



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE KİMYASAL OLARAK OLUŞTURULAN KALP
HİPERTROFİSİNİN HİSTOLOJİK VE ELEKTROKARDİYOGRAFİK
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hazırlayan: Merve TEMEL
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK

MANİSA-2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE KİMYASAL OLARAK OLUŞTURULAN KALP
HİPERTROFİSİNİN HİSTOLOJİK VE ELEKTROKARDİYOĞRAFİK
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hazırlayan: Merve TEMEL
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK	(Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Necip KUTLU	(Üye)
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ	(Üye)
Prof. Dr. Berkant Muammer KAYATEKİN	(Üye)
Prof. Dr. Nuran EKERBİÇER	(Üye)

Manisa-2022

I. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından, veri toplanması ve yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Merve TEMEL



II. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden en verimli şekilde yararlandığım, sonsuz desteğini, sabrını, rehberliğini, hiçbir zaman esirgemeyen, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK'e,

Doktora eğitimim boyunca bilgisini ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, değerli hocam Prof. Dr. Necip KUTLU'ya, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini aktaran değerli hocam Prof. Dr. Nuran EKERBİÇER'e,

Yüksek lisans eğitiminden bu yana her konuda büyük katkıları bulunan, yol gösteren tavrıyla yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, manevi desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e,

Çalışmamın deney aşamasında yanımda olan ve bilgisini, tecrübesini cömertlikle aktaran ağabeyim Öğr. Gör. Dr. H. Fehmi ÖZEL'e,

Tanıdığım günden bu yana tüm üzüntü ve sevinçlerimi paylaştığım, dosttan öte kardeş gibi olduğum tezimin deney aşamasında dahi yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen canım arkadaşım Dr. Öğretim Üyesi Pınar KILIÇASLAN SÖNMEZ'e,

Sevgi, dostluklarını her zaman hissettiğim arkadaşlarım Arş. Gör. Şüheda ALPAY ve Arş. Gör. Beste MENTEŞE ile fizyoloji bölümündeki tüm arkadaşlarıma,

Her zaman hayır duasını üzerimde hissettiğim, bugünü görmesini çok istediğim, beni izlediğinden emin olduğum canım Anneanneme,

Hayatıma girdiğinden bu yana varlığını ve desteğini her zaman hissettiren ve yanımda olan sevgili eşim Orhan ÖZDEN'e,

Hayat yolunda attığım her adımda yanımda olan, varlıklarından gurur duyduğum, bugün gelmiş olduğum noktayı sağlayan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, beni sevgi ile büyütüp yetiştiren canımdan öte çok sevdiğim Annem, Babam ve Canım kardeşime,

Bu tezin desteklenmesini sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

III. KISALTMALAR VE SİMGELER

5-HT	: 5-hidroksitriptamin (Serotonin)
5-HT2B	: 5-hidroksitriptamin 2B (Serotonin reseptörü)
ANG II	: Anjiyotensin II
ANP	: Atrial Natriüretik Peptit
APD	: Aksiyon Potansiyeli Süresi
AP	: Aksiyon Potansiyeli
AV	: Atrioventriküler Kapaklar
BNP	: Beyin Natriüretik Peptit
BW	: Vücut Ağırlığı
β-AR	: Beta Adrenerjik
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
DAB	: Diamino Benzidin
EC-hücreleri	: Enterokromafin Hücreleri
ECM	: Hücre Dışı Matris
EKG	: Elektrokardiyografi (Elektrokardiyogram)
FAO	: Yağ Asidi Oksidasyonu
fVCG	: Frontal Vektörkardiyografi (Vektörkardiyogram)
GABA	: Gama Aminobütirik Asit
GDP	: Guanozin Difosfat
GPCR	: G Protein-Bağlı Reseptör
HW	: Kalp Ağırlığı
ISO	: Isoproterenol Hidroklorid
İP	: İntraperitoneal
KY	: Konjestif Kalp Yetmezliği
LAD	: Koroner Arter Ligasyonu
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
mRNA	: Mesajcı RNA
NP	: Natriüretik Peptit
PBS	: Fosfat Tamponlu Çözelti
PI3K	: Fosfoinositol 3-Kinaz
PKA	: Protein Kinaz A
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri

SA	: Sinoatrial Düğüm
SC	: Subkutan
SERCA	: Sarkoplazmik Retikulum Ca^{+2} ATPaz
SERT	: Serotonin transportu
SSRI	: Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörleri
TPH	: Triptofanhidroksilaz
Tph1	: Triptofanhidroksilaz1
Tph2	: Triptofanhidroksilaz2
VCG	: Vektörkardiyografi (Vektörkardiyogram)
VT	: Ventriküler Taşikardi



IV. İÇİNDEKİLER

I. BEYAN.....	i
II. TEŞEKKÜR	i
III. KISALTMALAR VE SİMGELER.....	ii
IV. İÇİNDEKİLER	iv
V. ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	1
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. KARDİYOYASKÜLER SİSTEME GENEL BAKIŞ	6
4.2. KALP HÜCRELERİNDE AKSİYON POTANSİYELLERİ VE İYON AKIMLARI	7
4.2.1. Miyokard Hücresi Aksiyon Potansiyeli	8
4.2.2. Nodal Hücre (Pace-maker) Aksiyon Potansiyelleri.....	11
4.3. ELEKTROKARDİYOĞRAFI (EKG).....	12
4.4. İNSAN VE FARE ELEKTROKARDİYOĞRAFISI	14
4.5. VEKTÖRKARDİYOĞRAFI (VCG)	16
4.6. SEROTONİN (5-HİDROKSİTRİPTAMİN, 5- HT).....	18
4.6.1. Kalpteki 5HT'nin Kaynağı ve Sentezlenmesi	19
4.6.2. Kardiyovasküler Sistemde Serotonin Etkileri	20
4.6.3. Kardiyovasküler Sistemde 5 HT Reseptörleri	21
4.6.3.1. 5-HT1 Reseptör Grubu.....	21
4.6.3.2. 5-HT2 Reseptör Grubu.....	22
4.6.3.3. 5-HT3 Reseptörü: Ligand Kapılı Bir İyon Kanalı	23
4.6.3.4. 5-HT4 Reseptörü.....	23
4.6.3.6. 5-HT7 Reseptörü.....	23

4.7. ISOPROTERENOL ve BETA ADRENERJİK AKTİVASYON	23
4.8. KARDİYAK HİPERTROFİ.....	24
4.8.1. Hücresel Düzeyde Kardiyak Hipertrofi	25
4.8.2. Kardiyak Hipertrofinin Sınıflandırılması.....	26
4.8.2.1. Fizyolojik ve Patolojik Hipertrofi	26
4.8.2.2. Konsantrik ve Eksantrik Hipertrofi	27
4.8.3. Kardiyak Hipertrofi Belirteçleri (ANP ve BNP)	29
5. GEREÇ VE YÖNTEM	31
5.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ	31
5.2. ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI YER ve SÜRESİ.....	31
5.3. ARAŞTIRMANIN EVRENİ ve ÖRNEKLEMİ	31
5.3.1. Deneyisel Kardiyak Hipertrofi Modelinin Oluşturulması	32
5.3.2. Çalışma Grupları.....	32
5.4. ARAŞTIRMA SORULARI veya ARAŞTIRMA HİPOTEZLERİ.....	34
5.5. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI	34
5.6 VERİ TOPLAMA YÖNTEMİ.....	35
5.6.1. EKG Kaydı	35
5.7.2. Fare Vektörkardiyografi Yöntemi	36
5.7.3. Dokuların Histokimya Ve İmmünohistokimya İçin Hazırlanması	37
5.7.3.1. Parafin Takip Protokolü	37
5.7.3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi.....	38
5.7.3.4. İndirekt İmmünoperoksidaz Boyama Yöntemi.	39
5.7.3.5. Masson Trikrom Boyama Yöntemi.....	42
5.8 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	43
5.9 ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI	44
5.10 ARAŞTIRMANIN ETİK YÖNÜ.....	44
6. BULGULAR.....	45

6.1. ELEKTROKARDİYOĞRAFİK BULGULAR.....	45
6.1.1. VCG Değerlendirmelerinde Kalp Aksı Değişimleri.....	45
6.1.2. Kalp Ağırlığı / Vücut Ağırlığı Oranı	47
6.2. HİSTOKİMYASAL BULGULAR	52
6.2.1. Histokimyasal Değerlendirme	52
6.2.2. Masson Trikrom Boyaması Değerlendirilmesi.....	55
6.2.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	58
6.2.3.1. ANP immünoreaktivitesi.....	58
6.2.3.2. BNP İmmünoreaktivitesi.....	61
6.3. BULGULARIN KANTİTATİF KARŞILAŞTIRILMASI	65
7. TARTIŞMA	67
8. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	72
9. KAYNAKLAR	73
10. EKLER.....	83
EK-1 ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARI	83
EK-2. ETİK KURUL ONAYI.....	84
EK-3. TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	85
11. ÖZGEÇMİŞ	86

V. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kalbin Anatomisi.....	6
Şekil 2. Ventrikül kas hücresi aksiyon potansiyeli (üstte) ve bu sırada oluşan K, Na, Ca iyon akımlarına karşı geçirgenlikler “PK, PNa, PCa” değişiyor (altta).	9
Şekil 3. Sinoatriyal (SA) düğüm aksiyon potansiyeli ve “F” kanallarının açık olduğu zaman dilimleri.....	12
Şekil 4. “Bipolar” ekstremite derivasyonlarının (DI, DII, ve DIII) oluşturduğu Einthoven üçgeni (üstte). “Bipolar” (DI, DII, ve DIII) ve “Unipolar” ekstremite derivasyonları (aVR, aVL, ve aVF) elektrod pozisyonları (altta).....	13
Şekil 5. İnsanda yüzey EKG'si ve bir ventriküler miyositinden elde edilen aksiyon potansiyeli eş zamanlı kaydı. 0, 1, 2, 3, 4: Aksiyon potansiyeli fazları, APD: Aksiyon potansiyeli süresi.	14
Şekil 6. İnsan ve Farenin Temsili Yüzey Elektrokardiyografisi (EKG) Eğrileri.....	16
Şekil 7: Bağırsaktaki enterokromafin hücrelerinden (EC-hücreleri) Tph1'i eksprese ederek serotoninin (5-HT) çoğunu sentezler.	20
Şekil 8 : Kardiyak hipertrofi sürecinde meydana gelen olaylar.	28
Şekil 9. Deney protokolünün şematik gösterimi.	32
Şekil 10. Farede frontal plan Vektörkardiyografi amacıyla kullanılan modifiye EINTHOVEN üçgeni (RA: Sağ kol, LA: Sol kol, LF: Sol bacak).	36
Şekil 11. A: SFSF grubundan örnek bir R derivasyonu (sağ taraf) ve ona ait fVCG (sol taraf), B: SERSF grubundan örnek bir R derivasyonu (sağ taraf) ve ona ait fVCG (sol taraf).	45
Şekil 12. “R” derivasyonu kullanılarak EKG intervallerinin ölçülmesi, R derivasyonu kaydı mavi, DII derivasyonu kırmızı renkle ile yapılmıştır. A: SERISO grubundan temsili bir örnek, B: ISOSF grubundan temsili bir örnek.	49
Şekil 13. Tüm gruplarda kalp dokusunun Masson trikrom boyaması sonrasında fibrotik alanın yüzde olarak gösterimi. Veriler, “ortalama $\pm$ standart sapma” şeklinde gösterilmiştir.	58
Şekil 14. ANP H-Skor İmmünoreaktivite sonuçlarının gösterimi. Veriler, “ortalama $\pm$ standart sapma” şeklinde gösterilmiştir.	61
Şekil 15. BNP H-Skor immünoreaktivite sonuçlarının gösterilmesi. Veriler, “ortalama $\pm$ standart sapma” şeklinde gösterilmiştir.	64

Şekil 16. Tüm gruplarda bulunan rakamsal değerlerin “relatif” değerlere indirgenerek karşılaştırılması: “1.00” değeri %100 değerine denk gelmektedir, diğer değerler relatif değişimi göstermektedir. 65



VI. RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Çalışmamızda kullandığımız erkek farelerin ayrı ayrı kafeslerde barınmaları.	31
Resim 2. İntraperitoneal olarak kimyasal / ilaç uygulaması.....	34
Resim 3. EKG kaydı için elektrotların konumları (sol) ve Bilgisayarlı EKG kayıt sistemi (sağ).	35
Resim 4. Farelerde miyokard dokusunun histolojik incelemesi. SFSF (A, B), ISOSF (C, D), SERSF (E, F), SERISO (G, H) , Deney Gruplarının Hematoksilen Eozin (H&E) mikroskopik boyama görüntüleri.	54
Resim 5. Miyokardiyal fibrozisin histolojik değerlendirmesi. SFSF (A, B), ISOSF (C, D), SERSF (E, F), SERISO (G, H) . Deney Gruplarının kalp dokularından elde edilen kesitler miyokardiyal fibrozisi değerlendirmek için Masson trikrom ile boyandı. (mavi doku rengi kollajen birikimini gösterir).	56
Resim 6. ANP immünoreaktivitesinin SFSF (A,B), ISOSF (C,D), SERSF (E,F), SERISO (G,H) gruplarındaki dağılımları.	59
Resim 7. BNP immünoreaktivitesinin SFSF (A,B), ISOSF (C,D), SERSF (E,F), SERISO (G,H) , gruplarındaki dağılımları.	62

VII. TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Parafin Takip Protokolü.	38
Tablo 2. Hematoksilen –Eozin Boyama Protokolü.	39
Tablo 3. İndirekt İmmünoperoksidaz Boyama Protokolü.	41
Tablo 4. Masson Trikrom Boyama Protokolü.	43
Tablo 5. Tüm Gruplardaki fVCG deki ventriküler depolarizasyon başlangıç aks (Ri) ve final aks (Rf) değerleri.	46
Tablo 6. Ventriküler depolarizasyonun final kısmında ölçülen ‘Rf’ değerlerinin gruplar arasında istatistiksel karşılaştırmaları.	47
Tablo 7. Tüm Gruplarda “Kalp Ağırlığı / Vücut Ağırlığı” Oranı.	48
Tablo 8. “Kalp Ağırlığı / Vücut Ağırlığı” Değerlerinin Gruplar Arasında İkili Karşılaştırmaları.	48
Tablo 9. R derivasyonunda EKG sürelerinin veya intervallerin değerlendirilmesi.	50
Tablo 10. SFSF Grubu Elektrokardiyografik, kalp aksı ve kalp indeksi verileri.	51
Tablo 11. ISOSF Grubu Elektrokardiyografik, kalp aksı ve kalp indeksi verileri	51
Tablo 12. SERSF Grubu Elektrokardiyografik, kalp aksı ve kalp indeksi verileri ...	52
Tablo 13. SERISO Grubu Elektrokardiyografik, kalp aksı ve kalp indeksi verileri .	52
Tablo 14. Tüm gruplarda Masson trikrom boyaması sonrasında oluşan fibroz bölgenin yüzde alan olarak değerlendirilmesi.....	57
Tablo 15. ANP İmmünoreaktivitesin H-Skor Değerlendirmesi.	60
Tablo 16. BNP İmmünoreaktivitesi H-Skor değerlendirilmesi.	63

Tezin Başlığı: Farelerde Kimyasal Olarak Oluşturulan Kalp Hipertrofisinin Histolojik ve Elektrokardiyografik Olarak Değerlendirilmesi

Öğrencinin Adı : Merve TEMEL

Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK

Anabilim Dalı : Fiziyojji Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Çalışmada birincil olarak Farelerde Isoproterenol ile kardiyak hipertrofi modeli oluşturulması amaçlanmıştır. Ve bu modelde ‘5-HT2B’ serotonin reseptör antagonistinin miyokardiyal hipertrofi ve/veya fibrosisten koruyucu etkisi olup olmadığı vektörkardiyografik ve histolojik yöntemler ile değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Balb-C farelerine 15 gün boyunca verilen (SF, sc), isoproterenol (ISO, 30 mg/kg/g, sc), ve 5-HT2B antagonisti (SER, 5 mg/kg/g, ip)’ ilaçlarının ikili kombinasyonlarıyla dört grup oluşturuldu: i. SF+SF (kontrol grubu: SFSF), ii. ISO+SF (ISOSF), iii. SER+ISO (SERISO), iv. SER+SF (SERSF). 16. günde Thiopental-Na anestezisi (50 mg/kg, ip) altında DII. DIII derivasyonları sayısal EKG kayıtları yapıldı. Frontal vektörkardiyografi (fVCG) değerlendirildi. Ventriküler depolarizasyonun başlangıç ve son kısmında kalp aksları ölçüldü (Ri ve Rf). ‘Kalp ağırlığı/vücut ağırlığı’ oranı ile kardiyak hipertrofi ölçüldü ve aşağıdaki histokimyasal boyamalar yapıldı: i. Masson trikrom, ii. HE, ve iii. Anti-ANP Anti-BNP natriüretik peptit reseptör antikorlarında içeren İmmünohistokimyasal yöntemler.

Bulgular: Ri değerinde bir sapma olmazken, ISOSF ve SERISO gruplarında Rf değeri bazı farelerde daha büyük bulunmuştur. EKG interval ölçümlerinde gruplarda herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Isoproterenol alan ISOSF ve SERISO gruplarında JT segmentide bazı farelerde yükselmiştir ve ‘kalp ağırlığı/vücut ağırlığı’ oranında belirgin bir şekilde artmıştır. ISOSF de yoğun SERISO grubunda ise az yoğun fibrozis görüldü. Buna paralel olarak Anti-ANP ve Anti-BNP immünoreaktiviteleri anlamlı derecede azaldı.

Sonuçlar: Isoproterenol alan farelerde JT yükselmesi, histolojik ve immünohistolojik olarak yapılan değerlendirmelerdeki fibrozis ve hipertrofi bulguları ile uyumludur. Serotonin reseptör antagonisti ‘5-HT2B’ nin uygulandığı gruplarda bu etkilerin azalması fibrozisin ve hipertrofinin bloke edilmesini işaret etmektedir. ‘5-HT2B’ etkisi ile ANP ve BNP reseptörlerinin aktiviteleri baskılanmış görünmektedir.

Anahtar kelimeler: Fare, Elektrokardiyografi, Vektörkardiyografi, Isoproterenol, 5-HT2B, Kardiyak hipertrofi.



Title: Histological and Electrocardiographic Assesment of Chemically Induced Heart Hypertrophy in Mice

Student Name : Merve TEMEL

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK

Department : Physiology Department

2. ABSTRACT

Aim: In the study, it was primarily aimed to create a cardiac hypertrophy model with Isoproterenol in mice. In this model, whether the '5-HT2B' serotonin receptor antagonist has a protective effect against myocardial hypertrophy and/or fibrosis was evaluated by vectorcardiographic and histological methods.

Material and Methods: Four groups of Balb-C mice were formed, each receiving two of following drugs, saline (SF, sc), isoproterenol (ISO, 30 mg/kg/g, sc), and 5-HT2B antagonist (SER, 5 mg/kg/g, ip), for 15 days : i. SF+SF (control group: SFSF), ii. ISO+SF (ISOSF), iii. SER+ISO (SERISO), iv. SER+SF (SERSF). At 16th day, DII DIII leads digital ECG recordings were performed under Thiopental-Na anesthesia (50 mg/kg, ip). Frontal vectorcardiography (fVCG) was evaluated. Heart axes were measured at the beginning and end of ventricular depolarization (Ri and Rf). Cardiac hypertrophy was measured by the ratio of heart weight to body weight and the following histochemical stainings were performed: i. Masson trichrome, ii. HE, and iii. Immunohistochemical methods including Anti-ANP Anti-BNP natriuretic peptide receptor antibodies.

Results: While there was no deviation in the Ri value, the Rf axis was higher in some mice in the ISOSF and SERISO groups. There was no difference in ECG interval measurements in any group. The JT segment was also elevated in some mice in the ISOSF and SERISO groups receiving isoproterenol, and the heart weight to body weight ratio significantly increased, as well. Intensive fibrosis was seen in ISOSF, whereas fibrosis in the SERISO group was less intense. Parallel to that both Anti-ANP and Anti-BNP immunoreactivities were significantly decreased.

Conclusion: JT elevation in mice receiving isoproterenol is consistent with histological and immunohistological findings of fibrosis and hypertrophy. The reduction of these effects in the groups with the serotonin receptor antagonist '5-HT2B' indicates that fibrosis and hypertrophy are blocked. The activities of ANP and BNP receptors seems to be suppressed by the '5-HT2B' effect.

Key words: Mice, Electrocardiography, Vectorcardiography, Isoproterenol, 5-HT2B, Cardiac hypertrophy



3. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi ve/veya hipertansiyona bağlı oluşan kalp hipertrofisi kardiyoloji hastalarında sık rastlanan bir semptom olmakla beraber patofizyolojinin de bir konusudur. Kalp hipertrofisi, özellikle sol ventrikül hipertrofisinin β -adrenerjik aşırı aktivasyon ile oluşabilir ve kalp hastalıklarında morbidite ve mortalitenin artmasına neden olan önemli bir risk faktörüdür. Uzun süreli β -adrenerjik uyarım miyokardiyal hipertrofi yaparak miyokardda yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana getirir. Ayrıca miyokardiyal proteinlerin sentezi ve oksidatif stresin artması hipertrofi sürecinde oluşan patofizyolojik süreçlerdir. Bu süreçlerin sonunda miyokardın nekroza uğraması, interstisyel fibroza bağlı miyokardiyal sertlik gibi bulgular oluşur (Gogiraju ve ark., 2019; Oleg E Osadchii, 2007; Roy & Prince, 2013).

Hastalardaki kalp hipertrofisini deney hayvanlarında model olarak oluşturmak prensipte birkaç şekilde mümkün görünse de, her deney hayvanında bu modelin oluşturulması için kolay ve başarısı garanti yöntemler bulunmamaktadır. Bu tez çalışmamda farelerde kalp hipertrofisi oluşturmak için β 1-adrenerjik uyarıcı olarak "Isoproterenol" (ISO) kronik olarak uygulanmıştır. Fare son yıllarda kardiyovasküler çalışmalarda çok sık olarak tercih edilen bir deney hayvanıdır. Çünkü farenin genetik yapısında uygulanan gen mühendisliği manipulasyonlarıyla kalp hücrelerinde bulunan iyon kanallarında tam veya kısmen değişiklikler yapılabilmektedir. Böylece deney için "istenilen hayvan" fenotipi de oluşturulmaktadır (Balakumar ve ark., 2007; Gomes ve ark., 2013; Noll ve ark., 2020; Rai ve ark., 2017).

β 1-Adrenerjik reseptör (β 1-AR) agonisti isoproterenol ile bazı kalp hipertrofisi deney modelleri in-vivo olarak daha önce yapılmış olsa da fare için üzerinde mutabakata varılmış hazır bir model tarifi yoktur. Örneğin, sıçan, hamster, maymun ve kaplumbağaya 1-3 gün boyunca çok büyük dozlarda (20-100 mg/kg/gün) subkutan isoproterenol enjeksiyonlarının, insanlarda miyokard enfarktüsünü andıran "enfarktüs benzeri" tabloya neden olduğu görülmüştür.

Akut olarak isoproterenol uygulaması artan oksijen talebi ile koroner kan akımının azalmasından kaynaklanan miyokardiyal iskemisine neden olarak miyokardiyal hasarı oluşturmaktadır. Ve oluşan bu miyokardiyal hasar i) sol ventrikül ağırlığının artması, ii) sol ventrikül liflerinin kalınlaşması, iii) kardiyak miyositlerde sarkoplazmik hacmin artması gibi göstergelerle kalp hipertrofisinin oluşmasını başlatabilir (Feng & Li, 2010; Oleg E Osadchii, 2007; Periasamy ve ark., 2011).

Esasen kardiyak hipertrofi, kalp miyositlerinin sayılarından ziyade boyutlarının artmasıyla ilişkilidir. Kardiyomiyositler çoğalamayan son derece farklılaşabilen hücrelerdir. Bu değişikliklerin yanında kollajen sentezinin uyarılmasıyla interstisyel miyokard fibrozu görülür ve fokal miyosit nekrozları oluşur (Jalil ve ark., 1989; Oleg E. Osadchii, 2007).

Bu tez çalışmasında isoproterenol kimyasalının 15 gün süre ile “kronik” uygulaması sonucunda kalp hipertrofisi oluşturulması planlanmış ve uygulanmıştır. Bu β 1-Adrenerjik uyarının kalpteki hipertrofik ve/veya fibrotik etkileri aşağıda bahsedilen histokimyasal yöntemler ile incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada birinci olarak kalp içinden “atrium kaynaklı natriüretik peptit” (ANP) ve “beyin dokusu kaynaklı natriüretik peptit” (BNP) aktivasyonu ile kalp hipertrofisi arasındaki ilişki immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmiştir: **ANP ve BNP, isimlerinden anlaşılacağı gibi, peptit tabiatında hormonlar olup kalp içinde reseptörleri bulunmaktadır.** Bu hormonlar diüretik, natriüretik, vazorelaksan özellikleriyle hedef dokularda etki gösterirler. Vücut sıvı hacminin, kan basıncının ve kardiyovasküler hastalıkların azaltılmasına ve kardiyak büyümenin düzenlenmesi ve kontrolüne yönelik antiproliferatif, antiinflamatuvar ve antihipertrofik etki gösterirler (Kapoun ve ark., 2004; Pandey, 2021; Tamura ve ark., 2000).

Bu çalışmada ikinci olarak serotoninin kalp içi fibröz aktivite üzerine etkisini incelemek için kalp içindeki fibroz aktivite üzerine etkisi olduğu bildirilen Serotonin 2B tipi (5-HT_{2B}) reseptör blokleri kullanılmıştır (Nebigil ve ark., 2000; Nebigil ve ark., 2001; Nebigil & Maroteaux, 2003). Böylece Serotonin transmitterinin kalp hipertrofisindeki rolü ve/veya etkinliği araştırılmıştır. Serotoninin kalpteki fibröz aktivite üzerine etkisi özel Masson-Trikrom boyası ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kalp hipertrofisinin kantitatif değerlendirilmesi için kalp ağırlık indeksi değerlendirilmiştir.

Kronik isoproterenol uygulamasının ve Serotonin 5-HT_{2B} reseptör inhibitörü uygulaması ile nasıl etkileşeceğini ortaya koymak için yukarıda bahsedilen histokimyasal incelemelerin dışında Vektörkardiyografik (VCG) bir yöntem bu tez çalışmasında kalp hipertrofisinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Bilindiği gibi kalp hipertrofisi insanda ventriküler depolarizasyonu sırasında aks sapması ve EKG

de özellikle prekordiyal derivasyonlarda amplitüt artması değişikliklerine neden olmaktadır (Kanu Chatterjee, 2013; Nicholas Sperelakis, 2000).

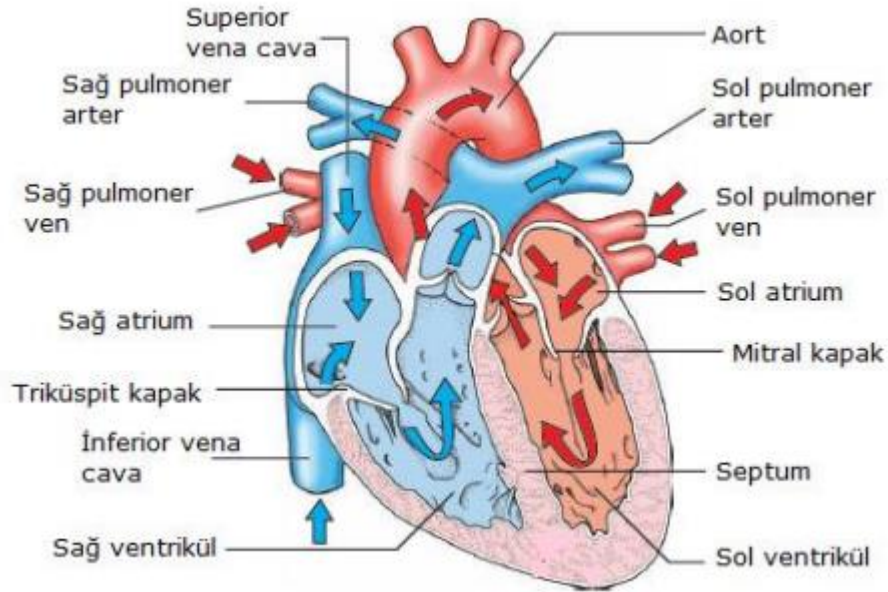
Bu çalışmada kullanılacak olan fVCG yöntemi özel bir frontal Vektörkardiyografi yöntemi olup frontal planda kalp aksı ölçümlerinin yanı sıra aynı zamanda EKG depolarizasyon ve repolarizasyon intervallerinin hassas bir şekilde ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Bu şekilde fare kalp hipertrofinde elektrokardiyografik parametrelerin değişip değişmediğinin araştırılması ve fVCG ile histokimyasal parametreler arasındaki ilişkisinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Amaç: Bu tez çalışmasında “5-HT_{2B} serotonin reseptör blokörü” nin farede β -Adrenerjik stimülasyon ile oluşturulan kalp hipertrofinin oluşum mekanizmasındaki rolünün atrium-kaynaklı natriüretik peptit (ANP) ve beyin-kaynaklı natriüretik peptit (BNP) reseptör aktivasyonları incelenerek araştırılması hedeflendi. Ayrıca kalp hipertrofinin elektrokardiyografik değerlendirilmesinde frontal vektörkardiyografi’ye (fVCG) yansıyan değişikliklerin kantitatif olarak belirlenmesi amaçlandı: Böylece fare kalbinde β -Adrenerjik stimülasyonun histokimyasal değerlendirmesi ile vektörkardiyografik değerlendirmesi arasında bir korelasyon olup olmadığı ortaya çıkarılmak istendi.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. KARDİYOYASKÜLER SİSTEME GENEL BAKIŞ

Kardiyovasküler sistem metabolizmanın yan ürünlerini ortamdan uzaklaştırırken, oksijen ve besin gibi gerekli maddeleri vücut dokularına dağıtmak için ve vücutta kanın hareketini sağlayan bir transport sistemidir. Bu transport sisteminin çalışması için kalp, bir pompa olarak, damarlar boyunca basınç farkı yaratarak tüm hayat boyu kanın akışını sağlar. Kalp akciğerlere kan pompalayan sağ kalp ve vücudun diğer doku ve organlarına kan akımını sağlayan ve sistemik dolaşıma kan pompalayan sol kalp olmak üzere birbirine bağlı iki pompadan oluşur. Kalbin her iki tarafında da sağ ve sol atriumlar ve sağ ve sol ventriküller olmak üzere dört oda bulunur ve bu odalar **atrioventriküler (AV) kapaklar** denilen kanın geri kaçışını engelleyen tek yönlü kapaklarla birbirine bağlıdır. Bu kapaklar kanın tek yönde yani atriumdan ventriküle akmasını sağlayacak şekilde tasarlanmıştır (Costanzo, 2018; Rodney A. Rhoades, 2017).



Şekil 1. Kalbin Anatomisi.

4.2. KALP HÜCRELERİNDE AKSİYON POTANSİYELLERİ VE İYON AKIMLARI

Kalp hücreleri nöronlara benzer şekilde uyarılabilir özelliktedir ve kendi kendilerine aksiyon potansiyeli üretebilir. Kalp kası hücrelerinde oluşan aksiyon potansiyelleri kalbin kasılmasını başlatır ve bu sayede kalp atım hızı belirlenir. Kalpte bulunan tüm miyokard hücreleri birbirlerine gap junctionlar aracılığıyla elektriksel olarak bağlantılıdır. Böylece kalp büyük bir hücre gibi davranmasını sağlayan fonksiyonel bir sinsityum özelliği gösterir. Bu durumda bir miyokard hücresinde meydana gelen aksiyon potansiyeli kalpteki bütün hücelere yayılır. Hücrelerde oluşan aksiyon potansiyelleri ve hücrelerarası elektriksel bağlantılar kalbin ritmik ve düzenli kasılmasını sağlar. Sistol (kasılma) sırasında tüm kalp hücreleri aktive olur (John E. Hall, 2017 ; Rodney A. Rhoades, 2017).

Kalp hücreleri aynı zamanda otomatik olarak çalışır, yani, farklı kaynaklardan gelen herhangi bir elektriksel ya da kimyasal olarak uyarı olmaksızın kendi aksiyon potansiyellerini üretir. Fizyolojik olarak uyarının üretildiği yer sağ atriumda “sino-atrial” düğümdür. Bu özellik düzenli ve tekrarlı olarak **ritmisite (otoritmik=pacemaker)** özelliği olarak ifade edilir (Eric P. Widmaier, 2018; Rodney A. Rhoades, 2017).

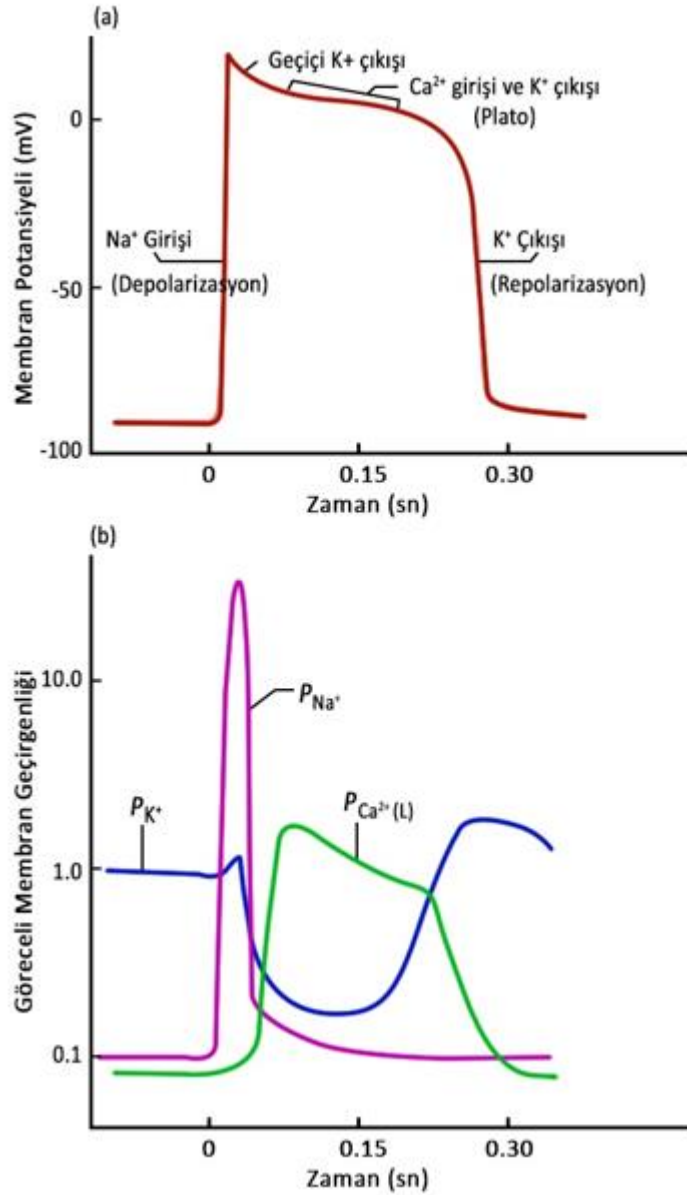
Kalpte oluşan aksiyon potansiyelleri nöronlar ve iskelet kas liflerinde görülen aksiyon potansiyelinden şekil açısından farklılık gösterirler. Kalp kas histolojisi ve iskelet kas histolojisine benzer fakat bu iki doku elektriksel özellikler bakımından farklıdır: Kalp aksiyon potansiyelleri ve iskelet kası hücresi aksiyon potansiyeli ile kıyaslandığında kalp kasında daha uzun aksiyon potansiyeli ve plato bulunması olması temel farklılık olarak öne çıkmaktadır. Hem iskelet ve hem de kalp kasında oluşan aksiyon potansiyeli hücre dışı sıvıda bulunan çok fazla miktarda sodyum iyonunun (Na) iskelet kas lifine girmesini sağlayan hızlı Na kanallarının açılması ile oluşur. Bu yüzden bu kanallar hızlı Na-kanalları olarak bilinir. 1/1.000 saniye süre ile açık kalırlar ve aniden kapanırlar. Daha sonra repolarizasyon fazı başlar ve aksiyon potansiyeli sona erer. İşte esasen aksiyon potansiyelinin şeklinin farklı oluşu bu repolarizasyon dönemindeki olaylardaki her iki doku arasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (John E. Hall, 2017 ; Rodney A. Rhoades, 2017).

4.2.1. Miyokard Hücresi Aksiyon Potansiyeli

Kalp ventrikül kasında meydana gelen aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazının oluşumunda temel olarak iki çeşit kanalın açılması söz konusudur: Bunlardan birincisi **hızlı sodyum kanalları (voltage kapılı sodyum kanalları)**, ikincisi ise **L tipi kalsiyum kanallarıdır (yavaş kalsiyum kanalları: long lasting)**. Repolarizasyon fazında ise yine temel olarak K kanalları açılarak K^+ iyonu hücre dışına çıkar (John E. Hall, 2017).

Kısaca bir genel bakış yapıldığında; depolarizasyon döneminde çok fazla oranda sodyum 1/10 saniye süresince ve takiben kalsiyum iyonları 2/10 saniyede kas hücresine girer ve bu durum uzun süreli depolarizasyona neden olarak aksiyon potansiyelinin plato evresini oluşturur. Aynı zamanda bu evrede akan kalsiyum iyonları kas kasılma sürecini başlatır (John E. Hall, 2017). Aksiyon potansiyelinin başlamasından kısa süre sonra kalp kasının potasyum geçirgenliği azalır, bunun sebebi kalsiyum kanallarından kalsiyumun hücre içine akışı olabilir. Hücre membranı esas olarak kalsiyuma karşı geçirgen hale gelmiştir potasyuma değil. Potasyum geçirgenliğinin azalması, pozitif yüklü potasyum iyonlarının hücre dışına akışını aksiyon potansiyelinin plato evresinde azaltarak aksiyon potansiyelinin erkenden dinlenim düzeyine dönmesini engeller. Plato evresinin sonunda yavaş kalsiyum sodyum kanalları 0,2-0,3 saniye içinde kapanınca kalsiyum ve sodyum iyonlarının hücre içine akımı durur. Bu fazın hemen ardından başlayan repolarizasyon fazında membranın potasyum iyonlarına geçirgenliği de hızlı bir şekilde artar. Kas lifi potasyum kaybedince membran potansiyeli de dinlenim durumuna döner ve aksiyon potansiyeli son bulur (Ganong, 2015; John E. Hall, 2017).

Daha detaylı olarak incelendiğinde kalp ventrikül kası (miyokard) hücresinin aksiyon potansiyelinin oluşumu aşağıdaki beş fazda tanımlanmıştır, ilgili aksiyon potansiyeli ve iyon akımları **Şekil 2** de gösterilmiştir:



Şekil 2. Ventrikül kas hücresi aksiyon potansiyeli (üstte) ve bu sırada oluşan K, Na, Ca iyon akımlarına karşı geçirgenlikler “PK, PNa, PCa” değişiyor (altta).

Faz 0 (Hızlı Depolarizasyon)

Faz 1 (Başlangıçtaki Hızlı Repolarizasyon)

Faz 2 (Plato)

Faz 3 (Yavaş Repolarizasyon)

Faz 4 (Dinlenim Membran Potansiyeli)

Faz 0 (Hızlı Depolarizasyon): Sodyum iyonunun hücre içine girişi hücreyi **depolarize eder** ve geri bildirim mekanizmasıyla daha fazla sodyum kanalını açar,

böylece çok hızlı olarak membran potansiyeli -85 mV civarından +20 mV değerine ulaşır, bu faz “Faz 0” olarak isimlendirilir (Şekil 2): Fizyolojik olarak, Sinoatrial (SA) düğümünden çıkan ve tüm kalbe yayılan uyarılar bir ventrikül hücre membranı üzerindeki hızlı sodyum kanalları olarak da bilinen voltaj kapılı sodyum kanallarını açarak diğer kalp hücrelerinde depolarizasyonu başlatır. Dışardan komşu hücreden “Gap junction” ile uygulanan voltaj hücre membranındaki protein yapısındaki sodyum (Na^+) kanallarını konformosyonel değişikliğine neden olur ve bu kanallara voltajla açılan hızlı sodyum kanalları denir. Böylece, sodyum iyonu hücre içine girer. Bu durum zar potansiyelini daha pozitif değere getirir. Zar potansiyeli sodyum kanalları kapanmadan önce hücre zar potansiyelinin maksimum değeri olan +20 mV değerine ulaşır (Eric P. Widmaier, 2018; John E. Hall, 2017).

Faz 1 (Başlangıçtaki Erken Repolarizasyon): Hızlı Sodyum kanalları kapanır, hücre repolarize olmaya başlar. Potasyum iyonları potasyum kanalları aracılığıyla hücreyi terk eder; bu durum geçici K^+ akımı olarak Şekil 2 de gösterilmiştir. Bu fazda kalsiyum kanalları da bulunur, ancak bunlar Faz 2 de kalsiyum kanallarından farklılık gösterir. Bu fazdaki kalsiyum akımları T tipi (transient=geçici) kalsiyum kanalları olarak bilinir ve hücre içine bir miktar Ca^{+2} girişi olur (Costanzo, 2018; John E. Hall, 2017).

Faz 2 (Plato): Bu fazda L tipi Kalsiyum kanalları bulunur, bu kanalların açılmasıyla Ca^{+2} hücre içine girer (Şekil 2). Kalsiyum iyon geçirgenliğinin artması ve potasyum iyonu geçirgenliğinin azalmasıyla plato evresi oluşur. Bu fazda ihmal edilebilir K^+ çıkışından da söz edilebilir (John E. Hall, 2017).

Faz 3 (Yavaş Repolarizasyon): Kalsiyum kanalları kapanır, potasyum kanalları açılır. Kalsiyum kanallarının kapanması ve potasyumun hücre dışına çıkmasıyla membranın potasyum geçirgenliğinin artması plato evresini sonlandırır. Hücre zar potansiyeli azalarak dinlenim seviyelerine döner. Bu seviye ventrikül hücresi için -85 mV civarındadır (John E. Hall, 2017).

Faz 4 (Dinlenim Membran Potansiyeli): Bu fazda Potasyum iyonları (K^+) hücre dışına sızma şeklinde yani az miktarda çıkabilir. Ancak bu fazda esas elektriksel transport mekanizması Na^+/K^+ pompasının çalışmasıdır. Membran potansiyeli -85 mV civarındadır ve bir daha ki aksiyon potansiyeli oluşumuna kadar bu seviyesini korur (John E. Hall, 2017).

4.2.2. Nodal Hücre (Pace-maker) Aksiyon Potansiyelleri

Kalpde iki tane nodal (uyarı oluşturan= “pace-maker”) bölgesi vardır: i. Sinoatrial (SA) düğüm bölgesi ve ii. Atrioventriküler (AV) düğüm bölgesi. Şekil 3 de gösterildiği gibi bu bölgelerdeki aksiyon potansiyelleri hem yapısı gereği hem de iyonik temeli açısından pürkinje hücreleri ve ventrikül kalp kası aksiyon potansiyelinden farklıdır. Sinoatrial düğüm her periyodun başında kalpte elektriksel aktivitenin başladığı yerdir ve ritmik olarak deşarj yapan hücreler burada “fizyolojik elektriksel uyarıcı” özelliği gösterir. Bu hücreler herhangi bir sinirsel uyarı olmaksızın kendiliğinden aksiyon potansiyeli üretebilir. Bu hücreler fonksiyonları ile uyumlu stabil (sabit) olmayan dinlenme membran potansiyeline sahiptir. Ve burada ventrikül hücresinden farklı iyon akımları olduğundan nodal hücre aksiyon potansiyellerinde plato evresi görülmez. Hücre membranı yavaş depolarizasyona uğrar. SA ve AV düğümde oluşan aksiyon potansiyellerinin süreleri ve yükseklikleri dikkate alındığında boyutları diğer miyokard hücrelerindeki aksiyon potansiyellerinin boyutlarından daha küçüktür. Düğüm dokusu hızlı voltaj kapılı sodyum kanallarını içermez. T tipi ve L tipi “yavaş” voltaj kapılı kalsiyum kanalları etkindir. Ayrıca SA ve AV düğümü hücrelerinde aksiyon potansiyelinin oluşmasında “F” tipi denilen hem Na^+ hem de Ca^{+2} geçişine izin veren özel bir iyon kanalı bulunmaktadır (Costanzo, 2018; Eric P. Widmaier, 2018; Rodney A. Rhoades, 2017).

Faz 0: Aksiyon potansiyelinin çıkan koludur. Bu yukarı çıkış miyokard hücresindeki kadar hızlı ve keskin değildir. L tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalları üzerinden içeriye kalsiyum girer (John E. Hall, 2017).

Faz 1 ve Faz 2 görülmez.

Faz 3: Diğer kalp hücrelerinde olduğu gibi repolarizasyon, K^+ dışı akımıyla oluşan K^+ iyonlarının yüksek iletkenliğinden kaynaklanır. K^+ iyonlarının büyük elektrokimyasal gradyanı, bu aşamada bu dışı doğru K^+ akımını ortaya çıkarır (John E. Hall, 2017).

Faz 4: SA düğüm aksiyon potansiyelinin en uzun bölümüdür. Bu faz kendiliğinden (spontan) oluşan ve “erken depolarizasyon” denen artan bir potansiyel dönemi olarak dikkat çeker. Zar potansiyelinin en negatif değeri yaklaşık -60mv dur. Bu fazda “garip” (ing. funny) diye adlandırılan “ I_f ” tipi kanallar açılır. Bu kanallardan Ca^{+2} ve Na^+ iyonları hücre içine girer ve membran potansiyeli eşik değere doğru

I_f _____



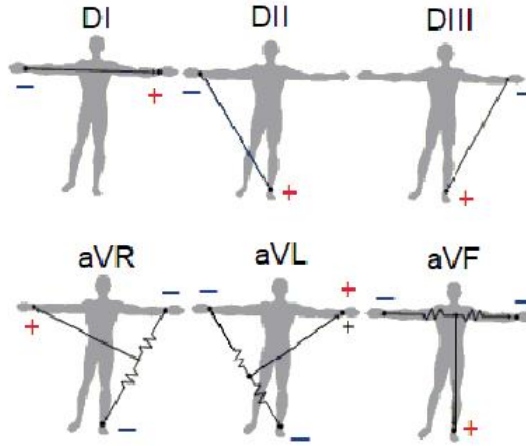
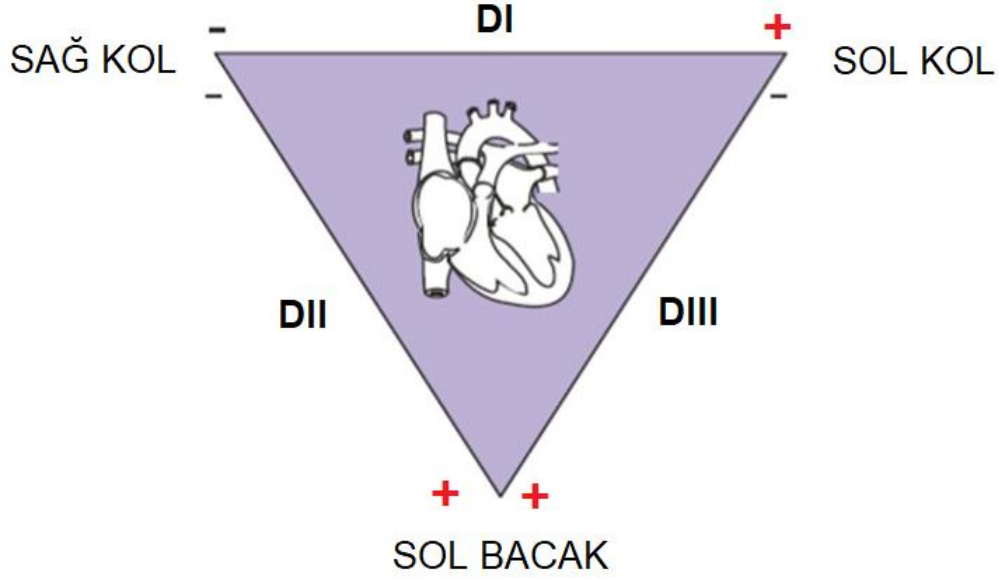
Şekil 3. Sinoatriyal (SA) düğüm aksiyon potansiyeli ve “F” kanallarının açık olduğu zaman dilimleri.

4.3. ELEKTROKARDİYOĞRAFI (EKG)

Kalpdeki elektriksel aktivitenin vücutta belli noktalara yerleştirilen elektrotlar yardımıyla kaydedilmesi işlemidir. Bunun için kullanılan cihaza elektrokardiyograf ve kayıt sonunda elde edilen grafiye **elektrokardiogram** denir (John E. Hall, 2017).

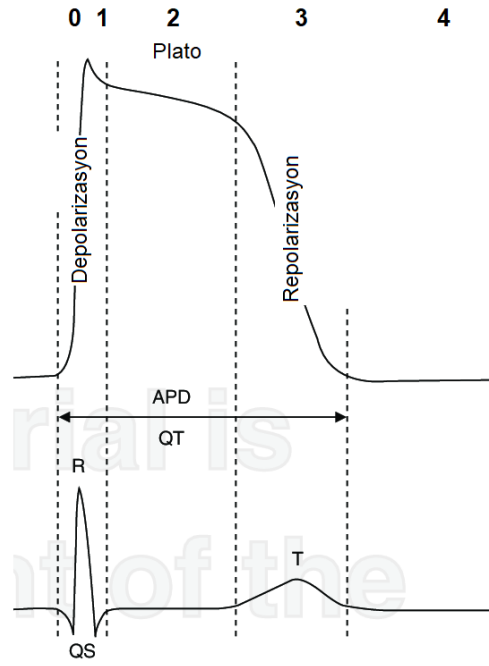
Kalp kasında aksiyon potansiyelinin aynı anda birden fazla hücrede meydana gelmesi ve yayılımı sonucu oluşan akımların kalbin çevresinde yer alan dokulara ve sıvılara yayılması deri üzerinde zamana bağlı olarak değişen elektriksel potansiyel farkı yaratır. Bu potansiyel değişikliklere ekstraselüler potansiyel değişikliği denir ve EKG de bir ekstraselüler değişim grafiğidir (John E. Hall, 2017).

EKG'nin temel prensibine bakıldığında depolarizasyon dalgası pozitif elektrota doğru ilerliyorsa pozitif potansiyel kaydedilir, uzaklaşırsa negatif potansiyel kaydedilir. Yine aynı şekilde repolarizasyon dalgası negatif elektroda doğru yaklaşıyorsa pozitif dalga elde edilir. Bu nedenle elektrotların pozisyonları EKG dalgalarının ne şekilde olacağını belirler. Şekil 4 standart ekstremité derivasyonlarındaki elektrot pozisyonlarını göstermektedir, standart prekordiyal derivasyonlar bu şekilde gösterilmemiştir. Şekil 4'ün üst kısmında verilen DI, DII, ve DIII derivasyonları tarafından oluşturulan EINTHOVEN üçgeninin bir eşkenar üçgen olduğu varsayılarak klinikte kalp aksı yaklaşık olarak tahmin edilmektedir.



Şekil 4. “Bipolar” ekstremitte derivasyonlarının (DI, DII, ve DIII) oluşturduğu Einthoven üçgeni (üstte). “Bipolar” (DI, DII, ve DIII) ve “Unipolar” ekstremitte derivasyonları (aVR, aVL, ve aVF) elektrod pozisyonları (altta).

Şekil 5 bir yüzey EKG ile bir ventrikül aksiyon potansiyelinin eşzamanlı kaydını göstermektedir. Bu şekilde QRS kompleksi ki ventrikül depolarizasyonu sırasında oluşmaktadır aksiyon potansiyelinin depolarizasyon dönemine denk gelmektedir. T dalgası ise repolarizasyonu temsil etmektedir ve zamansal olarak aksiyon potansiyelindeki repolarizasyon dönemi ile uyumludur. Aksiyon potansiyeli süresi “APD” EKG deki QT intervalinin eşleniğidir ve ventriküler repolarizasyon süresi olarak kabul edilir.



Şekil 5. İnsanda yüzey EKG'si ve bir ventriküler miyositinden elde edilen aksiyon potansiyeli eş zamanlı kaydı. 0, 1, 2, 3, 4: Aksiyon potansiyeli fazları, APD: Aksiyon potansiyeli süresi.

4.4. İNSAN ve FARE ELEKTROKARDİYOĞRAFİSİ

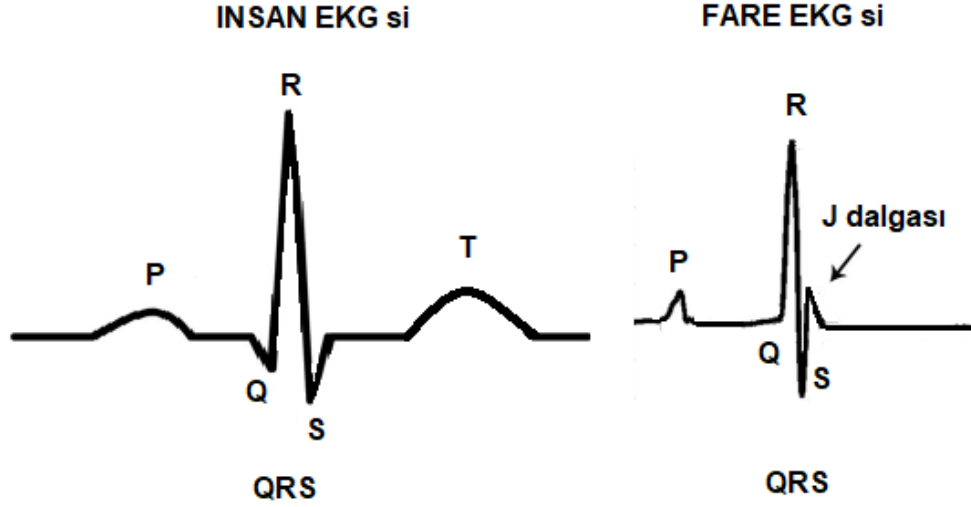
Yüzey elektrokardiyogramı (EKG), kalpteki elektriksel aktiviteyi ve potansiyeli kaydetmek, kalp hastalıklarını tespit etmek için kullanılan primer klinik araçtır. Günümüzde özellikle genetiği değiştirilmiş fare türlerinin sayısının sürekli artmasına paralel olarak, kardiyovasküler hastalıkları incelemek için kullanılan fare modellerinin sayısını ve aynı zamanda önemi de artmaktadır. Bununla birlikte, fare EKG'si hala geniş ölçüde anlaşılamamış bazı özellikler içermektedir ve fare yüzey EKG'sinin kalpteki fizyolojik ve patolojik değişikliklerle ilişkisi hakkında tartışmalar devam etmektedir (Merentie ve ark., 2018; Speerschneider & Thomsen, 2013). Çünkü Fare EKG'si bazı yönleriyle insan EKG'sinden farklıdır: Şekil 6'da bu farklar vurgulanmaktadır:

Hem fare hem de insan EKG'sinde atriyumların depolarizasyonu P dalgası olarak görülür (Şekil 6): Fare P dalgasından sonra bazen küçük bir negatif dalga görülebilir; bu dalganın ya atriyal repolarizasyonu temsil ettiği ya da elektrotların konumlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Boukens ve ark., 2014; Merentie ve ark., 2018). P dalgasını, atriumlardan ventriküllere iletim süresini ifade eden PQ (veya PR) aralığı takip eder. Yüzey EKG'sinde QRS kompleksi ventriküllerin depolarizasyonunu gösterirken ventriküler kasılma ile başlar. QRS süresi, farelerde farklı derivasyonlar

arasında değişir. İnsan kalbindeki ventrikül aksiyon potansiyeline bakıldığında, AP'nin repolarizasyonunun 1. Fazı transmembran potansiyelinde sadece küçük bir değişiklik bulunur. Buna karşın farelerde, AP yukarı vuruşunu yani aksiyon potansiyelinin tepe noktası daha yüksek bir sivrilik gösterir ve bunu takiben plato fazıda çok değildir ve alçaktır. Farede ventriküler aktivasyon tamamlanmadan önce repolarizasyon kısmen oluşmaya başlar. Bu nedenle, fare QRS kompleksinin son kısmında depolarizasyon ile repolarizasyon iç içe girmektedir. Eğer İnsanlarda ventriküler iletim yavaşlarsa QRS süresi uzar. Bunun yerine, fare ventriküler iletimi yavaşladığında, QRS kompleksi ventriküler aktivasyon bitmeden sona erebilir? şeklinde görüşler bulunmaktadır (Boukens ve ark., 2014; Merentie ve ark., 2018).

Farelerde ventriküler aksiyon potansiyelinin (AP) şeklinin farklı olması ile uyumlu olarak QRS kompleksini hemen bir J dalgası takip eder (bkz. şekil 6). J dalgası erken repolarizasyonu temsil eder. J dalgaları ayrıca hipotermi ve Brugada sendromu gibi hastalıklarda insan EKG'sinde de görülebilir (Boukens ve ark., 2014; Merentie ve ark., 2018).

İnsanlarda QRS kompleksi ve T dalgası, tüm ventriküler kardiyomiyositlerin depolarize olduğu bir izoelektrik ST segmenti ile ayrılır. Bu durum, ekstraselüler akım akmadığı ve dolayısıyla yüzey EKG'sinde voltaj değişikliği görülmediği zaman ventriküler AP'nin plato fazından kaynaklanır (Merentie ve ark., 2018). T dalgası, ventriküler kas lifleri gevşemeye başladığında ventriküllerin repolarizasyonunu gösterir. Farelerde ise belirgin bir plato fazı yoktur ve sonraki süreçte de T dalgası gibi net bir repolarizasyon dalgası fizyolojik olarak yoktur, bunun yerine J dalgası repolarizasyonu temsil etmektedir. Bazı çalışmalarda fare EKG sinde T dalgası negatiftir, nispeten küçük genliğe sahiptir ve QRS kompleksinin son kısmını takip eden J dalgası ile birleşir. Ventriküler repolarizasyonun sonu, EKG'deki T dalgasının sonu ile çakışır. Fakat T dalgası her zaman ortaya çıkmamaktadır. T dalgasının sonunun saptanması sorunludur, izoelektrik hatta döndüğü noktadır denebilir fakat tespit edilmesi klasik yöntemler ile zordur hatta tartışmalıdır. şekil 6' da gösterildiği gibi farelerde izoelektrik ST segmenti olmadığı için J dalgası ucu ile T dalgası ucu arasındaki segment JT segmenti olarak adlandırılmıştır (Merentie ve ark., 2018; Speerschneider & Thomsen, 2013).



Şekil 6. İnsan ve Farenin Temsili Yüzey Elektrokardiyografisi (EKG) Eğrileri.

4.5. VEKTÖRKARDİYOĞRAFI (VCG)

Vektörkardiyogram, elektrokardiyografinin bir parçasıdır. Vektörkardiyogram tüm kalp döngüsü boyunca elektrokardiyogramın P, QRS, T bileşenlerini kalpten gelen anlık ortalama elektrik kuvvetlerini temsil eden döngüler (loop) biçimde gösterir. Kalp üç boyutlu bir yapı olduğundan, her kalp atışı sırasında kalpten gelen elektrik kuvvetleri üç boyutlu olarak yönlendirilir ve bu nedenle, bu ortalama elektrik kuvvetlerinin büyüklüğünü ve yönünü gösteren bir vektör zaman dizisi ile temsil edilebilmektedir (Burch, 1985).

Vektörkardiyografi (VCG), kardiyak elektriksel aktivitenin değerlendirilmesinde oldukça yararlı bir inceleme yöntemi olarak kabul edilen klinik bir uygulamadır. Kardiyovasküler hastalıklar arasında hipertrofide kullanılmasının yanı sıra iskemik kalp hastalığının tespiti içinde yüksek oranda insanda kullanılabilir. Ancak genel olarak deney hayvanlarında VCG nin değerlendirilmesi insandaki kadar detaylı yapılmamıştır.

VCG ortogonal olarak üç düzlemde (transvers, sagittal ve planer) ifade edilirse de bu şekilde elde edilen kayıtların yorumlanması karışık olduğu için klinikte yaygın kullanımı yoktur.

VCG birkaç farklı derivasyon kullanılarak ölçülebilir. Fakat bu yöntemlerin her birinde önce X, Y ve Z derivasyonlarının EKG kayıtlarını elde etmek gerekir. Klinikte pratik olarak, X, Y ve Z derivasyonlarını elde etmek için FRANK ortogonal derivasyon sistemi kullanılan en yaygın yöntemdir. Frank tarafından tanımlanmıştır ve

kardiyak elektriksel aktivite üç ortogonal elektrot kullanılarak hassas bir şekilde ölçülür. VCG ölçümleri için ortogonal üç düzlemdeki (vertikal, transvers ve sagittal) 2- boyutlu grafikler elde edilir. Bunlar iki boyutlu grafikler olup XY, YZ ve XZ ile gösterilen planer VCG grafikleridir. Yani 2- boyutlu grafiklerin her biri planer VCG dir. FRANK sisteminde çok fazla sayıda elektrot kullanıldığı için klinikte yaygın olarak uygulanmaz. Fakat akut miyokard enfarktüsü, sağ ve sol ventrikül hipertrofisi gibi hastalıklarının teşhisinde FRANK VCG grafiklerinin değerli olduğu belirtilmiştir (Jaros ve ark., 2019).

Yukarıda belirtildiği gibi VCG, transvers, sagittal ve transvers olarak üç düzlemde oluşur bu düzlemleri oluşturan X, Y ve Z derivasyonlarının tek bir bileşkesi alınarak 3 boyutlu bir grafik elde edilirse buna “Spasyal” yani “Uzaysal” VCG denir. Frontal (X-Y), transvers (X-Z), ve sagittal (Y-Z) grafiklerin her birinde “loop” denen kapalı bir ya da birkaç tane grafik döngüsü elde edilir. Bu “lup” lar üzerinden zaman ölçümü yapılamaz çünkü her bir planer VCG “voltaj-voltaj” grafiğidir. EKG ise voltaj-zaman eğrisidir. Her kalp atım periyonunda bu “lup” şeklindeki döngüler tekrar tekrar elde edilir: Vektörkardiyografide her düzlem için bir atım periyodundaki döngüler çizilir. Bir kalp periyodunda ilk lup P dalgasına, en büyük lup olan 2. Lup QRS kompleksine ve üçüncü lup da T dalgasını ifade eder. Kalp elektriksel aksı ise bu “loop” denen ve noktalamalardan oluşan grafikteki her bir noktaya denk gelmektedir, yani her bir noktanın konumu değiştiğinde kalbin elektriksel aksıda noktanın olduğu koordinatlara hareket ediyor demektir (Jaros ve ark., 2019). Yani bu durumda vektörü iki bileşen değiştirir; bunlardan i) vektörün voltajının artmasına ve azalmasına bağlı olarak boyu uzar ya da kısalır; ii) kalbin elektriksel potansiyelinin ortalama yönünün değişmesine bağlı olarak vektör yön değiştirir (John E. Hall, 2017).

FRANK derivasyon sisteminde X, Y ve Z EKG kayıtlarının elde edilmesi için analog dirençler kullanılmıştır. Oysa günümüzde bilgisayar hesaplamaları ile bu derivasyonlar “sanal” ya da sayısal olarak elde edilebilir. Bunun için uygulanan elektrotların konumlarının ve toraksın geometrisinin hesaba katılması gerekir.

4.6. SEROTONİN (5-HİDROKSİTRİPTAMİN, 5- HT)

İnsanlarda kan basıncının kontrolünü sağlayan çeşitli kimyasal ajanlardan birisi olan serotoninin etkileri geniş ölçüde araştırılmıştır. Çeşitli kimyasal maddeler tarafından indüklenen serotonin antagonistleri kan basıncını çelişkili ve farklı yollardan etkilediğinden dolayı hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki önemi tam olarak fark edilmemiştir (Frishman ve ark., 1995).

Bir nörotransmitter ve periferik bir hormon olarak bilinen serotonin (5-hidroksitriptamin:5-HT) beyinde, enterokromaffin dokusunda, kan trombositlerinde, gastrointestinal sistemde doğal olarak oluşan bir biyojenik amindir (Ni & Watts, 2006; Rieder ve ark., 2021). Serotonin ruh halinin kontrolü, idrar depolama ve miksiyon, uyku, vücut ısısının düzenlenmesi, gıda alımı ve bağırsak hareketliliği gibi çeşitli fonksiyonlarda görev alan, vücutta yaygın olarak bulunan vazoaktif bir maddedir (Ni & Watts, 2006). Son zamanlarda kardiyovasküler hastalıklarda, anksiyete ve depresyonun patogenezindeki rolü dikkat çekicidir (Żmudzka ve ark., 2018). Serotonin ilk olarak bir asırdan fazla bir süre önce kan damarlarının vazokonstriktörü olarak tanımlandı ve son yirmi yılda arteriyel düz kas mitojeni, yani mitojen bölünmeyi tetikleyici, olarak kabul edildi. Son on yılda da pulmoner hipertansiyonda serotonin (5-HT) ve serotonin transporterinin (SERT) rolü önemli tartışma konusu olmuştur (Ni & Watts, 2006).

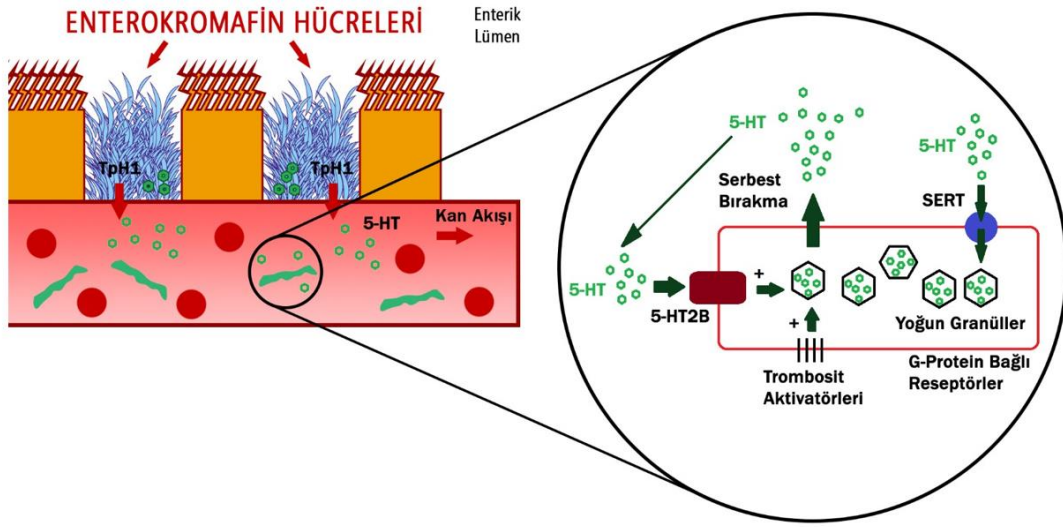
Temel olarak memeli vücudunun çok sayıda fizyolojik sistemlerinin 5-hidroksitriptamin'den etkilendiği bildirilmiştir. Primer olarak etkilenen sistemler merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemidir ancak 5-HT aynı zamanda bağırsak, karaciğer ve dalakta da kompleks roller oynar. Bununla birlikte, 5-HT' nin ayrıca kalpte önemli derecede patofizyolojik rollere sahip olduğu görülmektedir. Kardiyovasküler sistem dışındaki hastalıkları tedavi etmek için tasarlanan birtakım ilaçların kalpteki 5-HT seviyesini değiştirdiği veya memeli kalbindeki bir veya daha fazla 5-HT-reseptörü üzerinde agonist/antagonist olarak etkilediği görülmüştür. Son olarak, kardiyovasküler hastalıklarda 5-HT'nin kendisinin kalbi onarıcı veya olumsuz bir şekilde etkileyebileceğine dair kanıtlar vardır (Neumann ve ark., 2017; Rieder ve ark., 2021).

4.6.1. Kalpteki 5HT'nin Kaynağı ve Sentezlenmesi

Esansiyel aminoasit olan triptofan 5-HT'nin prekürsörüdür. Vücuttaki 5-HT'nin yüzde doksanı %90'ı bağırsakta bulunan enterokromaffin hücrelerinde, %5'i trombositlerde ve yaklaşık % 2'si beyinde yer alan rafe çekirdeklerinde geri kalanı ise akciğeri kaplayan endotelial hücrelerde ve kardiyovasküler sistemde farklı bölgelerde sentezlenir (Ni & Watts, 2006).

5-HT'nin biyosentezi, triptofanhidroksilaz (Tph), Tph1 ve Tph2 enziminin iki izoformu tarafından düzenlenir. **Tph2**, merkezi sinir sisteminde 5-HT sentezinin düzenlendiği beyin sapında sentezlenir. Merkezi sinir sisteminde 5-HT'nin etkilediği durumlar oldukça karmaşıktır: Ruh halinin, iştahın, sirkadiyen ritmin ve cinsel dürtünün düzenlenmesi gibi durumlarda rol oynar. Bu sistemdeki rahatsızlıklar, depresif veya anksiyete bozuklukları gibi psikiyatrik hastalıklarla yakından bağlantılı görünmektedir (Rieder ve ark., 2021; Żmudzka ve ark., 2018).

Bununla birlikte, 5-HT'nin büyük çoğunluğu periferik sistemde bulunabilir. Periferik 5-HT, bağırsakta bulunan enterokromafin hücreleri tarafından triptofan hidroksilaz (**Tph1**) tarafından sentezlenir ve kan plazmasına salınır. Dolaşımdaki 5-HT'nin çoğu, 5-HT taşıyıcı SERT aracılığıyla trombositler tarafından alınır. 5-HT'nin dolaşımdaki ana deposu olan trombositler, onu yoğun granüllerinde yüksek konsantrasyonlarda depolar ve aktive olduklarında serbest bırakır. Trombositler 5-HT'yi sentezleyemediğinden, selektif serotonin geri alım inhibitörleri ilaçların (SSRI' lar) kronik alımı ve dolayısıyla uzun süreli SERT bloke olması, trombosit 5-HT deposunun tükenmesine neden olur (Rieder ve ark., 2021).



Şekil 7: Bağırsaktaki enterokromafin hücrelerinden (EC-hücreleri) Tph1'i eksprese ederek serotoninin (5-HT) çoğunu sentezler.

Periferik dokularda 5-HT, vasküler tonus, bağırsak motilitesinin düzenlenmesi, hemostaz ve bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesi dahil olmak üzere çok çeşitli işlevlerde görev alır. Kardiyovasküler sistemdeki reseptörlerin geniş dağılımı nedeniyle, 5-HT, arteriyel hipertansiyon, karotis aterosklerozu veya koroner arter hastalığı gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir rol oynamaya yeteneği gösterebilir (Rieder ve ark., 2021).

4.6.2. Kardiyovasküler Sistemde Serotonin Etkileri

Serotonin, kardiyak miyositlerde 5-HT₄ reseptörlerinin uyarılması yoluyla kalp üzerindeki pozitif kronotropik, inotropik ve lusitropik etkilerden sorumludur. Miyokarddaki varlığı, serotoninin atriyal aktivitenin kontrolünde rol oynayabileceği fikrine yol açtı. 5-HT₄ reseptörlerinin uyarılması, insan miyositlerinde hücre içi kalsiyum artışına neden olmasına rağmen sıçan, tavşan, kobay veya fareden elde edilen atriyal miyositlerde, yüksek konsantrasyonlarda serotoninin Ca²⁺ akımları üzerinde hiçbir etki göstermemiştir. Birkaç 5-HT₄-reseptör antagonistinin, atriyal fibrilasyon için etkili tedavi olabilir diye düşünülmektedir (Côté ve ark., 2004).

In-vitro çalışmalar, gelişmekte olan kalpte serotoninin doğrudan bir rolü olduğunu göstermiştir. Kardiyak gelişim sırasında, 5-HT_{2B} reseptörü kardiyovasküler dokularda eksprese edilir ve tek serotonerjik reseptördür, kardiyak hücrelerde ve embriyojenik olarak nöral krestten kaynaklanan öncül hücrelerde yer aldığı bilinmektedir (Côté ve ark., 2004; Nebigil ve ark., 2000). Kalbin oluşumu sırasında

kardiyak miyositler serotonin ve 5-HT2B reseptörleri aracılığıyla serotonerjik sinyallere yanıt verir. 5-HT2B reseptörünü kodlayan genden yoksun fareler kullanılarak, kalp gelişiminde serotoninin gerekli olduğu in vivo olarak kanıtlanmıştır. Bu mutant hayvanlarda, gebelikte fetüsün organ gelişiminin tamamlandığı ölüme neden olan kalp defektleri görülür. 5-HT2B knockout embriyolar, subepikardiyal tabakanın kusurlu olmasını ve ventriküler miyokardda trabekül eksikliğini ortaya çıkarmıştır (Nebigil ve ark., 2000; Nebigil ve ark., 2001). Bununla birlikte yeni doğan 5-HT2B knockout farelerde kardiyak dilatasyon gelişmiştir. Ventrikül duvarının incelenmesi ve ventrikül kütleindeki azalmanın sebebi (hipoplazi) miyokardiyal hücre sayısının azalması (bozulmuş proliferasyon) ve kardiyomiyosit boyutundaki azalmadan (doğum sonrası gelişim sırasında büyümenin bozulması) kaynaklanır. Bu nedenle, 5-HT2B reseptörleri aracılığıyla serotonin sinyalinin eksikliği, kardiyomiyositin hücresel yapısını değiştirmesinin yanında kalp kasılmasını da etkiler (Nebigil ve ark., 2001; Nebigil & Maroteaux, 2003).

4.6.3. Kardiyovasküler Sistemde 5 HT Reseptörleri

Şimdiye kadar tanımlanmış 14 farklı 5-HT reseptörü moleküler yapıya, sinyal iletim özelliklerine ve farmakolojik özelliklerine göre yedi gruba (5-HT1 ile 5-HT7) ayrılır (Kaumann & Levy, 2006). 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2B ve 5-HT7, damar tonusunu düzenleyen arterlerin ve damarların düz kas ve endotelial hücrelerinde eksprese edilir. Kardiyovasküler hastalıklarla ilgili olarak, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT4 ve 5-HT7 reseptör alt tipleri özellikle dikkat çekicidir (Rieder ve ark., 2021).

4.6.3.1. 5-HT1 Reseptör Grubu

5-HT1 grubu, 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E ve 5-HT1F olmak üzere beş farklı reseptörden oluşur. Bu reseptörlerin tümü, birincil sinyal mekanizmaları olarak adenil siklazin inhibisyonu ile G proteini Gi aracılığıyla etki gösterir. **5-HT1A** reseptörü başlıca merkezi sinir sisteminde bulunur ve sıçanlarda renal vazorelaksasyonundaki rolü dışında, bu reseptörün doğrudan kardiyovasküler fonksiyonuna dair kanıt yoktur. Ayrıca, bu reseptörün kalpte veya kan damarlarında lokalizasyonuna yönelik veriler de eksiktir. Buna karşılık, **5-HT1B** reseptörü kardiyovasküler sistemde yaygın olarak dağılmıştır. Daha önce 5-HT1D β olarak da bilinen 5-HT1B reseptörü, insanlarda koroner ve pulmoner arter damarlar dahil olmak üzere hem endotel hücrelerinde hem de düz kas hücrelerinde bulunur. 5-HT1B reseptörü primer olarak vazokonstriksiyon ile ilişkilidir. **5-HT1D** reseptörünün

(önceden 5-HT1D α olarak da bilinir) kardiyovasküler rolü daha daha az bilinmektedir. 5-HT1D için mRNA, genellikle 5-HT1B'den daha az miktarda bulunur ve endotel hücrelerinde veya insan kan damarındaki düz kas hücrelerinde bulunmaz. 5-HT1B reseptörleri, insanda arterlerde 5-HT ve triptanlar aracılığıyla vazokonstriksiyona da katkıda bulunur. Hem 5-HT1B hem de 5-HT1D reseptörleri, migren ataklarını azaltmak için kullanılan triptanlar açısından önemlidir. 5-HT1E reseptörünün kardiyovasküler etkilerine dair hiçbir kanıt yoktur (Hoyer ve ark., 2002; Kaumann & Levy, 2006).

4.6.3.2. 5-HT2 Reseptör Grubu

Bu reseptör sınıfının, **5-HT2A**, **5-HT2B** ve **5-HT2C** olmak üzere 3 üyesi vardır. Bu reseptör çiftleri öncelikle G proteinlerinden Gq veya G11 aracılığıyla fosfolipaz C (PLC)'ye bağlanarak aktivasyon gösterir. **5-HT2A** reseptörü, insan kardiyovasküler sisteminde yaygındır. **5-HT2A** arteriyel düz kasta bulunur ve vazokonstriksiyona aracılık eder, endotel hücrelerinde ise yoktur. Ayrıca trombositlerde bulunur ve trombosit agregasyonunu kolaylaştırır. **5-HT2B** reseptörü, mitojenik sinyalizasyona aracılık eder ve pulmoner hipertansiyon ve valvülopati ile ilişkilidir. **5-HT2C** reseptörü kardiyovasküler sistemde bulunmamıştır (Kaumann & Levy, 2006). Çoğunlukla merkezi sinir sistemi ve koroid pleksusta bulunmaktadır (Hoyer ve ark., 2002). Farelerde 5-HT2B reseptörünün normal kardiyak embriyogenez için zorunlu bir rolü olduğu görülmektedir. 5-HT2B reseptörlerinin genetik bilgisinin değiştirilmesi gebelikte fetüsün organ gelişiminin tamamlandığı dönemde ölüme neden olur (Nebigil ve ark., 2000). 5-HT2B reseptörleri aynı zamanda kemirgen kardiyomiyositlerinde antiapoptotik özelliklere sahiptir (Nebigil ve ark., 2003). Gelişmiş genetik modeller kullanılarak 5-HT nin kalbin nörohumoral strese tepkisi sırasında kardiyak fibroblastların yüzeyindeki 5-HT2B reseptörlerini aktive ettiği gösterilmiştir. Kardiyak fibroblastlardaki 5-HT2B reseptörlerinin ventriküler hipertrofi gelişimi için çok önemli olduğu gösterilmiştir: Jaffre ve ark. (2009) kardiyak fibroblastlardaki 5-HT2B reseptörlerinin, kardiyomiyositlerin değil, izoproterenol ile indüklenen ventriküler hipertrofide önemli bir rol oynadığını bildirmiştir (Bai ve ark., 2010; Brea ve ark., 2010).

4.6.3.3. 5-HT3 Reseptörü: Ligand Kapılı Bir İyon Kanalı

5-HT3 reseptörü, G proteinine bağlı bir reseptör olmayan, ancak “Cys-loop” reseptör ailesine ait olan tek serotonin reseptörüdür. Nikotinik asetilkolin ve Gama aminobütirik asit (GABA) reseptörlerine benzeyen pentamerik ligand kapılı bir katyon kanalıdır (Hoyer ve ark., 2002; Kaumann & Levy, 2006). 5-HT3 reseptörü esas olarak kalp ile ilgili afferent vagal ve sempatik nöronlarda yer alır, refleks bradikardi ve ağrıya aracılık ettiği düşünülür (Kaumann & Levy, 2006).

4.6.3.4. 5-HT4 Reseptörü

5-HT4 reseptörü, Gs protein/adenil siklaz sistemine bağlanarak cAMP oluşumunu sağlar. İnsanda kardiyovasküler sistemde 5-HT4 reseptörleri atriyum ve ventriküllerde bulunur ve kasılmanın artmasını sağlarlar. 5-HT4 reseptörleri insan endotel hücrelerinde de eksprese edilebilir ancak işlevleri hala bilinmemektedir (Kaumann & Levy, 2006). Kardiyak atriyum ve ventrikülde eksprese edilen 5-HT4, pozitif inotropik ve lusitropik etkiler yapar aynı zamanda aritmileri de tetikleyebilir (Rieder ve ark., 2021).

4.6.3.5. 5-HT5 ve 5-HT6 Reseptörleri

Şimdiye kadar, insan 5-HT5A reseptörünün endojen bir ortamda ifade edildiğini doğrulayacak herhangi bir kanıt olmadığı için hala varsayılan bir reseptör olarak kabul edilmektedir. 5-HT6 reseptörü ile ilgili olarak, bu reseptörün kardiyovasküler sistemdeki rolünü destekleyen hiçbir kanıt yoktur (Kaumann & Levy, 2006).

4.6.3.6. 5-HT7 Reseptörü

5-HT7 reseptörü, Gs proteinine bağlanarak adenil siklazı aktive eder. Kardiyovasküler sistemde, 5-HT7 reseptörü için mRNA, koroner arterlerde ve vasküler düz kasta bulunmuştur ancak 5-HT7 reseptörünün insanda kardiyak fonksiyonlarına ilişkin kanıtlar yetersizdir (Kaumann & Levy, 2006).

4.7. ISOPROTERENOL ve BETA ADRENERJİK AKTİVASYON

β -1 ve β -2 adrenerjik reseptör tipleri G proteini bağlı reseptörler olan G-alfa uyarımlı bir ikinci haberci aracılığıyla etkilerini gösterir. β -1 adrenerjik reseptörler özellikle kalp dokusunda yoğunlaşmıştır. β -1 adrenerjik reseptöründe hücre içi kalsiyumda artış meydana gelir. İnaktif durumda hücre içinde bulunan GDP molekülüne G-alfa bağlanır ve bu alfa alt birimi GDP molekülünü GTP ye değiştirerek hücre içinden ayrılır ve adenilat siklazı aktive eder. Aktive edilen bu molekülde hücre içinde ATP yi cAMP ye dönüştürür. Bu yoldaki başlıca ikinci haberci olan cAMP,

protein kinaz A'yı (PKA) aktive eder. Aktive edilen PKA, kardiyak miyositlerde L tipi kalsiyum kanallarını fosforile ederek hücre içinde kalsiyumun artmasına neden olur. PKA ayrıca sarkoplazmik retikulumdaki ryanodin reseptörlerinden kalsiyum salınımında bir artışa neden olur (Kanu Chatterjee, 2013; William E. Stansfield, 2014).

Kemirgenlerde kronik isoproterenol uygulamasının ardından kardiyak morfolojide değişiklikler oluşur. Burada morfolojide oluşan değişiklikler suşa bağlıdır ve düşük sodyum diyeti uygulanan hayvanlarda daha az görülür. Ayrıca, kronik isoproterenol uygulamasını takiben kardiyak hipertrofi indüksiyonun yaşa bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Özellikle, sıçanlarda aynı isoproterenol uygulama protokolü yetişkin hayvanlarda kardiyak hipertrofiye neden olurken, yenidoğanlarda herhangi bir etki görülmemektedir (J. L. Zeiders, 1999; Oleg E. Osadchii, 2007).

Isoproterenolün etkisinde öne çıkan bulgular; sol ventrikül subendokardiyumda kollajen liflerinin birikimi, intermusküler boşluklardan dışarı doğru uzanır ve ventriküler lifleri çevreler. Bu etki miyokardiyal sertliğin artmasına ve diyastolik gevşemenin bozulmasına neden olur. Ayrıca, miyokardiyal fibrozis, kalın ve ince kollajen liflerden oluşan yoğun bir ağ örgüsü ile kaplanmış subendokardiyal bölgede bulunan liflerin çapının azalmasına neden olur (Jalil ve ark., 1989; Oleg E. Osadchii, 2007).

4.8. KARDİYAK HİPERTROFİ

Kalp hipertrofisi kalp kütlesinde oluşan artış olarak ifade edilmektedir. Doğum sonrası kalbin büyümesi fonksiyonel yüküyle yakından ilişkilidir. Yükte oluşan bu artışa yanıt olarak kalp normal koşullarda olduğundan daha fazla çalışır. Mekanik stres ve çeşitli uyaranlara yanıt olarak gelişir ve miyokarddaki yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri de kapsayan yeniden şekillenmeyi (ing. “remodelling”) ifade eder (Selvetella & Lembo, 2005). Kalp hipertrofisinde duvar stresindeki kronik artışı dengelemek için kalp kası hücrelerinin hem kütlesi artar hem de boyutları büyür ve sonuç olarak kalp büyür. Kalbin kütlesinin artması büyük oranda ventrikül ağırlığının artması ile sonuçlanmaktadır (Hunter & Chien, 1999; Kanu Chatterjee, 2013; Sugden & Clerk, 1998).

Kardiyak hipertrofi fizyolojik ya da patolojik olarak iki farklı durumda ortaya çıkabilir. Fizyolojik hipertrofi, kronik egzersiz gibi durumlarda fibrozis ya da hücre ölümü gerçekleşmeksizin meydana gelir. Bu tabloda kalp morfolojisi ve fonksiyonları normal seyreder. Patolojik kardiyak hipertrofide ise interstisyel fibrozis ve hücre

ölümü ile ilişkili olarak kalbin fonksiyonlarında da bozulma görülür (Bianca C Bernardo ve ark., 2010).

Kardiyomiyositler terminal olarak farklılaştığı yani nihai olarak farklılaşmış olgun hücrelere dönüştüğü için kısıtlı bir proliferasyon kabiliyetleri vardır ve bu nedenle kardiyomiyositler yeteri kadar çoğalamadığından kalp, kasılma kuvvetini ve iş yükünü artırmak için hipertrofik yeniden şekillenme yolu (ing. “remodelling”) ile hacmini ve kas kütlesini değiştirir (Kong ve ark., 2014). Bu dinamik yanıtın oluşması sırasında, kardiyomiyositlerde boyut artışı, morfolojik değişiklik, gen ifadesinin değişimi, hücre iskeleti ve hücre dışı matrisinin (ECM) yeniden şekillenmesi gibi durumlar görülmektedir (Gallo ve ark., 2019).

4.8.1. Hücresel Düzeyde Kardiyak Hipertrofi

Kalp, kardiyak miyositler (kas hücreleri) ve miyosit olmayan hücreler (fibroblastlar, endotelial hücreler, mast hücreleri, vasküler düz kas hücreleri vs) grubundan birçok hücre bulunur. Ayrıca bu hücreleri çevreleyen hücre dışı matriksten bulunmaktadır. Ekstraselüler matriks ağı kollajen ağırlıklıdır ve hücresel süreçlerle ilişkili olmasının yanında kasılma kuvveti bakımından da önem taşır. Miyokarda bulunan kollajenin yaklaşık %85'i tip I' kollajendir ve kalın liflerden oluşur. Tip III kollajen ise kalpteki toplam kollajen proteininin %11'ini temsil eder, tipik olarak ince lifler oluşturur ve matriks ağının elastik özelliğini korur. Kollajenlere ek olarak, kardiyak hücre dışı matriks ayrıca glikozaminoglikanlar (hyaluronan gibi), glikoproteinler ve proteoglikanlar içerir (Bianca C. Bernardo ve ark., 2010; Jiang ve ark., 2021; Kong ve ark., 2014).

Ventrikülerdeki kardiyak miyositler, kalpteki tüm hücre sayısının sadece üçte birini oluştururken kalp kütlesinin ise %70-80'ini oluşturur. Memelilerde, doğumda veya hemen sonrasında, kardiyak miyosit hücrelerinin çoğunluğu proliferasyon yeteneğini kaybeder. Bu nedenle kalp büyümesi esas olarak, miyosit sayısında değil, miyosit boyutundaki bir artış yoluyla gerçekleşir (Bianca C. Bernardo ve ark., 2010; Kong ve ark., 2014).

Miyositler, miyofibril demetlerinin bir araya gelmesiyle oluşur. Miyofibriller bünyesinde kalbin temel kasılma ünitesi olan sarkomerlerden oluşan miyofilamentleri bünyesinde barındırır. Miyositler, sol ventrikül etrafında dairesel ve spiral bir konumda bulunur. Kardiyak miyositlerin uçlarına taraflarında bipolar yerleşen interkale diskler, birbiri ile birleşik şekilde bulunarak kardiyak miyositler arasında

elektriksele uyaranın ve dolayısıyla kasılma kuvvetinin iletilmesini sağlamaktadır (Bianca C. Bernardo ve ark., 2010; Sugden & Clerk, 1998).

Kardiyak hipertrofi miyokard enfarktüsü, aritmi ve ani ölüm için bağımsız olarak düşünülen bir risk faktörüdür. Hipertrofi mekanizması ile kasılma yükünde kronik bir artışa yanıt olarak, duvar stresini normalleştirmek ve dinlenme halinde normal kardiyovasküler fonksiyona, yani kompanse büyümeye izin vermek için kalp kütlesinde bir artış oluşur. Bu hipertrofi sürecinin uzamasıyla oluşan progresif fibroz, miyokardiyal kontraktilitenin azalmasıyla birlikte nihayetinde konjestif kalp yetmezliğine (KY) yol açabilir. Veya, miyokard enfarktüsü (MI), bozulmuş sistolik ve diyastolik fonksiyon, ventriküler dilatasyon ve sonuç olarakta konjestif kalp yetmezliği (KY) oluşturabilir (Bianca C Bernardo ve ark., 2010; Stansfield ve ark., 2014).

4.8.2. Kardiyak Hipertrofinin Sınıflandırılması

Kardiyak büyüme veya hipertrofi, genel olarak **fizyolojik veya patolojik** olarak sınıflandırılabilir.

4.8.2.1. Fizyolojik ve Patolojik Hipertrofi

Fizyolojik kalp büyümesi, doğum sonrası büyümeyi, hamileliğe bağlı büyümeyi ve egzersize bağlı kalp hipertrofisini içerir. Buna karşılık, patolojik büyüme, bir hastalık durumunda (örneğin hipertansiyon, kalp kapak hastalığı), miyokard enfarktüsü veya koroner arter hastalığı ile ilişkili iskemi veya kardiyomiyopatiye yol açan anormallik durumunda kronik basınç veya aşırı hacim yüklenmesine yanıt olarak meydana gelir (Bianca C. Bernardo ve ark., 2010; Kanu Chatterjee, 2013; Nakamura & Sadoshima, 2018; Oldfield ve ark., 2020).

Hem fizyolojik hem de patolojik kalp büyümesi, kalp boyutunda bir artış ile ilişkilidir, ancak **patolojik hipertrofi** ayrıca tipik olarak miyosit kaybı ve fibrotik yerleşim kalp fonksiyon bozukluğu, artan kalp yetmezliği ve ani ölüm riski ile ilişkilidir. Buna karşılık, fizyolojik büyüme normal kalp yapısı, normal veya gelişmiş kalp fonksiyonu ile ilişkilidir ve egzersiz veya hamileliğin neden olduğu hipertrofi durumunda tersine çevrilebilir (Bianca C. Bernardo ve ark., 2010; Nakamura & Sadoshima, 2018).

4.8.2.2. Konsantrik ve Eksantrik Hipertrofi

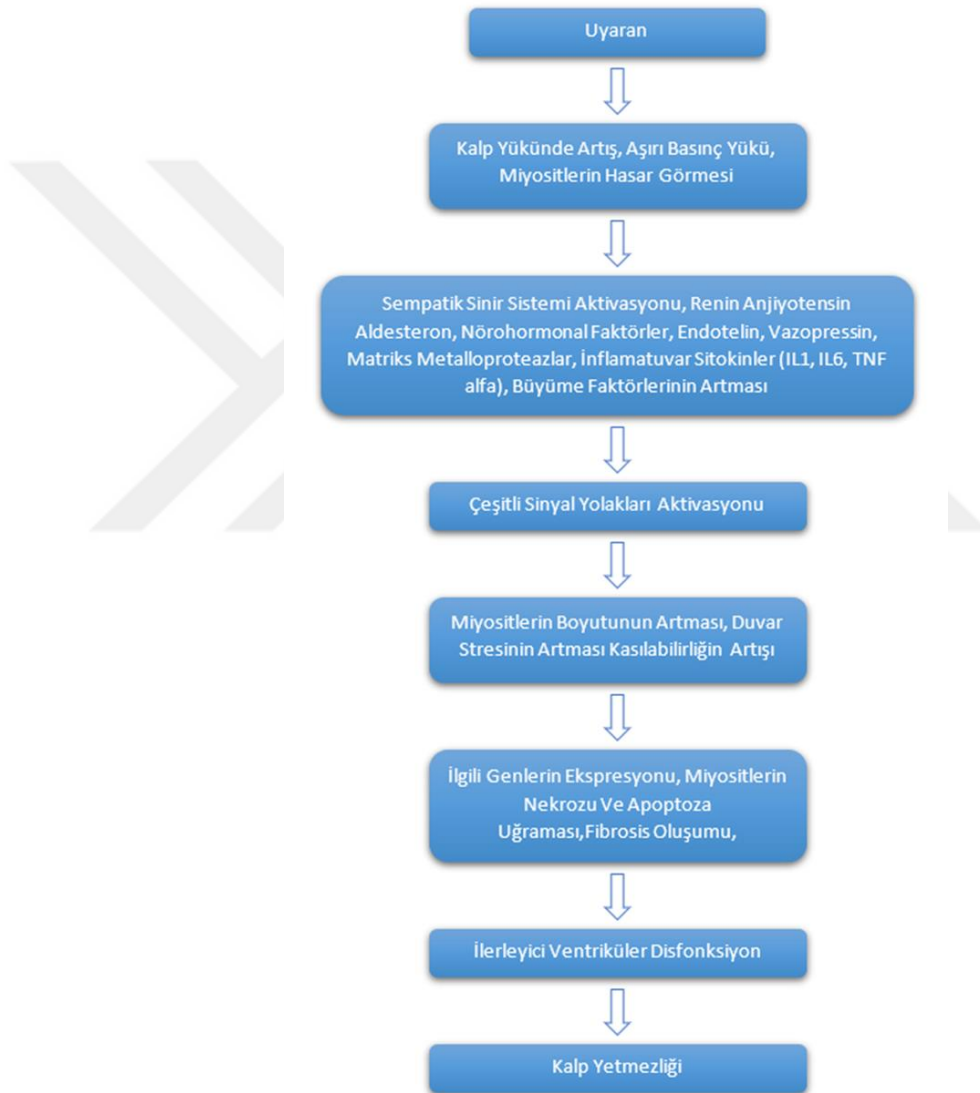
Patolojik ve fizyolojik hipertrofi, temel olarak eşmerkezli veya eksantrik olarak alt bölümlere ayrılmıştır. Bu sınıflandırmalar, başlatıcı uyarana bağlı olan değişiklikleri içermektedir. Konsantrik hipertrofi, oda hacminde küçük bir azalma ile ya da herhangi bir değişiklik olmadan duvar kalınlığının ve kalbin kütlesinin artmasıdır. Konsantrik hipertrofide miyosit hücreleri genişler ve sarkomerlere yeni sarkomerlerin eklenmesi ile oluşur. Eksantrik hipertrofi, odacık hacminin artmasına paralel olarak odacıkların genişlemesi ile kalp kütlesinde meydana gelen artışı ifade eder. Bu durumda duvar kalınlığı normal, azalmış veya artmış olabilir. Eksantrik hipertrofide sarkomerlerin birbirine seri olarak eklenmesi miyosit hücre uzunluğunun artmasına neden olur. Basınç yükünü arttıran patolojik bir uyarın (örneğin aort stenozu, hipertansiyon) sistolik duvar stresinde artışa neden olur ve bu da konsantrik hipertrofi ile sonuçlanır. Buna karşılık, hacim yükünü arttıran bir uyarın (örneğin aort yetersizliği, arteriyovenöz fistüller) diyastolik duvar stresinde bir artışa neden olur ve eksantrik hipertrofi ile sonuçlanır. Klinik çalışmalar, patolojik uyarınların neden olduğu eksantrik kalp hipertrofisinin, konsantrik kalp hipertrofisinden daha büyük bir risk oluşturduğunu göstermektedir (Bianca C. Bernardo ve ark., 2010; Izhak Kehat, 2010; Kanu Chatterjee, 2013; William Grosman, 1975).

Fizyolojik uyarılarda ayrıca konsantrik veya eksantrik hipertrofi üretebilir. Aerobik egzersiz (uzun mesafe koşu, yüzme, dayanıklılık antrenmanı, izotonik veya dinamik egzersiz olarak da adlandırılır) ve hamilelik, kalbe venöz dönüşü artırır ve bu da hacim yüklenmesine ve eksantrik hipertrofiye neden olur. Bu tip eksantrik hipertrofi genellikle odacık büyümesi ve duvar kalınlığında orantılı bir değişiklik ile karakterize edilirken, hastalık durumlarında eksantrik hipertrofi genellikle ventriküler duvarların incelmeleri ile ilişkilidir. Kuvvet, dayanıklılık antrenmanları (ağırlık kaldırma, güreş, ağır cisimleri fırlatma izometrik veya statik egzersiz olarak da adlandırılır), hacim yükü ve eşmerkezli hipertrofi yerine kalp üzerinde bir basınç yükü oluşması ile sonuçlanır (Bianca C. Bernardo ve ark., 2010; Pluim ve ark., 2000).

Normalde kalp kütlesi ile kalbin iş yükü arasında bir denge vardır. Bu iş yükü fazlalaşırsa denge bozulur, kalpte cevap olarak hipertrofi geliştirir. Kalp hipertrofisi birçok sinyal yolağı aracılığıyla gerçekleşebilir. Bunlardan birisi de sempatik sinir sistemi sonucu aktivasyon gösteren katekalominler aracılığıyla etki gösteren beta adrenerjik sinyal yolağıdır (Barros Rde ve ark., 1999). Başlangıçta kalp fonksiyonunun azalmasını tolere edebilmek için sempatik sistem aktivitesi artar. Kalp fonksiyonu

azalmaya devam ettikçe sempatik sinir sisteminin aktivitesi daha çok artar. Böylece plazmada katekolamin miktarı artmasıyla birlikte β -Adrenerjik'ler devamlı uyarılır ve hipertrofi gelişir. Katekolamin miktarının artmasının sonucunda da kalp fonksiyonunda ve hücresel yapısında miyokard nekrozu, monosit inflamasyonu, kollajen birikimi, fibrosis gibi olumsuz durumlar oluşur. Başlangıçta faydalı görülen bu durum sürekli hale gelirse kalp yetmezliği riski oluşur (Patricia C. Brum & Medeiros, 2006).

Meydana gelen bu süreç aşağıdaki gibi özetlenebilir;



Şekil 8 : Kardiyak hipertrofi sürecinde meydana gelen olaylar.

4.8.3. Kardiyak Hipertrofi Belirteçleri (ANP ve BNP)

Natriüretik peptitler (NP'ler) ailesi, atriyal natriüretik (ANP) ve Beyin dokusu kaynaklı natriüretik (BNP) peptidden oluşur. Geniş ölçüde kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve kan basıncının düşürülmesine yönelik kardiyovasküler, endokrin, renal ve vasküler homeostaz süreçlerinin kontrolünü sağlayan, kalp tarafından üretilen bir grup hormon içerir (Ellmers ve ark., 2007; Pandey, 2021).

Her iki hormonda (ANP ve BNP) düzenleyici etkilerini ikinci haberci 3'5' siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretimi ile guanil siklaz A (PGC-A) reseptörünün aktivasyonu aracılığıyla gösterir. Natriüretik peptitlerin (NP'ler) metabolik süreçlerde rol oynamakla birlikte lipid ve glukoz metabolizmasında da önemli derecede etkilidir. Ve böylelikle metabolik ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki patofizyolojik ilişkiye önemli katkılar sağlayabilir. ANP'nin lipolizi ve lipid oksidasyonunu indüklediği, aynı zamanda insülün direnci üzerinde iyileştirici etkileri bulunmuştur (Coué & Moro, 2016; Pandey, 2021; Schlueter ve ark., 2014).

NP'lerin sadece kan basıncı ve kardiyovasküler hastalıkları düzenlemesinin yanında renin anjiyotensin aldosteron sisteminde de (RAAS) antagonistik etki gösterir, miyokardiyal fibrozu ve hipertrofiyi inhibe eder (Pandey, 2021). Bütün bunlara ek olarak endotel hücre fonksiyonu, mitokondriyal biyogenez, kıkırdak büyümesi ve bağışıklık üzerinde de rolleri vardır (Ellmers ve ark., 2007; Pandey, 2021).

ANP, NP'lerin ilk üyesi olarak tanımlanmıştır. Kalp üzerinde doğrudan etkilere sahip olduğundan dolayı endokrin organ olarak da bilinir ve kalp hipertrofisini ve fibrozu inhibe eder. ANP, kardiyomiyositlerin apoptozunu indükler ve fibroblast büyümesini inhibe eder. ANP, anjiyotensin-II, aldosteron ve endotelin-1'in yanı sıra pro-inflamatuar faktör ve makrofaj infiltrasyonu dahil inflammatuar reaksiyonu önleyerek fibroblast göçünü ve proliferasyonunu baskılar. Hem ANP hem de BNP sistemik ve pulmoner kan basıncını azaltır ve kalp yetmezliğinde kardiyak hipertrofiyi inhibe eder. Natriürez, diürez ve vazodilatasyona ek olarak, BNP'nin de kalp üzerinde doğrudan etkileri vardır. BNP, miyokardiyal apoptoz ve nekrozu inhibe etmek, kardiyak hipertrofi ve fibrozisin azaltılmasına yönelik koruma sağlayabilir. BNP ayrıca kalp hasarına karşı immün ve inflammatuar reaksiyonu düzenleyebilir. BNP periferik kandaki monositleri, B lenfositlerini ve natural killer hücrelerini kullanır. BNP, monositlerin kemotaksisini ve makrofaj tarafından inflammatuar moleküllerin üretimini düzenler. BNP, miyokard enfarktüsünden (MI) sonra kardiyak nötrofil infiltrasyonunu ve metalloproteaz-9 ekspresyonunu uyarır ve ayrıca matriksin yeniden

şekillenmesi ve yara iyileşmesi üzerinde doğrudan etkileri olabilir (Cataliotti ve ark., 2006; Fu ve ark., 2018).

Hücrel, biyokimyasal, moleküler ve immünohistolojik çalışmalar, NP'nin ve bunların farklı reseptör alt tiplerinin geniş ölçüde hücre ve dokularda yayıldığı ve hem lokal hem de sistemik olarak pleotropik etki gösterdiği ortaya konmuştur. Kalp hormonları olarak bilinen ANP ve BNP atriyal gerime yanıt olarak salgılanır. ANP konsantrasyonu, BNP konsantrasyonundan yaklaşık 50–100 kat oranında daha yüksek seviyededir. Her iki hormonun da başlıca sentez ve salgı yerleri kardiyak atriyumdur. Aynı zamanda bu hormonlar ventriküllerde de sentezlenir ancak atriyumdan 100- 1000 kat daha düşük seviyededir. Herhangi bir kardiyak hastalık durumunda BNP'nin başlıca sentez yeri ventriküller olur. Miyokard enfarktüsünün erken döneminde bu hormonların seviyesi oldukça yüksektir. ANP ve BNP ekspresyonu, kalp hipertrofisi ve konjestif kalp yetmezliği başladığı zaman atriyum ve ventrikülde de artar. ANP ve BNP benzer fizyolojik ve hemodinamik özellikler gösterir. Ancak BNP nin yarılanma ömrü ANP ye kıyasla daha uzundur ve bu da natriüretik ve diüretik etkiye neden olur. Kardiyak atriyum, diğer kardiyak dokulardan hemen hemen 50-100 kat daha fazla miktarda ANP mRNA seviyeleri ifade eder (Langenickel ve ark., 2000; Pandey, 2021).

NP'ler ve reseptörleri kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi, tedavi edilebilmesi açısından yeni terapötik yaklaşımlar olarak kullanılabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda bu hormonların hücrel, biyokimyasal, moleküler mekanizmaları henüz tam olarak açıklığa ulaşmamıştır. Bundan sonraki süreçlerde transgenik fare modellerinde yapılan çalışmalarla mekanizmaları ve fonksiyonları geliştirilebilir (Pandey, 2021).

Isoproterenol (ISO) de atriyal natriüretik peptidi (ANP) ve beyin natriüretik peptidini (BNP) aktive ederek kardiyak hipertrofiyi tetikleyebilir. Bu nedenle, ANP ve BNP sıklıkla kardiyak hipertrofi belirteçleri olarak kullanılır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ

Bu çalışma hayvan deneyleri ile yapılmış olup farelerin deney hayvanı olarak kullanıldığı “in-vivo deneysel bir çalışmadır”. Bunun yanında farelerden elde edilen doku örnekleri histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

5.2. ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI YER ve SÜRESİ

Çalışmamız Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen fareler kullanılarak, 2021-2022 yıllarında Temmuz-Ocak ayları arasında Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD ve Histoloji ve Embriyoloji AD laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2021-014 no’lu proje ile desteklendi.

5.3. ARAŞTIRMANIN EVRENİ ve ÖRNEKLEMİ

Çalışmamızda deney hayvanları merkezinden temin edilen 32 adet Balb-C türünde 8-12 haftalık, yaklaşık 25-32 gr ağırlığında erkek fareler kullanılmıştır. Fareler tel kafeslerde $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığa sahip odada, %50-70 nem altında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık doğal döngüsünde, “ad-libitum” (serbest yem ve su alınması) standart laboratuvar yemi ve çeşme suyu ile beslenerek, stres ve gürültüden izole bir şekilde çalışmaya alındılar.



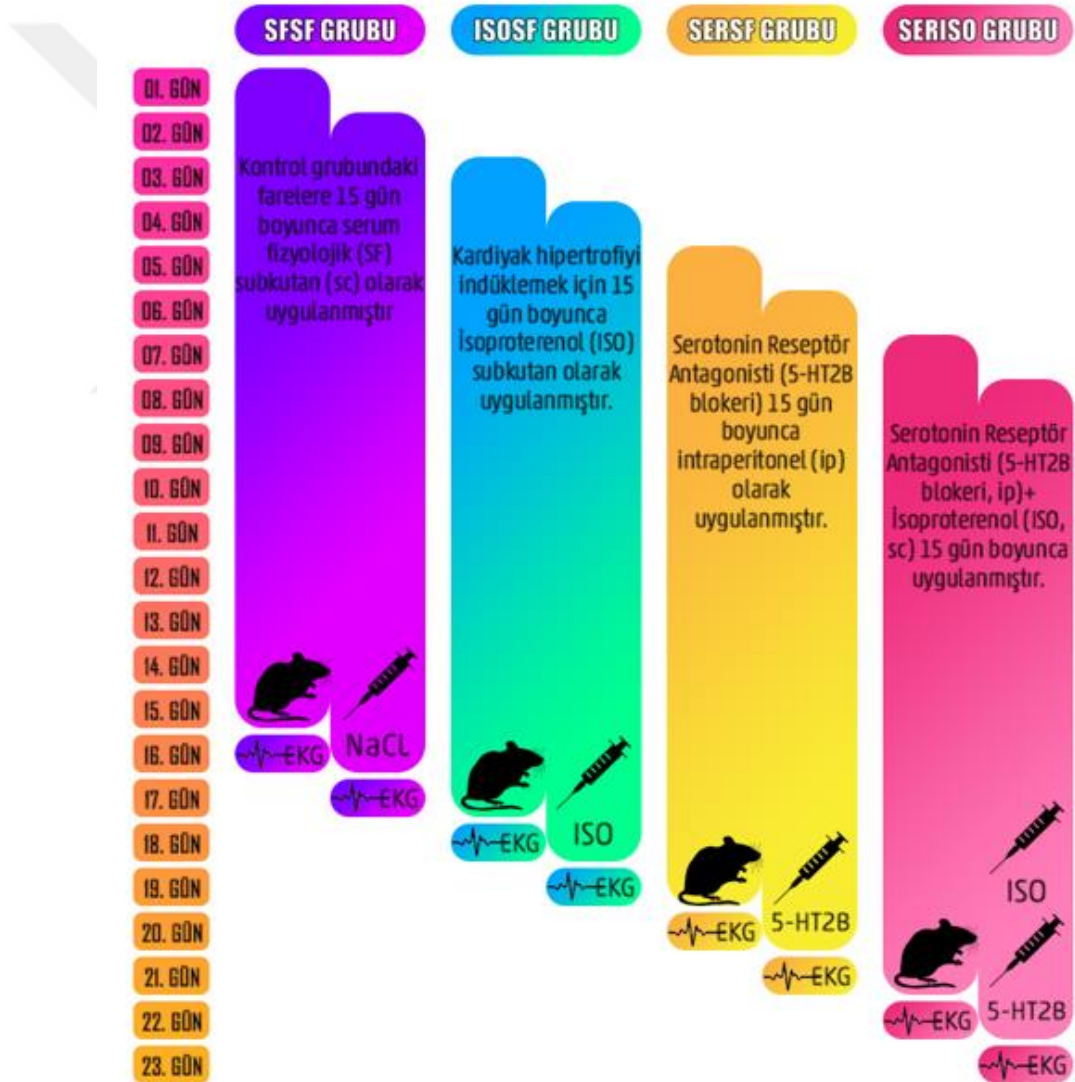
Resim 1. Çalışmamızda kullandığımız erkek farelerin ayrı ayrı kafeslerde barınmaları.

5.3.1. Deneysel Kardiyak Hipertrofi Modelinin Oluşturulması

Deneysel kardiyak hipertrofi modeli oluşturması amacıyla Balb-C cinsi erkek farelerde Isoproterenol (ISO) kullanıldı. Bunun için 15 gün boyunca farelere % 0,9'luk NaCl'de çözdürülen Isoproterenol (ISO) (I6504-1G, Merck) 30 mg/kg/gün 0,2 ml olacak şekilde subkutan (sc) olarak enjekte edildi (Bageghni ve ark., 2018; Gan ve ark., 2019).

5.3.2. Çalışma Grupları

Balb-C fareler tartılarak rastgele dört gruba ayrılmıştır. Şekil 9 deney hayvanlarının gruplanmasını zamansal olarak farklı şekilde uygulanan kimyasalları ile göstermektedir.



Şekil 9. Deney protokolünün şematik gösterimi.

Grup 1 (n=6) (SFSF): Kontrol grubundaki farelere 15 gün boyunca subkutan (sc) 0,2 ml % 0,9 NaCl çözeltisi (Serum Fizyolojik (SF)) enjekte edilmiştir.

Grup II (n=9) (ISOSF): Kardiyak hipertrofiyi indüklemek için, 15 gün boyunca 0,2 ml 30 mg/kg/gün sc olarak Isoproterenol hidroklorid (ISO)(I6504-1G, Merck) β -adrenerjik reseptör stimülasyonu subkutan olarak uygulanmıştır (Bageghni ve ark., 2018; Gan ve ark., 2019).

Grup III (n=8) (SERSF): Serotonin Reseptör Antagonisti grubunda 0,2 ml 5mg/kg/gün serotonin reseptör antagonisti (5-HT2B) (SB-20474, Cayman medical) Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözündürülerek intraperitonel (ip) olarak uygulanmıştır (W. Janssen ve ark., 2015).

Grup IV (n=9) (SERISO): Bu grupta Serotonin Reseptör Antagonisti + Isoproterenol kullanılmıştır. Yani, hem 5-HT2B bloker (0,2 ml, 5 mg/kg/gün, ip) hem de ISO (0,2 ml, 30 mg/kg/gün, sc) uygulanmıştır.

Şekil 9 da gösterildiği gibi uygulamalar her bir grup için 15 gün devam etti fakat birer gün farklı zaman dilimlerinde yapıldı. 1. gün ve 15. günde farelerin vücut ağırlıkları ölçüldü, 16. gün anestezi uygulandı. Bu amaçla 50 mg/kg Thiopental-Sodyum ip verildi ve anestezi altında EKG kayıtları aşağıda tarif edildiği gibi yapıldı. Anesteziye bağlı hipotermi oluşumunu engellemek için hayvanlar ısıtıcı tabla üzerine alındı. Rektal sıcaklık takip edilerek 37° de stabilizasyonu sağlandı. Anestezi durumu pedal refleksleri ile kontrol edildi. EKG kayıtları alındıktan sonra kalp dokusu imminohistokimyasal değerlendirme amacıyla bir bütün olarak çıkarıldı.



Resim 2. İntraperitonel olarak kimyasal / ilaç uygulaması.

5.4. ARAŞTIRMA SORULARI veya ARAŞTIRMA HİPOTEZLERİ

Farelerde “kronik” isoproterenol uygulaması ile kalp hipertrofisi oluşturulabileceği ve oluşması düşünülen kalp hipertrofisinin Serotonin 5-HT_{2B} reseptör blokeri uygulaması ile kısmen engellenebileceği hipotez olarak düşünüldü. Bu hipotezin test edilmesi için aşağıdaki yöntemlerin uygun olup olmaması araştırıldı: **i.** kalp ağırlığı **ii.** histokimyasal yöntemler ve **iii.** Vektörkardiyografik yöntemler. Son olarak bu üç yöntem arasında bir korelasyon olabileceği düşünüldü.

5.5. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

Analog-Dijital dönüştürücülü bir bilgisayar kullanılarak EKG kayıtları yapılmıştır (LabChart 7, PowerLab 8/35, ‘ADInstruments’-Australia). EKG voltaj ölçümleri şeklinde elde edilen sayısal datalar bilgisayar ortamında kayıt edilmiştir daha sonra bu datalarda üzerinde sayısal ölçümler yapılmıştır. ImageJ-Fiji görüntüleme bilgisayar programı kullanılarak Masson trikrom boyama görüntüleri bu programa aktarıldıktan sonra alan ölçümü yapılmış ve sayısal veriler elde edilmiştir. İmmünohistokimya boyama ölçümleri de mikroskop üzerinde hücre sayımı yapılarak H-skor yöntemi [H-Skor: $\sum P_i (i+1)$ (P_i : % pozitif boyanmış hücre sayısı; i : boyanma şiddeti)] ile hesaplanarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

5.6 VERİ TOPLAMA YÖNTEMİ

İki kanallı voltaj kaydı ile EKG verileri elde edildi, bu amaçla ‘LabChart 7’ yazılımı kullanıldı (‘ADInstruments’-Australia). EKG kayıtlarında her bir kanal için 4000 Hz örnekleme hızı tercih edildi. Rektal sıcaklık takibi analog termometre ile yapıldı. Kalp ağırlıkları dijital hassas terazi ile ölçüldü. Kalp bir bütün olarak çıkarıldıktan sonra parafin bloklarda muhafaza edildi. Miyokard dokularına ait kesitler Rotary Mikrotom ile lam üzerine alındı ve daha sonra ileri histolojik incelemeler ve immunohistokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

5.6.1. EKG Kaydı

Tüm gruplarda frontal düzlemde vektörkardiyografi elde etmek için (fVCG) anestezi altında iki kanallı EKG (DII ve DIII) kayıtları yapılmıştır. Toplam kayıt süresi her bir deneyde beş dakika ile sınırlandırılmıştır. EKG kaydı için 0,3 mm çapında akupunktur iğnelerinden yapılmış elektrotlar deri altına yerleştirilmiştir. Resim 3’de görüldüğü gibi iğne ekstremite elektrotları kullanılarak DII ve DIII derivasyonları kayıt edilmiştir. Sağ alt ekstemiteye de iğne topraklama elektrotu yerleştirilmiştir.



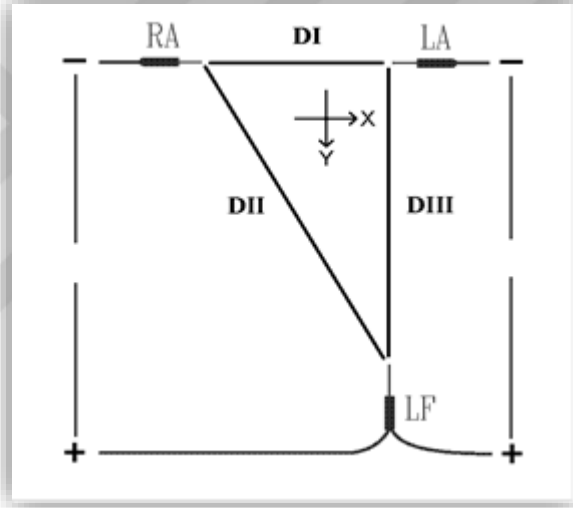
Resim 3. EKG kaydı için elektrotların konumları (sol) ve Bilgisayarlı EKG kayıt sistemi (sağ).

Tüm grupların EKG kayıt işlemleri bittikten sonra her bir farenin kalbinin immüno-histolojik incelemesi daha sonra takip eden günler içinde yapıldı. Sakrifiye edildikten sonra fare kalpleri çıkarıldı. Kalpler taze hazırlanmış fosfat tamponlu (PBS) çözeltide yıkandı ve tartıldı. Kalp hipertrofisinin derecesini tahmin etmek için vücut ağırlığı (BW) ve kalp ağırlığı (HW) ölçüldü, ardından bu değerler HW/BW oranını

hesaplamak için kaydedildi. Daha sonra tüm gruplarda histokimyasal, immünohistokimyasal inceleme için kalp dokusu kesitleri alındı. İmmünohistokimyasal incelemeler Anti-ANP, Anti-BNP hipertrofi parametreleri ile yapıldı. Kollajen birikiminin ve kardiyak fibrozisin değerlendirilmesi için Masson trikrom boyama yapıldı.

5.7.2. Fare Vektörkardiyografi Yöntemi

Farede frontal plan Vektörkardiyografi (fVCG) kaydı elde etmek için EINTHOVEN üçgeni diye bilinen ve sağ-kol, sol-kol ve sol-bacağa bağlanan elektrotların oluşturduğu eşkenar üçgen modifiye edilmiştir. Modifiye edilen Einthoven üçgeni 30, 60, ve 90 dereceli açılara sahip dik üçgen olup Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. Farede frontal plan Vektörkardiyografi amacıyla kullanılan modifiye EINTHOVEN üçgeni (RA: Sağ kol, LA: Sol kol, LF: Sol bacak).

Şekil 10'da gösterilen derivasyon sisteminden frontal plan vektörkardiyografi elde etme yöntemi M. Özbek'in BAP-2018-026 numaralı MCBÜ projesi çerçevesinde geliştirilmiştir. Şekil 10'da gösterildiği gibi DII derivasyonu için negatif iğne-elektrot sağ-kol, pozitif iğne-elektrot ise sol-bacak cilt altına tespit edilmiştir. DIII derivasyonu için negatif iğne-elektrot sol-kol, pozitif iğne-elektrot ise yine sol-bacak cilt altına tespit edilmiştir. Tüm kayıtlarda 4-6 mm uzunluğunda iğne elektrotlar kullanılmıştır. DII ve DIII derivasyonlarının eş zamanlı iki kanallı olarak elde edilen EKG kayıtları daha sonra kullanılmak üzere bir Microsoft-EXCEL bilgisayar dosyasına dönüştürülerek kayıt edilmiştir. DI derivasyonu kaydı DII ve DIII derivasyonlarının sayısal kayıtlarından elde edilmiştir. Bunun için bu iki derivasyon arasındaki cebirsel

fark alınmıştır. Bilindiği gibi elektrot pozisyonları dikkate alarak DI, DII ve DIII derivasyonlarına ait EKG kayıtlarında anlık potansiyeller arasındaki cebirsel ilişki “DII = DI + DIII” şeklindedir. Ve bu eşitlikten $DI = DII - DIII$ bağıntısı elde edilerek DI derivasyonu matematiksel olarak hesaplanarak ortaya çıkarılmıştır. Frontal vektörkardiyografi (fVCG) grafiklerini oluşturacak olan X ve Y derivasyonları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır, ve SCILAB yazılımı kullanılarak grafikler elde edilmiştir (M. Özbek, 2018):

$$X(i) = 1,878.DI(i) + 5,365.DII(i) - 2,890.DIII(i)$$

$$Y(i) = -3,786.DI(i) + 7,862.DII(i) + 2,556.DIII(i)$$

Yukarıdaki ifade de X (i) ve Y (i) sırasıyla X ve Y derivasyonlarını ifade eden zaman dizileridir. I (i), II (i), ve III (i) ise sırasıyla DI, DII ve DIII derivasyonlarını ifade eden zaman dizileridir. DI, DII ve DIII sayısal dizilerinin her birinde yukarıda örnekleme hızına göre iki örnek arası zaman aralığı $\frac{1}{4}$ ms dir. X (i) ve Y (i) dizilerinden bileşke kalp vektörünün uzunluğu aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$R(i) = \sqrt{X(i)^2 + Y(i)^2}$$

R(i) dizisi “R” derivasyonu olarak isimlendirilmiş olup EKG intervallerinin ölçümünde kullanılacaktır (bkz. M. Özbek, 2018).

5.7.3. Dokuların Histokimya Ve İmmünohistokimya İçin Hazırlanması

5.7.3.1. Parafin Takip Protokolü

Tüm gruplarda farelerin sakrifiye edilmesinin ardından deneklere ait olan kalp dokuları hızlı bir şekilde %10 formalin solüsyonu içine alınarak 48 saat süreyle tespit (fikse) edilmiştir. Daha sonra rutin ışık mikroskopi analizleri için tespit solüsyonunu uzaklaştırmak amacıyla bir gece akar su altında bekletildi. Tüm örnekler parafin doku yöntemi ile takip edilerek dehidratasyon işlemi için %60-%70-%80-%100 derecesi giderek artan alkol serilerinden geçirildi (1.00983.2511, Merck, Darmstadt, Almanya). Ardından ksilen (Surgipath, Birleşmiş Milletler) ile şeffaflandırılması sağlanarak parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (RM2245, Leica Microsystems, Almanya) ile beş µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler histokimyasal ve immünohistokimyasal analizler için kullanıldı. Tablo 1’de Parafin Takip Protokolünün detayları verilmektedir.

Tablo 1. Parafin Takip Protokolü.

İŞLEM BASAMAKLARI	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Tespit	%10'luk Formalin	48 saat
	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	%60'lık Etil Alkol	30 dakika
	%70'lik Etil Alkol	30 dakika
	%80'lik Etil Alkol	30 dakika
	%90'lık Etil Alkol	30 dakika
	%100'lük Etil Alkol	1 saat
	%100'lük Etil Alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Alkol–Ksilen	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
İnfiltrasyon	Ksilen–Parafin	30 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

5.7.3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Tüm deneklere ait olan kalp doku örnekleri etüvde 60 derecede bir gece deparafinize edildi. Ardından ksilen ile parafinin uzaklaştırılması sağlandıktan sonra rehidratasyon işlemi için ikişer dakika süreyle giderek azalan alkol serilerinden (%95-%80-%70-%60) geçirildi. Alkolün uzaklaştırılması için beş dakika akar su altında tutulduktan sonra çekirdek boyaması için hematoksilende beş dakika tutuldu. Fazla boyanın uzaklaştırılması için beş dakika akar su altında yıkama yapıldı. Diferansiyasyon işlemi için 1-2 saniye %1 lik asit alkole daldırılıp çıkarılan kesitler tekrar beş dakika akar su altında yıkandı. Sitoplazma boyaması için eozinde üç dakika bekletildi ardından akar su altında beş dakika yıkama işlemi yapıldı. Dehidratasyon işlemi için %80 ve %95 lik alkolde birer dakika tutulup havada kurutma yapıldıktan sonra şeffaflandırma işlemi için bir saat ksilende tutuldu. Entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelenerek değerlendirme yapıldı. Tablo 2’de Hematoksilen –Eozin Boyama Protokolünün detayları verilmektedir.

Tablo 2. Hematoksilen –Eozin Boyama Protokolü.

İŞLEM BASAMAKLARI	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60 °C Etüvde	1 Gece
	Ksilen	1 Saat
Rehidratasyon	%96'lık Etil Alkol	2 Dakika
	%80'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%70'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%60'lık Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Boyama	Hematoksilen	5 Dakika
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Diferansiyasyon	Asit–alkol	1 saniye
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Boyama	Eozin	3 Dakika
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Dehidratasyon	%80'lik Etil Alkol	1 Dakika
	%96'lık Etil Alkol	1 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 Saat
Kapama	Entellan	

5.7.3.4. İndirekt İmmünoperoksidaz Boyama Yöntemi

Tüm deneklere ait olan kalp doku örnekleri etüvde 60 derecede bir gece deparafinize edildi. Daha sonra bir saat ksilende tutularak şeffaflandırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından rehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirildi (%95-%80-%70-%60). Daha sonra beş dk distile suda bekletildi. Dakopen ile sınırlandırılan kesitler permeabilizasyon işlemi için tripsin solüsyonu içinde 37 derecede 10 dk tutularak inkübasyonu sağlandı. Daha sonra doku endojen peroksidadını inhibe etmek amacıyla beş dk %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulanmıştır. Üç defa beşer dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; phosphate buffer solution) ile yıkanan kesitler bloklama amacıyla 10 dakika bloklama solüsyonu ile muamele edilmiştir. Bloklama solusyonu yıkama işlemi yapılmadan dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar Anti-ANP ve Anti-BNP 1:200 ve 1:100 dilüsyonlarda kullanılmak üzere bir gece +4° de inkübe edilmiştir. Ertesi gün PBS solüsyonu ile üç defa yıkanan kesitler, 10 dk biotin-peroksidad sekonder antikorunda tutulduktan sonra 3x5 PBS yıkama işlemi ardından 10 dk süreyle streptavidin-peroksidad uygulandı. Yine PBS solüsyonu ile üç defa yıkanan kesitlere

immünoreaktiviteninin görünürlüğünü saptamak için iki dk DAB kromojeni uygulandı. Aynı zamanda İmmünoreaktivitenin spesifikliğini belirlemek için primer antikorlar kullanılmayarak negatif kontrol boyamaları da yapıldı. Mayers Hematoksilen ile artalan boyaması yapılarak distile su ile üçer defa beş dakika yıkama işlemini takiben %80 ve %95 alkollerden geçirilip ksilen ile de şeffaflaştırma işlemi sağlandıktan sonra kapatma medyumunu olan entellan kullanılarak kapatıldı. Işık mikroskobu altında incelenerek her bir örneğin immünoreaktivitesinin boyanma yoğunlukları 0 (boyanma yok, negatif), zayıf şiddetli boyanma (+), orta şiddetli boyanma (++), güçlü şiddetli boyanma (+++) olarak değerlendirilerek H-Skor analizi yapıldı. Tablo 3' de İndirekt İmmünoperoksidaz Boyama Protokolü sunulmaktadır.



Tablo 3. İndirekt İmmünoperoksidaz Boyama Protokolü.

İŞLEM BASAMAKLARI	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
	Ksilen	1 Saat
	Ksilen	1 Saat
Rehidratasyon	%96'lık Etil Alkol	2 Dakika
	%80'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%70'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%60'lık Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Distile su	10 Dakika
	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
Permeablizasyon	%0,5'lik Tripsin Solüsyonu	37°C de 10 dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
Endojen Peroksidaz İnhibasyonu	%3'lük Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	5 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
	Bloklama Solüsyonu	10 dakika
İnkübasyon	Primer Antikor	18 saat +4°C'de
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
	Sekonder Antikor (Biotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz)	10 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
	Streptavidin	10 Dakika
İmmünoreaktivite	Diaminobenzidine (DAB)	2 Dakika
Artalan Boyama	Mayer's Hematoksilen	5 dakika
Dehidratasyon	%80'lik Etil Alkol	1 Dakika
	%96'lık Etil Alkol	1 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 Saat
Kapama	Entellan	

5.7.3.5. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Bu boyama yöntemi kalp, deri gibi dokularda kollajen lifleri saptamak için formalin ile fikse edilmiş, parafine gömülmüş kesitlerde ya da frozen kesitlerde kullanılır. Bu boyama yönteminde kollajen lifler mavi, çekirdekler siyah ve sitoplazma kırmızı renkte boyanır.

Tüm deneklere ait olan kalp doku örnekleri etüvde 60 derecede bir gece deparafinize edildi. Ardından ksilen ile parafinin uzaklaştırılması sağlandıktan sonra rehidratasyon işlemi için (%95-%80-%70-%60) ikişer dakika süreyle giderek azalan alkol serilerinden geçirildi. Alkolün uzaklaştırılması için beş dakika akarsu altında bekletildi.

Masson trikrom kit içerisinde bulunan Weigert's Hematoksilen C solüsyonunda 10 dakika tutuldu ve bunu takiben distile su ile yıkandı. Ardından Ponceau asit fuksin D solüsyonunda 10 dakika bekletildi ve boyanın uzaklaştırılması için distile su ile yıkandı. Farklılaşma için fosfomolibdik-fosfotungustik asit solüsyonunda E 10 dakika kollajen kırmızı renk boyanmayana kadar tutuldu. Ardından yıkama yapılmaksızın anilin blue solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandı ve dehidratasyon işlemi için %80 ve %95 lik alkolde birer dakika tutulduktan sonra şeffaflandırma işlemi için bir saat ksilende tutuldu. Kapatma solüsyonu ile kapatıldıktan sonra ışık mikroskobu altında incelendi. Tablo 4'de Masson Trikrom Boyama Protokolü verilmiştir.

Tablo 4. Masson Trikrom Boyama Protokolü.

YAPILAN İŞLEM	SÜRE
Deparafinizasyon	1 gece
Ksilen	1 saat
%96'lık Etil Alkol	2 Dakika
%80'lik Etil Alkol	2 Dakika
%70'lik Etil Alkol	2 Dakika
%60'lık Etil Alkol	2 Dakika
Weigert's Hematoksilen C	10 Dakika
Distile su	5 Dakika
Ponceau Asit Fuksin D	10 Dakika
Distile su	5 Dakika
Fosfomolibdik-Fosfotungustik Asit	10 Dakika
Anilin Blue	10 Dakika
Distile su	5 Dakika
%80 lik Etil Alkol	1 Dakika
%95 lik Etil Alkol	1 Dakika
Ksilen	1 saat
Entellan Kapama	

5.8 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ ve İSTATİSTİK YÖNTEMLER

EKG verilerin değerlendirilmesi için sayısal frontal plan Vektörkardiyografi (fVCG) grafikleri kullanılmıştır. Bu amaçla R derivasyonunda EKG ölçümleri yüksek çözünürlüklü ekran kullanılarak önce analog olarak görsel işaretleme yapılarak tamamlanmıştır. Ayrıca fVCG grafiklerinden aks hesaplamaları da önce analog olarak görsel işaretleme yaparak tamamlanmıştır.

İmmünohistokimya için her deneğe ait örneklerin immünoreaktivitesinin boyanma şiddeti 0 (boyanma yok), zayıf şiddetli boyanma (+), orta şiddetli boyanma (++), güçlü şiddetli boyanma (+++) olarak değerlendirilmiştir. Her grup için 100 hücre sayılarak pozitif olarak boyanan hücreler semi kantitatif H-Skor değerleri hesaplandı. [H-Skor: $\sum P_i (i+1)$ (P_i : % pozitif boyanmış hücre sayısı; i : boyanma şiddeti)]. Sonuçların değerlendirilmesi için istatistiksel analiz IBM SPSS Statistics version 26,0 (IBM Corp, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar normal dağılım göstermediği için non parametrik test olan Kruskal Wallis ANOVA ve bunun sonucunda grupların ikili karşılaştırılmalarında Mann Whitney U testi uygulandı. Verilere ilişkin değerler medyan, minimum, maksimum olarak tablo halinde sunuldu.

İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ olarak kabul edildi. Grafikler Graphpad Prism8 programı kullanılarak çizildi.

Masson trikrom boyaması sonrasında fibroz oluşumunun kantitatif olarak değerlendirilmesi için ImageJ Fiji görüntü analiz programı kullanılarak alan ölçümü yapıldı ve fibrotik bölgelerin yüzdesi saptandı. Analiz için her gruptan 2x büyütmede 'jpeg' formatında görüntüler kullanıldı. Program üzerinde analyze sekmesi altından set scale seçeneğinden piksel kısmından birim mikrometre (μm) cinsine dönüştürüldü ve ölçeklendirme işlemi yapıldı. Ardından Image sekmesi altından color bölmesi ve oradan color deconvolution Masson trikrom boyama seçeneği işaretlendi. Ardından tekrar Image sekmesinden adjust kısmından threshold bölmesi seçilerek fibrotik alan manuel olarak ayarlandı. Analyze sekmesinden measure kısmı seçilerek fibrotik bölgenin yüzdesi hesaplandı.

5.9 ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI

Çalışmamızda deney gruplarında denek sayısının az olması açıktır ki istatistik sonuçlarını etkileyecektir. Çalışmamıza hem ekokardiyografik analiz hem de moleküler yöntemlerin dahil edilmesi elde edilen verilerin daha ayrıntılı olarak karşılaştırılmasını sağlayabilirdi. Moleküler yöntemlerden, Western Blot tekniği ile protein ekspresyon karşılaştırılması ve RT-PCR yöntemi ile gen ifadesindeki değişikliklerin belirlenmesi bu çalışmanın elde edilen mevcut verilerini destekleyebilirdi.

5.10 ARAŞTIRMANIN ETİK YÖNÜ

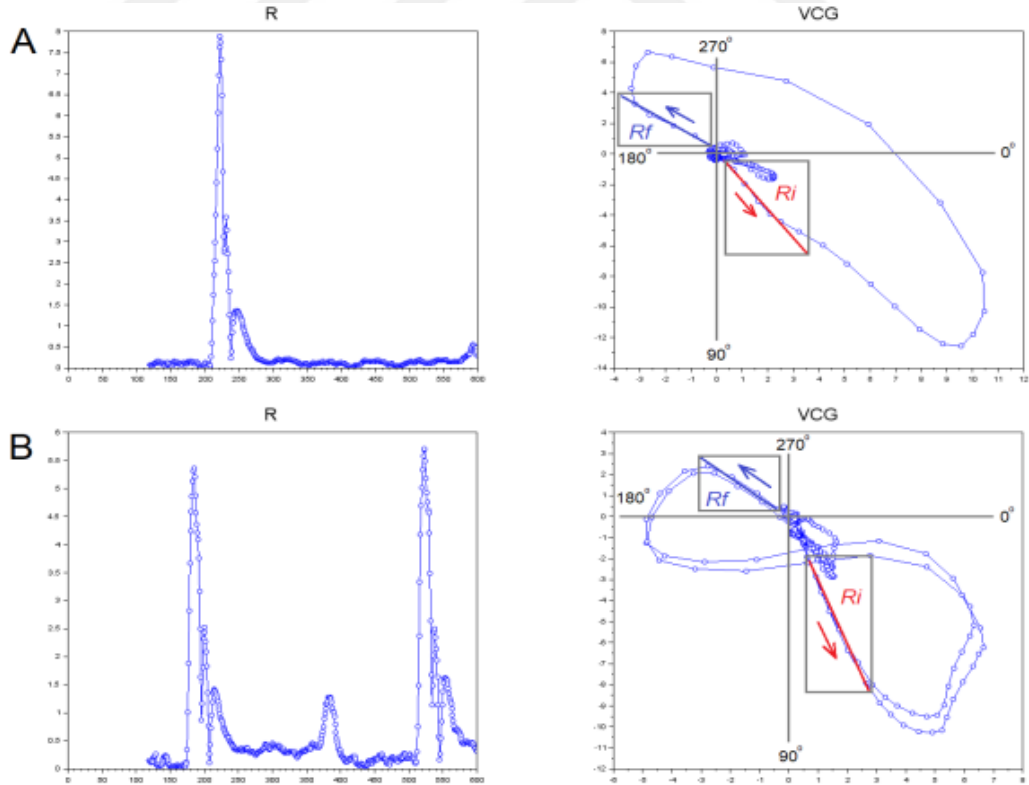
Araştırmanın yürütülmesi sırasında bilimsel ve evrensel ilkelere bağlı kalınmıştır. Tüm hayvan deneyleri, resmi kural ve yönetmeliklere göre yapılmıştır. Çalışmamız Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'nun 21.12.2020 tarihli 77 637 435 karar numaralı onayı ve kontrolü ile gerçekleştirilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. ELEKTROKARDİYOĞRAFİK BULGULAR

6.1.1. VCG Değerlendirmelerinde Kalp Aksı Değişimleri

Şekil 11 iki ayrı fareden elde edilmiş R derivasyonu EKG kaydı ve frontal planer VCG (fVCG) örneklerini göstermektedir. Hem Şekil 11A hem de 11B’de sol tarafta “R derivasyonu” sağda ise bu kayıda ait fVCG verilmiştir; Şekil 11A’daki grafikler SFSF grubundan bir örnek iken Şekil 11B’deki grafikler SERSF grubundan bir örnektir; fVCG noktalamaları PR intervalinin yaklaşık olarak ortasından itibaren başlatılmıştır; PR intervali izoelektrik hattadır diye kabul edilmiştir; Şekil 11A’da bir kalp atımı Şekil 11B’de ise iki kalp atımı boyunca elde edilen kayıtlar verilmektedir, buna uygun olarak, A da tek B de çift QRS kompleksine ait “lup” lar elde edilmiştir. Şekil 11A’daki QRS lup formu Şekil 11B’den farklıdır; A tek bir ovalimsi döngü içerirken B de döngü “kelebek” şeklinde iki tane lup içermektedir. Diğer farelerde de QRS lup formlarının farklılığı görülmüştür yani QRS lup formları fareden fareye değişkenlik göstermektedir.



Şekil 11. A: SFSF grubundan örnek bir R derivasyonu (sağ taraf) ve ona ait fVCG (sol taraf), B: SERSF grubundan örnek bir R derivasyonu (sağ taraf) ve ona ait fVCG (sol taraf).

Fakat tüm farelerin QRS lupunun başlangıcında ‘ventriküler depolarizasyon’ kalp aksı açısı ki “Ri” olarak isimlendirilmiştir, fareden fareye pek değişiklik göstermemektedir, grup ortancalarının değerleri 60-70 derece arasında yığılma göstermektedir (Tablo 5). QRS lupunun son kısmına denk gelen ‘ventriküler depolarizasyon’ kalp aksı “Rf” olarak isimlendirilmiştir. Rf değeri de aşağıda tartışılacağı gibi genel olarak stabildir fakat muhtemelen isoproterenole bağlı oluşan iskemiden etkilenmektedir.

Tablo 5’te tüm gruplarda Ri ve Rf akslarının ortanca değerleri verilmektedir. Kruskal Wallis ANOVA sonuçlarına göre Rf değeri farklı görünmektedir: Rf değeri SFSF ve SERSF gruplarında sırasıyla 229,20 ve 226,90 derece iken SERISO ve ISOSF gruplarında sırasıyla 248,94 ve 254,69 derece olarak bulunmuştur yani Rf değeri isoproterenol alan farelerde biraz daha büyük bulunmuştur.

Tablo 5. Tüm Gruplardaki fVCG deki ventriküler depolarizasyon başlangıç aks (Ri) ve final aks (Rf) değerleri.

GRUPLAR					
Başlangıç ve final aks değerleri	SFSF Ortanca (min-max)	ISOSF Ortanca (min-max)	SERSF Ortanca (min-max)	SERISO Ortanca (min-max)	Anlamlılık
Ri	68,26 (45,18-79,21)	61,78 (55,70-72,44)	70,53 (50,13-80,97)	70,16 (40,20- 78,98)	p= 0,354 ns
Rf	229,20 (211,76- 241,71)	254,69 (206,70- 294,37)	226,90 (215,50- 263,83)	248,94 (213,54- 330,20)	p= 0,034

Non-Parametric “Kruskal Wallis” ANOVA testine göre p değeri belirlenmiştir (p<0,05).
ns: istatistiksel anlamlı olmayan fark

Tablo 6’da ise Tablo 5’te sunulan Rf değerlerinin gruplar arasında istatistiksel kıyaslaması test edilmiştir. Bu amaçla Mann Withney-U testi uygulanmıştır. SFSF grubu ile SERISO grubu arasında yapılan kıyaslamada P değeri 0,024 bulunmuştur, p<0,05 anlamlı olduğuna göre burada Rf’nin istatistiksel olarak bir farklı olduğundan söz edilebilir. Ancak “Düzeltilmiş Anlamlılık “ değerine bakıldığında P değeri 0,143 seviyesine yükselmektedir yani buna değere göre ise fark istatistiksel anlamlı çıkmamaktadır. Benzer bir durum SERSF ve SERISO grupları arasında ortaya çıkmıştır, yani P değeri 0,018 bulunmuştur fakat “Düzeltilmiş Anlamlılık “ seviyesini gösteren P değeri 0,143 olmaktadır. Bu sonuçlara göre Tablo 6’daki değerler bizim için ne ifade etmelidir? Genel olarak Tablo 6’daki sonuçlar isoproterenol içeren deney hayvanlarında QRS lup grafisinden ölçülen Rf aks değeri farklılık göstermektedir,

ancak hayvanlar arasındaki bireysel farklılıklar istatistiksel anlamlılığı bozucu bir etki oluşturmaktadır. Böylece isoproterenol ventriküler depolarizasyonun son kısmını etkilemektedir denebilir. Burada özellikle SERSF ve SERISO grupları arasındaki değerin 0,018 olması göz önüne alınırsa Serotonin reseptör antagonisti uygulamasının Rf üzerine isoproterenolün etkisini ortadan kaldıramamıştır.

Tablo 6. Ventriküler depolarizasyonun final kısmında ölçülen ‘Rf’ değerlerinin gruplar arasında istatistiksel karşılaştırmaları.

Gruplar	Anlamlılık (p)	Düzeltilmiş Anlamlılık (dp)
SFSF - SERSF	,934	1
SFSF - ISOSF	,082	,489
SFSF - SERISO	,024	,143
SERSF - ISOSF	,072	,433
SERSF - SERISO	,018	,110
ISOSF - SERISO	,563	1

Mann Withney-U testine göre kıyaslama yapılmıştır (p), Bonferroni'ye göre anlamlılık seviyesi düzeltilmiştir (dp).

6.1.2. Kalp Ağırlığı / Vücut Ağırlığı Oranı

Tablo 7’de kalp ağırlığındaki değişim vücut ağırlığına oranlanarak varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Burada kalp ağırlığı “mg” olarak, vücut ağırlığı ise “g” olarak alınmıştır ve “kalp ağırlığı/vücut ağırlığı” oranı (Ka/Va) fiziksel olarak bir kalp hipertrofisi indeksi olarak düşünülmüştür. Ka/Va indeksi SFSF ve SERSF gruplarında sırasıyla 4,54 ve 4,49 olarak bulunmuştur yani buradaki değerler oldukça birbirine yakındır. SERISO için bulunan Ka/Va değeri 5,54 olup SFSF ve SERSF’daki değerlerden yüksektir, fakat ISOSF grubunun Ka/Va değeri 6,34 olup tüm gruplar içinde en yüksektir. Tablo 8’de grupların ikili karşılaştırmaları Mann Withney-U testi ile istatistiksel olarak yapılmış ve yukarıda bahsedilen farkların anlamlı olup olmadığı daha kesin olarak ortaya çıkmıştır: Özellikle ISOSF grubu Ka/Va değeri hem SFSF deki değerden hem de SERSF’deki değerden farklıdır, düzeltilmiş P değeri sırasıyla $P<0,008$ ve $P<0,001$ olarak ortaya çıkmaktadır. SERSF ve SERISO gruplarının Ka/Va değeri ise düzeltilmiş P değerine ($P<0,072$) göre anlamlı olmasa da düzeltilmemiş değer ($P<0,012$) anlamlı farkı işaret etmektedir.

Tablo 7. Tüm Gruplarda “Kalp Ağırlığı / Vücut Ağırlığı” Oranı.

GRUPLAR					
Kardiyak indeks	SFSF Ortanca (min-max)	ISOSF Ortanca (min-max)	SERSF Ortanca (min-max)	SERISO Ortanca (min-max)	Anlamlılık
Kalp ağırlığı /Vücut ağırlığı	4,54 (3,81-5,11)	6,34 (5,09-7,84)	4,49 (3,87-4,87)	5,54 (4,11-6,39)	P<0,001

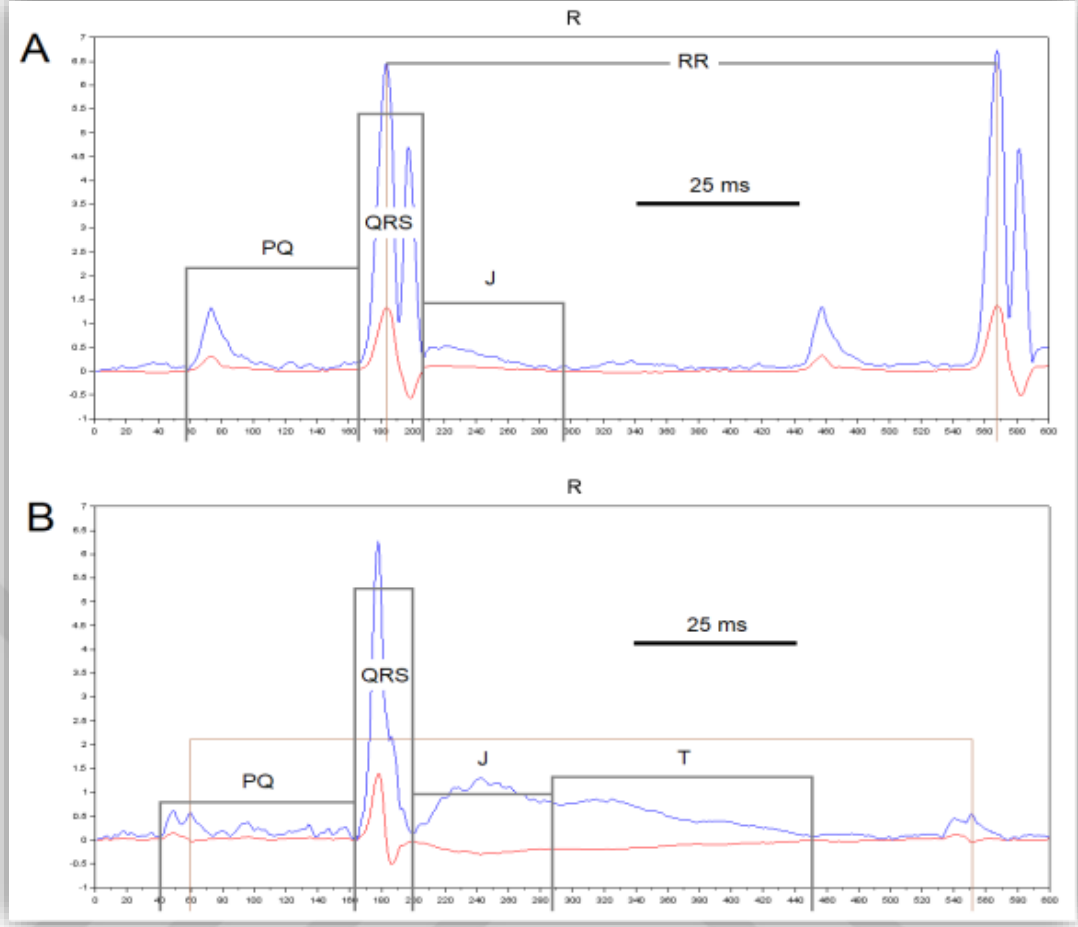
Non-Parametric“Kruskal Wallis” ANOVA testine göre p değeri belirlenmiştir (p<0,001).

Tablo 8. “Kalp Ağırlığı / Vücut Ağırlığı” Değerlerinin Gruplar Arasında İkili Karşılaştırmaları.

Gruplar	Anlamlılık (P)	Düzeltilmiş Anlamlılık (dP)
SERSF - SFSF	,699	1
SERSF - SERISO	,012	,072
SERSF - ISOSF	,000	,001
SFSF - SERISO	,055	,328
SFSF - ISOSF	,001	,008
SERISO - ISOSF	,145	,870

Mann Withney-U testine göre kıyaslama yapılmıştır (P), Bonferroni'ye göre anlamlılık seviyesi düzeltilmiştir (dP).

Şekil 12’de kalp bileşke elektriksel vektörünün zamana göre değişimi olan R derivasyonu kullanılarak EKG sürelerinin (intervalleri) nasıl ölçüldüğünü göstermektedir. Şekil 12’de eş zamanlı olarak kaydedilmiş DII derivasyonuna ait EKG grafikleri de gösterilmiştir: Burada işaretlenen EKG süreleri ve intervalleri R derivasyonu ölçülmüştür DII derivasyonu bu amaçlı kullanılmamıştır. Şekil 12A SERISO grubundan bir örnek kayıt olup RR intervali ile birlikte PQ, QRS ve J dalgalarına ait EKG intervalleri işaretlenmiştir. Şekil 12A’da T dalgası tam belirgin kabul edilmediğinden işaretlenmemiş dolayısı ile istatistiksel değerlendirmeye de alınmamıştır. Şekil 12A’ya benzer birçok kayıta T dalgası belirgin olarak bulunmamıştır. Şekil 12B ise ISOSF grubundan bir örnek olup RR intervali hariç tüm EKG intervalleri (PQ, QRS, J ve T dalgaları) işaretlenmiştir. Şekil 12B’de özellikle T dalgasının ortaya çıkması ilginçtir ki bir iskemi göstergesi olarak kabul edilmektedir. Isoproterenol alan diğer başka farelerde de, tamamında olmasada bir kısmında, T belirginleşmesi Şekil 12B’deki gibi olmaktadır ve bunların bir kısmında bir ST yükselmeside dikkat çekmektedir.



Şekil 12. “R” derivasyonu kullanılarak EKG intervallerinin ölçülmesi, R derivasyonu kaydı mavi, DII derivasyonu kırmızı renkle ile yapılmıştır. A: SERISO grubundan temsili bir örnek, B: ISOSF grubundan temsili bir örnek.

Şekil 12A ve 12B’de DII derivasyonu EKG si (kırmızı renkli) üzerinde pek belirgin olmayan J ve T dalgaları R derivasyonunda çok daha belirgin hale gelmektedir. Bu durumda bize EKG intervallerinin ölçümünde R derivasyonunun kullanılmasının değerini işaret etmektedir. Bu nedenle yapılan tüm EKG interval ölçümlerinde R derivasyonu kullanılmıştır.

Tablo 9’da kalp bileşke elektriksel vektörün büyüklüğünün zamana göre değişimi olan R derivasyonu üzerinden ölçülen tüm EKG süreleri (intervalleri) toplu olarak sunulmaktadır: Görüldüğü gibi varyans analizi sonuçları hiçbir grupta ne depolarizasyon ne de repolarizasyon değişimini göstermemektedir. Daha açık bir ifade ile PQ ve QRS süreleri değişmediği için depolarizasyon sırasında aktivasyon yayılımının değişmediğine karar verilmiştir. Esas olarak ventriküler repolarizasyonu işaret eden J dalgası süresinde de bir farklılık bulunmamıştır ancak yukarıda işaret

edildiği gibi T dalgası bazı deney hayvanlarında Isoproteranole bağlı olarak ortaya çıkmaktadır fakat bu durum ventriküler repolarizasyonun ve T dalgasının süresinin uzadığı anlamına gelmemektedir.

Tablo 9 tüm deney gruplarından ayrı ayrı elde edilen EKG süreleri medyan değerlerini içermektedir. SERSF grubunda hiç bir hayvanda T dalgası belirgin olmadığından ölçülememiştir, bu nedenle herhangi bir değer verilmemiştir. Tablo 9 deki istatistiksel değerlendirme varyans analizi olarak yapılmıştır ki burada herhangi bir fark bulunamamıştır ($P < 0.05$). Bunun için Tablo 9 değerleri daha başka bir istatistiksel kıyaslama ile test edilmemiştir.

Tablo 9. R derivasyonunda EKG sürelerinin veya intervallerin değerlendirilmesi.

GRUPLAR					
Süreler veya İntervaller	SFSF Ortanca (min-max)	ISOSF Ortanca (min-max)	SERSF Ortanca (min-max)	SERISO Ortanca (min-max)	Anlamlılık
PQ	31,43 ms (23,39-34,94)	34,50 ms (30,70-41,66)	34,72 ms (30,70-37,57)	32,50 ms (26,75-36,55)	p=0,114 (ns)
QRS	9,86 ms (7,89-10,81)	9,06 ms (8,18-10,81)	9,42 ms (9,21- 9,64)	10,08 ms (7,60-11,84)	p=0,561 (ns)
J	16,22 ms (12,42-24,26)	17,10 ms (10,08-23,68)	13,81 ms (11,11-20,90)	18,56 ms (11,84-25,00)	p=0,120 (ns)
JT	57,01 ms (57,01-57,01)	40,20 ms (32,00-56,00)	--	42,45 ms (33,00-45,32)	p=0,250 (ns)
RR	128,53 ms (105,99-148,88)	116,22 ms (84,06-125,24)	116,96 ms (83,82-171,54)	111,70 ms (74,85-147,42)	p=0,184 (ns)

min: Grup içinde ölçülen en düşük değer.

max: Grup içinde ölçülen en yüksek değer.

p: Kruskal–Wallis Varyans analizi (one-way ANOVA) ile belirlenmiş anlamlılık değeri

ns: İstatistiksel olarak anlamlı olmayan fark

EKG interval veya süre ölçümü sonucu elde edilen RR ve J+T verilerini daha iyi değerlendirebilmek için bu veriler ile Ka/Va ve Kalp aksı verilerini (Rf ve Ri) aynı tabloda gösterilmesinin uygun olacağı düşünüldü. Bu şekilde her grubu temsilen bir Tablo olacak şekilde ham EKG verilerini içeren toplam dört ayrı Tablo oluşturuldu (Tablo 10, Tablo 11, Tablo 12 ve Tablo 13). Tablo 10'daki SFSF grubunda ki bu grup bir çeşit kontrol grubu olarakta kabul edilebilir, altı farenin sadece bir tanesinde T dalgası tespit edilebildi dolayısı ile bu fareler için JT verisi bulunmamaktadır. Tablo 11'deki SERSF grubunda sekiz farenin hiçbirinde T dalgası tespit edilemedi bu

nedenle bu fareler için JT verisi bulunmamaktadır. Tablo 12’de SERISO grubunun verileri sunulmaktadır. Bu grupta dokuz fareden altısında JT verisi bulunmamaktadır. Tablo 13’de ise ISOSF grubundaki sadece iki farede JT süresi T dalgası tespit edilemediği için verilemedi fakat yedi farede JT ve T süreleri tespit edildi.

Tablo 10. SFSF Grubu Elektrokardiyografik, kalp aksı ve kalp indeksi verileri.

Deney No	RR	J+T	Ri	Rf	Ka/Kv
1	125,73 ms	--	61,7°	223,77°	5,10 mg/g
2	126,46 ms	--	79,21°	227,38°	4,59 mg/g
3	130,6 ms	--	62,72°	231,02°	4,93 mg/g
4	148,88 ms	57,01	73,80°	233,13°	4,49 mg/g
5	135,96 ms	--	79,08°	241,70°	3,80 mg/g
6	105,99 ms	--	45,17°	211,76°	4,02 mg/g

Tablo 11. ISOSF Grubu Elektrokardiyografik, kalp aksı ve kalp indeksi verileri

Deney No	RR	J+T	Ri	Rf	Ka/Kv
1	84,06 ms	40 ms	60,65°	247,07°	6,43 mg/g
2	118,42 ms	32 ms	61,78°	219,3343°	6,63 mg/g
3	116,228 ms	56 ms	72,43°	254,69°	7,84 mg/g
4	95,52 ms	--	64,8714°	274,6264°	7,31 mg/g
5	91,13 ms	38 ms	55,70°	294,37°	6,34 mg/g
6	125,24 ms	41,95 ms	60,95°	234,40°	5,45 mg/g
7	122,95 ms	40,93 ms	59,38°	206,70°	5,34 mg/g
8	125 ms	40,2 ms	69,65°	256,33°	5,688 mg/g
9	114,03 ms	--	61,85°	270°	5,09 mg/g

Tablo 12. SERSF Grubu Elektrokardiyografik, kalp aksı ve kalp indeksi verileri

Deney No	RR	J+T	Ri	Rf	Ka/Kv
1	83,82 ms	--	70,54°	223,58°	4,50 mg/g
2	105,51 ms	--	80,96°	228,06°	3,94 mg/g
3	144,25 ms	--	50,12°	220,68°	4,86 mg/g
4	128,41 ms	--	62,01°	226,33°	4,48 mg/g
5	171,54 ms	--	71,37°	236,29°	4,53 mg/g
6	95,46 ms	--	75,64°	263,82°	4,60 mg/g
7	105,4 ms	--	62,56°	227,47°	4,27 mg/g
8	152,05 ms	--	70,51°	215,50°	3,87 mg/g

Tablo 13. SERISO Grubu Elektrokardiyografik, kalp aksı ve kalp indeksi verileri

Deney No	RR	J+T	Ri	Rf	Ka/Kv
1	112,5 ms	--	75,03°	293,50°	5,95 mg/g
2	74,85 ms	--	78,98°	248,57°	5,56 mg/g
3	95,91 ms	--	70,16°	270°	5,95 mg/g
4	82,46 ms	--	72,63°	213,53°	4,98 mg/g
5	108,63 ms	42,45	65,84°	240,60°	5,54 mg/g
6	129,97 ms	--	71,48°	330,19°	6,38 mg/g
7	147,42 ms	--	60,13°	268,84°	4,89 mg/g
8	124,42 ms	45,32 ms	45,68°	244,73°	4,83 mg/g
9	111,7 ms	33 ms	40,19°	248,94°	4,11 mg/g

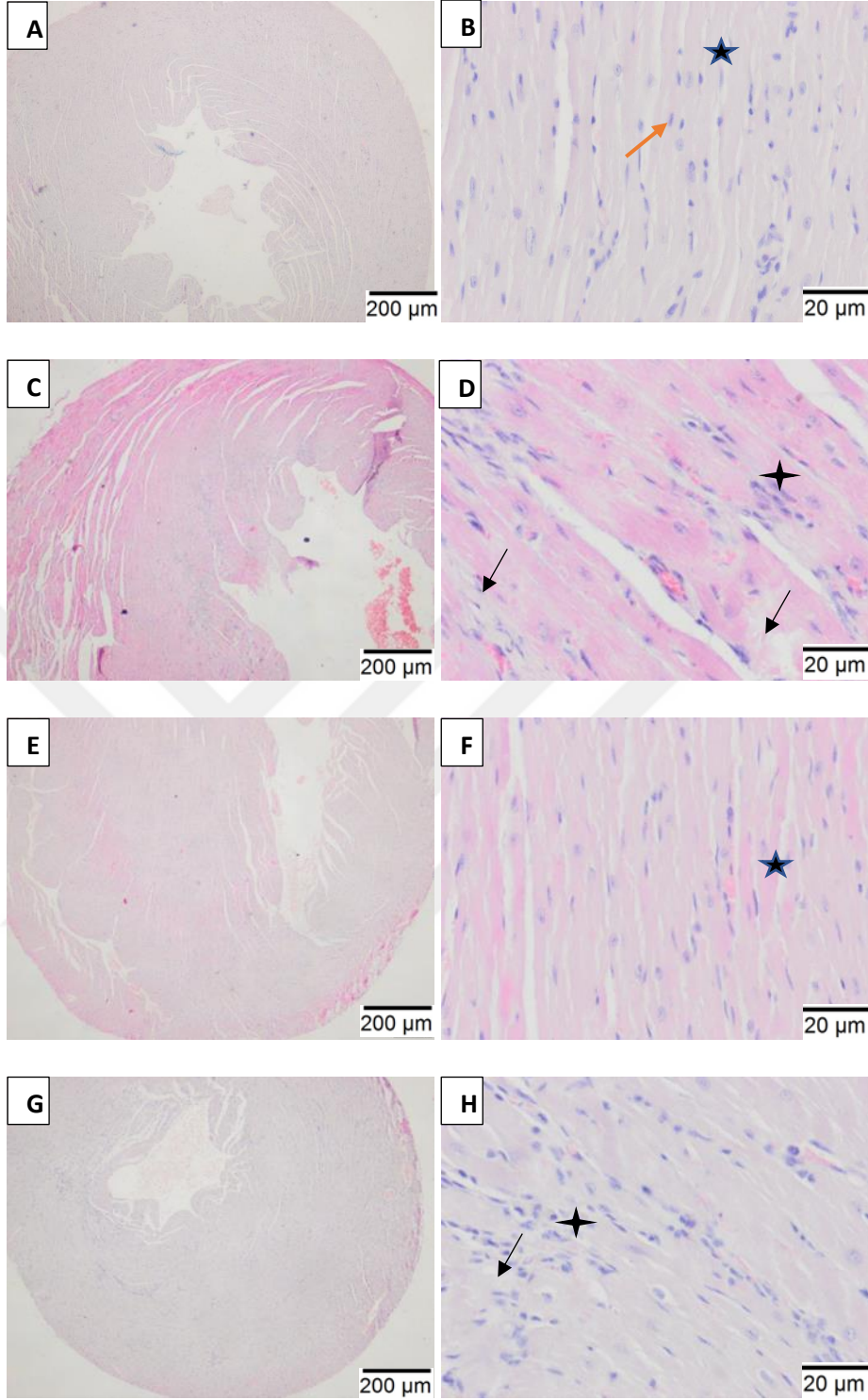
Tablo 12 ve Tablo 13 verileri ki sırasıyla SERISO ve ISOSF gruplarına aittir, içinde Rf değerine bakıldığında bu değer bazılar hayvanlarda kontrol olarak nitelenen SFSF grubundaki gibi olduğu fakat bazı hayvanlarda sıçrama şeklinde çok yüksek değerlere ulaştığı dikkat çekmektedir.

6.2. HİSTOKİMYASAL BULGULAR

6.2.1. Histokimyasal Değerlendirme

Çalışmada histokimyasal analizler Hematoksilen Eozin (H&E) ve Masson Trikrom boyamaları sonrasında yapıldı. Tüm gruplara ait miyokard dokusunun Hematoksilen-Eozin (H&E) boyamasına ait görüntüler Resim 4'te verilmiştir. Kontrol grubunda (SFSF) kardiyomiyositlerin çekirdeklerinin ortada olduğu, dallanma gösteren yapıda ve her kalp hücresi arasında interkale disklerin olduğu kardiyomiyositlerin düzgün şekilde sıralandığı, hücrel boşlukların histolojik olarak

normal olduğu, miyokardiyal atrofi ya da hücre infiltrasyonunun olmadığı görüldü (Resim 4, A,B). Miyokard fibrozu (MF) görülen ISOSF grubunda özellikle subendokardial bölgede soluk boyalı alanların olduğu ve yoğun bir şekilde fibrozis oluşumu izlendi (Resim 4, C,D). Kontrol grubuna göre (SFSF), ISOSF grubunda hücreler arasındaki boşlukların arttığı, kardiyomiyosit hücrelerinin sitoplazmasında küçük vakuollerin olduğu, isoproterenol kimyasalının verdiği hasara bağlı ödem oluşumu ve çok sayıda vakuolizasyon alanları saptandı (Resim 4, C,D). Hücresel değışikliklerin yanısıra, MF görüldüğü ISOSF grubundaki hücrelerde genişlemiş, düzensiz, eozinofilik kardiyomiyositlerle birlikte yer yer infiltrasyon oluşumu, inflamasyona bağlı olarak hücrelerin belli bölgelerde biriktiğı ve kollajen birikimine bağlı eozinofilik alanların artmış olduğu saptandı (Resim 4, C,D). Serotonin reseptör antagonisti grubu (SERSF) kontrol grubu (SFSF) ile benzer özellikler göstermekteydi. Kardiyomiyositlerin yapısında hücresel değışiklikler görülmedi (Resim 4, E,F). SERISO grubunda ise ISOSF de gözlenen yoğun fibrozis oluşumu bir miktar azalmıştı ancak soluk bölge alanlar ve infiltrasyon oluşumu devam etmekteydi (Resim 4, G,H).



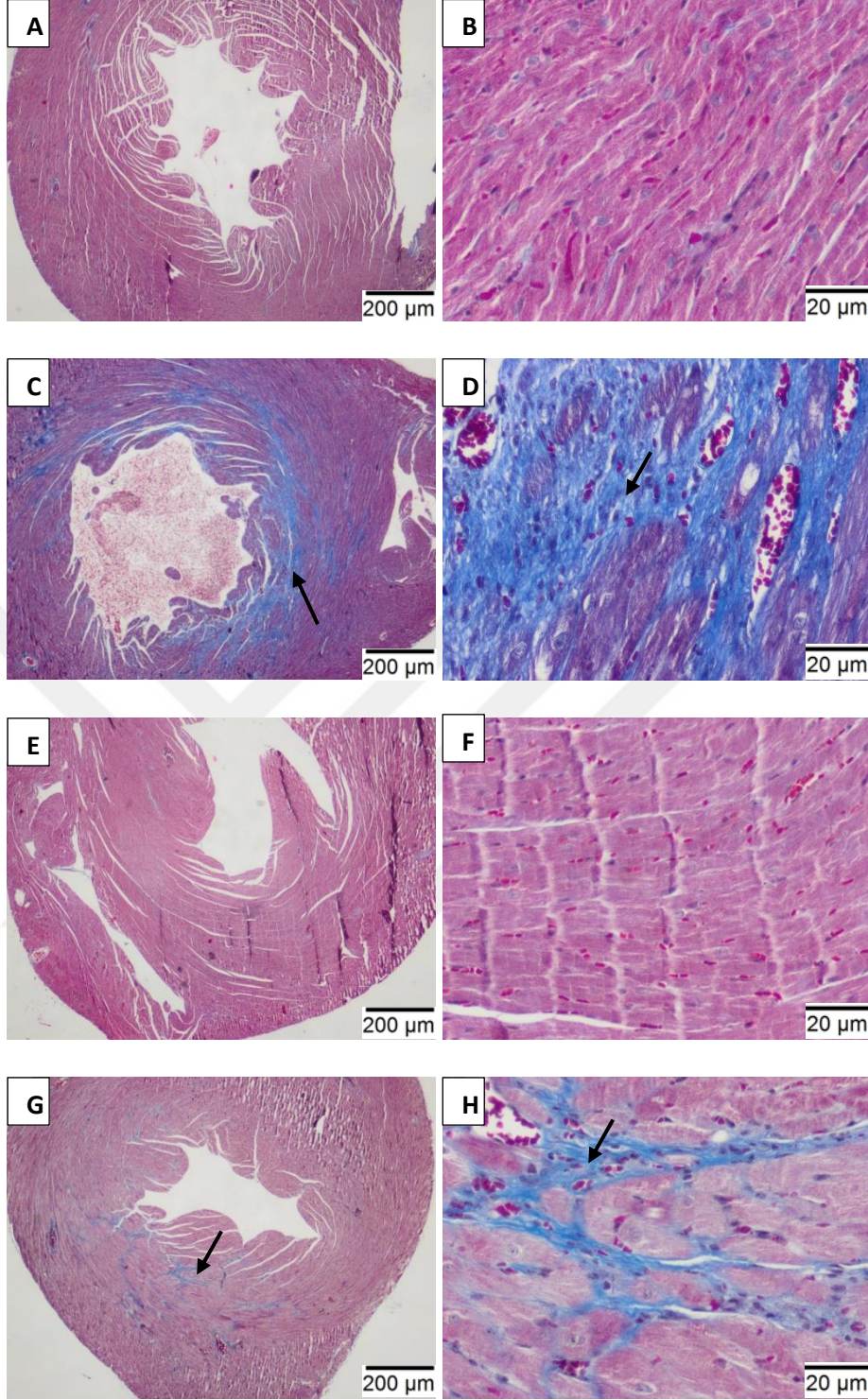
Resim 4. Farelerde miyokard dokusunun histolojik incelemesi. **SFSF (A, B), ISOSF (C, D), SERSF (E, F), SERISO (G, H),** Deney Gruplarının Hematoksilen Eozin (H&E) mikroskopik boyama görüntüleri.

↗ : Merkezi yerleşimli nükleus, ↘ : Soluk alanlar, fibrozis görülen bölgeler,
 ★ : İnfiltrat olmuş hücre kümesi, ★ : Düzenli kas lifleri

6.2.2. Masson Trikrom Boyaması Değerlendirilmesi

Tüm kalp dokularının kesitlerinde interstisyel veya perivasküler kollajen birikimini belirlemek için Masson trikrom ile boyanması Resim 5'te gösterilmiştir. Bu boyama yönteminde resimlerde siyah renk hücre çekirdeklerini, kırmızı renk kas dokusunu ve mavi renk ise kollajen lifleri göstermektedir (Van De Vlekkert ve ark., 2020).

Kontrol grubundaki (SFSF) farelerde kollajene ait boyamaların çok az miktarda miyokardial interstisyel alanda olduğu görüldü (Resim 5, A,B). ISOSF grubunda ise özellikle subendokardiyal bölgede kollajen liflerin dağılımını ve birikimini gösteren mavi renkli boyalı alanların olduğu saptandı (Resim 5, C,D). Bununla birlikte kardiyomiyosit demetlerin ve interstisyel fibrozisin miyokardın farklı katmanlarında gelişigüzel dağıldığı da görüldü (Resim 5, C,D). SERSF grubunda Masson trikrom boyaması sonrasında kollajen dağılımının azaldığı, kollajene ait mavi boyalı alanların kontrol grubuna benzer olduğu görüldü (Resim 5, E,F). Serotonin reseptör antagonisti (5-HT2B) ile beraber isoproterenolün birlikte uygulandığı grupta (SERISO) ISOSF grubuna nazaran azalmış olduğu ve daha az miktarda kollajen birikimi olan mavi boyalı alanların olduğu saptandı (Resim 5, G,H).



Resim 5. Miyokardiyal fibrozisin histolojik değerlendirmesi. **SFSF (A, B), ISOSF (C, D), SERSE (E, F), SERISO (G, H).** Deney Gruplarının kalp dokularından elde edilen kesitler miyokardiyal fibrozisi değerlendirmek için Masson trikrom ile boyandı. (mavi doku rengi kollajen birikimini gösterir).

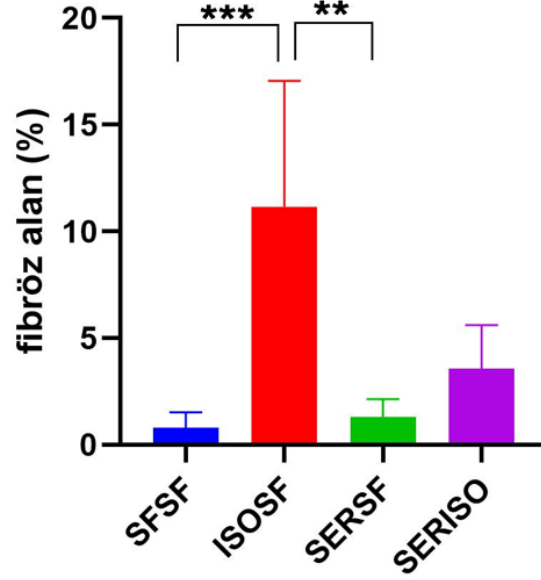
↙ : kollajen birikimi

Gruplarda kollajen birikimi (fibroz doku) bakımından fibröz dokunun yüzde alan olarak ifadesi Tablo 14’de istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve sonuçlar Şekil 13’te grafik olarak gösterilmiştir. Kollajen yoğunluğu bakımından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Anlamlı fark bulunan grupları belirlemek için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda Tablo 14’te de gösterildiği şekilde ISOSF grubunun kollajen yoğunluğu diğer gruplar içerisinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. ISOSF grubunda fibroz oluşumu kontrol grubu olan SFSF grubuna kıyasla anlamlı derecede artmış bulundu ($p<0,001$). ISOSF grubu ve SERISO grubu arasında yapılan karşılaştırma sonucunda fibrozis oluşumu SERISO grubunda bir miktar azalmış olup istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Tablo 14, Şekil 13). SERSF grubu SFSF grubu olan kontrol grubuyla benzerlik göstermekte olup fibrozis oluşumu ISOSF grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldı ($p<0,01$) (Tablo 14, Şekil 13).

Tablo 14. Tüm gruplarda Masson trikrom boyaması sonrasında oluşan fibroz bölgenin yüzde alan olarak değerlendirilmesi.

GRUPLAR					Anlamlılık
	SFSF Ortanca (min-max) Ortalama±SD	ISOSF Ortanca (min-max) Ortalama±SD	SERSF Ortanca (min-max) Ortalama±SD	SERISO Ortanca (min-max) Ortalama±SD	
Yüzde Alan	0,71 (0,14-2,13)	10,6 (2,33-12,76) ^a	1,17 (0,37-2,82) ^b	4,39 (0,83-5,80) ^c	$p<0,001$
	0,80 ± 0,712	9,04 ± 3,42	1,30 ± 0,82	3,57 ± 2,02	

p: İstatistiksel anlamlı fark ($p<0,001$), One Way Anova non parametrik test. Kruskal Wallis, İkili karşılaştırmaların istatistik verileri (Mann Whitney U). **SD:** Standart sapma. **a.** SFSF ile kıyaslandı, **b.** ISOSF ile kıyaslandı **c.** ISOSF ile kıyaslandı.



Şekil 13. Tüm gruplarda kalp dokusunun Masson trikrom boyaması sonrasında fibrotik alanın yüzde olarak gösterimi. Veriler, “ortalama $\pm$ standart sapma” şeklinde gösterilmiştir.

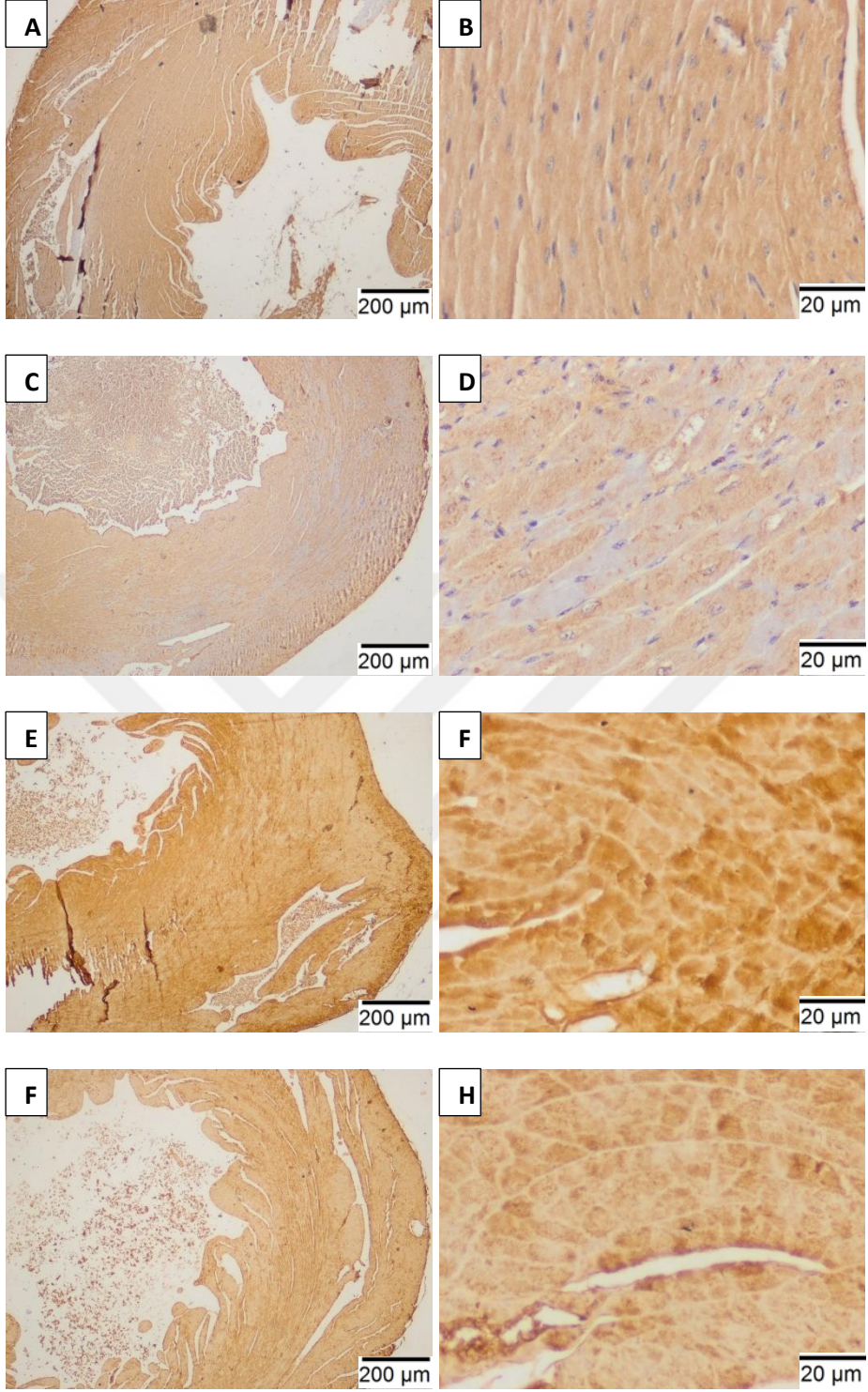
ISOSF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$

6.2.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal analiz için tüm gruplarda, deneklerden elde edilen parafin bloklardan alınan kalp dokularına ait kesitlere indirekt immünoperoksidaz boyama tekniği uygulanmıştır. Diaminobenzidin (DAB) kromojeni boyaması sonrasında immünoreaktiviteler kahverengi olarak görülmektedir. Her örneğin immünoreaktivitesinin boyanma şiddeti 0 (boyanma yok), zayıf şiddetli boyanma (+), orta şiddetli boyanma (++), güçlü şiddetli boyanma (+++) olarak değerlendirilmiştir. Her grup için 100 hücre sayılarak pozitif olarak boyanan hücrelerde semi kantitatif H-Skor değerleri hesaplandı. [H-Skor: $\sum P_i (i+1)$ (P_i : % pozitif boyanmış hücre sayısı; i : boyanma şiddeti)].

6.2.3.1. ANP immünoreaktivitesi

ANP immünoreaktivitesi SFSF grubunda kalp kası hücrelerinde şiddetli pozitif ve yer yer orta şiddette pozitif olarak saptanır iken, ISOSF grubunda ve SERISO grubunda özellikle fibroz oluşumunun olduğu bölgelerde zayıf pozitif olarak ve yer yer negatif olduğu görüldü (Resim 6).



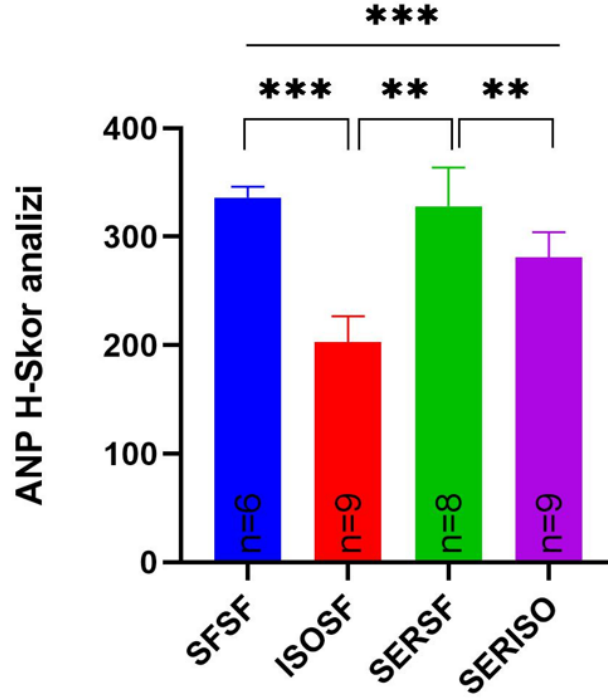
Resim 6. ANP immünoaktivitesinin SFSF (A,B), ISOSF (C,D), SERSF (E,F), SERISO (G,H) gruplarındaki dağılımları.

Gruplar arasında immünoreaktivite bakımından yapılan H-Skor analizi Tablo 15’te istatistiksel olarak karşılaştırılmış olup sonuçlar Şekil 14’te grafikte verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. ANP protein ekspresyon seviyeleri açısından farklılığın bulunduğu grupları belirlemek için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda ANP immünoreaktivitesinin en fazla kontrol grubu olan SFSF grubunda olduğu saptandı. İstatistiksel olarak SFSF grubunun ANP immünoreaktivitesinin ISOSF ve SERISO grubu ile karşılaştırılması sonrasında bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 15, Şekil 14). Kontrol grubu olan SFSF grubu ile SERSF arasındaki karşılaştırma sonrasında ANP immünoreaktivitesinin SFSF grubunda yüksek olduğu ve bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. ISOSF grubunda ve SERISO grubunda kontrol grubu olan SFSF grubuna kıyasla ANP immünoreaktivitesinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (Tablo 15, Şekil 14).

Tablo 15. ANP İmmünoreaktivitesin H-Skor Değerlendirmesi.

GRUPLAR					Anlamlılık
GRUPLAR	SFSF	ISOSF	SERSF	SERISO	
	Ortanca (min-max) Ortalama±SD	Ortanca (min-max) Ortalama±SD	Ortanca (min-max) Ortalama±SD	Ortanca (min-max) Ortalama±SD	
ANP	339 (317-346) 336,16 ± 9,94	210 (155-225) ^a 202,77±24,17	322,5 (285-403) ^b 328,12± 35,58	210 (155-225) ^{a,c} 202,77±24,17	p<0,001

p: istatistiksel anlamlı fark (p<0,001) Kruskal Wallis, İkili karşılaştırmaların istatistik verileri (Mann Whitney U). **SD:** Standart sapma, a: SFSF ile kıyaslandı, b: ISOSF ile kıyaslandı, c: SERSF ile kıyaslandı.

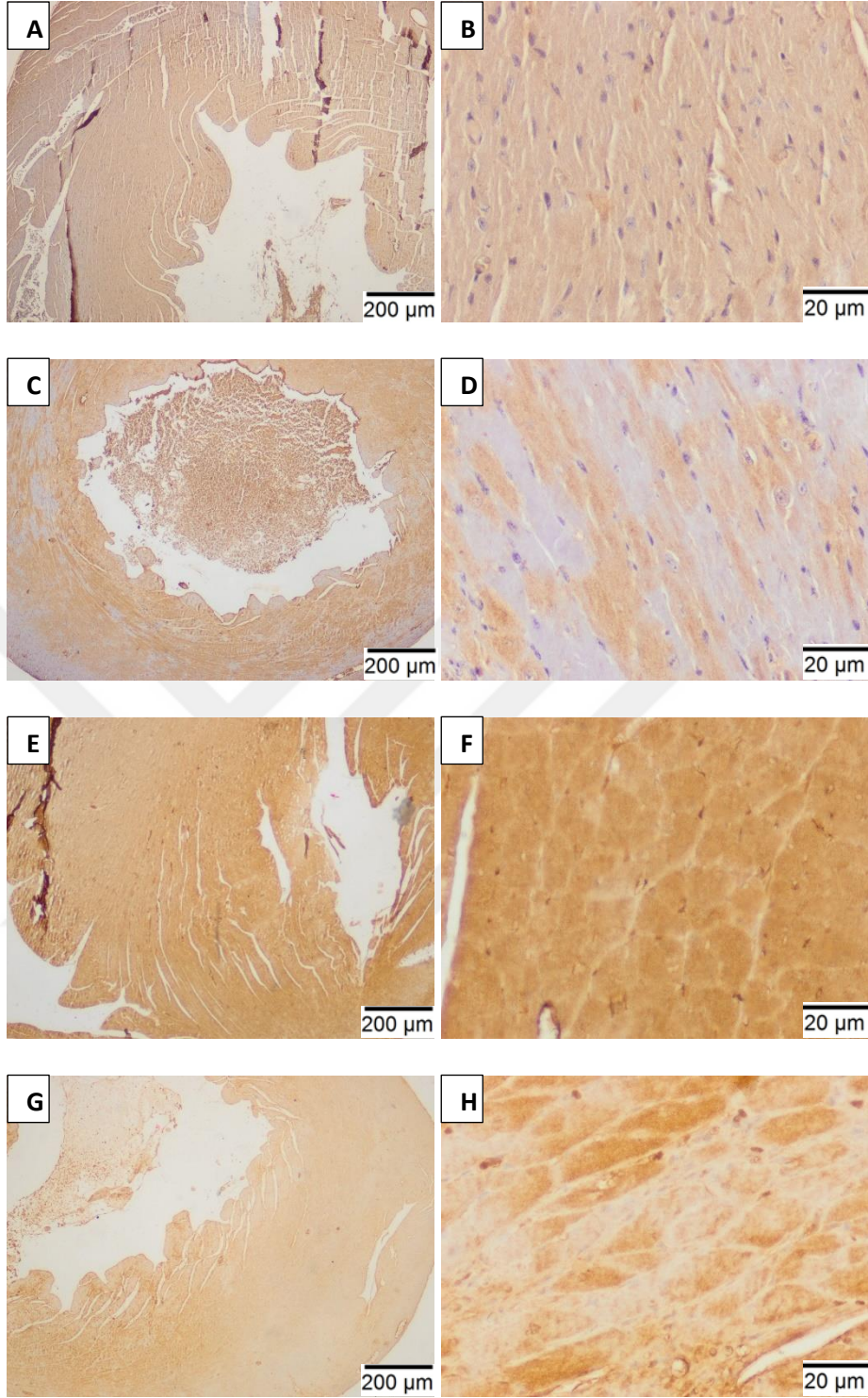


Şekil 14. ANP H-Skor İmmünoaktivite sonuçlarının gösterimi. Veriler, “ortalama ± standart sapma” şeklinde gösterilmiştir.

SFSF grubuna göre anlamlılık *** $p < 0,001$, SERSF grubuna göre anlamlılık ** $p < 0,01$

6.2.3.2. BNP İmmünoaktivitesi

BNP immünoaktivitesi de ANP ile benzer etki göstermekte olup SFSF grubunda kalp kası hücrelerinde şiddetli pozitif ve yer yer orta şiddette pozitif olarak saptanır iken, ISOSF grubunda ve SERISO grubunda özellikle fibroz oluşumunun olduğu bölgelerde zayıf pozitif olarak veya yer yer negatif olduğu görüldü (Resim 7). Ancak ANP immünoaktivitesine göre boyanma miktarı daha azdı.



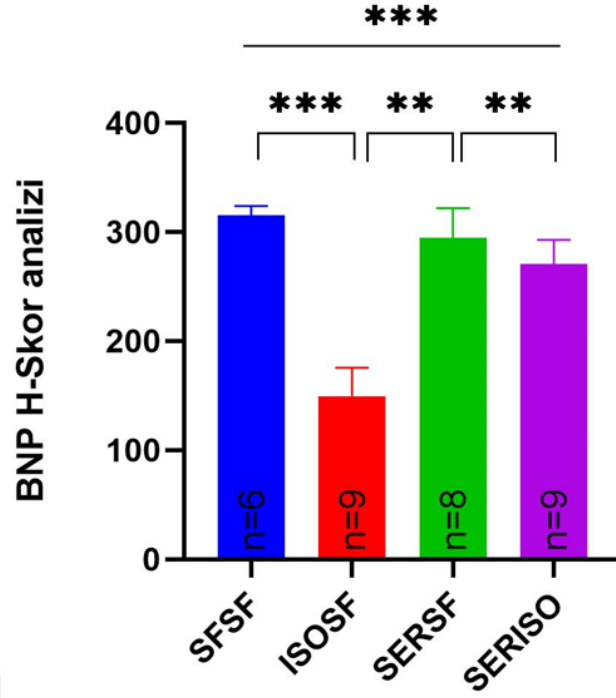
Resim 7. BNP immünoaktivitesinin SFSF (A,B), ISOSF (C,D), SERSF (E,F), SERISO (G,H), gruplarındaki dağılımları.

Gruplar arasında immünoreaktivite bakımından yapılan H-Skor analizi Tablo 15'te istatistiksel olarak karşılaştırılmış olup sonuçlar Şekil 14'te grafikte verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda gruplar arasında BNP immünoreaktivitesinin ANP immünoreaktivitesi ile paralel olduğu ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu bulunmuştur. BNP protein ekspresyon seviyeleri açısından farklılığın bulunduğu grupları belirlemek için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda BNP immünoreaktivitesinin en fazla kontrol grubu olan SFSF grubunda olduğu saptandı (Tablo 16, Şekil 15). İstatistiksel olarak SFSF grubunun BNP immünoreaktivitesinin ISOSF ve SERISO grubu ile karşılaştırılması sonrasında bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Kontrol grubu olan SFSF grubu ile SERSF arasındaki karşılaştırma sonrasında BNP immünoreaktivitesinin SFSF grubunda daha yüksek olduğu ancak bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo16). ISOSF grubunda ve SERISO grubunda kontrol grubu olan SFSF grubuna kıyasla BNP immünoreaktivitesinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (Tablo16, Şekil 15).

Tablo 16. BNP İmmünoreaktivitesi H-Skor değerlendirmesi.

GRUPLAR					
GRUPLAR	SFSF Ortanca (min-max) Ortalama±SD	ISOSF Ortanca (min-max) Ortalama±SD	SERSF Ortanca (min-max) Ortalama± SD	SERISO Ortanca (min-max) Ortalama± SD	Anlamlılık
BNP	312,5 (305-330) 315,00± 8,94	146 (118-190) ^a 149,55±26,06	292,5 (260-345) ^b 294,37±27,44	146 (118-190) ^{a,c} 149,55±26,06	P<0,001

p: İstatistiksel anlamlı fark (p<0,001). Kruskal Wallis, İkili karşılaştırmaların istatistik verileri (Mann Whitney U). **SD:** Standart sapma. a: SFSF ile kıyaslandı, b: ISOSF ile kıyaslandı, c: SERSF ile kıyaslandı

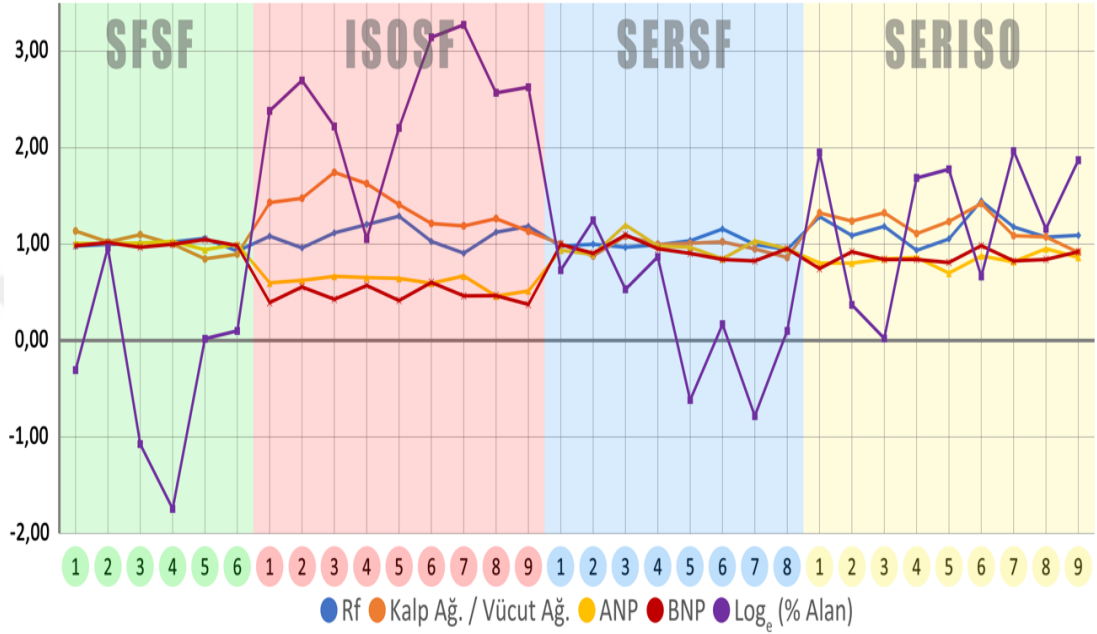


Şekil 15. BNP H-Skor immünoaktivite sonuçlarının gösterilmesi. Veriler, “ortalama $\pm$ standart sapma” şeklinde gösterilmiştir.

SFSF grubuna göre anlamlılık *** $p < 0,001$, SERSF grubuna göre anlamlılık ** $p < 0,01$

6.3. BULGULARIN KANTİTATİF KARŞILAŞTIRILMASI

Şekil 16’da tüm gruplarda bulunan hayvanlarda QRS lupunun son kısmındaki kalp aksı ‘Rf’, ‘kalp ağırlığı / vücut ağırlığı oranı’, kardiyak hipertrofi belirteçleri ‘ANP ve BNP’, son olarak fibrotik alanın ‘e’ tabanında logaritması ‘log_e (% Alan)’ sunulmuştur—böylece fibrotik alan değişimleri diğer parametreler ile ortak bir düşey skala kullanılarak kıyaslanmaktadır (bkz. Şekil 16).



Şekil 16. Tüm gruplarda bulunan rakamsal değerlerin “relatif” değerlere indirgenerek karşılaştırılması: “1.00” değeri %100 değerine denk gelmektedir, diğer değerler relatif değişimi göstermektedir.

Rf: Kalp aksı, **Kalp Ağ./Vücut Ağ.:** Hipertrofi indeksi, **ANP ve BNP:** Atrial ve Brain natriüterik kardiyak hipertrofi belirteçleri, **Log_e (% Alan):** Fibrotik alan indeksi

Şekil 16’da verilen grafikte hem grup içinde hem de gruplar arasındaki farklar gösterilmektedir. SFSF (kontrol) grubunda altı adet fare, ISOSF grubunda dokuz adet fare, SERSF grubunda sekiz adet, SERISO grubunda ise dokuz adet fare kullanılmıştır.

Kontrol grubu olan SFSF grubuna bakıldığında fibrotik alanın hayvandan hayvana değişen ve stabil olmayan bir parametre olduğunu görüyoruz. Aynı durum diğer gruplarda da dikkat çekmektedir. ISOSF grubuna baktığımızda ise fibrotik alanda belirgin olarak artış görülmektedir. Bu durumda İsopterrenol belirgin olarak fibrozisi arttırmaktadır diyebiliriz. SERSF grubunda ise fibrotik alan kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir. SERISO grubunda ise isoproterenole bağlı olarak fibrotik bölgenin arttığını ancak bu artışın ISOSF grubundaki kadar olmaması 5-HT2B’nin fibrotik alanları azaltmadaki etkisini göstermektedir. Şekil 16’da özellikle dikkat çeken bir

bulgu olarak, fibrotik alan ile hipertrofi indeksi oldukça paralel bir şekilde değişim göstermektedir. Yani belirgin bir korelasyon vardır.

Kardiyak hipertrofi belirteçleri olan ANP ve BNP seviyelerine bakıldığında ise tüm gruplar için hayvandan hayvana çok fark görülmemektedir. Ancak ANP ve BNP'nin her ikisi de ISOSF grubunda kontrol grubuna kıyasla azalmış olarak görünmektedir. Fibrozis oluşumu ve hipertrofi indeksinin bu grupta yüksek iken fibrotik bölgelerde ANP ve BNP eksprese edilmemiş ya da azalmıştır diyebiliriz. Bu durum fibrotik alanla ters olarak korelasyonu göstermektedir. Genel olarak bakıldığında ise ANP ve BNP ekspresyonları bütün gruplarda birlikte göstermekte olup tek bir parametre gibi hareket etmektedir.

ISOSF grubunda 'kalp ağırlığı/vücut ağırlığı' oranının net bir şekilde artarken SERSF grubunda değişiklik olmaması yani kontrol grubu gibi olması şöyle özetlenebilir: 5-HT_{2B} serotonin reseptör antagonistinin normal dokuda tek başına bir etkisi yoktur yani indeksi azaltmaz ve fibroziste değişim yapmaz. SERISO grubunda ise kalp vücut ağırlığı ve fibrotik indeks SERSF yani kontrol grubuna kıyasla bir miktar artmış görünmektedir ancak bu artış ISOSF grubundaki kadar değildir. Böylece, 5-HT_{2B} serotonin reseptör antagonistinin etkisi burada da görülmektedir. Rf (kalp aksı) olarak ifade ettiğimiz parametre SERISO grubunda kalp/vücut ağırlığı oranı ile paralellik göstermektedir. İlginçtir ki ISOSF grubunda bu paralellik görülmemektedir. Burada isoproterenolün etkisi bu korelasyonu bozmuş olabilir. Yani ISOSF grubunda hipertrofi olurken elektrofizyolojisi bu durumdan çok etkilenmemiş olabilir. SERISO grubunda ise hipertrofinin derecesi çok fazla olmasa bile Serotonin kalbin elektrofizyolojik etkisini bir miktar değiştiriyor etkiliyor olabilir.

7. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar bilim ve teknolojiadaki ilerlemelere rağmen dünya çapında insan yaşamını tehdit eden, morbidite ve mortalitenin yüksek oranda görüldüğü hastalıklar arasındadır. Bu nedenle bu hastalıklara neden olabilecek patolojik etkenleri bulmak ve yenilikçi tedavi yaklaşımları geliştirmek günümüzde oldukça önem taşımaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar arasında yer alan kardiyak hipertrofi de sebepleri henüz tam olarak anlaşılmamış multifaktöriyel ve kalp yetmezliği ile sonuçlanan, insanın yaşam kalitesini olumsuz olarak etkileyen bir hastalıktır (Hanping Qi, 2018). Kalp yetmezliği bilim ve teknolojiye gerçekleşen tüm ilerlemelere rağmen bugün hala dünya çapında 38 milyon teşhis edilmiş hastada şaşırtıcı bir prevalansa sahiptir (Wang ve ark., 2021).

Kalp hipertrofisi ve yetmezliği ile ilgili mekanizmaları anlamak yeni tedavilerin geliştirilmesi için deneysel kalp iskemisi hayvan modelleri oldukça önemlidir (Rai ve ark., 2017).

Kardiyak hipertrofi ve miyokard enfarktüsü deneysel hayvan modellerinde araştırma laboratuvarlarında kullanılan farklı cerrahi yöntemler vardır. Bunlardan aort daralması, pulmoner arter bantlanması veya ligasyonu ve iskemik reperfüzyon (I/R) modelleri sıklıkla kullanılan cerrahi yöntemlerdendir. Ancak kullanılan bu modeller komplikasyonlar nedeniyle yüksek mortalite oranına sahiptir (Hou ve ark., 2011; Noll ve ark., 2020; Rai ve ark., 2017).

Bunların dışında kardiyak hipertrofi, anjiyotensin II (Ang II), norepinefrin, endotelin1 ve β -adrenerjik reseptör agonistleri gibi ajanlar tarafından da oluşturulmaktadır (Gan ve ark., 2019). Bunlardan β -adrenerjik reseptör agonisti olan isoproterenol ile indüklenen hayvan modellerinde EKG parametleri, inflamasyon, hücre infiltrasyonu ve fibrozis gibi kalp dokusunu etkileyen patolojik durumlar kolaylıkla incelenebildiğinden bu model sıklıkla tercih edilmektedir.

Isoproterenol'ün kalp üzerindeki etkileri, isoproterenol uygulamasının dozuna ve süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Fare ve sıçanlarda isoproterenol'ün düşük, orta ve yüksek dozlarda uygulandığı gösteren akut ve kronik olmak üzere birçok çalışma mevcuttur (Bageghni ve ark., 2018; Gan ve ark., 2019; Mikušová ve ark., 2009; Rajadurai & Prince, 2007). Bizim çalışmamızda karşılaştığımız en büyük problem kronik olarak oluşturduğumuz kalp hipertrofisi modelinde uyguladığımız dozun kaç gün süreyle ve miktar olarak ne kadar uygulanması gerektiği idi. Her ne

kadar literatürde fare ve sıçanlarda daha önce isoproterenol ile oluşturulmuş kalp hipertrofisi modelleri olmasına rağmen özellikle fare için kesin bir protokol bulunmamaktadır. Son yıllarda yapılmış çalışmaları dikkate alarak isoproterenol ile kronik kalp hipertrofisi modelini oluşturduk (Bageghni ve ark., 2018; Gan ve ark., 2019). Oluşturduğumuz bu modelde elektrokardiyografik, vektörkardiyografik, morfolojik değişiklikler hipertrofi ve iskemi kriteri olarak belirlendi.

Isoproterenolle oluşturulan hipertrofi modellerinde EKG sıklıkla tercih edilen değerlendirme yöntemlerinden biridir (Kela ve ark., 1980; Kralova ve ark., 2008; Krennek ve ark., 2009). Ancak, yaptığımız literatür araştırmasında, bu amaçla Vektörkardiyografi daha önce kullanılmamıştı. Öncelikli olarak insanlarda sol ventrikül hipertrofisi ve miyokard iskemisi durumunda EKG’de görülen değişiklikler tipik olarak ST segmentinde görülür (Klabunde, 2017). Fare EKG’sinde ise doğal olarak insana göre birtakım farklar bulunur. Bu durumda farede EKG’de iskeminin bulguları ne olmalıdır? Farede “normal” EKG dalgalarının yorumlanması bile zordur, çünkü fare EKG’sinde dalgaların şekli insandakinden farklıdır. Özellikle ST segmentinin insandakinden farklı olması fare EKG’sinin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (Boukens ve ark., 2014). Çünkü fare EKG sinde ST segmenti J dalgası olarak görünür iken, farelerde akut miyokard iskemisi sırasında ise insandakinin aksine S dalgası amplitüdünde azalma olur ve bunu anormal J dalgası ve T dalgası takip eder (Boukens ve ark., 2014). Dolayısıyla biz de çalışmamızda EKG’de JT segmentindeki değişikliklere odaklandık.

Krennek ve ark. (2009) sıçanlarda isoproterenol ile oluşturdukları kalp hipertrofisi modelinde ST segmenti yükselmesi ve negatif T dalgası olduğunu rapor ettiler. Král’ová ve ark. (2008) ise sıçanlarda isoproterenol’ün farklı dozlarının hipertrofi üzerine etkilerini inceledikleri araştırmalarında 150 mg/kg lık tek bir dozun QRS süresini uzattığını ve kalp hızını azalttığını gösterdiler. Bizim çalışmamızda gruplar arasında JT segmentindeki farklılıklar dikkat çekmektedir. Özellikle iskemi grubunda R derivasyonunda J ve T dalgaları diğer derivasyonlarındakilere kıyasla daha belirgin hale geldiği için ölçümler R derivasyonu üzerinde yapılmıştır. Bu ölçümlere göre SFSF ve SERSF grubunda bulunan hayvanlarda T dalgası tespit edilemediği için JT süresi ölçülememiştir. ISOSF grubunda T dalgası isoproterenole bağlı olarak ortaya çıkmıştır ve bu da iskemi göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden JT süresi ölçülebilmıştır. Yine ISOSF grubunda tüm hayvanlarda görülme de bir kısmında ST yükselmesi görülmesi dikkat çekicidir. SERISO grubunda da sadece üç hayvanda JT

süresi ölçülebilmektedir. Bu durumda 5-HT_{2B} reseptör antagonisti hipertrofiyi bir dereceye kadar azaltmıştır denebilir.

Gruplar arası kıyaslamalarda EKG ölçümlerinde istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Hatta ventriküler repolarizasyonu işaret eden J dalgası süresinde de bir farklılık bulunmamıştır. Fakat Vektörkardiyografik olarak aks açısından değerlendirdiğimizde ventrikül depolarizasyonunun son kısmına denk gelen “Rf” iskemiye bağlı olarak daha büyük bulunmuştur. Akut isoproterenol uygulamasında ise düşük dozlarda bile (4mg/kg) Rf değişimi daha belirgin olarak rapor edilmiştir (Özbek, 2018). Buradan sonuç olarak isoproterenolün akut etkisinde elektrokardiyografik bulgular kronik uygulamasında ise immünohistokimyasal bulgular ön plana çıkmaktadır. Özellikle Masson trikrom hassas bir şekilde iskemiye bağlı fibrosis göstermektedir.

Sürekli β -Adrenerjik uyarım sonunda kalp üzerinde iş yükü artar, kardiyovasküler sistemde değişiklikler meydana gelir ve sonuçta morfolojik olarak kalp hipertrofisinin göstergesi olan kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranında önemli artış görülür (Gan ve ark., 2019; Mikušová ve ark., 2009). Ryu ve ark. (2016) farelerde isoproterenolle oluşturulmuş miyokard hipertofisi modelinde gallik asidin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada farelere isoproterenol verildikten iki hafta sonra kalp ağırlığı /vücut ağırlığı oranının belirgin bir şekilde arttığı buldular. Gan ve ark. (2019) da benzer kalp hipertrofisi modelinde kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranının isoproterenol uygulanan grupta arttığı vurgulanmıştır.

Bizim çalışmamızda da ISOSF grubunda kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranı parametresinin belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir (bkz. Tablo 7). Bu da farelerin miyokardiyal hipertrofi sergilediğini açık olarak göstermektedir—duyarlı bir parametredir. Kalp ağırlığı açısından, SERSF grubu sonuçları kontrol grubu olan SFSF grubu sonuçlarına benzemektedir (Tablo 7). Bu nedenle Serotonin blokajının bu grupta kalp dokusunda herhangi bir etkisi olmamıştır diyebiliriz. SERISO grubunda ise kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranı ISOSF grubu kadar olmasa da isoproterenole bağlı olarak bir miktar artmıştır. Bu bulgularımıza göre bizim sonuçlarımız isoproterenol ile artan kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranını gösteren fare çalışmaları ile uyumludur (Gan ve ark., 2019; Ryu ve ark., 2016). Isoproterenol uygulanan farelerde kalbin ağırlığının artmasının nedeni ödem oluşumu, miyokart içinde yoğun fibrozis görülmesi ve inflamatuvar hücrelerin artmasıyla açıklanabilir (Roy & Prince, 2013).

Farelerde isoproterenol ile kalp hipertrofisi oluşumunun en önemli sonuçlarından birisi de kalp dokusunda görülen fibrozis oluşumudur. Çalışmamızda kalpte fibrozis oluşumu histolojik boya olan Masson trikrom boyaması ile gösterilmiştir. ISOSF grubunda kollajen birikiminin yoğun olarak görülmesinin nedeninin kardiyomiyositlerin fibrozu sonucunda oluştuğunu düşündürdü. Kontrol grubuna (SFSF) ait boyamalarda kalp dokusunda “kalbin normal yapısında rastlanan” çok az miktarda kollajen liflerde vardı. SERSF grubu da büyük oranda SFSF ile benzerdi. Bu durumda 5-HT2B antagonistinin fizyolojik olarak mevcut olan fibrozisi azaltma gibi bir etkisi yoktur diyebiliriz (bkz. Şekil 16). SERISO grubunda ise Masson trikrom boyaması sonrasında kollajen birikiminin yani fibrozisin ISOSF ile kıyaslandığında azalmış olması 5-HT2B antagonistinin kardiyomiyositleri fibrozisten koruduğunu düşündürdü (Şekil 16). Başka bir ifadeyle bu histopatolojik bulgular 5-HT2B antagonistinin kronik isoproterenol uygulaması ile farelerde oluşturulan deneysel hipertofi modelinde koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

5-HT2B antagonisti birkaç çalışmada farklı dozlarda kullanılmış olup, maksimum 10 mg/kg dozu kullanılmıştır. Bu çalışmada literatür dikkate alınarak (Bai ve ark., 2010; Gocht ve ark., 2018; Wiebke Janssen ve ark., 2015) 5 mg/kg doz kullanılmasına karar verilmiştir. 5-HT2B isimli seratonin antagonistinin isoproterenolün etkisini tamamen ortadan kaldırmaması belki dozun veya tedavi süresinin yetersiz kalması ile açıklanabilir. İkinci olarak erişkin fare kalbinde kardiyomiyositler (%55) ve miyosit olmayan hücreler (~%27 fibroblastlardan) bulunmaktadır (Ryu ve ark., 2016). Bu hücrelerden fibroblastların da fibrozis oluşumunda etkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Ryu ve ark., 2016). Bu durumda fibrozisin tamamen ortadan kalkmaması fibroblastların aktivasyonuna da bağlı olabilir. Çünkü β -Adrenerjik uyarının kardiyomiyositler üzerinden mi ve/veya miyosit olmayan hücreler üzerinden mi kalp hipertrofisini indükleyip indüklemediği hala tartışma konusudur (Jaffré ve ark., 2009).

Bunun için kardiyak hipertrofi belirteçleri olarak da değerlendirilen ve miyokard yapısında rol oynayan ve kardiyak gelişim açısından oldukça önemli olan natriüretik peptitlerden ANP ve BNP'nin immünoreaktivitesi değerlendirilmiştir. İnsanda kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsü geçiren hastaların plazmasında ANP ve BNP seviyeleri belirgin olarak arttığı için ANP ve BNP bu hastalıklar ile ilişkili önemli belirteç olarak kabul edilmektedir. Ayrıca ANP ve BNP fizyolojik fonksiyonları açısından da kalp yetmezliği ve hipertrofinin patolojisi ile yakından ilişkilidir (Ellmers

ve ark., 2002; Lee ve ark., 2020; Ruskoaho ve ark., 1989; Yoshimura ve ark., 2001). Ayrıca miyokard enfarktüsü ve kalp yetmezliği oluşturulmuş deneysel hayvan modellerinde kalp dokusunda ANP ve BNP'nin gen ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Ellmers ve ark., 2002; Shimoike ve ark., 1997). İn vitro kültür ortamında ise sıçan miyositlerine endojen olarak uygulanan ANP'nin kardiyak hipertofideki rolünün araştırıldığı bir çalışmada endojen ANP'nin kardiyak miyosit hipertrofisini inhibe ettiği gösterilmiştir (Horio ve ark., 2000). ANP ve BNP'nin kardiyak hipertrofiyi inhibe etmesinin yanında kardiyak fibroblastların büyümesini de inhibe ettiğini gösteren çalışmalar vardır (Cao & Gardner, 1995; Ellmers ve ark., 2002). Bizim çalışmamızda da kalp dokusunda İmmünohistokimya boyama sonuçlarında ANP ve BNP'nin fibrozis bölgesinde görülmediği tespit edildi. Bu durum muhtemelen miyokardın diğer bölgelerinden daha fazla oranda ANP ve BNP ekspresyonu ile kompanze edilmiş olabilir. Ancak 'sağlam miyokard dokusunda ANP ve BNP nin aktivitesinin arttığına dair elimizde kesin bir sonuç yoktur.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, β -Adrenerjik agonisti olan isoproterenol'un kronik uygulanması sonucunda oluşan kardiyak hipertrofinin kalpte oluşturduğu, vektörkardiyografik ve histopatolojik değişimleri inceledik. Bunun yanında fibrozis üzerinde etkili olduğu düşünülen serotonin reseptör antagonisti olan 5-HT_{2B}'nin isoproterenol ile nasıl etkileştiğini araştırdık. Çalışmamızın sonuçları aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- ❖ fVCG grafikleri üzerinde yapılan değerlendirmelerde QRS lupunun son kısmındaki "Rf" olarak isimlendirilen kalp aksı isoproterenol alan ISOSF ve SERISO gruplarında daha yüksek bulunmuştur. "Rf"nin yüksek olması İsoptererenolün neden olduğu iskemiden etkilendiğini göstermektedir.
- ❖ Bileşke vektör olarak isimlendirilen "R" derivasyonu üzerinden yapılan EKG intervalleri ölçümlerinde istatistik sonuçlarına göre hiçbir grupta depolarizasyon ve repolarizasyona ait değişim görülmemektedir. Ancak İsoptererenole bağlı olarak bazı deney hayvanlarında T dalgası görülmüştür.
- ❖ Kardiyak hipertrofinin göstergelerinden olan kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranı ISOSF grubunda diğer gruplara kıyasla yüksek bulunmuştur. SERISO grubunda Serotonin reseptör antagonisti kalp vücut ağırlığını bir miktar azaltmıştır ve kalbin elektrofizyolojik etkisini bir miktar değiştirmektedir.
- ❖ Kardiyak hipertrofinin en önemli sonuçlarından olan kollajen birikimine bağlı olarak fibrotik doku hasarı ISOSF grubunda yoğun bir şekilde görülmüştür. SERISO grubunda fibrotik alanların azalması Serotonin reseptör antagonistinin protektif koruyucu olarak etki gördüğünü düşündürmektedir.
- ❖ Kardiyak hipertofi belirteçlerinden olan ANP ve BNP'nin fibroz oluşumu ile orantılı olduğu göstermektedir ve bu iki histolojik parametre paralel olarak değişim göstermektedir. ANP ve BNP'nin fibroz oluşumunun görüldüğü bölgelerde ifade edilmemesi fibrozisten koruduğunu düşündürmektedir.

Elde ettiğimiz bulgular isoproterenolle oluşturulan kardiyak hipertrofi modelinde 5-HT_{2B} reseptör antagonisti uygulamasının hem vektörkardiyografik hem de histolojik yöntemlerle değerlendirildiğinde "fibrosisi iyileştirme" yönünde etki ettiği değerlendirildi. Çalışmamızda oluşturulan fare modeli kalp hipertrofisinde elektrokardiyografik ve histolojik bulguların arasındaki patofizyolojik ilişkileri araştırmak için ileride bu alandaki araştırmalarda kullanılabilir. Özellikle fVCG de geç

ventriküler depolarizasyon aksını gösteren ‘Rf’ değeri ve Masson trikrom boyama yöntemlerinin faredeki kalp hipertrofisini gösteren hassas parametreler olduğu sonucuna varılmıştır.



9. KAYNAKLAR

Bageghni, S. A., Hemmings, K. E., Zava, N., Denton, C. P., Porter, K. E., Ainscough, J. F., Drinkhill, M. J., & Turner, N. A. (2018). Cardiac fibroblast-specific p38 α MAP kinase promotes cardiac hypertrophy via a putative paracrine interleukin-6 signaling mechanism. *The FASEB Journal*, 32(9), 4941-4954.

Bai, C. F., Liu, J. C., Zhao, R., Cao, W., Liu, S. B., Zhang, X. N., Guo, H. J., Yang, Q., Yi, D. H., & Zhao, M. G. (2010). Role of 5-HT_{2B} receptors in cardiomyocyte apoptosis in noradrenaline-induced cardiomyopathy in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37(7), e145-e151.

Balakumar, P., Singh, A. P., & Singh, M. (2007). Rodent models of heart failure. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 56(1), 1-10.

Barros Rde, A., Okoshi, M. P., & Cicogna, A. C. (1999). Beta-adrenergic pathway in healthy and hypertrophied hearts. *Arq Bras Cardiol*, 72(5), 641-656. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x1999000500012>

Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L., & McMullen, J. R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics*, 128(1), 191-227. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.005>

Boukens, B. J., Rivaud, M. R., Rentschler, S., & Coronel, R. (2014). Misinterpretation of the mouse ECG: 'musing the waves of *Mus musculus*'. *The Journal of Physiology*, 592(21), 4613-4626. <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1113/jphysiol.2014.279380?download=true>

Brea, J., Castro-Palomino, J., Yeste, S., Cubero, E., Párraga, A., Domínguez, E., & Loza, M. I. (2010). Emerging opportunities and concerns for drug discovery at serotonin 5-HT_{2B} receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(5), 493-503.

Burch, G. E. (1985). The history of vectorcardiography. *Medical History*, 29(S5), 103-131.

Cao, L., & Gardner, D. G. (1995). Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension*, 25(2), 227-234.

Cataliotti, A., Chen, H. H., Redfield, M. M., & Burnett, J. C. (2006). Natriuretic peptides as regulators of myocardial structure and function: pathophysiologic and therapeutic implications. *Heart Failure Clinics*, 2(3), 269-276.

- Costanzo, L. S. (2018). *Physiology* (L. Öztürk, Ed. Sixth ed.).
- Côté, F., Fligny, C., Fromes, Y., Mallet, J., & Vodjdani, G. (2004). Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends in molecular medicine*, 10(5), 232-238.
- Coué, M., & Moro, C. (2016). Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis. *Biochimie*, 124, 84-91.
- Ellmers, L. J., Knowles, J. W., Kim, H.-S., Smithies, O., Maeda, N., & Cameron, V. A. (2002). Ventricular expression of natriuretic peptides in Npr1^{-/-} mice with cardiac hypertrophy and fibrosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(2), H707-H714.
- Eric P. Widmaier, H. R., Kevin T. Strang. (2018). *Vander's Human Physiology The Mechanisms of Body Function* (Z. S. Tuncay Özgünen, Ed.).
- Feng, W., & Li, W. (2010). The study of ISO induced heart failure rat model. *Experimental and Molecular Pathology*, 88(2), 299-304.
- Frishman, W. H., Huberfeld, S., Okin, S., Wang, Y. H., Kumar, A., & Shareef, B. (1995). Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non-cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 35(6), 541-572.
- Fu, S., Ping, P., Wang, F., & Luo, L. (2018). Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. *Journal of Biological Engineering*, 12(1), 1-21.
- Gallo, S., Vitacolonna, A., Bonzano, A., Comoglio, P., & Crepaldi, T. (2019). ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *Int J Mol Sci*, 20(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092164>
- Gan, M., Zheng, T., Shen, L., Tan, Y., Fan, Y., Shuai, S., Bai, L., Li, X., Wang, J., & Zhang, S. (2019). Genistein reverses isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by regulating miR-451/TIMP2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108618.
- Ganong, W. (2015). *Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi* (H. Gökbel, Ed.).
- Gocht, A., Distler, J. H., Spriewald, B., Ramsperger-Gleichner, M., Weyand, M., Ensminger, S. M., & Heim, C. (2018). Effects of different serotonin receptor subtype antagonists on the development of cardiac allograft vasculopathy in murine aortic allografts. *Transplant Immunology*, 49, 43-53. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0966327418300042?via%3Dihub>

Gogiraju, R., Bochenek, M. L., & Schäfer, K. (2019). Angiogenic endothelial cell signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 20.

Gomes, A., Falcao-Pires, I., Pires, A., Brás-Silva, C., & Leite-Moreira, A. (2013). Rodent models of heart failure: an updated review. *Heart failure reviews*, 18(2), 219-249. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10741-012-9305-3.pdf>

Hanping Qi, J. R., Mingyao E, Qianhui Zhang, Yonggang Cao, Lina Ba. (2018). MiR-103 inhibiting cardiac hypertrophy through inactivation of myocardial cell autophagy via targeting TRPV3 channel in rat hearts. *Wiley* 1926-1938. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14095>

Horio, T., Nishikimi, T., Yoshihara, F., Matsuo, H., Takishita, S., & Kangawa, K. (2000). Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension*, 35(1), 19-24.

Hou, Y., Huang, C., Cai, X., Zhao, J., & Guo, W. (2011). Improvements in the establishment of a rat myocardial infarction model. *Journal of International Medical Research*, 39(4), 1284-1292.

Hoyer, D., Hannon, J. P., & Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 71(4), 533-554. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00746-8](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00746-8)

Hunter, J. J., & Chien, K. R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*, 341(17), 1276-1283. <https://doi.org/10.1056/NEJM199910213411706>

Izhak Kehat, J. D., Malte Tiburcy, Federica Accornero, Marc K. Saba-El-Leil, Marjorie Maillet, Allen J. York, John N. Lorenz, Wolfram H. Zimmermann, Sylvain Meloche, Jeffery D. Molkentin. (2010). Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 Regulate the Balance Between Eccentric and Concentric Cardiac Growth. *Circulation Research*, 108(2). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.231514>

J. L. Zeiders, F. J. S., G. Iaccarino, W. J. Koch¹ and T. A. Slotkin. (1999). Ontogeny of Cardiac β -Adrenoceptor Desensitization Mechanisms: Agonist Treatment Enhances Receptor/G-Protein Transduction Rather than Eliciting Uncoupling. *J Mol Cell Cardio*.

Jaffré, F., Bonnin, P., Callebort, J., Debbabi, H., Setola, V., Doly, S., Monassier, L., Mettauer, B., Blaxall, B. C., & Launay, J.-M. (2009). Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy.

Jalil, J. E., Doering, C. W., Janicki, J. S., Pick, R., Shroff, S. G., & Weber, K. T. (1989). Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res*, 64(6), 1041-1050. <https://doi.org/10.1161/01.res.64.6.1041>

Janssen, W., Schymura, Y., Novoyatleva, T., Kojonazarov, B., Boehm, M., Wietelmann, A., Luitel, H., Murmann, K., Krompiec, D. R., & Tretyn, A. (2015). 5-HT2B receptor antagonists inhibit fibrosis and protect from RV heart failure. *BioMed research international*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/438403>

Jaros, R., Martinek, R., & Danys, L. (2019). Comparison of different electrocardiography with vectorcardiography transformations. *Sensors*, 19(14), 3072.

Jiang, W., Xiong, Y., Li, X., & Yang, Y. (2021). Cardiac Fibrosis: Cellular Effectors, Molecular Pathways, and Exosomal Roles. *Front Cardiovasc Med*, 8, 715258. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.715258>

John E. Hall, A. C. G. (2017). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (B. Ç. YEĞEN, Ed. Thirteenth ed.).

Kanu Chatterjee, M. A., Donald Heistad, Richard E Kerber. (2013). *Cardiology: An Illustrated Textbook (Volume 1)*.

Kapoun, A. M., Liang, F., O'Young, G., Damm, D. L., Quon, D., White, R. T., Munson, K., Lam, A., Schreiner, G. F., & Protter, A. A. (2004). B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor- β in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circulation Research*, 94(4), 453-461. <https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/01.RES.0000117070.86556.9F?download=true>

Kaumann, A. J., & Levy, F. O. (2006). 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther*, 111(3), 674-706. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.004>

Kela, A., Reddy, L. P., & Thombre, D. (1980). ECG findings in normal rats and after administration of isoproterenol. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 24(2), 84-90.

Klabunde, R. E. (2017). Cardiac electrophysiology: normal and ischemic ionic currents and the ECG. *Advances in physiology education*, 41(1), 29-37.

Kong, P., Christia, P., & Frangogiannis, N. G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*, 71(4), 549-574. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1349-6>

Kralova, E., Mokran, T., Murin, J., & Stankovicova, T. (2008). Electrocardiography in two models of isoproterenol-induced left ventricular remodeling. *Physiol Res*, 57(Suppl 2), S83-S89.

Krenek, P., Kmecova, J., Kucerova, D., Bajuszova, Z., Musil, P., Gazova, A., Ochodnický, P., Klimas, J., & Kyselovic, J. (2009). Isoproterenol-induced heart failure in the rat is associated with nitric oxide-dependent functional alterations of cardiac function. *European journal of heart failure*, 11(2), 140-146. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2639419/pdf/hfn026.pdf>

Langenickel, T., Pagel, I., Höhnel, K., Dietz, R., & Willenbrock, R. (2000). Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 278(5), H1500-H1506.

Lee, H. S., Cho, K. W., Kim, H. Y., & Ahn, Y. M. (2020). Chamber-specific regulation of atrial natriuretic peptide secretion in cardiac hypertrophy: atrial wall dynamics in the ANP secretion. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 472(6), 639-651.

Merentie, M., Lottonen-Raikaslehto, L., & Ylä-Herttuala, S. (2018). Development and Validation of ECG Analysis Algorithm in Mice. In *Conn's Handbook of Models for Human Aging* (pp. 271-285). Elsevier.

Mikušová, A., Kráľová, E., Tylkova, L., Novotova, M., & Stankovičová, T. (2009). Myocardial remodelling induced by repeated low doses of isoproterenol. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 87(8), 641-651.

Nakamura, M., & Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*, 15(7), 387-407. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0007-y>

Nebigil, C. G., Choi, D. S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J. M., & Maroteaux, L. (2000). Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17), 9508-9513. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.17.9508>

Nebigil, C. G., Etienne, N., Messaddeq, N., & Maroteaux, L. (2003). Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling. *FASEB J*, 17(10), 1373-1375. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1122fje>

Nebigil, C. G., Hickel, P., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Douchet, M. P., Monassier, L., Gyorgy, K., Matz, R., Andriantsitohaina, R., Manivet, P., Launay, J. M., & Maroteaux, L. (2001). Ablation of serotonin 5-HT_{2B} receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. *Circulation*, 103(24), 2973-2979. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.24.2973>

Nebigil, C. G., & Maroteaux, L. (2003). Functional consequence of serotonin/5-HT_{2B} receptor signaling in heart: role of mitochondria in transition between hypertrophy and heart failure? *Circulation*, 108(7), 902-908. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000081520.25714.D9>

Neumann, J., Hofmann, B., & Gergs, U. (2017). Production and function of serotonin in cardiac cells. *Serotonin-a chemical messenger between all types of living cells*, 271-305.

Ni, W., & Watts, S. W. (2006). 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 33(7), 575-583.

Nicholas Sperelakis, Y. K., Andre Terzic, Michael V. Cohen. (2000). *Heart Physiology and Pathophysiology* (Fourth Edition ed.).

Noll, N. A., Lal, H., & Merryman, W. D. (2020). Mouse models of heart failure with preserved or reduced ejection fraction. *The American Journal of Pathology*, 190(8), 1596-1608. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7416075/pdf/main.pdf>

Oldfield, C. J., Duhamel, T. A., & Dhalla, N. S. (2020). Mechanisms for the transition from physiological to pathological cardiac hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*, 98(2), 74-84. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0566>

Osadchii, O. E. (2007). Cardiac hypertrophy induced by sustained β -adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev, Springer*

Osadchii, O. E. (2007). Cardiac hypertrophy induced by sustained β -adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart failure reviews*, 12(1), 66-86. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10741-007-9007-4.pdf>

Özbek, M. (2018). *Farelerde β -Adrenerjik Stimülasyon İle Oluşturulan Miyokardial Hasarın Elektrokardiyografik ve İnflamatuvar Parametreler İle Değerlendirilmesi.*

Pandey, K. N. (2021). Molecular Signaling Mechanisms and Function of Natriuretic Peptide Receptor-A in the Pathophysiology of Cardiovascular Homeostasis. *Frontiers in Physiology*, 12.

Patricia C. Brum, N. P. L. R., Aline V.N. Bacurau, & Medeiros, a. A. (2006). Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000300009>

Periasamy, S., Chen, S. Y., & Liu, M.-Y. (2011). The study of ISO induced heart failure rat model, *Exp Mol Pathol*. 2010; 88: 299–304. *Experimental and Molecular Pathology*, 1(90), 84.

Pluim, B. M., Zwinderman, A. H., van der Laarse, A., & van der Wall, E. E. (2000). The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*, 101(3), 336-344. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.3.336>

Rai, V., Sharma, P., Agrawal, S., & Agrawal, D. K. (2017). Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Molecular and cellular biochemistry*, 424(1), 123-145.

Rajadurai, M., & Prince, P. S. M. (2007). Preventive effect of naringin on cardiac markers, electrocardiographic patterns and lysosomal hydrolases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Toxicology*, 230(2-3), 178-188.

Rieder, M., Gauchel, N., Bode, C., & Duerschmied, D. (2021). Serotonin: a platelet hormone modulating cardiovascular disease. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 52(1), 42-47.

Rodney A. Rhoades, D. R. B. (2017). *Tıbbi Fizyoloji, Klinik Tıbbın Temelleri* (E. AĞAR, Ed.).

Roy, S. J., & Prince, P. S. M. (2013). Protective effects of sinapic acid on cardiac hypertrophy, dyslipidaemia and altered electrocardiogram in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *European Journal of Pharmacology*, 699(1-3), 213-218. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299912009430?via%3Dihub>

Ruskoaho, H., Kinnunen, P., Taskinen, T., Vuolteenaho, O., Leppäluoto, J., & Takala, T. (1989). Regulation of ventricular atrial natriuretic peptide release in hypertrophied rat myocardium. Effects of exercise. *Circulation*, 80(2), 390-400.

Ryu, Y., Jin, L., Kee, H. J., Piao, Z. H., Cho, J. Y., Kim, G. R., Choi, S. Y., Lin, M. Q., & Jeong, M. H. (2016). Gallic acid prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through regulation of JNK2 signaling and Smad3 binding activity. *Scientific reports*, 6(1), 1-14.

Schlueter, N., de Sterke, A., Willmes, D. M., Spranger, J., Jordan, J., & Birkenfeld, A. L. (2014). Metabolic actions of natriuretic peptides and therapeutic potential in the metabolic syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*, 144(1), 12-27.

Selvetella, G., & Lembo, G. (2005). Mechanisms of cardiac hypertrophy. *Heart Fail Clin*, 1(2), 263-273. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2005.03.006>

Shimoike, H., Iwai, N., & Kinoshita, M. (1997). Differential regulation of natriuretic peptide genes in infarcted rat hearts. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 24(1), 23-30.

Speerschnieder, T., & Thomsen, M. (2013). Physiology and analysis of the electrocardiographic T wave in mice. *Acta Physiologica*, 209(4), 262-271.

Stansfield, W. E., Ranek, M., Pendse, A., Schisler, J. C., Wang, S., Pulinilkunnil, T., & Willis, M. S. (2014). The pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure. In *Cellular and molecular pathobiology of cardiovascular disease* (pp. 51-78). Elsevier.

Sugden, P. H., & Clerk, A. (1998). Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med (Berl)*, 76(11), 725-746. <https://doi.org/10.1007/s001090050275>

Tamura, N., Ogawa, Y., Chusho, H., Nakamura, K., Nakao, K., Suda, M., Kasahara, M., Hashimoto, R., Katsuura, G., & Mukoyama, M. (2000). Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 4239-4244. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18212/pdf/pq004239.pdf>

Van De Vlekkert, D., Machado, E., & d'Azzo, A. (2020). Analysis of Generalized Fibrosis in Mouse Tissue Sections with Masson's Trichrome Staining. *Bio Protoc*, 10(10), e3629. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3629>

Wang, Y., Zhang, X., Fu, Y., Fu, D., Zhen, D., Xing, A., Chen, Y., Gong, G., & Wei, C. (2021). 1, 8-cineole protects against ISO-induced heart failure by inhibiting

oxidative stress and ER stress in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*, 910, 174472.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174472>

William E. Stansfield, M., Mark Ranek, PhD, Avani Pendse, MBBS, PhD, Jonathan C. Schisler, MS, PhD, Shaobin Wang, PhD, Thomas Pulinilkunnil, PhD, Monte S. Willis, MD, PhD. (2014). The Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. In *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease*.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405206-2.00004-1>

William Grosman, D. J. a. L. P. M. (1975). Wall Stress and Patterns of Hypertrophy in the Human Left Ventricle. *Int J Dev Neurosci*, 56.
<https://doi.org/10.1172/JCI108079>

Yoshimura, M., Yasue, H., & Ogawa, H. (2001). Pathophysiological significance and clinical application of ANP and BNP in patients with heart failure. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 79(8), 730-735.
<https://www.ingentaconnect.com/content/cndscipub/cjpp/2001/00000079/00000008/art00013;jsessionid=5fe3b361ci6si.x-ic-live-03>

Żmudzka, E., Sałaciak, K., Sapa, J., & Pytka, K. (2018). Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. *Life sciences*, 210, 106-124.

10. EKLER

EK-1 ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARI

Evrak Tarih ve Sayısı: 13/08/2020-E.60260



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



Sayı : 28233352-302.14.01-
Konu : Merve TEMEL Tez Konusu Hk.

SBE FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüzün 12.08.2020 tarih ve 25/7 sayılı Yönetim Kurulu Toplantısında, Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Merve TEMEL'in tez konusunun, etik kurul onayı ile birlikte (etik kurul onayı gerekli ise) **“Farelerde Kimyasal Olarak Oluşturulan Kalp Hipertrofisinin Histolojik ve Elektrokardiyografik Olarak Değerlendirilmesi”** olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Ömer TETİK
Enstitü Müdürü

EK-2. ETİK KURUL ONAYI

T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu							
KARAR TARİH / NO	22/ 12 / 2020 / 77.637.435						
ARAŞTIRMANIN ADI	Farclerde Kimyasal Olarak Oluşturulan Kalp Hipertrofisinin Histolojik Ve Elektrokardiyografik Olarak Değerlendirilmesi						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK - Fizyoloji AD						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Doktora öğrencisi Merve TEMEL,- Prof. Dr. H. Seda VATANSER						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐	YÜKSEK LİSANS-DOKTORA TEZİ ☒	AKADEMİK AMAÇLI ☐	Eğitim ☐			
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	07/ 12 / 2020 / Tarih ve 39902 sayılı; araştırma dosyası						
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.						
Unvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlgili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlgili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye		
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ	☐	☐	Prof. Dr. Gömhan TEMELTAŞ	☐	☐		
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon AD	☐	☐	Prof. Dr. Özge YILMAZ Çocuk Hastalıkları AD.	☐	☐		
Prof. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi AD	☐	☐	Dr. Öğr. Üyesi Fulya OCAK – Veteriner Hekim	☐	☐		
Prof. Dr. Kıvanç GÜNHAN (DEHAM MD)	☐	☐	Saima ÖZKARA - Sivil Toplum Üyesi	☐	☐		
Dr. Öğr. Üyesi Selim ALTAN Tıp Tarihi ve Etik AD	☐	☒	Levent ÖDEMİŞ Sivil Üye	☐	☐		
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgileri rica ederim. Ercüment ÖLMEZ							

EK-3. TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tez Adı: Farelerde Kimyasal Olarak Oluşturulan Kalp Hipertrofisinin Histolojik Ve Elektrokardiyografik Olarak Değerlendirilmesi

Tezime ilişkin 12/05/2022 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7'dir.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

12.05.2022

Adı Soyadı :Merve TEMEL
Öğrenci No :171363004
Anabilim Dalı :Fizyoloji Anabilim Dalı
Programı :Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
(Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK)

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Merve	Soyadı	TEMEL
------------	-------	---------------	-------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fizyoloji AD, YÖK100/2000 Öncelikli alanlar Patofizyoloji AD	2022
Yüksek Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD.	2015
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü.	2012
Lise	Turgutlu Anadolu Lisesi	2006

Yabancı dilleri	Okuduğunu anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

YDS/e-YDS	ÜDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
		70,00							

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
MS Office Programları	İyi
SPSS İstatistik Programı	İyi
Graphpad Prism İstatistik Programı	İyi