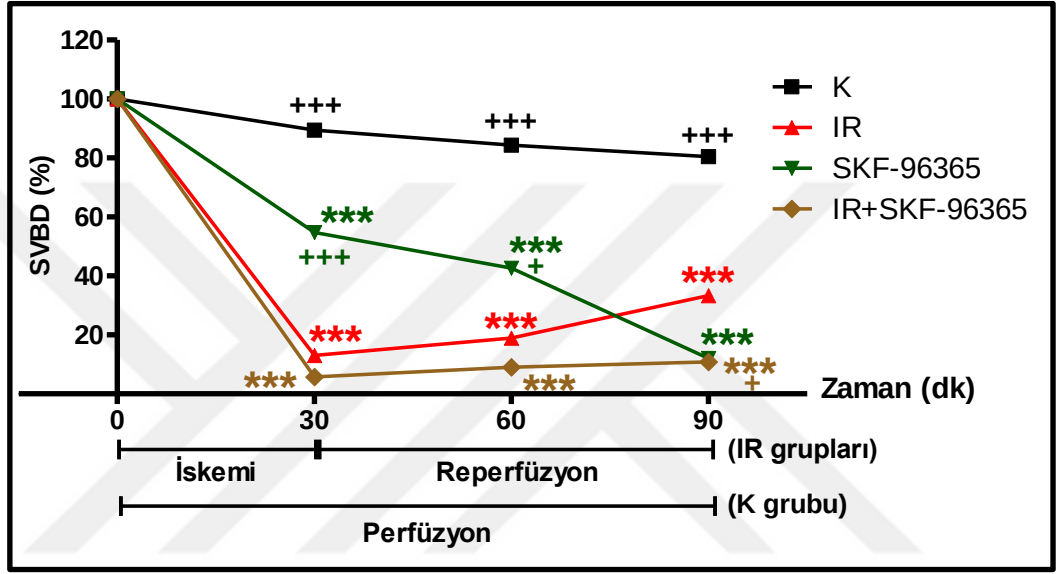


Şekil 4.1.3.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında son diyastolik basıncın (SDB) yüzde değişimleri (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

4.1.4.Sol Ventrikül İçi Basınc Değişimi (SVBD)

Grupların veri alınan zaman noktalarındaki sol ventrikül içi basınç değişimine (SVBD) ait yüzde değişimleri incelendiğinde, deney süresince tüm grupların değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi. SKF-96365 uygulanan kontrol grubunun 30.

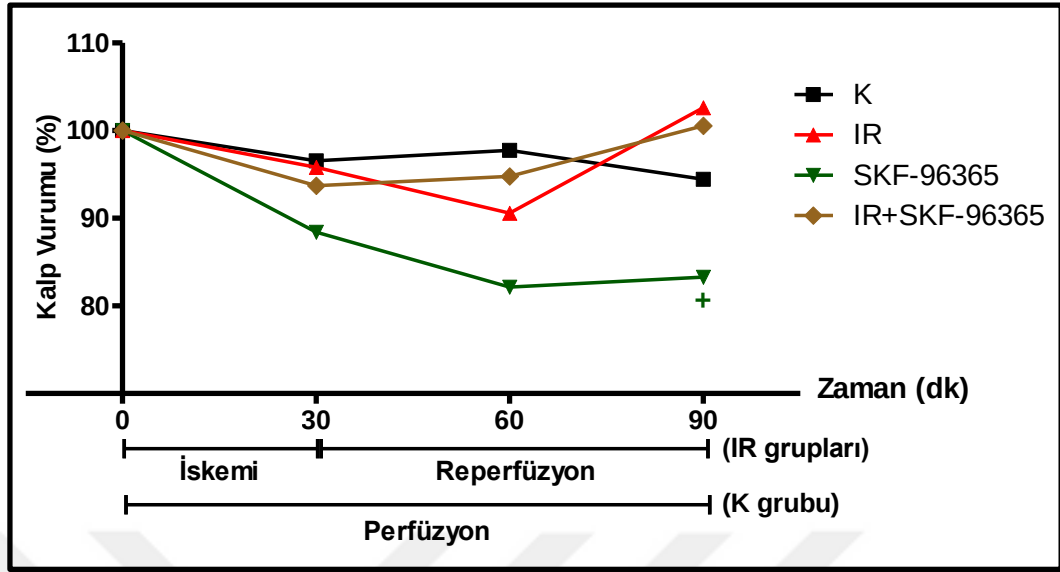
($P<0.001$) ve 60. ($P<0.05$) dakikadaki SVBD değerleri, her iki IR grubuna göre yüksekti. Deney sonu olan 90. dakikada ise, SKF-96365 uygulanan kontrol ve IR gruplarına ait SVBD değerlerinin, hem kontrol hem de IR gruplarına göre azaldığı ve birbirlerine çok yakın olduğu gözlemlendi. Yine deney sonunda, IR grubunun SVBD değerinin, 30. ve 60. dakikalardaki kendi değerlerine göre arttığı ve halen düşük olmakla birlikte kontrol grubu değerlerine en yakın grup olduğu belirlendi (Şekil 4.1.4.1).



Şekil 4.1.4.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında sol ventrikül içi basınç değişiminin (SVBD) yüzde değişimleri (** $P<0.001$; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; * $P<0.05$, *** $P<0.001$; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

4.1.5.Kalp Vurumu

Deney gruplarının veri alınan zaman noktalarındaki kalp vurumu değerlerine ait yüzde değişimleri incelendiğinde, özellikle deneyin 30. dakikasında K ve IR gruplarının kalp vurumu değerlerinin birbirine yakın olduğu, madde uygulanan gruplarda ise bu değerlerin anlamlı olmamakla birlikte kontrol ve IR gruplarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Deneyin 60. dakikasında SKF-96365 uygulanan kontrol grubu değerlerinin K ve IR gruplarına göre daha düşük olduğu, IR+SKF-96365 grubu değerlerinin ise K ve IR gruplarının değerlerine yakın olduğu belirlendi. Ancak bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Deney sonu olan 90. dakikada SKF-96365 uygulanan kontrol grubunun IR grubuna göre kalp vurumu değerinde anlamlı bir azalma ($P<0.05$) olduğu gözlenirken, IR+SKF-96365 grubu değerlerinin IR grubu değerleri ile oldukça benzer olduğu belirlendi (Şekil 4.1.5.1).



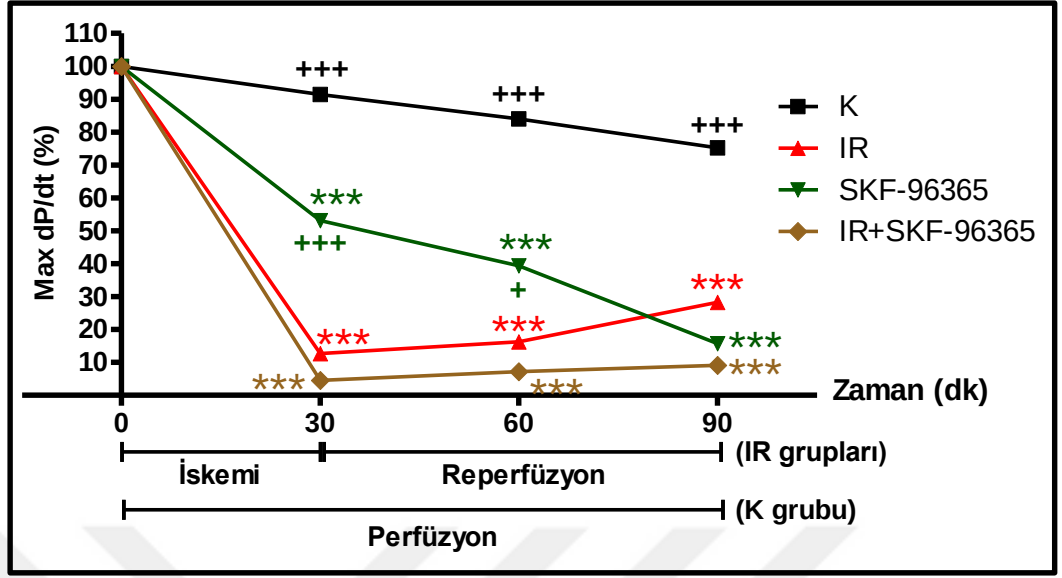
Şekil 4.1.5.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında kalp vurumunun yüzde değişimleri (* $P < 0.05$; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

4.1.6.Max dP/dt

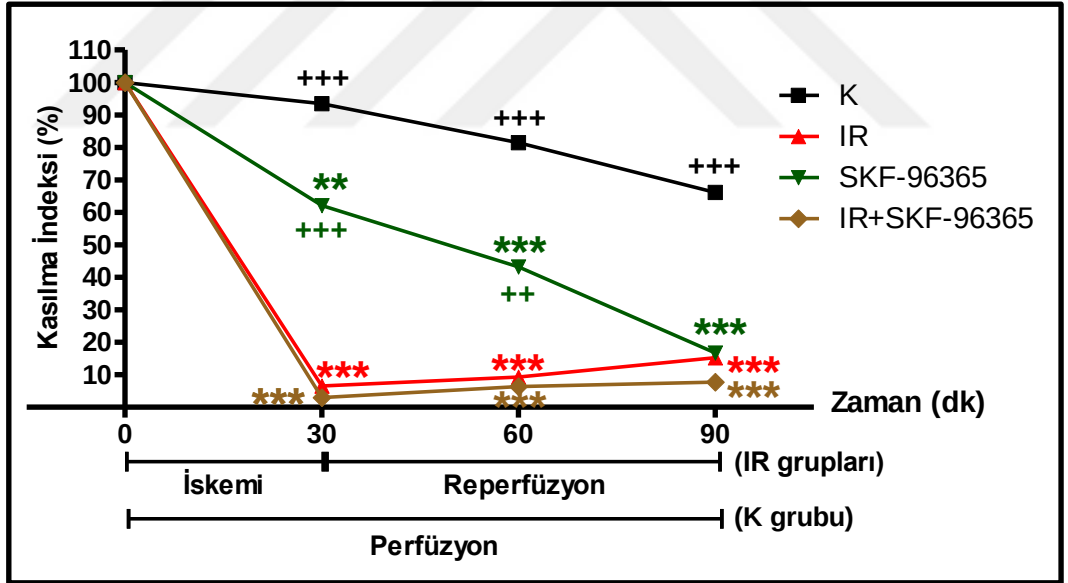
Kalbin kasılabilme yeteneğinin belirlenmesinde kullanılan özel bir indeks olan Max dP/dt değerleri incelendiğinde, deney süresince tüm grupların değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ($P < 0.001$) olduğu belirlendi. Sadece SKF-96365 uygulanan grubun değerlerinde, deneyin 30. ($P < 0.001$) ve 60. ($P < 0.05$) dakikalarında IR grubuna göre anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. Deney sonunda ise, SKF-96365 uygulanan kontrol grubu değerlerinin azalarak, IR+SKF-96365 uygulanan gruba yaklaştığı belirlendi (Şekil 4.1.6.1).

4.1.7.Kasılma İndeksi

Gruplara ait veri alınan zaman noktalarındaki kasılma indeksi değerlerinin yüzde değişimleri incelendiğinde, deneyin 30. dakikasında SKF-96365 ($P < 0.01$), IR ($P < 0.001$) ve IR+SKF-96365 ($P < 0.001$) gruplarının değerlerinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu ve bu anlamlılığın deneyin 60. ve 90. dakikalarında da ($P < 0.001$) benzer biçimde devam ettiği görüldü. Deneyin 30. ve 60. dakikalarında SKF-96365 uygulanan kontrol grubunun kasılma indeksi yüzdesinin, her iki IR uygulaması yapılan gruptan daha yüksek olduğu belirlendi. Deney sonu olan 90. dakikada, sadece SKF-96365 uygulanan grubun değerlerinin azalarak, tüm deney süresince kasılma indeksi değerleri birbirine çok yakın olan her iki IR grubunun değerlerine oldukça yaklaştığı belirlendi (Şekil 4.1.7.1).



Şekil 4.1.6.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında Max dP/dt değerlerinin yüzde değişimleri (**P<0.001; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; *P<0.05, ***P<0.001; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

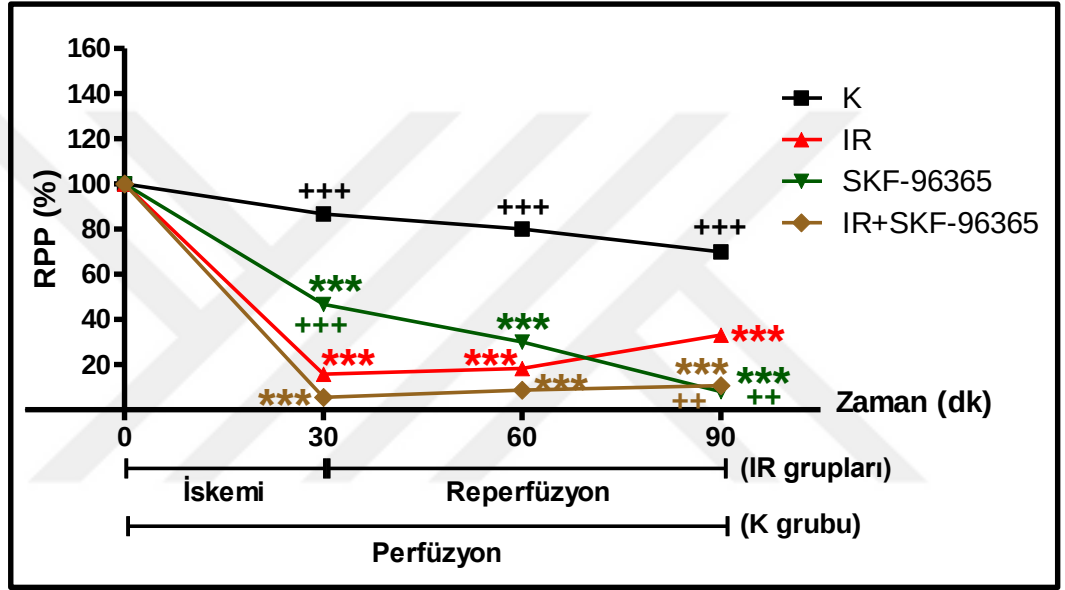


Şekil 4.1.7.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında kasılma indeksi değerlerinin yüzde değişimleri (**P<0.01, ***P<0.001; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; **P<0.01, ***P<0.001; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

4.1.8.Rate Pressure Product (RPP)

Gruplara ait veri alınan zaman noktalarındaki miyokardiyal oksijen tüketiminin dolaylı bir göstergesi olan RPP (Rate Pressure Product) değerlerinin yüzde değişimleri incelendiğinde, deney başlangıcından deney sonuna kadar geçen süreçte, tüm grupların değerlerinin kontrol

grubuna göre düşük ($P<0.001$) olduğu belirlendi. IR grubu ile karşılaştırıldığında, deneyin 30. ve 60. dakikalarında, SKF-96365 uygulanan kontrol grubunun miyokardiyal oksijen tüketimi değerlerinin yüksek (30. dakika, $P<0.001$), IR+96365 grubu değerlerinin ise düşük olduğu görüldü. Deneyin 90. dakikasında ise, daha önceki zaman noktalarında yüksek olarak belirlenen SKF-96365 uygulanan kontrol grubu değerlerinin azalarak, IR+SKF-96365 grubu değerlerine yaklaştığı ve her iki SKF-96365 uygulaması yapılan grubun, IR grubuna göre anlamlı derecede düşük (her iki grup için $P<0.01$) RPP değerlerine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.1.8.1).



Şekil 4.1.8.1: Deney gruplarına (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait aynı zaman noktalarında RPP değerlerinin yüzde değişimi (*** $P<0.001$; kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

4.2.BİYOKİMYASAL BULGULAR

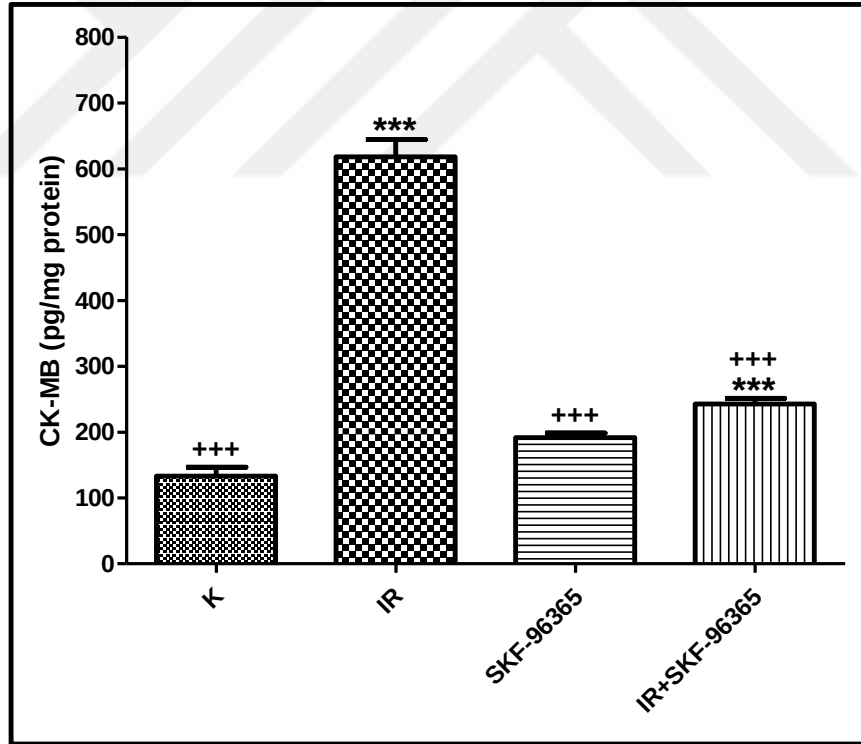
Kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda kreatin kinaz-MB (CK-MB), kardiyak troponin T (cTnT), miyeloperoksidaz (MPO), laktat dehidrogenaz (LDH), malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), Angiotensin II, TRPC1, TRPC3, TRPC6 ve ENKUR düzeyleri belirlendi. Ayrıca, total oksidan kapasite (TOS), total antioksidan kapasite (TAS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) belirlenerek, tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.2.1).

Tablo 4.2.1: Kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda CK-MB, cTnT, MPO, LDH, MDA, SOD, GPx, Ang II, TRPC1, TRPC3, TRPC6, ENKUR, TOS, TAS ve OSI ortalama $\pm$ standart hata değerleri (*P<0.05, ***P<0.001; Kontrol (K) grubuna göre; ⁺P<0.05, ⁺⁺⁺P<0.001; İskemi/Reperfüzyon (IR) grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

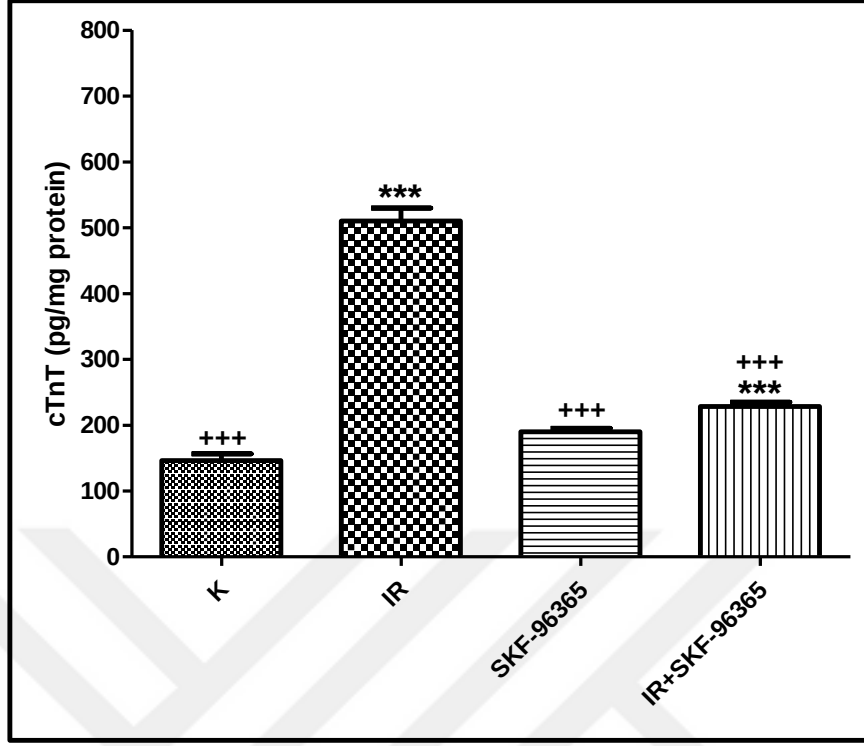
BİYOKİMYASAL PARAMETRELER	K	IR	SKF-96365	IR+SKF-96365
CK-MB (pg/mg protein)	133,0 $\pm$ 13,5 ⁺⁺⁺	618,3 $\pm$ 26,1 ^{***}	191,6 $\pm$ 7,0 ⁺⁺⁺	242,8 $\pm$ 8,5 ^{***, +++}
cTnT (pg/mg protein)	146,1 $\pm$ 10,1 ⁺⁺⁺	510,1 $\pm$ 19,5 ^{***}	190,1 $\pm$ 5,2 ⁺⁺⁺	228,5 $\pm$ 6,4 ^{***, +++}
MPO (ng/mg protein)	12,4 $\pm$ 0,8 ⁺⁺⁺	39,2 $\pm$ 1,4 ^{***}	15,6 $\pm$ 0,4 ⁺⁺⁺	18,5 $\pm$ 0,5 ^{***, +++}
LDH (U/mg protein)	103,4 $\pm$ 7,1 ⁺⁺⁺	358,2 $\pm$ 13,7 ^{***}	134,2 $\pm$ 3,7 ⁺⁺⁺	161,1 $\pm$ 4,5 ^{***, +++}
MDA (ng/mg protein)	550,3 $\pm$ 28,4 ⁺⁺⁺	1570,0 $\pm$ 54,7 ^{***}	673,5 $\pm$ 14,6 ⁺⁺⁺	780,9 $\pm$ 17,9 ^{***, +++}
SOD (ng/mg protein)	71,0 $\pm$ 7,4 ⁺⁺⁺	20,7 $\pm$ 1,1 ^{***}	49,0 $\pm$ 1,0 ^{***, +++}	43,5 $\pm$ 0,7 ^{***, +++}
GPx (ng/mg protein)	131,8 $\pm$ 15,7 ⁺⁺⁺	24,8 $\pm$ 2,3 ^{***}	85,0 $\pm$ 2,1 ^{***, +++}	73,2 $\pm$ 1,6 ^{***, +++}
Ang II (pg/mg protein)	101,9 $\pm$ 12,5 ⁺⁺⁺	673,3 $\pm$ 43,7 ^{***}	202,6 $\pm$ 9,9 ^{*, +++}	271,9 $\pm$ 7,6 ^{***, +++}
TRPC1 (ng/mg protein)	5,9 $\pm$ 0,6 ⁺⁺⁺	15,0 $\pm$ 0,3 ^{***}	6,9 $\pm$ 0,4 ⁺⁺⁺	11,2 $\pm$ 0,7 ^{***, +++}
TRPC3 (ng/mg protein)	4,3 $\pm$ 0,8 ⁺⁺⁺	11,9 $\pm$ 0,4 ^{***}	5,3 $\pm$ 0,5 ⁺⁺⁺	9,4 $\pm$ 0,7 ^{***, +}
TRPC6 (pg/mg protein)	263,4 $\pm$ 26,8 ⁺⁺⁺	647,9 $\pm$ 45,7 ^{***}	254,6 $\pm$ 18,7 ⁺⁺⁺	617,0 $\pm$ 49,4 ^{***}
ENKUR (ng/g protein)	288,8 $\pm$ 42,2 ⁺⁺⁺	1007,0 $\pm$ 32,7 ^{***}	279,0 $\pm$ 28,6 ⁺⁺⁺	673,5 $\pm$ 53,6 ^{***, +++}
TOS (μ mol H ₂ O ₂ Eşdeğeri/L)	7,50 $\pm$ 0,26 ⁺⁺⁺	14,52 $\pm$ 0,63 ^{***}	8,71 $\pm$ 0,26 ⁺⁺⁺	10,78 $\pm$ 0,19 ^{***, +++}
TAS (Trolox Eşdeğeri/L)	1,46 $\pm$ 0,10 ⁺⁺⁺	0,65 $\pm$ 0,02 ^{***}	0,90 $\pm$ 0,02 ^{***, +++}	0,89 $\pm$ 0,01 ^{***, +++}
OSI (Arbitrary Unit)	5,30 $\pm$ 0,40 ⁺⁺⁺	22,27 $\pm$ 0,66 ^{***}	9,77 $\pm$ 0,36 ^{***, +++}	12,11 $\pm$ 0,32 ^{***, +++}

4.2.1. Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Kreatin Kinaz-MB (CK-MB) ve Kardiyak Troponin T (cTnT) Düzeyleri

Kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda miyokardiyal hasarı göstermek için kreatin kinaz-MB ve kardiyak troponin T (cTnT) düzeyleri incelendiğinde, K grubuna göre tüm grupların CK-MB (IR ve IR+SKF-96365 grupları için $P<0.001$) ve cTnT (IR ve IR+SKF-96365 grupları için $P<0.001$) düzeylerinin yüksek, IR grubuna göre ise düşük (tüm gruplar için $P<0.001$) olduğu belirlendi. Ancak, sadece SKF-96365 uygulaması yapılan kontrol grubunun CK-MB ve cTnT düzeylerindeki artış, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kontrol grubunda en düşük olarak gözlenen CK-MB ve cTnT düzeylerinin, IR uygulaması ile anlamlı olarak arttığı ve SKF-96365 uygulaması ile azaldığı belirlendi. Bu azalmanın, SKF-96365 uygulanan kontrol grubunda, IR+SKF-96365 grubuna göre daha belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.1.1 ve Şekil 4.2.1.2).



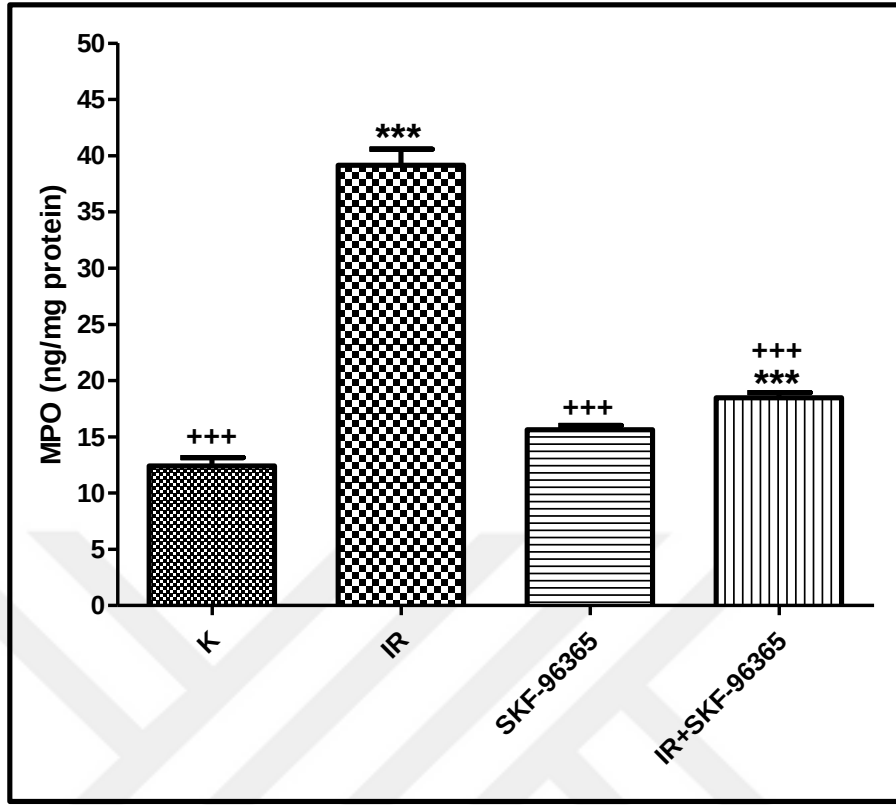
Şekil 4.2.1.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait CK-MB düzeyleri (*** $P<0.001$, K grubuna göre; +++ $P<0.001$, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).



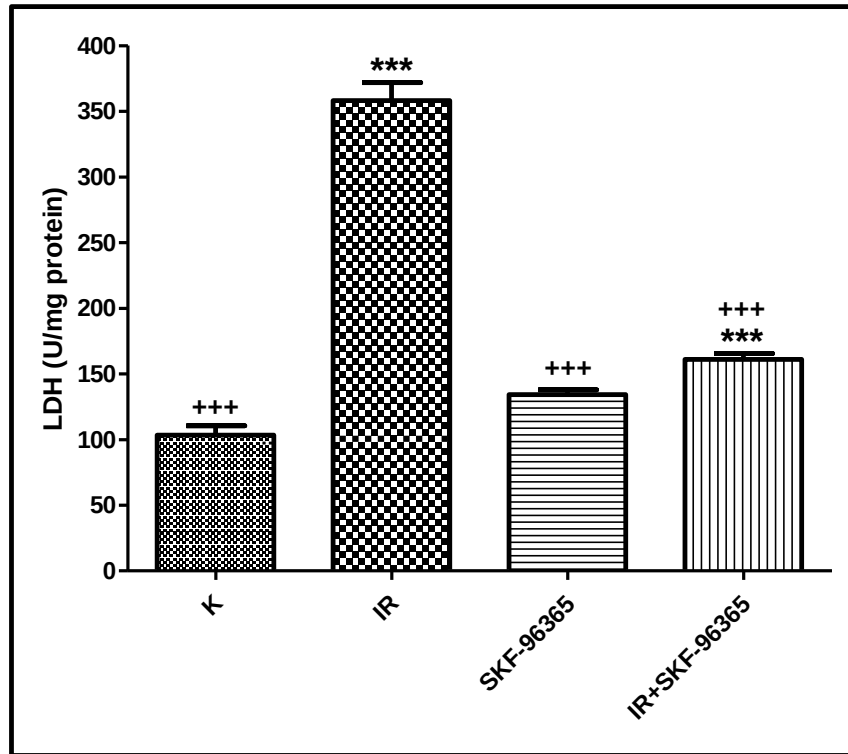
Şekil 4.2.1.2: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait cTnT düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

4.2.2.Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Miyeloperoksidaz (MPO), Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

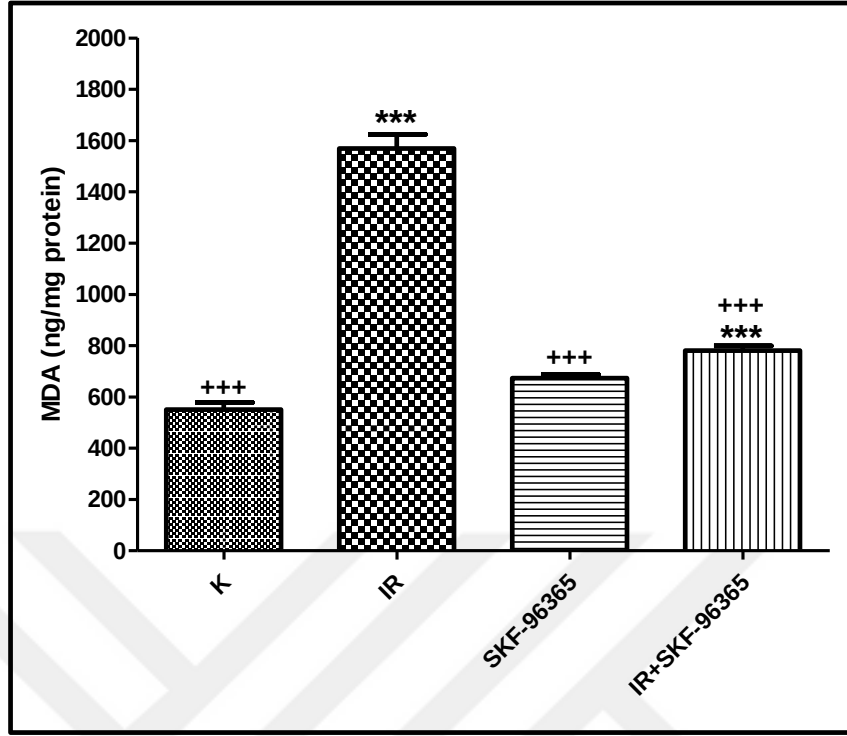
Kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda, inflamasyon belirteci olarak mieloperoksidaz (MPO), nekrozun belirteci olarak laktat dehidrogenaz (LDH) ve lipid peroksidasyonunun gösterilmesi için malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü. Her üç parametrenin de, IR uygulaması ile arttığı, SKF-96365 uygulaması ile azaldığı belirlendi. Ölçülen tüm değerler, K grubunda en düşük düzeydeydi. Kontrol grubuna göre MPO, LDH ve MDA düzeylerinde gözlenen artış, madde uygulaması yapılan ve yapılmayan her iki IR grubunda istatistiksel olarak anlamlı iken ($P<0.001$), sadece SKF-96365 verilen kontrol grubunda anlamlı değildi. IR grubu ile karşılaştırıldığında, SKF-96365 uygulanan her iki grubun MPO, LDH ve MDA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı ($P<0.001$) belirlendi (Şekil 4.2.2.1, Şekil 4.2.2.2. ve Şekil 4.2.2.3).



Şekil 4.2.2.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait MPO düzeyleri (**P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).



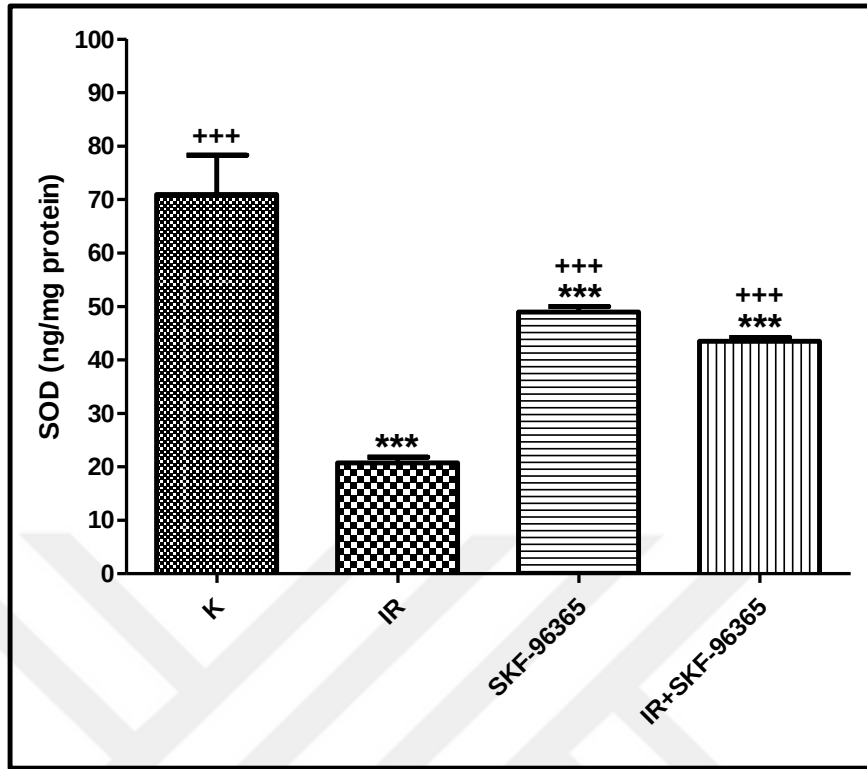
Şekil 4.2.2.2: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait LDH düzeyleri (**P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).



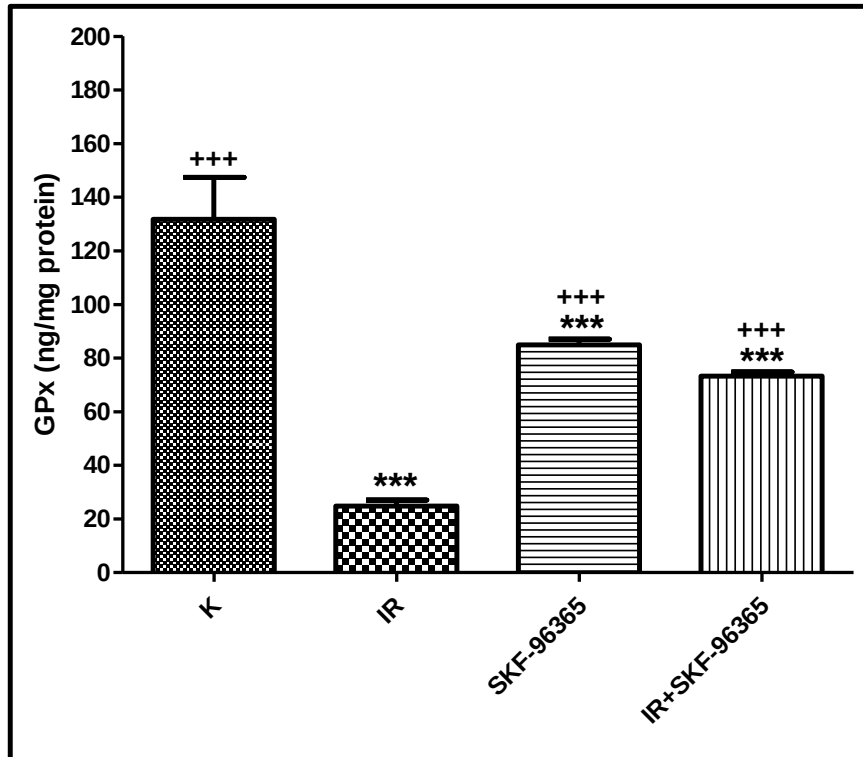
Şekil 4.2.2.3: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait MDA düzeyleri (**P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

4.2.3. Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzeyleri

Kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda, hücresel endojen antioksidan düzeylerinin tespit edilmesi için süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GPx) düzeyleri ölçüldü. Kontrol grubunda en yüksek düzeyde olan bu antioksidanlar, tüm gruplarda anlamlı derecede azaldı ($P<0.001$). Bu azalma, özellikle sadece IR uygulaması yapılan grupta oldukça belirgindi. SKF-96365 uygulanan kontrol ve IR gruplarının SOD ve GPx düzeyleri ise IR grubuna göre anlamlı derecede arttı ($P<0.001$). SKF-96365 uygulaması yapılan kontrol grubu değerlerinin, IR+SKF-96365 grubu değerlerine göre daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.2.3.1 ve Şekil 4.2.3.2).



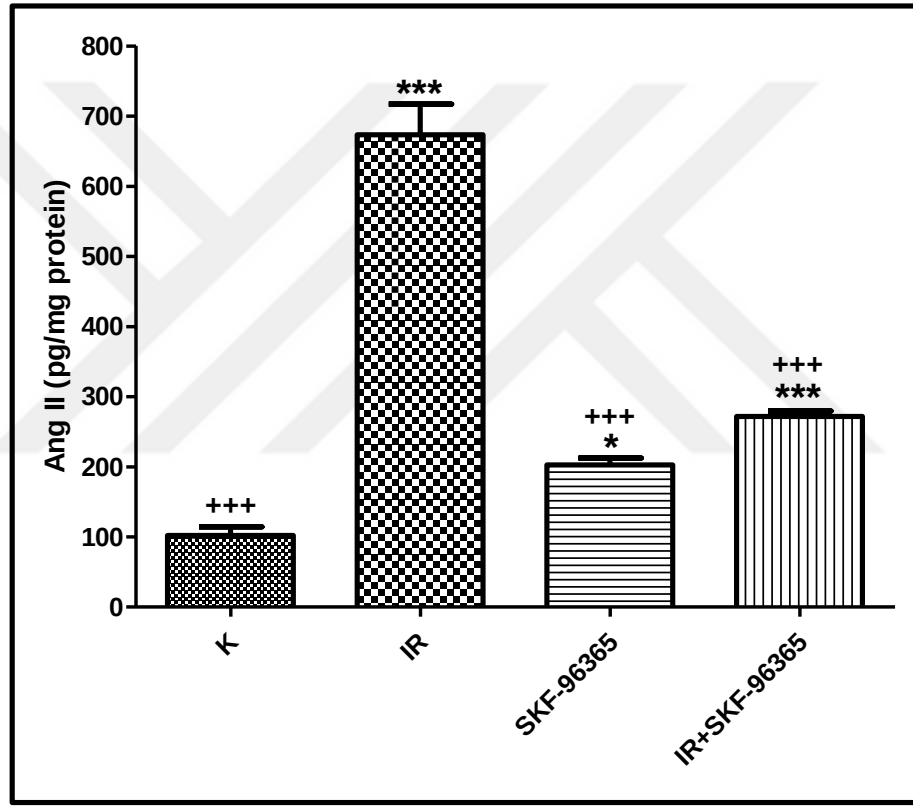
Şekil 4.2.3.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait SOD düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).



Şekil 4.2.3.2: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait GPx düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

4.2.4. Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Angiotensin II (Ang II) Düzeyleri

Kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda, angiotensin II (Ang II) düzeyleri ölçüldü. Angiotensin II'nin IR grubunda en yüksek düzeylerde olduğu belirlendi. Diğer tüm gruplarda, IR grubuna göre bu düzeylerin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü ($P<0.001$) tespit edildi. IR grubuna en yakın değerler, IR+SKF-96365 grubunda gözlenirken, kontrol grubuna en yakın düzey ise, SKF-96365 uygulanan kontrol grubunda belirlendi (Şekil 4.2.4.1).

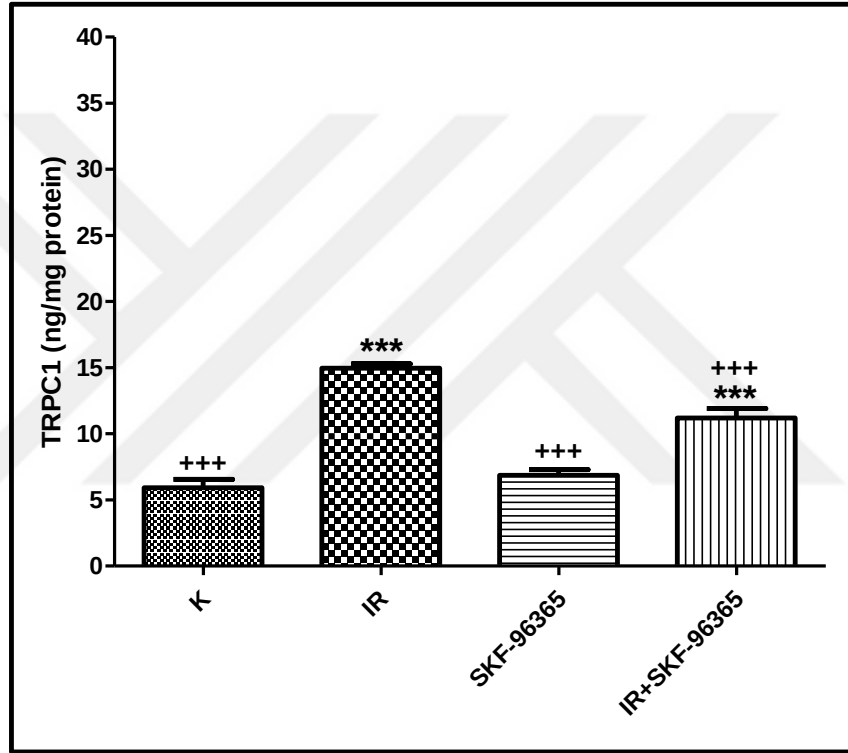


Şekil 4.2.4.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait Ang II düzeyleri (* $P<0.05$, *** $P<0.001$, K grubuna göre; +++ $P<0.001$, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

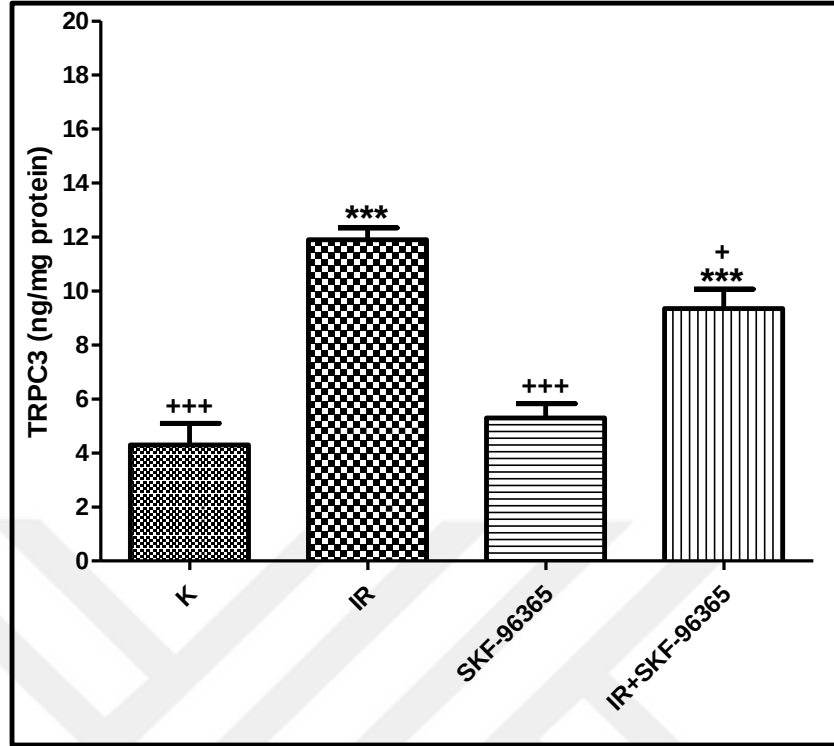
4.2.5. Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda TRPC1, TRPC3, TRPC6 ve ENKUR Düzeyleri

Kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda, TRPC1, TRPC3, TRPC6 ve TRPC kanalları ile etkileşime giren ve bir adaptör protein olarak işlev gösteren Enkurin adaptör protein (ENKUR) düzeyleri belirlendi. TRPC1, TRPC3, TRPC6 ve ENKUR düzeylerinin, sadece IR uygulaması yapılan grupta en yüksek değerlere sahip olduğu ve SKF-96365 uygulaması ile azaldığı

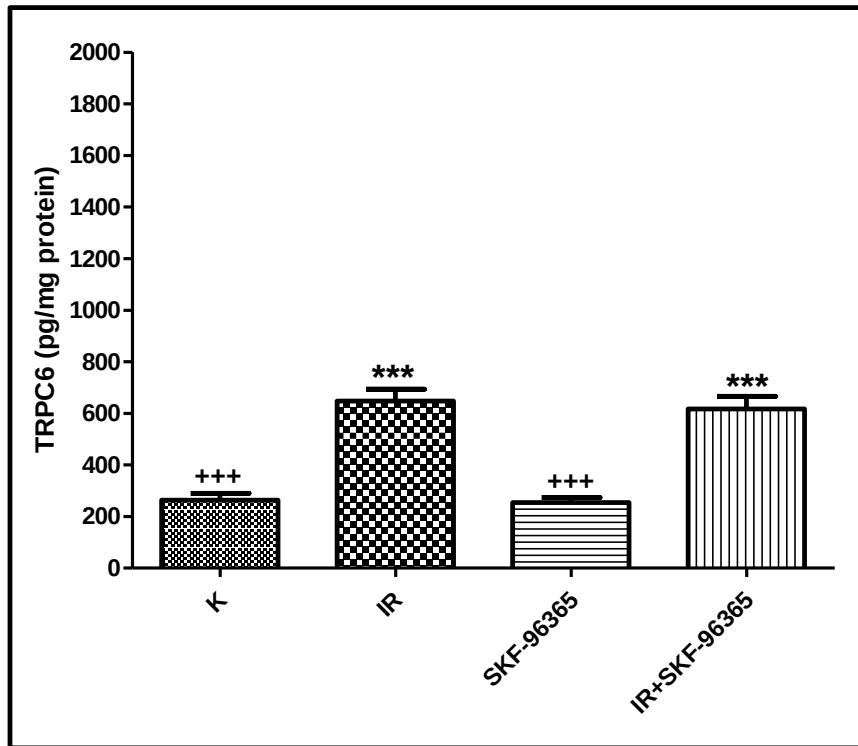
belirlendi. TRPC1, TRPC3, TRPC6 ve ENKUR düzeylerinin SKF-96365 uygulaması yapılan kontrol grubunda IR grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı (tüm gruplar için $P<0.001$) tespit edildi. IR grubunda belirlenen artış, IR+SKF-96365 grubunda da azalmakla birlikte, bu azalma TRPC1 ($P<0.001$), TRPC3 ($P<0.05$) ve ENKUR ($P<0.001$) düzeyleri için istatistiksel olarak anlamlı iken, TRPC6 için anlamlı değildi. Tüm parametreler için kontrol grubuna en yakın değerlerin, sadece SKF-96365 uygulanan grupta olduğu belirlendi (Şekil 4.2.5.1, Şekil 4.2.5.2, Şekil 4.2.5.3 ve Şekil 4.2.5.4).



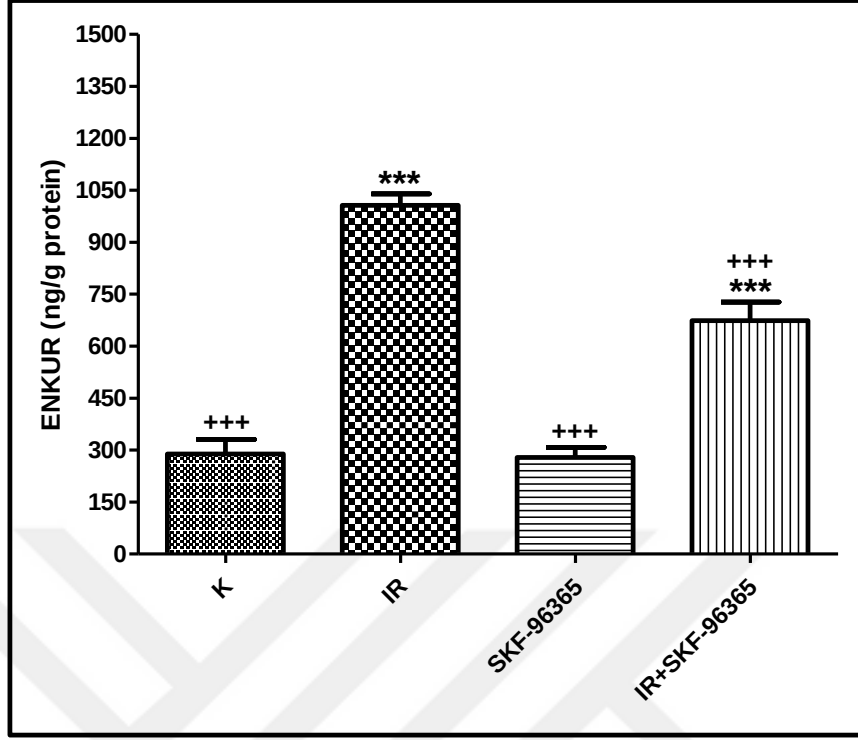
Şekil 4.2.5.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait TRPC1 düzeyleri (*** $P<0.001$, K grubuna göre; +++ $P<0.001$, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).



Şekil 4.2.5.2: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait TRPC3 düzeyleri (**P<0.001, K grubuna göre; +P<0.05, +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).



Şekil 4.2.5.3: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait TRPC6 düzeyleri (**P<0.001, K grubuna göre; +++P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).



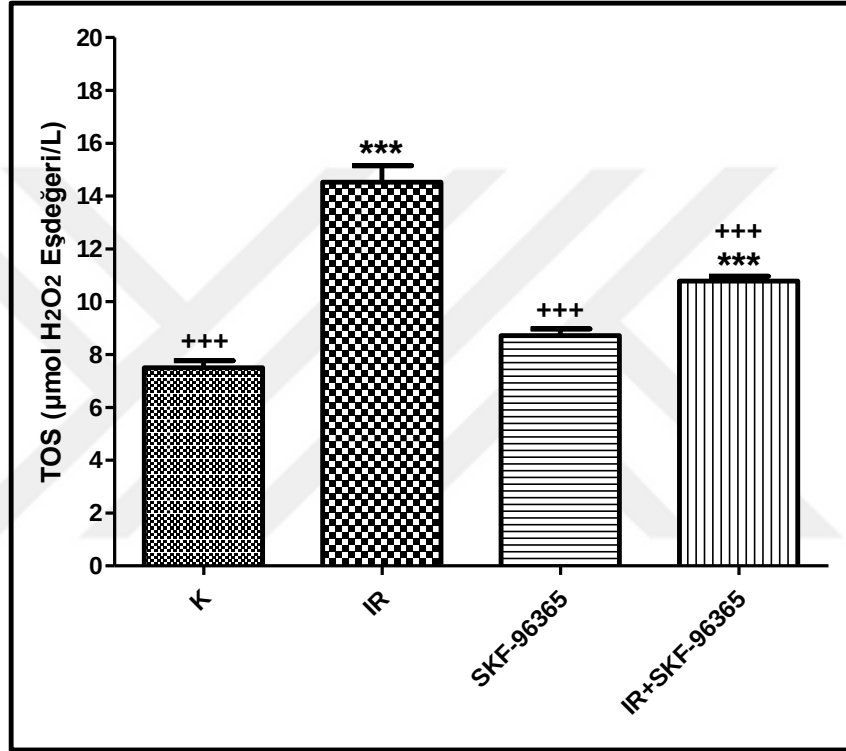
Şekil 4.2.5.4: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait ENKUR düzeyleri (***P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

4.2.6. Kalp Dokusundan Elde Edilen Süpernatantlarda Total Oksidan Kapasite (TOS), Total Antioksidan Kapasite (TAS) Düzeyleri ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

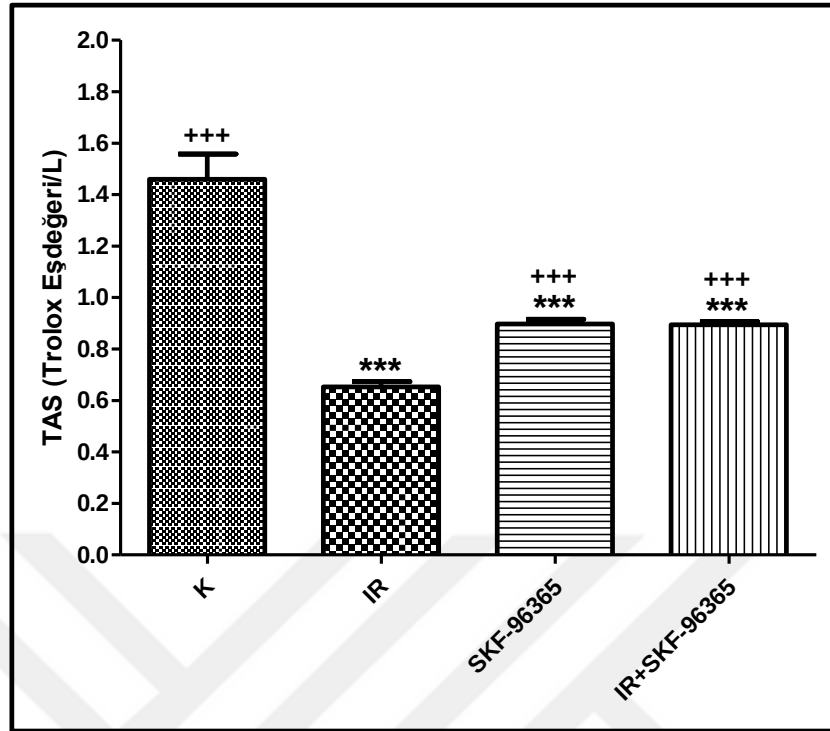
Kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda, Total Oksidan Kapasite (TOS), Total Antioksidan Kapasite (TAS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI) belirlendi. TOS düzeylerinin, IR grubunda en yüksek değerlerde olduğu, diğer tüm gruplarda IR grubuna göre azaldığı (P<0.001) belirlendi. En düşük düzeyler K grubunda gözlenirken, SKF-96365 uygulanan kontrol grubuna ait TOS değerlerinin, IR ile birlikte SKF-96365 uygulanan gruptan daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.6.1).

TAS düzeylerinin IR grubuna göre, tüm gruplarda yüksek (P<0.001) olduğu tespit edildi. Bu değerler, K grubunda en yüksek düzeydeydi. SKF-96365 uygulanan kontrol ve IR gruplarına ait TAS değerlerinin birbirlerine çok yakın olmakla birlikte, kontrol grubundan anlamlı olarak düşük (P<0.001), IR grubundan ise anlamlı olarak yüksek olduğu (P<0.001) belirlendi (Şekil 4.2.6.2).

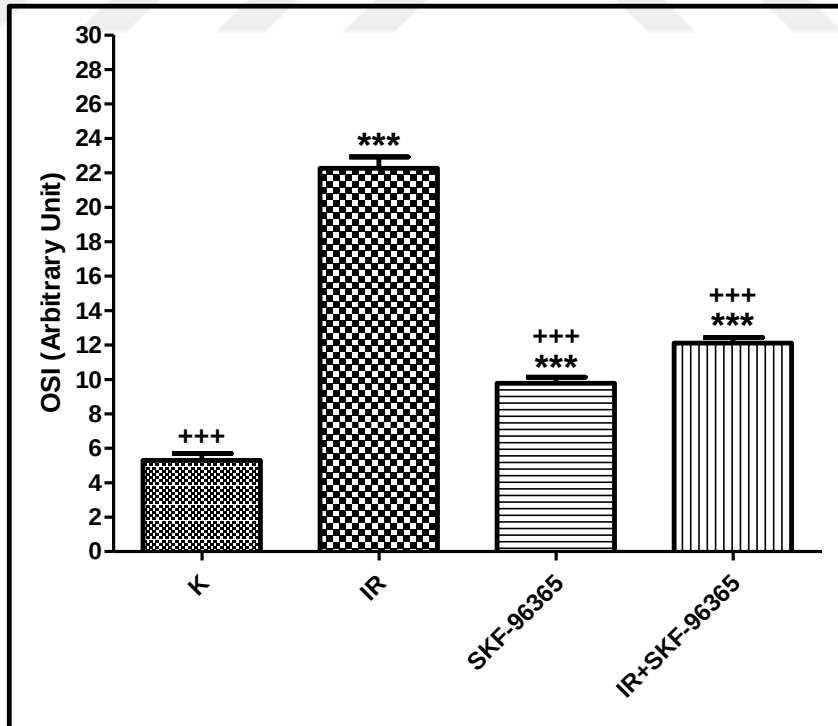
Tüm grupların OSI değerleri incelendiğinde, IR grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($P<0.001$) belirlendi. En yüksek OSI değerleri IR grubunda tespit edilirken, bu grubu IR+SKF-96365 grubunun izlediği gözlemlendi. SKF-96365 uygulanan kontrol grubunun, K grubundan sonraki en düşük OSI değerine sahip grup olduğu belirlendi. SKF-96365 uygulaması, OSI değerlerinde bir azalmaya neden olmakla birlikte, bu azalma IR uygulaması yapılmayan grupta daha belirgindi (Şekil 4.2.6.3).



Şekil 4.2.6.1: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait TOS düzeyleri (*** $P<0.001$, K grubuna göre; +++ $P<0.001$, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).



Şekil 4.2.6.2: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait TAS düzeyleri (**P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).



Şekil 4.2.6.3: Tüm gruplara (K, IR, SKF-96365, IR+SKF-96365) ait OSI değerleri (**P<0.001, K grubuna göre; ***P<0.001, IR grubuna göre istatistiksel anlamlılık).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücre içi Ca^{+2} sinyalleri, kalp fizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. İskemi/reperfüzyon ile uyarılan aşırı miyokardiyal Ca^{+2} yükü, kalp yetmezliğinde miyokardiyal fonksiyon bozukluğunun önemli bir ögesidir. Kalsiyum fazlalığı, dokuların iskemiden sonra maruz kaldıkları hasarın kritik nedeni olarak kabul edilmiştir. Kalpte IR hasarından sorumlu Ca^{+2} girişine neden olan başlıca faktörler olarak TRPC kanalları gösterilmektedir (He ve diğ., 2017). TRPC kanallarının artan aktivitesi sonucunda, kalp kasılmasının olumsuz etkilendiği ve TRPC kanalları fonksiyonel olarak durdurulduğunda (bloke edildiğinde) kasılabilirliğin arttığı ile ilgili veriler bulunmaktadır. Ancak, TRPC'nin bu etkisinin altında yatan mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir (Kiyonaka ve diğ., 2009). Bu kanalların aktivitesini veya aşırı anlatımını bloke etmek, kalp dokusunu ve hücreleri IR hasarından belirgin şekilde korumaktadır. Bu nedenle TRPC kanalları, kalp hastalıklarıyla mücadelede umut vadeden terapötik hedefler haline gelmişlerdir (He ve diğ., 2017).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, miyokard enfarktüsünden sonra TRPC kanallarının anlatımında artış olduğu gösterilmektedir. Ca^{+2} iyonlarının bu kanallardan hücre içine geçişi sonucunda patolojik hipertrofinin gelişmesi, kalbin kasılma düzenin bozulması ve bununla birlikte kalbin kanı vücuda pompalayamaması gibi kalp rahatsızlıkları görülmektedir. TRPC ailesi ile ilgili detaylı bilgi olmasa da, kalpte yeniden yapılanmaya neden olduğu, ayrıca patolojik hipertrofi ve kalp yetmezliği gibi durumlarda anlatımının arttığı görülmektedir (Makarewich ve diğ., 2014).

TRPC kanalları, atriyoventriküler kasılmalarda çok önemli görevlere sahiptir. Sabourin ve diğerleri (2011), TRPC kanallarının ventriküler kasılma üzerindeki etkilerinin anlaşılması amacıyla yaptıkları çalışmada, TRPC3 özgül inhibitörü Pyr3 (10 μ M), TRPC kanallarının seçici olmayan blokeri SKF-96365 (40 μ M) ve L-tipi Ca^{+2} kanallarının blokeri olarak Nifedipin (2 μ M)'in uygulandığı gruplarda, bu blokerlerin, atriyum hücrelerinin içine Ca^{+2} girişini engellemelerine bağlı olarak atriyumların kasılma gücünü azalttıkları göstermişlerdir. TRPC kanallarının tümü için kullanılan SKF-96365 inhibitörü, tüm kalpte ve izole atriyumda pacemakerın uyarı doğurma oranını azalttığından, TRPC kanallarının atriyal pacemaker fonksiyonunda öneme sahip olduğu ileri sürülmektedir (Doleschal ve diğ., 2015).

İskemi/reperfüzyonda miyokard hasarı, primer patolojik değişiklik olarak dikkat edilmesi gereken önemli bir noktadır. Belirli bir iskemi periyodu sonrasında uygulanan reperfüzyon,

kardiyak kontraktıl fonksiyonları kötüleştirebilir ve miyokard metabolizmasında değışikliklere sebep olabilir. Bu nedenle, IR hasarına karşı yeni terapötik yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir. Araştırmalarda, IR'ye maruz kalan izole kalplerin, miyokardiyal kasılma/gevşeme basınçları ($-dp/dt$ ve $+dp/dt$), sol ventrikül içi basınç değışimi (SVBD) ve RPP değęerlerinin azalması, ayrıca son diyastolik basınç (SDB) değęerlerinin artması gibi bazı hemodinamik parametrelerdeki değışikliklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Radmanesh ve diğ., 2017).

Doleschal ve diğerleri (2015), kardiyak kasılmanın ve aritminin düzenlenmesinde TRPC3 kanallarının rolünü araştırdıkları bir çalışmada, TRPC3 agonisti olarak GSK1702934A ve Ang II moleküllerinin kardiyak fonksiyonlar üzerindeki etkilerini göstermişlerdir. TRPC3 kanallarının, kalbin kasılmasında ve uyarılmasında belirleyici bir faktör olduğunu ve TRPC3'ün bu görevinin, hücreseı Ca^{+2} düzeylerini ve aksiyon potansiyeli morfolojisini değıştiren NCX1 ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. TRPC3 aktivatörü olarak GSK1702934A'nın 1 μM 'lik bir konsantrasyonda uygulanması sonucunda, TRPC3'ün aşırı anlatımının yapıldığı transgenik depolarize miyositlerde, aksiyon potansiyeli süresinin önemli derecede arttığı gösterilmiştir. TRPC kanalları agonisti olarak bilinen Ang II'nin de membran iletkenliği ve aksiyon potansiyeli üzerinde benzer biçimde etkilerinin olduğu ifade edilmiştir. Langendorff sisteminin kullanıldığı bu çalışmada, GSK1702934A'nın, izole perfüze kontrol grubu fare kalplerinde kalp kasılması üzerine belirgin bir etkisi gösterilmemiş, ancak TRPC3'ün aşırı anlatımının yapıldığı transgenik fare kalplerinde net bir pozitif inotropik yanıt (hem atriyum, hem de ventrikül hücreesine Ca^{+2} girişini artırarak kalbin kasılma gücünün artırılması) ürettiği belirtilmiştir. Bu pozitif inotropik etki, sol ventrikül sistolik basıncın (SVSB) en yüksek değęerlere ulaştığı GSK1702934A perfüzyonunun başlangıcından 3-4 dakika sonrası için geçerlidir. Aynı zamanda GSK1702934A, diyastolik basınçta da bir artışa neden olmuş ve sonunda diyastolik bozulmalara yol açmıştır. Fakat deney başında, kontrol ve TRPC3 anlatımı yüksek olduğu gruplar arasında, SVBD değęerlerinde bir fark gözlenmemiştir. Bu nedenle pozitif inotropik etki TRPC3 aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ang II'nin de GSK1702934A'ya benzer etkilerinin olduğu belirtilmektedir. Çalışmadan elde edilen max dp/dt değęerleri, GSK1702934A'nın TRPC3 anlatımının düzeylerine bağlı olarak kardiyak kasılabilirliği değıştirdiğini göstermektedir. Deney başlangıcına kıyasla, GSK1702934A'nın kontrol ve TRPC3'ün aşırı anlatımının yapıldığı gruplarda SVB değęerlerini yükselttiği gösterilmiştir. GSK1702934A, TRPC3'ün aşırı anlatımının yapıldığı kalplerde aritmiye neden olmaktadır. Benzer biçimde Ang II uygulamasında, TRPC3'ün aşırı anlatımının yapıldığı

kalplerin SVB sonuçları, aritmik aktivitelerin varlığını göstermiştir. Kardiyak ritm bozukluklarını uyaran Ang II, TRPC3'ün aşırı anlatımının yapıldığı kalplerde aritmi değerlerini yükseltirken, kontrol grubu kalplerde önemli aritmik bozukluklara neden olmamıştır.

Wang ve diğerlerinin (2012), sıçan kalbinde Langendorff sistemi ile aminoetoksidifenil borat (2-APB)'ın aritmi üzerindeki etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, 2-APB'nin hücre içine Ca^{+2} giriş sinyali oluşturarak, kalpte yüksek frekanslı elektriksel aktiviteleri başlattığı ve aritmi ile fibrilasyona neden olduğu belirtilmiştir. TRPC kanal inhibitörü olan SKF-96365'nin ise bu fibrilasyonu tersine çevirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, bir grubun sıçan kalbi Krebs solüsyonu ile 40 dakika perfüze edildikten sonra, perfüzata 5 μ M 2-APB eklenerek perfüzyon 20 dakika daha devam ettirilmiştir. 2-APB'nin bu konsantrasyonda uygulanması, hücre içine Ca^{+2} girişi uyarırken, TRP kanalları ya da IP_3 reseptörünü bloke etmektedir. Bir başka gruptaki sıçanlara ait kalpler 15 dakika boyunca 22 μ M 2-APB içeren Krebs ile perfüze edilerek fibrilasyon oluşturulmuş, hemen ardından perfüzata 20 μ M SKF-96365 eklenip perfüzyon 15 dakika daha devam ettirilmiştir. SKF-96365'in bu dozda kullanımı TRPC kanallarını bloke ederek, hücre içine Ca^{+2} geçişini durdurup, kasılma fonksiyonlarını etkilemeden 2-APB'nin etkisini baskılamıştır. 20 μ M SKF-96365, fibrilasyonun kısa sürede ve büyük ölçüde durdurulmasına neden olmaktadır. Çalışmadan elde edilen kardiyak bulgulara göre, fibrilasyona neden olan 2-APB, kalpte SVBD değerlerini azaltırken, SDB'de önemli ölçüde artışa neden olmuştur. SKF-96365 uygulanan gruplarda ise bu değerlerin kontrol grubuna yaklaştığı gösterilmiştir. 2-APB'nin uygulandığı gruplarda kalp vurumu, RPP ve $max dp/dt$ değerleri belirlenemezken, SKF-96365 uygulanması sonucunda bu değerlerde iyileşmelerin olduğu belirlenmiştir.

He ve diğ. (2017), IR hasarında TRPC kanallarının rollerini inceledikleri çalışmada, 30 dakika iskeminin ardından 24 saat reperfüzyon uygulanan kontrol grubu kalpler ile TRPC3, TRPC6 ve TRPC7 kanallarından yoksun transgenik hayvan gruplarını karşılaştırmışlardır. Buna göre, kalp vurumu, sistolik basınç ve RPP değerlerinde herhangi bir fark gözlenmemiştir (He ve diğ., 2017). Bizim çalışmamızda ise, özellikle deneyin 60. dakikasında IR+SKF-96365 uygulanan grubun kalp vurum değerlerinin IR grubuna göre daha yüksek, kontrol grubuna göre ise daha yakın olduğu gözlenmiştir. Miyokardiyal oksijen tüketiminin dolaylı bir göstergesi olan RPP değerleri incelendiğinde, IR grubuna göre deneyin 30. ve 60. dakikalarında, SKF-96365 uygulanan kontrol grubunun RPP değerlerinin yüksek, IR+SKF-96365 grubu değerlerinin ise düşük olduğu görülmüştür.

Tian ve diğ. (2016), Langendorff deney modelini kullanarak Echinatin'in sıçan kalbinde IR hasarına karşı koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 20 dakika iskeminin ardından 45 dakika reperfüzyon uygulaması yapmışlardır. Echinatin'in kardiyak koruyucu etkisini, kalpte gözlenen hemodinamik verilerden yola çıkarak açıklamışlardır. IR grubunun, SVBD ve max dp/dt değerlerinin tüm gruplara göre düşük olduğu gösterilmiştir. İskeminin ardından reperfüzyon sürecinde farklı dozlarda Echinatin tedavisi uygulanan tüm gruplarda bu değerlerin doza bağlı bir şekilde arttığı ve kontrol grubu değerlerine oldukça yaklaştığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, tedavi amaçlı kullanılan bu maddenin, kalpte IR hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

İzole sıçan kalbinde PLC'nin inhibe edilmesi, kalpte iskemi sonrası geri dönüşe yardımcı olmaktadır. Ca^{+2} 'a bağlı PLC, fosfotidilinositol 4,5-bisfosfatı, DAG ve IP_3 'e dönüştürür ve bu ürünler kardiyak miyositlerde Ca^{+2} hareketlerini düzenler. IR hasarında hücre içi Ca^{+2} seviyelerinin oldukça fazla önem taşıdığı bilinmektedir. Asemu ve diğ. (2004) yaptıkları çalışmada, izole sıçan kalbinde IR hasarına karşı PLC inhibisyonunun etkilerini incelemişlerdir. Langendorff modelinde kontrol gruplarına 30 dakika iskeminin ardından 30 dakika boyunca reperfüzyon uygulanırken, deney grubu hayvanlar reperfüzyon boyunca PLC inhibitörü olan U-73122 ile muamele edilmiştir. Tüm gruplarda hemodinamik veriler incelendiğinde, IR grubunda SDB değerlerinde anlamlı bir artış, SVBD ve max dp/dt değerlerinde ise önemli bir azalma gözlenmiştir. PLC blokeri olarak U-73122 uygulanan tüm gruplarda SDB değerlerinde az da olsa bir düşüş belirtilmiştir. SVBD ve max dp/dt değerlerinde ise U-73122 uygulamasının ardından özellikle reperfüzyonun 30. dakikasında önemli miktarda artış olduğu gösterilmiştir. IR hasarına karşı PLC inhibisyonunun önemi kardiyodinamik verilerdeki değişikliklerden anlaşılmaktadır ve miyokardiyal geri dönüşü geliştirdiği belirtilmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada, TRPC kanallarının seçici olmayan blokeri SKF-96365 uygulamasının kalpteki etkileri incelenmiştir. Kontrol grubunda perfüzyon basıncının deney boyunca düzenli bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Sistolik basınç ve SDB değerlerinde deney süresince önemli bir değişiklik gözlenmezken, SVBD, max dp/dt ve kasılma indeksi değerlerinde deney sonuna kadar belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu grupta gözlenen en önemli değişikliklerden biri de, miyokardiyal oksijen tüketiminin dolaylı bir göstergesi olan RPP değerlerinde deney boyunca anlamlı bir düşüş izlenmesidir. Bu durum, izole kalplerde kardiyak fonksiyonların zamanla zayıflamasına bağlı olarak oksijen tüketiminin de giderek azalmış olabileceğini düşündürmektedir.

IR, SKF-96365 ve IR+SKF-96365 gruplarında, iskemiden hemen sonraki reperfüzyonun ilk 15-20 dakikasında perfüzyon basıncı, ilk 30 dakikasında ise SVBD, kalp vurumu, max dp/dt, kasılma indeksi ve RPP değerlerinin düşük olduğu, SDB değerlerinin ise yükseldiği belirlenmiştir. Bu durumun, hipoksinin neden olduğu kasılma ve gevşeme mekanizmasındaki bozulmaya bağlı olarak gelişen ventriküler dilatasyonun baskılanması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, kasılma indeksinin düşmesi ATP tüketimi ile de yakından ilişkilidir. Özellikle kas kasılmasında miyokardiyal yüksek enerjili fosfatların %60-70'inden yararlanılmaktadır (Takeo ve Nasa, 1999).

Kontrol grubuna göre IR grubunun SDB değerlerinde anlamlı derecede bir artış gözlenirken, iske mi sonrası reperfüzyon sürecinde SKF-96365 kullanılan grubun SDB değerlerinin azalarak kontrol grubuna yaklaştığı görülmektedir. Ancak, IR grubuna uygulanan SKF-96365, IR uygulaması sonucunda azalan SVBD değerleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. RPP, max dp/dt ve kasılma indeksi değerlerini incelediğimizde, IR uygulanan tüm gruplarda bu değerlerde anlamlı bir azalma gözlenirken, IR+SKF-96365 gruplarında reperfüzyon süresince bu değerlerde anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır. SKF-96365'in tek başına uygulandığı kontrol gruplarının kardiyak değerlerine bakıldığında, TRPC kanallarının inhibisyonu sonucu hücre içine Ca^{+2} girişinin azaldığı ve buna bağlı olarak kardiyak parametrelerin uygun biçimde değişime uğradığı görülmektedir. SKF-96365'in, kontrol gruplarında kalp vurumunu, SVBD, max dp/dt, kasılma indeksi ve RPP değerlerini azaltırken, IR uygulanan gruplarda anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı belirlenmiştir. Bu durum, SKF-96365'in TRPC Ca^{+2} kanallarını inhibe ettiğini ve kalbin normal kasılma fonksiyonlarını azalttığını, ancak IR hasarından sonra kalp kasılmasını önemli derecede etkilemediğini göstermektedir. Sadece SKF-96365 uygulanan kontrol grubunun SDB değerleri tüm deney süresince artış gösterirken, IR+SKF-96365 grubunun SDB değerleri azalarak, kontrol grubuna yaklaşmıştır. Son diyastolik basınç değerleri kontrol grubunda deney süresince sabit kalırken, bu değerlerin IR gruplarında iske mi ile birlikte hızla yükselmesi, reperfüzyon ile birlikte düşmeye başlaması, bu düşüşün ventrikül gevşemesiyle ve sonunda ventrikül hacmindeki artışla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Reperfüzyon periyodunun sonunda özellikle SKF-96365'in tek başına uygulandığı IR grubu değerlerinin, kontrol grubuna çok yakın olduğu belirlendi. Bu sonuçlar, SKF-96365 uygulamasının, kalpte kısmen de olsa, iyileştirici bir etkisi olabileceğine işaret etmektedir.

İskemi/reperfüzyon hasarından sonra miyokardiyal hücrelerin zarar görmesi sonucunda hücrelerden CK (Kreatin Kinaz) ve LDH (Laktat Dehidrogenaz) gibi enzimler salgılanır. Kalp kası hücrelerinde CK enziminin, özellikle CK-MB formu üretilmektedir ve miyokard hasarında enzimin miktarında artış görülmektedir. Bu nedenle miyokard hasarının belirleyicisi olarak CK-MB izoformu değerlendirilmektedir (Kemp ve diğ., 2004). Randhawa ve Jaggi (2016), bir TRP blokeri olan Gadolinyum (7,5 ve 15 mg/kg) maddesini kullanarak yaptıkları çalışmalarında, 30 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyon uygulaması sonrasında CK-MB düzeylerine bakarak sıçan kalbinde miyokardiyal hasarı göstermişlerdir. İskemi/reperfüzyonun uygulandığı süre boyunca 5 dakikalık zaman aralıklarında alınan perfüzatta CK-MB düzeylerinde önemli derecede artış olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber, Gadolinyum kullanılan gruplarda CK-MB seviyelerinde bir azalma olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, Gadolinyum'un kalbi koruyucu etkisinin, TRP kanalları ile bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür.

Li ve diğerlerinin (2012), VPO (vaskular peroksidaz, MPO izoformu)'nun IR hasarına karşı etkilerini inceledikleri bir başka çalışmada, 60 dakika iskemi ve 30 dakika reperfüzyonun ardından kardiyak fonksiyonlarda (LVP, max dp/dt, kalp vurumu) belirgin ölçüde değişiklikler ve CK-MB salınımında da anlamlı bir artış olduğu belirtilmiştir. IR hasarı, CK-MB salınımında artışa ve kardiyak fonksiyonlarda gerilemeye neden olurken, Floroglusinol (VPO inhibitörü) uygulamasının, doza bağlı olarak CK-MB salınımında azalmaya ve kardiyak fonksiyonlarda iyileşmeye neden olduğu gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda da, sıçan kalbinde CK-MB düzeylerinin, IR uygulaması sonucunda anlamlı olarak arttığı ve SKF-96365 inhibitörünün uygulanması ile azaldığı belirlenmiştir. Bu azalmanın, SKF-96365 uygulanan kontrol grubunda, IR+SKF-96365 grubuna göre daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, SKF-96365 uygulamasının kalpte miyokard hasarını azaltıcı yönde etkilerinin olabileceği düşünülmüştür.

Oksidatif strese bağlı değişiklikler, miyokard enfarktüsü sonrası gelişen miyokardiyal inflamasyona, IR hasarına ve sol ventrikül yeniden yapılanmasına yanıt olarak, hasarlı kardiyomiyosit kasılmasında anahtar rol oynamaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS), hücresel bileşenleri oksitlemektedir, bu da kardiyomiyosit kasılmalarında işlev bozukluğuna, miyosit apoptozuna veya kardiyak hipertrofiye yol açmaktadır (Heymes ve diğ., 2003). Oksidatif stres, hipertansiyon, ateroskleroz ve inme gibi yaygın kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilir. Kalpte miyokard enfarktüsü takiben meydana gelen oksidatif strese, dokularda iskemi/reperfüzyon hasarının neden olduğu bilinmektedir. Çeşitli organ sistemlerinde ROS ve

oksidatif strese verilen yanıtlarda pek çok TRP kanalı rol oynamaktadır (Earley ve Brayden, 2015).

Miyokardiyal inflamasyon ve iskemi/reperfüzyon hasarı, artmış oksidatif stres ve kontraktıl işlev bozukluğu ile karakterizedir. Pek çok dokuda olduğu gibi, kalp dokusunda da miyokardiyal inflamasyon belirteci olan miyeloperoksidaz (MPO); nötrofiller, monositler ve makrofajlar tarafından sentezlenen ve lökosit aktivasyonu sonrasında önemli miktarlarda salınan peroksidaz süper ailesinin bir üyesidir. MPO, doğuştan gelen bağışıklık mekanizmaları üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Dolaşımdaki MPO'nun artışı, mortalite gelişiminin bir belirtecidir ve MPO, miyokard enfarktüsü sonrası sol ventriküllerde olumsuz yeniden yapılanmaya katkıda bulunur. MPO'nun serum seviyesi sol ventriküllerdeki işlev bozukluğunun şiddeti ile pozitif korelasyon gösterir ve kalp yetmezliğinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir faktör gibi görünmektedir (Kalász ve diğ., 2015).

Li ve diğerleri (2012), Langendorff sistemini kullanarak bir MPO izoformu olan VPO'nun IR hasarına karşı etkilerini inceledikleri bir çalışmada, reperfüzyon sonrasında iskemik miyokard alanında MPO miktarının arttığını ve MPO'nun ürettiği oksidanlarda (HOCl gibi) anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir. İskemi/reperfüzyon hasarının, nekroz veya apoptoz gibi miyokardiyal oksidatif hasara neden olduğu ileri sürülmüştür. Floroglusinol (VPO inhibitörü) uygulanan hayvan gruplarında, IR hasarına bağlı gelişen apoptozun azaldığı ve MPO aktivitesinin durdurulmasının kalpte koruyucu etkileri olduğu belirtilmiştir.

Asaga ve diğerleri (2008) Langendorff perfüzyon modelinde, JTE-607'nin (bir inflamatuvar sitokin sentez inhibitörü) böbrekte iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada, reperfüzyondan sonra MPO miktarında anlamlı bir artış olduğunu belirtmişlerdir. JTE-607'nin uygulandığı gruplarda IR grubuna göre MPO seviyesinin düşük olduğunu göstermişlerdir. Bu durumun, nötrofillerin salgıladığı MPO'nun ve reaktif oksijen türlerinin, hücresel hasarı azaltarak IR'ye bağlı gelişen böbrek hasarının azalmasına neden olabileceğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak, JTE-607'nin nötrofilleri baskılayarak, sıçan böbreğinde IR hasarını azalttığı ve renal fonksiyonları geliştirdiği ifade edilmiştir.

İskemi/reperfüzyonun neden olduğu miyokardiyal hücre hasarı, hücreden miyokardiyal enzimlerin salınmasına neden olur. LDH, pirüvatın laktata dönüşümünü katalize eden bir enzimdir. İskemi/reperfüzyon sonrası kalp hücrelerinde meydana gelen hasarın bir belirteci olarak kullanılır (Rossello ve diğ., 2016). Randhawa ve Jaggi (2016), iskemik sıçan kalbinde

TRP blokleri olan Gadolinyum maddesinin TRP kanalları üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, miyokardiyal hasarlı alanların ölçümünde, nekroz belirteci olan LDH düzeylerini incelemişlerdir. 30 dakikalık iskemi ve 120 dakikalık reperfüzyon periyodu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, LDH düzeylerinde belirgin bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Gadolinyum uygulanan gruplarda ise LDH düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı ve bu maddenin miyokardiyal hasarı önleyerek, kardiyak fonksiyonları geliştirdiği gösterilmiştir.

Tian ve diğerleri (2016), sıçan kalbinde iskemi/reperfüzyon hasarına karşı Echinatin'in iyileştici etkilerini araştırdıkları çalışmada, IR grubu kalplere Langendorff modelinde, 20 dakika iskemi ardından 45 dakika reperfüzyon uygulamışlardır. Tedavi grubunda kalpler, iskeminin ardından reperfüzyon süresince perfüze Echinatin eklenerek perfüze edilmiştir. IR hasarına bağlı gelişen nekrotik hücre ölümünün hesaplanmasında LDH düzeyleri ölçülmüştür. İskemiden sonra reperfüzyonun 30. dakikasında LDH ve CK-MB miktarlarının, kontrol grubuna göre oldukça yüksek seviyelere ulaştığı belirtilmiştir. IR grubuna tedavi amaçlı uygulanan Echinatin maddesinin, artan dozuna bağlı olarak LDH ve CK-MB düzeylerindeki artışı önleyebildiği ve kontrol grubunun referans değerlerine yaklaştığını göstermişlerdir. Aynı zamanda çalışmalarında, ROS oluşumunun IR hasarında önemli bir faktör olduğunu belirterek, kalpte koruyucu mekanizmaları saptamak amacıyla, lipid peroksidasyonunun gösterilmesi için malondialdehit (MDA) ve hücrel endojen antioksidan düzeylerinin tespit edilmesi için süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerini belirlemişlerdir. Farklı dozlarda Echinatin uygulanan tüm gruplarda, MDA düzeyinin belirgin şekilde düştüğünü, SOD aktivitesinin anlamlı derecede yükseldiğini tespit etmişlerdir. Bunlara ek olarak Echinatin'in, IR sonucunda değişen hemodinamik parametreleri (SVBD, $\max \pm dp/dt$) iyileştirdiğini, IR ile uyarılan CK-MB ve LDH düzeylerini ve enfarktüs alanını azalttığını da göstermişlerdir. Çalışmanın sonuçlarını göz önünde bulundurarak, Echinatin'in miyokardiyal IR hasarına karşı kalbi koruyucu etkisinin, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkinlikleri değiştirmesinden kaynaklanıyor olabileceğini ifade etmişlerdir.

Ozeren ve diğerlerinin (2005), izole sıçan kalbinde Langendorff modelini kullanarak IR hasarına karşı miyokard antioksidan savunma sistemi üzerinde kafeik asit fenetil ester (CAPE) takviyeli kardiyoplejik solüsyonun avantajlarını araştırdıkları çalışmada, CAPE'nin iskemi/reperfüzyon hasarıyla uyarılan lipid peroksidasyonunu önlediğini ve güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. CAPE uygulanan grupta MDA ve MPO düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir. Çalışmada, kardiyoplejik

solüsyonlarla CAPE uygulamasının, IR hasarı sırasında sıçan kalbinde antioksidan savunma sistemini geliştirdiğini ileri sürmüşlerdir.

Dong ve diğerleri (2016) yaptıkları çalışmada, geleneksel Çin ilaçları olarak kullanılan pek çok bitkisel polisakkaridin, kalpte IR hasarına karşı koruyucu etkilerini incelemişlerdir. İskemik organların tedavisinde öneme sahip olan 24 çeşit polisakkaritten bahsedilmektedir. Sonuçlar, bitkisel polisakkaritlerin IR hasarının önlenmesi ve tedavisinde yarar sağlayabileceğini ve bu tür polisakkaritlerin, sinir sisteminin fonksiyonunu değiştirerek, enfarktüs alanını, MDA, SOD ve MPO aktivitelerini azaltarak ve anti-inflamatuvar sitokin düzeylerini artırarak IR hasarına karşı umut vadeden bir çözüm olabileceğini belirtmişlerdir. Bu polisakkaritlerin, miyokardiyal IR hasarı üzerindeki biyoaktiviteleri incelendiğinde, CK-MB, MDA, LDH düzeylerinde azalma olduğu ve antioksidan düzeylerini gösteren SOD ve GPx düzeylerinde anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir. Bitkisel Çin ilaçlarının, oksidatif stresi iyileştirdiği ve miyokardiyal apoptozu engellediğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda beyin, karaciğer, böbrek ve bağırsak dokularında meydana gelen IR hasarında da bu ilaçların, MPO, MDA, LDH düzeylerini azaltıp, SOD ve GPx düzeylerini artırdığı ve bu dokularda oksidatif stresi düzenleyerek apoptozu engellediğini bildirmişlerdir.

Radmanesh ve diğerlerinin (2017), Langendorff modeli kullanarak, izole sıçan kalbinde iskemi/reperfüzyon hasarına karşı vanilik asidin, hemodinamik parametreler, MDA ve enfarktüs alanı üzerindeki koruyucu etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, 30 dakika iskemi ardından 60 dakika boyunca reperfüzyon yapılmıştır. IR'ye maruz kalan sıçan kalplerinde doğal bir antioksidan olan vanilik asidin, MDA azalması ile gösterilen lipid peroksidasyonu ile SOD, GPx ve total antioksidan kapasite (TAS) miktarlarının artışı ile gösterilen endojen antioksidan enzimlerin gelişimi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Çalışmanın biyokimyasal sonuçlarına bakıldığında, IR'ye maruz kalan gruplarda vanilik asidin, oksidatif strese karşı hücrel savunmada önemli etkilere sahip olan endojen antioksidan (SOD, GPx ve TAS) seviyelerini düzenlediği, MDA düzeylerinde ve enfarktüs alanında anlamlı derecede azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Hemodinamik parametreleri incelendiğinde, vanilik asidin IR grubuna kıyasla SVBD'de, kalbin kasılabilme yeteneğinde (dp/dt) ve RPP değerlerinde anlamlı derecede artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu verilerin ışığında, vanilik asidin sıçan kalbinde IR hasarını önleyici etkilerinin olduğu ve kardiyak fonksiyonları düzenleyerek kalbin kasılabilirliğini güçlendirdiği bildirilmiştir.

Badalzadeh ve diğerkleri (2017), iskemik ön koşullama ve Siklosporin-A (CsA)'nın diyabetik sıçan kalbinde iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, reperfüzyon sırasında meydana gelen oksidatif stres ve patolojik değişikleri incelemişlerdir. Kontrol ve diyabet grubuna ait kalplerde TAS seviyelerinin oldukça düşük olduğunu ve CsA uygulamasının, her iki grupta da TAS düzeyinde artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak, iskemik ön koşullama ile beraber CsA uygulamasının, diyabetik sıçan kalplerinde IR hasarını azalttığı ve kalbin korunma mekanizmaları ile yakından ilişkili olan oksidatif stres seviyelerinde önemli derecede azalmaya neden olduğu belirtilmiştir.

Aydın ve diğerkleri (2015), akciğer, karaciğer, kalp gibi organlarda IR hasarına karşı Timokinon (TQ)'un etkisini araştırdıkları çalışmada, 45 dakika iskeminin ardından 120 dakika boyunca reperfüzyon uygulamışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre, kontrol grubu TAS düzeylerinin, IR ve IR+TQ gruplarına göre oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir. Ancak, IR ve IR+TQ gruplarının TAS aktiviteleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Aynı zamanda kontrol ve IR+TQ gruplarında düşük olan TOS ve OSI değerlerinin, IR grubunda oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, Timokinon'un iskemi/reperfüzyon uygulanan sıçan modelinde, histopatolojik hasarı ve oksidatif stresi azaltıcı etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir.

Luan ve diğerkleri (2012), diyabetik sıçan böbreğinde Tempol'un koruyucu etkisini inceledikleri bir çalışmada, kontrol ve diyabet grupları oluşturmuşlardır. Kontrol grubna göre MDA seviyesinin diyabet grubunda anlamlı derecede artarken, Tempol tedavisinin MDA düzeyini diyabet grubuna kıyasla azalttığını göstermişlerdir. Kontrol grubundaki SOD ve GPx aktiviteleri diğer iki gruba göre anlamlı derecede yüksekken, diyabet grubunda bu değerler belirgin şekilde düşmüştür. Tempol uygulanan diyabetik sıçanlarda ise bu değişikliklerin hafiflediği ve kontrol grubuna yaklaştığı gösterilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda, böbrek hücrelerinde TRPC6 kanallarının anlatımının yapıldığı ve bu kanalların böbrek mezenşiyal hücrelerinde Ang II ile uyarılarak kasılmada rol oynayabildiği belirtilmiştir. Kontrol grubuna göre, diyabetik sıçanlarda TRPC6 anlatımının oldukça düşük olduğu ve yüksek glikoz seviyesinin TRPC6 mRNA miktarlarını azalttığı ifade edilmiştir. TRPC6 anlatımındaki bu azalmanın, diyabetik mezenşiyal hücrelerde Ca^{+2} sinyal mekanizmasını bozarak, hücrelerde kasılma yeteneğinin azalmasına neden olduğu belirtilmiştir. Tempol ile muamele edilen böbreklerde ise TRPC6 anlatımının önemli derecede arttığı görölmüştür. Çalışmanın sonuçlarına göre, antioksidan tedavinin, diyabetin TRPC6 üzerindeki etkisini etkili bir şekilde bastırđıęı düşünölmektedir. Diyabetin, TRPC6 geninin ROS tarafından baskılanmasıyla

TRPC6 kanal anlatımını azalttığı ve bu nedenle TRPC6'nın tedavi sürecinde potansiyel etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızın biyokimyasal analizleri göz önüne alındığında, iskemi/reperfüzyona bağlı olarak MPO, LDH ve MDA düzeylerinde kontrol gruplarına göre anlamlı derecede artış görülmektedir. İskeminin ardından reperfüzyon boyunca SKF-96365'in uygulandığı grupta ise MPO, LDH ve MDA seviyelerinde oldukça anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar ve bizim çalışmamızın sonuçları karşılaştırıldığında, iskemik kalpte MPO, LDH ve MDA düzeylerindeki artışın kardiyomiyositlere zarar verdiği ve bu maddelerin inhibisyonunun kalpte iyileştirici belirtiler gösterdiği anlaşılmaktadır. Aynı zamanda kalp dokularında, hücrel endojen antioksidan düzeylerini incelediğimizde, kontrol grubunda bu parametrelerin en yüksek düzeylerde olduğu, IR grubunda SOD ve GPx düzeylerindeki azalmanın kontrol grubuna göre oldukça anlamlı olduğu tespit edilmiştir. IR hasarına karşı tedavi amaçlı SKF-96365 uyguladığımız tüm gruplarda ise SOD ve GPx düzeylerinin IR grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmaların biyokimyasal sonuçlarına bakıldığında, bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Bu durum SKF-96365'in, sıçan kalbinde iskemi/reperfüzyon hasarını azaltıcı ve iskemik kalbi oksidatif strese karşı koruyucu etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. SKF-96365'in TRPC kanal inhibitörü olarak kullanıldığı çalışmamızda, bu antagonistin, IR hasarına karşı gösterdiği iyileştirici etkilerinin, TRPC kanallarının biyolojik aktivitelerinin baskılanması ile ilişkili olduğu ve bu nedenle TRPC kanallarının kalpte IR hasarının tedavisinde kritik bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda ayrıca, kontrol grubu sıçanlarda TAS düzeylerinin yüksek, TOS ve OSI değerlerinin ise düşük olduğu görülmektedir. Benzer biçimde IR hasarının ardından TAS seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı ve TOS seviyesi ile OSI değerlerinin arttığı belirlenmiştir. SKF-96365 blokerinin uygulanmasının ardından, TAS değerlerinde IR'ye göre bir artış olduğu ve TOS seviyesi ile OSI değerlerinde kontrol grubuna benzer şekilde bir azalma olduğu görülmektedir. Sonuçlarımız, SKF-96365 uygulamasının oksidatif stresin azaltılmasında etkili olduğuna işaret etmektedir.

Kalpte IR, proteaz enzimlerinin aktivasyonundan ve hücre ölümünden sorumlu Na^+ , Ca^{+2} iyonları ve oksijen salınımindaki artıştan dolayı, kalp kası hücrelerinde hasara yol açar (Agrawal ve diğ., 2016). Angiotensin II, kan hacmini ve vasküler direnci düzenlemedeki önemli rolünden dolayı, kardiyovasküler homeostazın sağlanmasında anahtar rol oynar. Angiotensin

II, özgül reseptörlerinin aktivasyonu ile kardiyak kasılma, hücre iletişimi ve impuls yayılmasını düzenler (De Mello ve Danser, 2000). Angiotensin II, kalpte özellikle damar daralmasına yol açarak hipertansiyona neden olur. Angiotensin II'nin aşırı üretimi kan basıncını arttırarak, beyin, böbrek ve kan damarları gibi çeşitli organların hasar görmesine neden olur. Miyokardiyal Ang II reseptörleri (AT1R, AT2R) kardiyak korumada çok önemli bir rol oynar. Angiotensin II reseptör antagonistleri, kan basıncını ve enfarktüs boyutunu azaltarak kalpte koruyucu etki gösterir. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, angiotensin dönüştürücü enzimlerin aktivasyonunu durdurarak, miyokard enfarktüsü azaltır. Böylece, Ang II miktarının azaltılması kalpte IR hasarını zayıflatmaktadır. Aynı zamanda, Angiotensin II'nin Valsartan gibi antagonistleri, Ang II'yi inhibe ederek enfarktüs alanının boyutunu azaltır (Agrawal ve diğ., 2016).

Deneysel çalışmalar Ang II'nin, IR hasarının patolojisine neden olan oksidatif strese yol açtığını göstermektedir (Dianat ve diğ., 2014). Angiotensin II, önemli miktarda süperoksit üretimine neden olur ve böylece iskemik kalp rahatsızlıklarının tedavisinde, Ang II miktarının azaltılması ya da Ang II reseptörlerinin bloke edilmesi önemli bir stratejik yaklaşım olarak değerlendirilir. Dianat ve diğerleri (2014) yaptıkları çalışmada, Ang II tip 1 reseptör blokörü (AT1R) olan Losartan'ın izole sıçan kalbinde oksidatif strese neden olan IR üzerindeki iyileştirici etkilerini araştırmışlardır. Langendorff modelinin kullanıldığı ve sıçan kalplerine 30 dakika iskeminin ardından 60 dakika boyunca reperfüzyon uygulaması yapılan bu çalışmada, Ang II miktarının iskemi uygulanan gruplarda arttığı gösterilmiştir. Çalışmanın biyokimyasal verileri incelendiğinde, Losartan inhibitörü uygulanan gruplarda LDH, MDA, CK-MB düzeylerinde anlamlı azalmalar olduğu ve bu nedenle Ang II reseptörlerinin inhibisyonunun IR hasarına karşı olumlu yönde etkilerinin bulunduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda Losartan uygulamasının SOD, GPx ve TAS düzeylerinde IR'ye göre bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu verilerin ışığında, Ang II'nin kalpte IR hasarında oldukça önemli fonksiyonlara sahip olduğu ve Ang II'nin artan düzeylerinin kalp fizyolojisinde olumsuz etkilerinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Daha önce yaptığımız çalışmamızda, angiotensin tip I reseptör blokörü Losartan ile angiotensin tip II reseptör blokörü PD123319'un, langendorff izole kalp sistemi ile sıçan kalbine ayrı ayrı ve beraber uygulanması ile iskemik kalp üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmadaki Ang II ve renin düzeyleri incelendiğinde, her ikisinin de sadece IR hasarı oluşturulan grupta anlamlı olarak arttığı, AT I antagonisti Losartan ve AT2 antagonisti PD123319'un tek başlarına ve

birlikte uygulandığı gruplarda anlamlı olarak azaldığı ve PD122319'un Losartan'a göre daha etkili bir cevap oluşturduğu belirlenmiştir (Kılıç ve diğ., 2016). Şimdiki çalışmamızda, kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda Ang II düzeyleri ölçüldüğünde, kontrol grubunda en düşük düzeylerde gözlenen değerlerin, IR grubunda anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. IR grubuyla karşılaştırıldığında, kontrol grubu ve IR grubu kalplere SKF-96365 blokerinin uygulamasının, Ang II seviyelerini anlamlı derecede düşürerek, kontrol grubu değerlerine yaklaştırdığı tespit edilmiştir. Her iki çalışmamızın sonuçları, IR'nin kardiyak renin-angiotensin sistem bileşenlerini anlamlı olarak arttırdığını ortaya koymuştur. Bu durumun, TRPC kanal blokeri ile önlenebileceği düşünülmektedir.

Angiotensin II, kardiyovasküler sistemde Ca^{+2} konsantrasyonunun artışına bağlı olarak düzensiz kasılmalara neden olur. Angiotensin II'nin kardiyak fonksiyonlar üzerindeki etkisinin TRPC kanallarının anlatımına bağlı olduğu ve bu kanalların Ang II aracılı aritmilerde anahtar rol oynadığı ileri sürülmektedir (Doleschal ve diğ., 2012). Ang II, kalpte doğrudan TRPC3 ve TRPC6 kanallarını aktive ederek, hücre içine katyonların geçişine izin verir ve devamında aksiyon potansiyeli oluşumuna neden olur. Kalpte Ang II aracılı hipertrofik yanıtların oluşmasında, TRPC3 ve TRPC6 kanallarının patofizyolojik öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Onohara ve diğ., 2006).

Angiotensin II'nin reseptörlerine bağlanması ile uyarılan PLC-IP₃-DAG sinyal yolağı, TRPC3 ve TRPC6 kanallarını aktive ederek, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu artırır. Kalsiyum sinyal yolağının uyarılması, kalp hastalıklarında önem taşıyan sistolik/diyastolik fonksiyon bozukluklarına ve miyokardiyal apoptoz gelişimine neden olur (Kang ve Izumo, 2003). TRPC kanallarının aktivasyonu, Ca^{+2} bağımlı sinyal yolağını uyarak, patolojik kardiyak yeniden yapılanmaya, hipertrofiye ve proapoptotik etkilere neden olur (Eder ve Molkentin, 2011). Aynı zamanda Ang II aracılığıyla sitosolik Ca^{+2} seviyesinin artırılmasında TRPC'lerin hücre ölümüne katkıda bulunduğu da gösterilmiştir (Shan ve diğ., 2008). TRPC3 ve TRPC6 benzer özelliklere sahip olduğundan, ventriküler miyositlerde TRPC6 anlatımının, olası kardiyak hipertrofiyi ve kalp hastalıklarını artırdığı da bilinmektedir (Feng ve diğ., 2011).

Doleschal ve diğerleri (2012), Langendorff perfüzyon modeli kullanarak kalpte Ang II'nin kardiyak fonksiyonlar üzerindeki etkilerini ve TRPC3 kanalı ile ilişkilerini araştırmışlardır. 100 nM Ang II uygulaması kontrol grubu kalplerde pozitif inotropik etkiler gösterirken, TRPC3 kanallarının aşırı anlatımının yapıldığı transgenik fare kalplerinde sol ventriküler basıncı

azalttığı belirtilmiştir. TRPC3 transgenik modellerdeki Ang II'nin neden olduğu kalp fonksiyonlarının bozulması, 30 μ M Pyr-3 blokleri tarafından kısmen tersine çevrilmiştir. Ang II, diyastolik Ca^{+2} düzeylerinde bir artışa neden olarak, TRPC3 anlatımının fazla olduğu kalplerde düzensiz kasılmalara yol açmıştır, ancak kontrol grubunda bir değişiklik görülmemiştir. Çalışmada, kardiyak fonksiyonların Ang II aracılığı ile düzenlenmesinin, TRPC3 kanallarının anlatımına bağlı olduğu ve TRPC3'ün aşırı anlatımının Ang II aracılı kardiyak bozuklukları arttırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, Ohba ve diğerleri (2007), kalpte Ang II aracılığı ile oluşan hipertrofik yanıtlarda TRPC1 kanallarının da önemli olduğunu belirtmişlerdir. TRPC1 kanal anlatımının engellenmesinin, kalpte Ang II aracılı hipertrofi gelişimini baskıladığını göstermişlerdir.

Yapılan çalışmalar ve bizim çalışmamızın sonuçları göz önüne alındığında, SKF-96365 uygulanan gruplarımızdaki Ang II düzeylerindeki azalmanın, TRPC kanallarının inhibisyonunun bir sonucu olarak hücre içine Ca^{+2} girişinin baskılanmasıyla ilişkili olabileceği görülmektedir. Bu sonuçlar, SKF-96365'in IR hasarında artan Ang II düzeylerini azaltarak, kalpte IR hasarına karşı olumlu etkiler gösterdiği ve kalbin korunma mekanizmaları açısından TRPC kanalları ile Ang II'nin yakın ilişki halinde olduğu ve IR hasarına karşı Ang II ve TRPC düzeylerinin düzenlenmesinin olası bir tedavi yöntemi olabileceğini düşündürmektedir.

Normal yetişkin kardiyak miyositlerinde TRPC kanallarının çok düşük seviyelerde anlatımı olur, ancak patolojik hipertrofide ve kalp yetmezliğinde bu kanalların anlatımları artmaktadır (Kiyonaka ve diğ., 2009). TRPC kanalları, patolojik kardiyak yeniden yapılanmaya, hipertrofiye ve kalp yetmezliğine yol açan Ca^{+2} bağımlı sinyal yollarının başlatıcıları olarak bilinirler. TRPC kanallarının inhibisyonunun hipertrofi tedavisinde önemli bir rolü olduğu ileri sürülmektedir. Bu kanalların inhibe edildiği veya kanalların anlatımdan sorumlu genlerin silindiği pek çok çalışma bulunmaktadır. Makarewich ve diğerleri (2014), fare kalbinde miyokard enfarktüsü sonrası yeniden yapılanmada ve kardiyak fonksiyonlarda TRPC aracılı Ca^{+2} geçişinin önemini araştırdıkları bir çalışmada, miyokardiyal iskemiden sonra TRPC1, TRPC3 ve TRPC6 mRNA anlatımlarının arttığını göstermişlerdir. Bu durumun TRPC aracılı Ca^{+2} girişi ile ilişkili olduğunu ve kalpte kasılabilirliği azalttığını ifade etmişlerdir. Miyokardiyal iskemi sonrasında, TRPC antagonisti SKF-96365 ve TRPC3/6 özgül inhibitörü GSK503A kullanılan çalışmada, miyositlerdeki TRPC aracılı Ca^{+2} girişinin özgülüğü doğrulanmıştır. Bu kanalların inhibisyonunun ardından, daha iyi bir kardiyak performans, kalp yetmezliği oluşumunda gecikmeler ve miyokardiyal iskemi sonrası yapılanma sürecinde

iyileştirici etkiler görüldüğü belirtilmiştir (Makarewich ve diğ., 2014). Kiyonaka ve diğerlerinin (2009) fare kalbindeki ventriküler miyositlerde bulunan TRPC kanalları üzerine yaptıkları çalışmada da, SKF-96365'in kullanıldığı hücre gruplarında TRPC3/4/6 aracılı Ca^{+2} girişi durdurulurken, daha seçici bir inhibitör olan GSK503A'nın kullanıldığı gruplarda, sadece TRPC3/6'nın inhibe olduğu gösterilmiştir. Benzer biçimde Pyr3'ün ise yalnızca TRPC3 kanallarını durdurduğu gösterilmiştir. Sonuçlar, miyokardiyal iskemi sonrası kasılma kabiliyetinin iyileştirilmesi amacıyla TRPC kanallarının inhibe edilmesinin, kalp hastalıkları ile mücadelede etkili bir strateji olabileceği yönündedir

Feng ve diğerleri (2011), Ca^{+2} 'a duyarlı reseptörlerin TRPC1 ve TRPC3 kanalları üzerinde etkilerini inceledikleri bir çalışmada, 15 dakika perfüzyonun ardından 1,5 saat boyunca kalsiyuma duyarlı reseptörleri aktive eden Gadolinyum (III) klorür ($GdCl_3$) ile perfüzyon uygulaması yapılmıştır. TRPC1 ve TPRC3 protein anlatım düzeyleri incelendiğinde, $GdCl_3$ grubunda kontrol grubuna göre bir artış olduğu görülmüştür. Bu artışın özellikle TRPC3 kanalında daha anlamlı olduğu belirtilmiştir. TRPC kanallarının anlatımındaki bu artışın hücre içinde uzun süren yüksek Ca^{+2} derişimine neden olduğu gösterilmiştir. TRPC kanal inhibitörü olan SKF-96365 uygulandığında, TRPC3 kanallarının aşırı anlatımı azalırken, TRPC1 kanallarında önemli bir değişiklik olmadığı ifade edilmiştir. Bu kanalların anlatımlarındaki artışın, hücre içi Ca^{+2} dengelerini değiştirdiği bilindiği için, özellikle hipertrofi veya apoptozdan sorumlu genlerin sentezlenmesini uyurabileceği bildirilmiştir.

Kalpte normal koşullarda oldukça düşük olan TRPC3 ve TRPC6 kanallarının anlatımları, kalp hastalıklarında belirgin bir artış göstermektedir (Eder ve Molquentin, 2011). Aynı zamanda bu kanalların birlikte delesyonlarının, kardiyak bozukluklar üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Wu ve diğ., 2010). Shan ve diğerleri (2008) yaptıkları çalışmada, yetişkin fare kalbinde IR hasarından sonra anlatımı artan TRPC3 kanallarının apoptoz üzerine etkilerini incelemişlerdir. İskemi/reperfüzyon hasarına bağlı gelişen apoptoz artışına, TRPC3 kanallarının aşırı anlatımlarının neden olduğu belirtilmiştir. 0,5 μM SKF-96365 inhibitörü uygulanan hücrelerde, IR uygulanan kontrol grubuna göre IR'yi takiben hücresel canlılık oranının önemli derecede arttığı gösterilmiştir. SKF-96365 aynı zamanda apoptozu da önemli ölçüde azaltmıştır. L-tipi Ca^{+2} kanal inhibitörü olan Verapamil ise apoptozda önemli bir değişime yol açmamıştır. TRPC3'ün aşırı anlatımı, hücre ölümüne de neden olan, hücre dışı alanda fazla miktarda bulunan Ca^{+2} 'a duyarlılığı artırmıştır.

Sabourin ve diğerlerinin (2011), TRPC kanallarının normal ve doğal süreçteki fonksiyonlarını belirlemek amacıyla, 4 günlük embriyonik tavuk kalbinde yaptıkları çalışmalarında, TRPC kanallarının gelişmekte olan kalbin pacemaker hücrelerinin fonksiyonlarını yerine getirmesinde, sinyal iletimi ve kasılma fonksiyonlarında anahtar bir rol oynadığı tespit edilmiştir. TRPC kanallarının anlatımının atriyum ve ventriküllerde eşit miktarda olduğu belirtilmiştir. İzole atriyum ve ventriküllerin aktivitesi üzerinde SKF-96365'in kullanım süresine ve dozuna bağlı olarak ortaya çıkan etkileri belirtilmiştir. SKF-96365 uygulanan gruplarda, 20-40 dakika sonra aritmiler ve kalp vurum sayısının ölçümü yapılmıştır. SKF-96365'in 5 μ M'dan fazla uygulanan konsantrasyonunda, kalbin tamamında aritmiye sebep olduğu gözlenmiştir. 40 μ M SKF-96365 kullanıldığında, atriyumun ve ventrikülün TRPC inhibisyonuna olan duyarlılığı farklılık göstermiştir. 20 dakika süren uygulamanın sonunda ventriküllerde %81 oranında inhibisyon sağlanırken, atriyumlarda sadece %36 oranında inhibisyon gerçekleşmiştir. Kontrol gruplarının ne atriyumunda ne de ventrikülünde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, 40 μ M SKF96365 uygulanan gruplarda ventriküllerin blokajının atriyuma kıyasla çok daha hızlı olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarda, TRPC1, TRPC3, TRPC6 ve TRPC kanalları ile etkileşime giren ve bir adaptör protein olarak işlev gösteren Enkurin adaptör protein (ENKUR) düzeyleri belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sadece IR grubunda TRPC1, TRPC3, TRPC6 ve ENKUR düzeylerinin arttığı ve SKF-96365 uygulaması ile bu değerlerin tüm gruplarda azaldığı belirlenmiştir. Bu kanallardan, kalpte IR hasarı sonrasında en fazla artışı özellikle TRPC3 göstermiştir. IR grubunda belirlenen artışın, IR+SKF-96365 grubunda azaldığı, aynı zamanda da bu azalmanın TRPC1, TRPC3 ve ENKUR düzeyleri için istatistiksel olarak anlamlı iken, TRPC6 için anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ve iskemi/reperfüzyon uygulaması yapılmadan SKF-96365 blokeri uygulanan gruplardaki TRPC1, TRPC3 ve TRPC6 kanallarının protein anlatım düzeyleri arasında bir fark olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlarımız, IR hasarının TRPC kanallarında aşırı anlatıma neden olduğunu göstermektedir. Bu durum, hücre içine Ca^{+2} akışını artırarak, hücrelerde kasılma fonksiyonları başta olmak üzere pek çok fizyolojik süreci etkileyerek, kalpte olumsuzluklar yaratmaktadır. İzole kalpteki IR hasarında TRPC kanallarına yönelik çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, kalpte meydana gelen IR hasarında bu kanalların inhibisyonunun olası bir tedavi yöntemi olabileceğinden bahsedilmektedir (Kiyonaka ve diğ. 2009; Makarewich ve diğ., 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda TRPC kanalları ailesinden özellikle TRPC1, TRPC3 ve TRPC6 kanallarının, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli olabileceği ileri sürülmektedir. Rowell ve diğerleri (2010) çalışmalarında, bu üç TRPC kanalının patofizyolojik rolünü destekleyen yeni kanıtları ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde inhibisyon stratejilerinin potansiyel yararlarını tanımlamışlardır. Ne yazık ki bu kanalların mevcut olan tüm inhibitörleri herhangi bir kanala özgü değildir ve sık sık diğer Ca^{+2} akış mekanizmalarını da etkileyebilmektedir. Örneğin SKF-96365, deneylerde sıklıkla TRPC kanallarını ve depo kontrollü Ca^{+2} kanallarını bloke etmek amacıyla kullanılmaktadır, ancak SKF-96365 TRPC kanalları ailesinin herhangi bir üyesini özgül olarak inhibe etmemektedir.

Bütün bu verilerin ışığında, çalışmamızın sonuçları özetlenecek olursa;

- Langendorff sistemi aracılığı ile izole kalplerden elde edilen kardiyodinamik veriler değerlendirildiğinde, iskemi/reperfüzyon hasarının miyokardiyal fonksiyon bozukluğuna neden olduğu,
- TRPC kanallarının seçici olmayan blokeri SKF-96365 uygulamasının iskemi/reperfüzyon hasarına karşı kalbi kısmen koruyucu rolünün olduğu,
- Biyokimyasal olarak hasar belirteçleri analiz edildiğinde, IR'nin kalp dokusunda hücrel hasara yol açtığı, SKF-96365 uygulaması ile bu hasarın azaldığı, antioksidan enzim düzeylerinin arttığı,
- SKF-96365'in, IR hasarında artan Ang II düzeylerini azaltarak, kalpte IR hasarına karşı olumlu etkiler gösterdiği ve kalbin korunma mekanizmaları açısından TRPC kanalları ile Ang II'nin yakın ilişki halinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda, izole sıçan kalbinde IR hasarında TRPC kanallarının rollerinin belirlenmesi ve bu kanalların reperfüzyon sürecindeki inhibisyonlarının iyileştirici etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, farklı metotların uygulanması, özellikle reperfüzyon süresinin uzatılması ve SKF-96365'in kullanımına ilişkin süre ve doz cevaplarının belirlenmesi ile bu antagonistin fizyolojik olarak daha yararlı etkilerinin görülebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, TRPC kanalları için daha özgül ajanların bulunması ve bu ajanların farklı dozları ile yapılacak çalışmalardan elde edilecek sonuçların, kardiyovasküler hastalıkların ve Ca^{+2} kanalları ile ilişkili diğer patofizyolojik bozuklukların önlenmesine yönelik yeni çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agrawal, V., Gupta, J.K., Qureshi, S.S., Vishwakarma, V.K., 2016, Role of cardiac renin angiotensin system in ischemia reperfusion injury and preconditioning of heart, *Indian heart journal*, 68 (6), 856-861.
- Asaga, T., Ueki, M., Chujo, K., Taie, S., 2008, JTE-607, an inflammatory cytokine synthesis inhibitor, attenuates ischemia/reperfusion-induced renal injury by reducing neutrophil activation in rats, *Journal of bioscience and bioengineering*, 106 (1), 22-26.
- Asemu, G., Dhalla, N.S., Tappia, P.S., 2004, Inhibition of PLC improves postischemic recovery in isolated rat heart, *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*, 287 (6), 2598-2605.
- Aydin, M.S., Kocarslan, A., Kocarslan, S., Kucuk, A., Eser, İ., Sezen, H., Buyukfirat, E., Hazar, A., 2015, Thymoquinone protects end organs from abdominal aorta ischemia/reperfusion injury in a rat model, *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular*, 30 (1), 77-83.
- Badalzadeh, R., Tabatabaei, S.M., Mohammadi, M., Khaki, A., Mohammadnezhad, D., 2017, Combined postconditioning with ischemia and restore oxidative stress and histopathological changes in reperfusion injury of diabetic myocardium, *Iran Journal basic medicine science*, 20 (10), 1079-1087.
- Benjamin, I.J. and Schneider, M.D., 2005, Learning from failure: congestive heart failure in the postgenomic age, *The journal of clinical investigation*, 115 (3), 495-499.
- Bergdahl, A., Gomez, M.F., Wihlborg, A.K., Erlinge, D., Eyjolfson, A., Xu, S.Z., Beech, D.J., Dreja, K., Hellstrand, P., 2005, Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: correlation with store-operated Ca^{+2} entry, *American journal of physiology-cell physiology*, 288 (4), 872-880.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nature reviews molecular cell biology*, 4 (7), 517-529.
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000, Signal transduction: the calcium entry pas de deux, *Science*, 287 (5458), 1604-1605.
- Bezzerides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., Greka, A., Clapham, D.E., 2004, Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels, *Natural cell biology*, 6 (8), 709-720.
- Bode, F., Sachs, F., Franz, M.R., 2001, Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation, *Nature*, 409 (6816), 35-36.

- Boitano, S., Dirksen, E.R., Sanderson, M.J., 1992, Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate, *Science*, 258 (5080), 292-295.
- Bolli, R., 1990, Mechanism of myocardial stunning, *Circulation*, 82 (3), 723-738.
- Bootman, M.D. and Roderick, H.L., 2008, Why, where and when do cardiac myocytes express inositol 1,4,5-trisphosphate receptors?, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 294 (2), H579-H581.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F., Lipp, P., 2001, Calcium signalling-an overview, *Seminars in cell and developmental biology*, 12 (1), 3-10.
- Bowman, C.L., Gottlieb, P.A., Suchyna, T.M., Murphy, Y.K., Sachs, F., 2007, Mechanosensitive ion channels and the peptide inhibitor GsMTx-4: history, properties, mechanisms and pharmacology, *Journal toxicon*, 49 (2), 249-270.
- Brover, R.W., Meij, S., Serruys, P.W., 1983, A model of asynchronous left ventricular relaxation predicting the bi-exponential pressure decay, *Cardiovascular research*, 17 (8), 482-488.
- Buckberg, G.D., 1987, Strategies and logic of cardioplegic delivery to prevent, avoid, and reverse ischemic and reperfusion damage, *Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 93 (1), 127-139.
- Castaldo, P., Cataldi, M., Magi, S., Lariccia, V., Arcangeli, S., Amoroso, S., 2009, Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases, *Progress in neurobiology*, 87 (1), 58-79.
- Cayouette, S., Lussier, M.P., Mathieu, E.L., Bousquet, S.M., Boulay, G., 2004, Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation, *The journal of biological chemistry*, 279 (8), 7241-7246.
- Chen, J., Crossland, R.F., Noorani, M.M.Z., Marrelli, S.P., 2009, Inhibition of TRPC1/TRPC3 by PKG contributes to NO-mediated vasorelaxation, *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*, 297 (1), H417- H424.
- Chen, K.H., Liu, H., Yang, L., Jin, M.W., Li, G.R., 2015, SKF-96365 strongly inhibits voltage-gated sodium current in rat ventricular myocytes, *European journal of physiology*, 467 (6), 1227-1236.
- Clapham, D.E., 2003, TRP channels as cellular sensors, *Nature*, 426 (6966), 517-524.
- Clapham, D.E., Runnels, L.W., Strübing, C., 2001, The TRP ion channel family, *Nature research journal neuroscience*, 2 (6), 387-396.

- Collins, H.E., Zhu-Mauldin, X., Marchase, R.B., Chatham, J.C., 2013, STIM1/ Orai1-mediated SOCE: current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology, *The american journal of physiology-heart and circulatory physiology*, 305 (4), H446- H458.
- Damjanov, I. and Linder, J., 1995, Cell injury and cellular adaptations, *Anderson's pathology*, 10 (1), 357-365.
- De mello, W.C. and Danser, A.H., 2000, Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system, *Hypertension*, 35 (6), 1183-1188.
- Dianat, M., Hamzavi, G.R., Badavi, M., Samarbafzadeh, A., 2014, Effects of losartan and vanillic acid co-administration on ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in isolated rat heart, *Iran Red Crescent Medical Journal*, 16 (7), e16664.
- Dietrich, A., Mederos, Y.S.M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaya, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., Essin, K., Pinkenburg, O., Luft, F.C., Gudermann, T., Birnbaumer, L., 2005, Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6-/- mice, *Molecular and cellular biology*, 25 (16), 6980-6989.
- Doleschal, B., Primessnig, U., Wölkart, G., Wolf, S., Scherthaner, M., Lichtenegger, M., Glasnov, T.N., Kappe, C.O., Mayer, B., Antoons, G., Heinzel, F., Poteser, M., Groschner, K., 2015, TRPC3 contributes to regulation of cardiac contractility and arrhythmogenesis by dynamic interaction with NCX1, *Cardiovascular research*, 106 (1), 163-173.
- Doleschal, B., Wolf, S., Huber, M.S., Wölkart, G., Antoons, G., Groschner, K., 2012, TRPC3 overexpression promotes angiotensin II-induced cardiac dysfunction, *BMC pharmacology and toxicology*, 13 (1), A83.
- Dong, Q., Lin, X., Shen, L., Feng, Y., 2016, The protective effect of herbal polysaccharides on ischemia-reperfusion injury, *International journal of biological macromolecules*, 92, 431-440.
- Earley, S. and Brayden, J.E., 2015, Transient receptor potential channels in the vasculature, *Physiological reviews*, 95 (2), 645-690.
- Eder, P. and Molkenin, J.D., 2011, TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy, *Circulation research*, 108 (2), 265-272.
- Feng, S.L., Sun, M.R., Li, T.T., Yin, X., Xu, C.Q., Sun, Y.H., 2011, Activation of calcium-sensing receptor increases TRPC3 expression in rat cardiomyocytes, *Biochemical and biophysical research communications*, 406 (2), 278-284.
- Ford, E.S., Greenlund, K.J., Hong, Y., 2012, Ideal cardiovascular health and mortality from all causes and diseases of the circulatory system among adults in the united states, *Circulation*, 125 (8), 987-995.

- Giordano, F.J., 2005, Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure, *The journal of clinical investigation*, 115 (3), 500-508.
- Gomes, D.A., Rodrigues, M.A., Leite, M.F., Gomez, M.V., Varnai, P., Balla, T., Bennett, A.M., Nathanson, M.H., 2008, c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals, *Journal of biological chemistry*, 283 (7), 4344-4351.
- Green, C.J., Gower, J.D., Healing, G., Cotterill, L.A., Fuller, B.J., Simpkin, S., 1989, The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys, *Free radical research communications*, 7 (3-6), 255-264.
- Guinamard, R. and Bois, P., 2007, Involvement of transient receptor potential proteins in cardiac hypertrophy, *Biochimica et biophysica acta-molecular basis of disease*, 1772 (8), 885-894.
- Györke, S., Hagen, B.M., Terentyev, D., Lederer, W.J., 2007, Chain-reaction (Ca^{2+}) signaling in the heart, *The journal of clinical investigation*, 117 (7), 1758-1762.
- He, X., Li, S., Liu, B., Susperreguy, S., Formoso, K., Yao, J., Kang, J., Shi, A., Birnbaumer, L., Liao, Y., 2017, Major contribution of the 3/6/7 class of TRPC channels to myocardial ischemia/reperfusion and cellular hypoxia/reoxygenation injuries, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 114 (23), 4582-4591.
- Henry, P.D., Shuchleib, R., David, J., Weiss, E.S., Sobel, B.E., 1977, Myocardial contracture and accumulation of mitochondrial calcium in ischemic rabbit heart, *American journal of physiology*, 233 (6), 667-684.
- Hess, M.L., Krause, S., Kontos, H.A., 1983, Mediation of sarcoplasmic reticulum disruption in the ischemic myocardium: proposed mechanism by the interaction of hydrogen ions and oxygen free radicals, *Advances in experimental medicine and biology*, 161, 377-389.
- Heymes, C., Bendall, J.K., Ratajczak, P., Cave, A.C., Samuel, J.L., Hasenfuss, G., Shah, A.M., 2003, Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure, *Journal of the american college of cardiology*, 41 (12), 2164-2171.
- Hirose, M., Takeishi, Y., Niizeki, T., Nakada, T., Shimojo, H., Kashihara, T., Horiuchi-Hirose, M., Kubota, I., Mende, U., Yamada, M., 2011, Diacylglycerol kinase ζ inhibits ventricular tachyarrhythmias in a mouse model of heart failure, *Circulation journal*, 75 (10), 2333-2342.
- Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., Schultz G., 1999, Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol, *Nature*, 397 (6716), 259-263.

- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T., 2000, Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel, *Biochemical journal*, 351 (1), 115-122.
- Homer-Vanniasinkam, S., Crinnion, J.N., Gough, M.J., 1997, Post-ischaemic organ dysfunction, *European journal of vascular and endovascular surgery*, 14 (3), 195-203.
- Huang, G.N., Zeng, W., Kim, J.Y., Yuan, J.P., Han, L., Muallem, S., Worley, P.F., 2006, STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels, *Nature cell biology*, 8 (9), 1003-1010.
- Hulot, J.S., Fauconnier, J., Ramanujam, D., Chaanine, A., Aubart, F., Sassi, Y., Merkle, S., Cazorla, O., Ouille, A., Dupuis, M., Hadri, L., Jeong, D., Mühlstedt, S., Schmitt, J., Braun, A., Benard, L., Saliba, Y., Laggerbauer, B., Nieswandt, B., Lacampagne, A., Hajjar, R.J., Lompre, A.M., Engelhardt, S., 2011, Critical role for stromal interaction molecule 1 in cardiac hypertrophy, *Circulation*, 124 (7), 796-805.
- Islam, M.S., 2011, Transient receptor potential channels, advances in experimental medicine and biology, Springer, Berlin, ISBN: 978-94-007-0265-3.
- Jeffs, G.J., Meloni, B.P., Bakker, A.J., Knuckey, N.W., 2007, The role of the Na(+)/Ca(2+) exchanger (NCX) in neurons following ischaemia, *Journal of clinical neuroscience*, 14 (6), 507-514.
- Jennings, R.B. and Ganote, C.E., 1976, Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury, *Circulation research*, 38 (1), I80-91.
- Jennings, R.B. and Reimer, K.A., 1991, The cell biology of acute myocardial ischemia, *Annual review of medicine*, 42, 225-246.
- Ju, Y.K., Lee, B.H., Trajanovska, S., Hao, G., Allen, D.G., Lei, M., Cannell, M.B., 2015, The involvement of TRPC3 channels in sinoatrial arrhythmias, *Frontiers in psychology*, 6 (86), 1-16.
- Jung, H.J., Kim, P.I., Lee, S.K., Lee, C.W., Eu, Y.J., Lee, D.G., Earm, Y.E., Kim, J.I., 2006, Lipid membrane interaction and antimicrobial activity of GsMTx-4, an inhibitor of mechanosensitive channel, *Biochemical and biophysical research communications*, 340 (2), 633-638.
- Jungnickel, M.K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J.R., Florman, H.M., 2001, Trp2 regulates entry of Ca⁺² into mouse sperm triggered by egg ZP3, *Nature cell biology*, 3, 499-502.

- Kalasz, J., Pasztor, E.T., Fagyas, M., Balogh, A., Toth, A., Csato, V., Edes, I., Papp, Z., Borbely, A., 2015, Myeloperoxidase impairs the contractile functions in isolated human cardiomyocytes, *Free radical biology medicine*, 84, 116-127.
- Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M., Korthuis, R.J., 2012, Cell biology of ischemia/reperfusion injury, *International review of cell and molecular biology*, 298, 229-317.
- Kang, P.M. and Izumo, S., 2003, Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases, *Trends of molecular medicine*, 9 (4), 177-182.
- Katz, B. and Minke, B., 2009, Drosophila photoreceptors and signaling mechanisms, *Frontiers in cellular neuroscience*, 3: 2.
- Kemp, M., Donovan, J., Higham, H., Hooper, J., 2004, Biochemical markers of myocardial injury, *British journal of anaesthesia*, 93 (1), 63-73.
- Kılıç, A., 2016. İzole sıçan kalbinde iskemi/reperfüzyon hasarında angiotensin tip I ve angiotensin tip II reseptör blokajının rolü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kinoshita, H., Kuwahara, K., Nishida, M., Jian, Z., Rong, X., Kiyonaka, S., Kuwabara, Y., Kurose, H., Inoue, R., Mori, Y., Li, Y., Nakagawa, Y., Usami, S., Fujiwara, M., Yamada, Y., Minami, T., Ueshima, K., Nakao, K., 2010, Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart, *Circulation research*, 106, 1849-1860.
- Kiyonaka, S., Kato, K., Nishida, M., Mio, K., Numaga, T., Sawaguchi, Y., Yoshida, T., Wakamori, M., Mori, E., Numata, T., Ishii, M., Takemoto, H., Ojida, A., Watanabe, K., Uemura, A., Kurose, H., Morii, T., Kobayashi, T., Sato, Y., Sato, C., Hamachi, I., Mori, Y., 2009, Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 106 (13), 5400-5405.
- Kloner, R.A. and Jennings, R.B., 2001, Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2, *Circulation*, 104 (25), 3158-3167.
- Kloner, R.A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., Braunwald, E., 1998, Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning, *Circulations*, 97 (18), 1848-1867.
- Koitabashi, N., Aiba, T., Hesketh, G.G., Rowell, J., Zhang, M., Takimoto, E., Tomaselli, G.F., Kass, D.A., 2010, Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation novel mechanism of

cardiac stress modulation by PDE5 inhibition, *The journal of molecular and cellular cardiology*, 48 (4), 713-724.

- Ku, D.D., 1982, Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia, *Science*, 218 (4572), 576-578.
- Li, T.T., Zhang, Y.S., He, L., Liu, B., Shi, R.Z., Zhang, G.G., Peng, J., 2012, Inhibition of vascular peroxidase alleviates cardiac dysfunction and apoptosis induced by ischemia-reperfusion, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 90 (7), 851-862.
- Liao, Y., Erxleben, C., Abramowitz, J., Flockerzi, V., Zhu, M.X., Armstrong, D.L., Birnbaumer, L., 2008, Functional interactions among Orai1, TRPCs and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 105 (8), 2895-2900.
- Liu, D., Yang, D., He, H., Chen, X., Cao, T., Feng, X., Ma, L., Luo, Z., Wang, L., Yan, Z., Zhu, Z., Tepel, M., 2009, Increased transient receptor potential canonical type 3 channels in vasculature from hypertensive rats, *Hypertension*, 53 (1), 70-76.
- Luan, J., Li, W., Han, J., Zhang, W., Gong, H., Ma, R., 2012, Renal protection of in vivo administration of tempol in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of pharmacological science*, 119 (2), 167-176.
- Lucchesi, B.R., 1990, Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury, *Annual review of physiology*, 52, 561-576.
- Makarewich, C.A., Zhang, H., Davis, J., Correll, R.N., Trappanese, D.M., Hoffman, N.E., Troupes, C.D., Berretta, R.M., Kubo, H., Madesh, M., Chen, X., Gao, E., Molkentin, J.D., Houser, S.R., 2014, Transient receptor potential channels contribute to pathological structural and functional remodeling after myocardial infarction, *Circulation research*, 15 (6), 567-580.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B., Hamill, O.P., 2005, TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells, *Natural cell biology*, 7 (2), 179-185.
- Martinac, B., 2004, Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction, *Journal of cell science*, 117 (Pt 12), 2449-2460.
- Mascari, A., Seven, S., De Nes, M., L'abbate, A., Chierchia, S., Marzilli, M., Ballestra, A.M., Parodi, O., Biagini, A., and Distant, A., 1978, Variant angina: one aspect of a continuous spectrum of vasospastic myocardial ischemia. pathogenetic mechanisms, estimated incidence and clinical and coronary arteriography finding in 138 patients, *American journal of physiology*, 42 (6), 1019-1035.

- McFadzean, I. and Gibson, A., 2002, The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle, *British journal of pharmacology*, 135 (1), 1-13.
- Mendis, S., Puska, P., Norrving, B., 2011, Cardiovascular diseases (CVDs) due to atherosclerosis, global Atlas on cardiovascular disease prevention and control, world health organization in collaboration with the world heart federation and the world stroke organization, Geneva, ISBN: 9789241564373.
- Monsinjon, T., Richard, V., Fontaine, M., 2001, Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement, *Fundamental and clinical pharmacology*, 15 (5), 293-306.
- Montero, M., Alonso, M.T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A.G., Garcia-Sancho, J., Alvarez, J., 2000, Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion, *Nature cell biology*, 2 (2), 57-61.
- Naeini, R.S., Folgering, J.H., Bichet, D., Duprat, F., Delmas, P., Patel, A., Honore, E., 2010, Sensing pressure in the cardiovascular system: Gq-coupled mechanoreceptors and TRP channels, *Journal of molecular cellular cardiology*, 48 (1), 83-89.
- Nilius, B., 2004, Store-operated Ca^{+2} entry channels: still elusive, *Science signaling*, 2004 (243), 36.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., Peters, J.A., 2007, Transient receptor potential cation channels in disease, *Physiological reviews*, 87 (1), 165-217.
- Nishida, M. and Kurose, H., 2008, Roles of TRP channels in the development of cardiac hypertrophy, *Naunyn-schmiedeberg's archives of pharmacology*, 378 (4), 395-406.
- Nishida, M., Watanabe, K., Sato, Y., Nakaya, M., Kitajima, N., Ide, T., Inoue, R., Kurose, H., 2010, Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition, *The journal of biological chemistry*, 285 (17), 13244-13253.
- Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima, T., Ito, H., 2007, Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42 (3), 498-507.
- Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., Kurose, H., 2006, TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, *The EMBO journal*, 25 (22), 5305-5316.
- Orrenius, S., Burkitt, M.J., Kass, G.E., Dypbukt, J.M., Nicotera, P., 1992, Calcium ions and oxidative cell injury, *Annual neurology*, 32, 33-42.

- Otsuguro, K., Tang, J., Tang, Y., Xiao, R., Freichel, M., Tsvilovskyy, V., Ito, S., Flockerzi, V., Zhu, M.X., Zholos, A.V., 2008, Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate, *The journal of biological chemistry*, 283 (15), 10026-10036.
- Ozeren, M., Sucu, N., Tamer, L., Aytacoglu, B., Bayri, O., Döndaş, A., Ayaz, L., Dikmengil, M., 2005, Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) supplemented St. Thomas' hospital cardioplegic solution improves the antioxidant defense system of rat myocardium during ischemia-reperfusion injury, *Pharmacological research*, 52 (3), 258-263.
- Parekh, A.B. and Putney, J.W., 2005, Store-operated calcium channels, *American physiological society physiological reviews*, 85 (2), 757-810.
- Piper, H.M., Meuter, K., Schafer, C., 2003, Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury, *Annual of thoracic surgery*, 75 (2), 644-648.
- Putney, J.W., Broad, L.M., Braun, F.J., Lievreumont, J.P., Bird, G.J., 2001, Mechanisms of capacitative calcium entry, *Journal of cell science*, 114, 2223-2229.
- Putney, J.W.Jr., 1986, A model for receptor-regulated calcium entry, *Cell calcium*, 7 (1), 1-12.
- Putney, J.W.Jr., 2007, Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitative calcium entry, *Cell calcium*, 42 (2), 103-110.
- Radmanesh, E., Dianat, M., Badavi, M., Goudarzi, G., Mard, S.A., 2017, The cardioprotective effect of vanillic acid on hemodynamic parameters, malondialdehyde, and infarct size in ischemiareperfusion isolated rat heart exposed to PM10, *Iran Journal basic medicine science*, 20 (7), 760-768.
- Randhawa, P.K. and Jaggi, A.S., 2016, Gadolinium and ruthenium red attenuate remote hind limb preconditioning-induced cardioprotection: possible role of TRP and especially TRPV, *Naunyn-schmiedeberg's archives of pharmacology*, 389 (8), 887-896.
- Rosado, J.A., 2006, Discovering the mechanism of capacitative calcium entry, *American journal of physiology-cell physiology*, 291 (6), 1104-1106.
- Rossello, X., Hall, A.R., Bell, R.M., Yellon, D.M., 2016, Characterization of the langendorff perfused isolated mouse heart model of global ischemia-reperfusion injury: impact of ischemia and reperfusion length on infarct size and LDH release, *Journal of cardiovascular therapy*, 21 (3), 286-295.
- Rowell, J., Koitabashi, N., Kass, D.A., 2010, TRP-ing up heart and vessels: canonical transient receptor potential channels and cardiovascular disease, *Journal of cardiovascular translational research*, 3 (5), 516-524.

- Sabourin, J., Antigny, F., Robin, E., Frieden, M., Raddatz, E., 2012, Activation of transient receptor potential canonical 3 (TRPC3)-mediated Ca^{+2} entry by A1 adenosine receptor in cardiomyocytes disturbs atrioventricular conduction, *The journal of biological chemistry*, 287 (32), 26688-26701.
- Sabourin, J., Bartoli, F., Antigny, F., Gomez, A.M., Benitah, J.P., 2016, Transient receptor potential canonical (TRPC)/Orai1-dependent store-operated Ca^{2+} channels: new targets of aldosterone in cardiomyocytes, *The journal of biological chemistry*, 291 (25), 13394-13409.
- Sabourin, J., Robin, E., Raddatz, E., 2011, A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart, *Cardiovascular research*, 92 (2), 226-236.
- Segal, B.L., 1962, The pathology of coronary heart disease, *Canadian medical association journal*, 87 (26), 1387-1390.
- Shan, D., Marchase, R.B., Chatham, J.C., 2008, Overexpression of TRPC3 increases apoptosis but not necrosis in response to ischemia-reperfusion in adult mouse cardiomyocytes, *American journal of physiology-cell physiology*, 294 (3), 833-841.
- Shine, K.I. and Douglas, A.M., 1983, Low calcium reperfusion of ischemic myocardium, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 15 (4), 251-260.
- Singal, P.K., Khaper, N., Palace, V., Kumar, D., 1998, The role of oxidative stress in the genesis of heart disease, *Cardiovascular research*, 40 (3), 426-432.
- Singh, B.B., Lockwich, T.P., Bandyopadhyay, B.C., Liu, X., Bollimuntha, S., Brazer, S.C., Combs, C., Das, S., Leenders, A.G., Sheng, Z.H., Knepper, M.A., Ambudkar, S.V., Ambudkar, I.S., 2004, VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated Ca^{+2} influx, *Molecular cell biology*, 15 (4), 635-646.
- Spassova, M.A., Soboloff, J., He, L.P., Xu, W., Dziadek, M.A., Gill, D.L., 2006, STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{+2} channels, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 103 (11), 4040-4045.
- Spivack, C., Ocken, S., Frishman, W.H., 1983, Calcium antagonists, *Drugs*, 25 (2), 154-177.
- Suchyna, T.M., Tape, S.E., Koeppe, R.E., Andersen, O.S., Sachs, F., Gottlieb, P.A., 2004, Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers, *Nature*, 430 (6996), 235-240.
- Takeo, S. and Nasa, Y., 1999, Role of energy metabolism in the preconditioned heart a possible contribution of mitochondria, *Cardiovascular research*, 43 (1), 32-43.

- Tani, M. and Neely, J.R., 1989, Role of intracellular Na^+ in Ca^{+2} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H^+ - Na^+ and Na^+ - Ca^{+2} exchange, *Circulation research*, 65 (4), 1045-1056.
- Tian, X.H., Liu, C.L., Jiang, H.L., Zhang, Y., Han, J.C., Liu, J., Chen, M., 2016, Cardioprotection provided by Echinatin against ischemia/reperfusion in isolated rat hearts, *BMC Cardiovascular disorders*, 16, 119.
- Wang, P., Umeda, P.K., Sharifov, O.F., Halloran, B.A., Tabengwa, E., Grenett, H.E., Urthaler, F., Wolkowicz, P.E., 2012, Evidence that 2-aminoethoxydiphenyl borate provokes fibrillation in perfused rat hearts via voltage-independent calcium channels, *European journal of pharmacology*, 681 (1-3), 60-67.
- Wang, S.Q., Lakatta, E.G., Cheng, H., Zhou, Z.Q., 2002, Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators, *The journal of experimental biology*, 205 (Pt 19): 2957-2962.
- Ward, M.L., Williams, I.A., Chu, W.Y., Cooper, P.J., Ju, Y.K., Allen, D.G., 2008, Stretch-activated channels in the heart: Contributions to length-dependence and to cardiomyopathy, *Progress in biophysics and molecular biology*, 97 (2-3), 232-249.
- Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Takahashi, Y., Ito, H., 2008, TRP channel and cardiovascular disease, *Pharmacology and therapeutics*, 118 (3), 337-351.
- Wilhelm, J., 1990, Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation, *Acta universitatis carolinae medica monographia*, 137, 1-53.
- Wilkins, B.J. and Molkentin, J.D., 2004, Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy, *Biochemical and biophysical research communications*, 322 (4), 1178-1191.
- Wolkowicz, P.E., Huang, J., Umeda, P.K., Sharifov, O.F., Tabengwa, E., Halloran, B.A., Urthaler, F., Grenett, H.E., 2011, Pharmacological evidence for Orai channel activation as a source of cardiac abnormal automaticity, *European journal of pharmacology*, 668 (1-2), 208-216.
- Woodcock, E.A. and Matkovich, S.J., 2005, Ins(1,4,5)P3 receptors and inositol phosphates in the heart-evolutionary artifacts or active signal transducers?, *Pharmacology and therapeutics*, 107 (2), 240-251.
- Wu, X., Eder, P., Chang, B., Molkentin, J.D., 2010, TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy, *Proceedings of the national academy of sciences*, 107 (15), 7000-7005.

- Yuan, J.P., Zeng, W., Huang, G.N., Worley, P.F., Muallem, S., 2007, STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels, *Nature cell biology*, 9 (6), 636-645.
- Zamponi, G.W., 2005, Distribution and targeting mechanisms of voltage activated Ca^{+2} channels, voltage gated calcium channels, Landes bioscience&Kluwer academic, U.S.A., ISBN: 0-306-47840-4.
- Zelis, R. and Flaim, S.F., 1981, Calcium influx blockers and vascular smooth muscle: do we really understand the mechanism? *Annals of internal medicine*, 94 (1), 124-126.
- Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A., Cahalan, M.D., 2005, STIM1 is a Ca^{+2} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{+2} store to the plasma membrane, *Nature*, 437 (7060), 902-905.
- Zhang, T., Luo, X.J., Sai, W.B., Yu, M.F., Li, W.E., Ma, Y.F., Chen, W., Zhai, K., Qin, G., Guo, D., Zheng, Y.M., Wang, Y.X., Shen, J. H., Ji, G., Liu, Q.H., 2014, Non-selective cation channels mediate chloroquine-induced relaxation in precontracted mouse airway smooth muscle, *Plos one*, 9 (7), 101578.
- Zhang, Z.B., Ruan, C.C., Chen, D.R., Zhang, K., Yan, C., Gao, P.J., 2016, Activating transcription factor 3 SUMOylation is involved in angiotensin II-induced endothelial cell inflammation and dysfunction, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 92, 149-157.
- Zimmerman, A.N.E., Daems, W., Hülsmann, W.C., Snijder, J., Wisse, E., Durrer, D., 1967, Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium-containing solutions (calcium paradox), *Cardiovascular research*, 1 (3), 201-209.
- Zimmerman, B.J. and Granger, D.N., 1992, Reperfusion injury, *Surgical clinics of north america*, 72 (1), 65-83.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Karar Metni

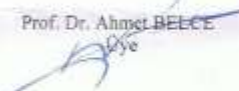



**T.C.
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ**

SAYI: 2014/ 171 21.11.2014
KONU: Sn. Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL

Sayın Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL,

Başlığı "İzole Sıçan Kalbinde İskemi/Reperfüzyon Hasarında TRPC Kanallarının Rolü" olan projeniz 21.11.2014 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Yrd. Doç. Dr. Fahri AKBAŞ Etik Kurul Başkan Vek. 	Prof. Dr. Ahmet BELCE Üye 	Prof. Dr. Erhan AYŞAN Üye 
Prof. Dr. İsmail MERAL Üye KATILMADI	Prof. Dr. Serdar UŞCMEZ Üye 	Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL Üye 
Vet. Hek. Mert ÇELİK TEN 	Nasuhi GÜNAY Üye 	Hakan AKTÜRK Üye 

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje, çalışma başlamadan 3 ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek üzere Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Cansu USTA
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	16.10.1991
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	+90 535 353 90 26
E-Posta Adresi	ustacns@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	15.06.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Zooloji Programı
Mezuniyet Tarihi	31.01.2018

Makale ve Bildiriler	
- İsmail Meral, Cihan Demirci-Tansel, Ebru Gürel-Gürevin, Elif İlkay Armutak, Mehmet Üyükü, Savaş Üstünova, Aysu Kılıç, Cansu Usta. İzole Sıçan Kalbinde İskemi/Reperfüzyon Hasarında TRPC Kanallarının Rolü. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Normal Proje, Proje No: 6.2016/8, Ekim 2016-Devam ediyor (Araştırmacı). - Savaş Üstünova, İsmail Meral, Cihan Demirci-Tansel, Ebru Gürel-Gürevin, Elif İlkay Armutak, Mehmet Üyükü, Cansu Usta, Aysu Kılıç. İzole sıçan Kalbinde İskemi/Reperfüzyon Hasarında Angiotensin Tip1 ve Tip2 Reseptör Blokajının Rolü. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Normal Proje, Proje No: 6.2016/9, Ekim 2016-Devam ediyor (Araştırmacı).	