

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAŞLANMAYA BAĞLI KALP FONKSİYON
DEĞİŞİKLİKLERİNDE BETA ADRENERJİK
SİSTEMİN ROLÜNÜN ELEKTROFİZYOLOJİK
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Ali Aytac SEYMEN

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Belma TURAN**

2008-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 15/01/2008

Prof. Dr. Hakan GÜRDAL
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet UĞUR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Raportör

Prof. Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Danışman

Prof. Dr. Nuhan PURALI
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. A. Aslıhan KÖKSOY
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kalbin Genel Özellikleri	1
1.2. Kardiyomiyositlerde Uyarılma Kasılma Çiftlenimi	1
1.3. Ca^{2+} Uyarımlı Ca^{2+} Salımı	4
1.4. G protein-kenetli Reseptörler	4
1.4.1. Adrenerjik Reseptörler	8
1.4.1.1. α -Adrenerjik Reseptörler	9
1.4.1.2. β -Adrenerjik Reseptörler	9
1.4.1.3. β -Adrenerjik Reseptör Blokerleri	9
1.5. Yaşlanma ve Kalpte β -Adrenerjik Sinyal İletim Sistemi	11
1.6. Çalışmanın amacı	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	13
2.1. Deneysel Gruplarının ve Yaş Artışı Modelinin Oluşturulması	13
2.2. Aksiyon Potansiyellerinin ve Kasılma Yanıtlarının Kaydedilmesi	14
2.3. Kardiyomiyositlerin İzolasyonu	16
2.4. L-tipi Ca^{2+} Akımlarının Kaydedilmesi	16

2.5. Hücre İçi Serbest Ca^{2+} Derişimi ($[Ca^{2+}]_i$) Ölçümü	17
2.6. İstatistiksel Yöntem	18
2.7. Kullanılan Kimyasallar	18
3. BULGULAR	19
3.1. Hayvanların Genel Durumları	19
3.2. Aksiyon Potansiyeli ile İlgili Parametreler	20
3.3. L-tipi Ca^{2+} Kanal Akımı Parametleri	23
3.4. Hücre içi Serbest Ca^{2+} Derişimleri	27
3.4.1. Hücre İçi Serbest Bazal Ca^{2+} Seviyeleri	28
3.4.2. Hücreiçi Ca^{2+} Transientleri	29
4. TARTIŞMA	33
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
ÖZET	40
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	50

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının danışmanlığını üstlenen ve çalışmanın yapılması için gerekli tüm olanakları sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Belma TURAN'a teşekkür ederim.

Çalışma süresince desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet UĞUR, Doç. Dr. Aslıhan KÖKSOY, Prof. Dr. Hakan GÜRDAL, Dr. Nazmi YARAŞ' a ve çalışmalarımın her aşamasında benimle birlikte olan sevgili arkadaşlarım Erkan TUNCAY ve Esmâ Nur ZEYDANLI'ya teşekkür ederim.

Varlığıyla ve sevgisiyle her zaman bana güç veren Dr. Aslı UYANIK' a, benim için karşılıksız her türlü fedakarlığı yapıp beni bugünlere getiren saygıdeğer anneme ve babama, her zaman kendisini örnek aldığım sevgili abime ve dostlarım Evrim TANRIVERDİ ve Murat HATİPOĞLU'na teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında emekleri ve mesaieleri ile her zaman yanımda olan Biyofizik ABD çalışanlarına ve öğrencilerine ayrıca teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AP	Aksiyon potansiyeli
APD ₂₅	AP repolarizasyon fazının % 25'ine inmesi için geçen süre
APD ₅₀	AP repolarizasyon fazının % 50'sine inmesi için geçen süre
AP ₇₅	AP repolarizasyon fazının % 75'ine inmesi için geçen süre
AP ₉₀	AP repolarizasyon fazının % 90'ına inmesi için geçen süre
βARK	β-Adrenerjik Reseptör Kinaz
[Ca ²⁺] _i	Hücre içi serbest Ca ²⁺ konsantrasyonu
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat (Bir hücre içi ikincil mesajcı)
CICR	Ca ²⁺ Induced Ca ²⁺ Release (Ca ²⁺ Uyarımlı Ca ²⁺ Salınımı)
PLB	Fosfolamban
DT ₅₀	Yarı gevşeme süresi
ISO	Isoproterenol (β-adrenerjik reseptör agonisti)
K3	üç aylık dişi sıçan grubu
K8	sekiz aylık dişi sıçan grubu
K8+TİM	timolol verilmiş 8 aylık dişi sıçan grubu
K8+PROP	propranolol verilmiş 8 aylık dişi sıçan grubu
mRNA	Mesajcı RNA
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ Exchanger (Na ⁺ /Ca ²⁺ Değiştokuşcusu)
PKA	Protein Kinaz A
RyR	Riyanodin Reseptörü
SERCA	Sarco/Endoplazmik Retikulum Calcium Pump ATPase (SR Ca ²⁺ Pompası)
SR	Sarcoplazmik Retikulum
SVBDG	Sol Ventrikül İçi Basınç Değişimi Genliği
TP	Kasılma süresi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Ventrikül hücresi aksiyon potansiyelinin evreleri ve bu evrelerde rol alan akımlar. (Mukherjee ve Spinale, 1999).

Şekil 1.2. Kardiyomiyositlerde hücre içi Ca^{2+} düzenlenim mekanizması. Küçük bölmedeki grafik aksiyon potansiyeli, Ca^{2+} transienti ve kasılmanın eş zamanlı değişimlerini göstermektedir (Bers, 2002).

Şekil 1.3. G protein-kenetli reseptör yapısı (katz,2006).

Şekil 1.4. β -adrenerjik sinyal iletim sisteminin şematik gösterimi. β -AR, beta-adrenerjik reseptörler; Gs uyarıcı (stimulatory) G protein; AC, adenilil siklaz; PDE IV, fosfodiesteraz IV; Tn-I, troponin-I; PLB, fosfolamban; RYN, ryanodin reseptörü; CS, kalsekstrin; L-SR, boyuna sarkoplazmik retikulum; SR-Cis, sarkoplazmik retikulum sisterna; P, fosforilasyon; SL, sarkolema

Şekil 1.5. β -adrenerjik agonistin miyokard kasılmasına etkisi

Şekil 2.1. Sol ventrikül papiller kasından kaydedilen bir aksiyon potansiyeli eğrisi üzerinde ölçülen parametreler. Kalın çizginin eğriyi kestiği nokta tepe değeri ve E_m dinlenme potansiyeli olmak üzere, çizgiden sağa doğru repolarizasyon evresinin maksimum değerinin %25, 50, 75 ve 90'ına düşmesi için geçen süreler gösterilmektedir (Özdemir, 2005).

Şekil 3.1. Deney gruplarında bulunan hayvanlara ait orijinal datalardan elde edilen aksiyon potansiyeli kayıtları. 3 aylık grup (K3), 8 aylık grup (K8), timolol verilmiş grubu (K8+TİM), propranolol verilmiş grubu (K8+PROP) olarak gösterilmiştir.

Şekil 3.2. Aksiyon potansiyeli parametrelerinin gruplardaki ölçülen ortalama değerleri. 3 aylık sıçan grubu (K3), 8 aylık sıçan grubu (K8), 7 ay boyunca timolol ile beslenmiş sıçan grubu (K8+TİM), 7 ay propranolol ile beslenmiş sıçan grubu (K8+PROP) ortalama değerleri için çizdirilmiş grafik. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $p<0,05$ K8 vs K3 grubu # $p<0,05$ vs K8 grubu

Şekil 3.3. L-tipi Ca^{2+} kanal akımları. K3, K8, K8+TİM ve K8+PROP gruplarına ait örnek I_{CaL} kayıtları. Örnek kayıtlar depolarizasyon 0 mV'dan (maksimum akım) alınmıştır.

Şekil 3.4. L-tipi kalsiyum kanal akım yoğunlukları. K3, K8, K8+TİM ve K8+PROP gruplarına ait 0 mV'da ölçülen akım yoğunlukları ortalamasından elde

edilen değerleri gösteren grafik. Değerler ortalama \pm standart hata ile temsil edilmiştir.

şekil 3.5. L-tipi Ca^{2+} kanallarının akım-voltaj karakteristikleri. Yukarıda K3, K8, K8+TİM VE K8+PROP gruplarına ait ölçülen akım yoğunluklarının ortalamasından elde edilen değerlerin değişimini gösteren grafik ve akımın kayıt protokolü görülmektedir. Değerler ortalama \pm SEM ile temsil edilmiştir.

şekil 3.6. Grupların hücre içi serbest bazal Ca^{2+} seviyeleri. Dinlenme durumundaki 3 Aylık(K3), 8 Aylık(K8), 7 ay boyunca Timolol verilen (K8+TİM) ve 7 ay boyunca Propranolol verilen (K8+Prop) kardiyomiyositlerinden kaydedilen ~20 s'lik sinyallerin ortalama değerleri ve standart hatalar (ortalama \pm SEM). * $p<0,05$ K8 vs K3 grubu. # $p<0,05$ vs K8 grubu.

şekil 3.7. Hücre içi Ca^{2+} transientleri. Belirli bir süre boyunca bir kontrol kardiyomiyositinden kaydedilen hücre içi Ca^{2+} transientleri ve hücre uyarını olarak elektriksel alan uyarısının uygulama biçimini (zdemir, 2005).

şekil 3.8. Gruplara ait rnek Ca^{2+} transientleri ve üzerlerine uydurulmuş fonksiyon (gama dağılım fonksiyonu) eğrisi (kesikli izgi). Transientler 10 ms süreli, 20-30 V'luk pulsların 0.2 Hz frekansında uygulanmasıyla elde edilmiştir.

şekil 3.9. Alan uyarısı ile kaydedilmiş Ca^{2+} transientleri. Transientlerden hesaplanan maksimum genliklerin ve kinetik parametrelerin ortalama değerleri (ortalama \pm SEM). **A;** maksimum genlik ($\Delta F_{340/380}$), **B;** tepeye çıkış süresi (TP), **C;** maksimum değerin %50' sine iniş süresi (DT_{50}). * $p<0,05$ K8 vs K3 grubu. # $p<0,05$ vs K8 grubu.

ÇİZELGELER

Tablo 1.1. Bazı β blokerleri ve boke edilen reseptörler.

Tablo 3.1. Deney gruplarındaki hayvanların vücut ağırlıkları

Tablo 3.2. Deney gruplarındaki hayvanların aksiyon potansiyeli parametreleri

Tablo 3.3. Kardiyomiyositlerden kaydedilen I_{CaL} akım yoğunluğu ve hücrelerin kapasitansları.

Tablo 3.4. Kardiyomiyositlerin kaydedilen hücre içi bazal Ca^{2+} değerleri.

Tablo 3.5. Kardiyomiyositlerden kaydedilen Ca^{2+} transientlerinin kinetik parametreleri (Max, TP, DT_{50}).

1. GİRİŞ

1.1. Kalbin Genel Özellikleri

Memelilerde tüm doku ve organlara kan pompalamakla görevli olan kalp, özel bir kas yapısına sahip olup dış yüzü fibröz bir kılıf olan perikardiyum ile sarmalanmıştır. Kalp duvarları temel olarak miyokardiyum denilen kalp kası hücrelerinden (kardiyomiyosit) oluşur. Kardiyomiyositler birbirine sıkıca bağlanmış tabakalar halinde bulunur ve kalp odacıkları adı verilen kalbin temel olarak 4 adet olan odacıklarını bütünüyle sarar. Odacıklardan birinin duvarları kasıldığı zaman sıkılmış bir yumruk gibi bir araya gelir ve çevreledikleri kana basınç uygularlar. Kardiyomiyositler mikrometre boyutunda olup birbirlerine interkale diskler denen yapılar aracılığı ile bağlıdırlar. Bunların içinde hücreleri bir arada tutan ve miyofibrillerin de bağlandığı desmozomlar vardır (Vander ve ark., 1994).

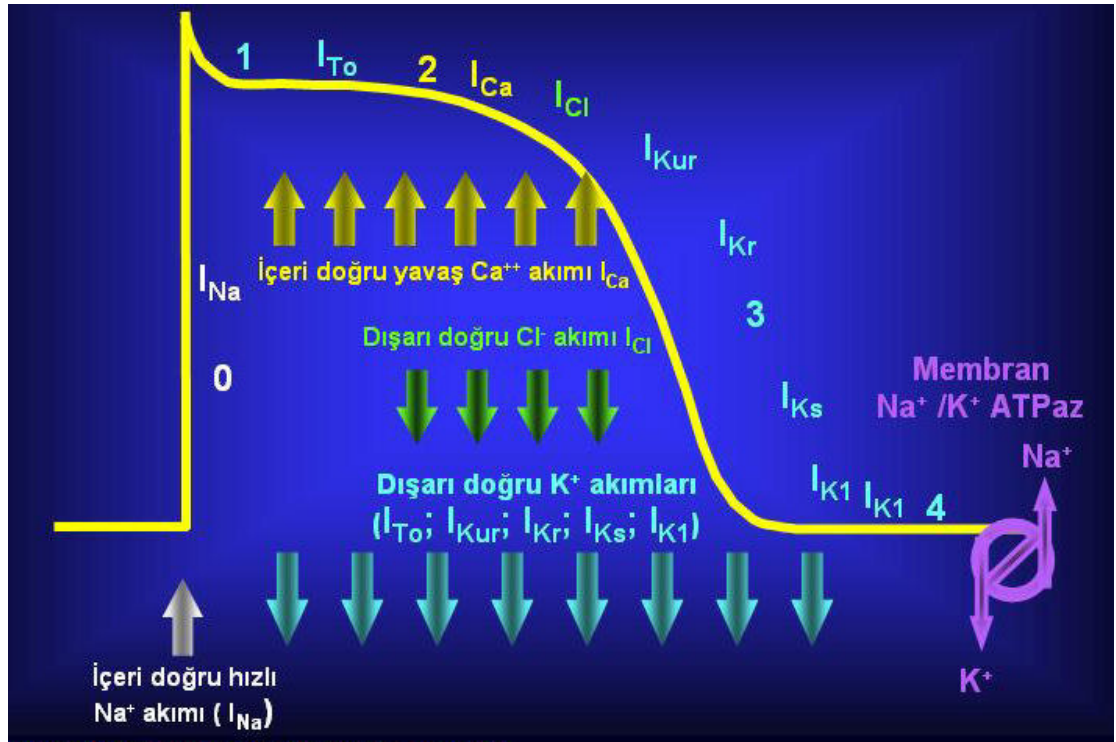
interkale diskler aslında, kalp kası hücrelerini birbirinden ayıran hücre zarlarıdır. Kalp kası lifleri, birbirine seri bağlanmış çok sayıda ayrı hücreden meydana gelir. Ancak interkale disklerin elektriksel direnci kalp kası lifinin dış zarının direncinin yalnızca 1/400'üdür. Çünkü hücre zarlarının kaynaşarak oluşturduğu, "gedik kavşaklar (gap junction)" geçirgendir, iyonların difüzyonuna izin verirler. Dolayısıyla, işlevsel açıdan, iyonların kalp kası liflerinin uzun eksen boyunca kolaylıkla hareket etmeleri sağlanır. Böylece aksiyon potansiyelleri kolaylıkla interkale diskleri geçer ve bir kalp kası hücresinden diğerine iletilirler. (GUYTON, 1996)

1.2. Kardiyomiyositlerde Uyarılma Kasılma Çiftlenimi

Kardiyomiyositleri saran hücre zarının (sarkolemma) depolarizasyonu ile başlayan ve kalbin kasılmasına kadar süren olaylar zincirine uyarılma-kasılma çiftlenimi (excitation-contraction coupling) adı verilir. Kalp kasının kasılması kası oluşturan

hücrelerin zarlarının depolarizasyonu ile başlar. Hücrelerin birbiriyle bağlantılı olmalarından dolayı oluşan aksiyon potansiyeli (AP) bir hücreden diğerine geçer. Böylece, başlangıçta bir hücrenin uyarılması diğer bütün hücrelerin uyarılmasıyla sonuçlanır (Wahler, 1997).

Kalp kası AP altında yatan iyonik mekanizmalar Şekil 1.1'de özetlenmiştir. Dinlenim durumunda hücre zarı potasyum iyonlarına (K^+) daha geçirgen olduğu için dinlenim zar potansiyeli K^+ denge potansiyeline (Nerst potansiyeli) yakın bir değerdedir (Wahler, 1997).



Şekil 1.1. Ventrikül hücresi aksiyon potansiyelinin evreleri ve bu evrelerde rol alan akımlar. (Mukherjee ve Spinale, 1999).

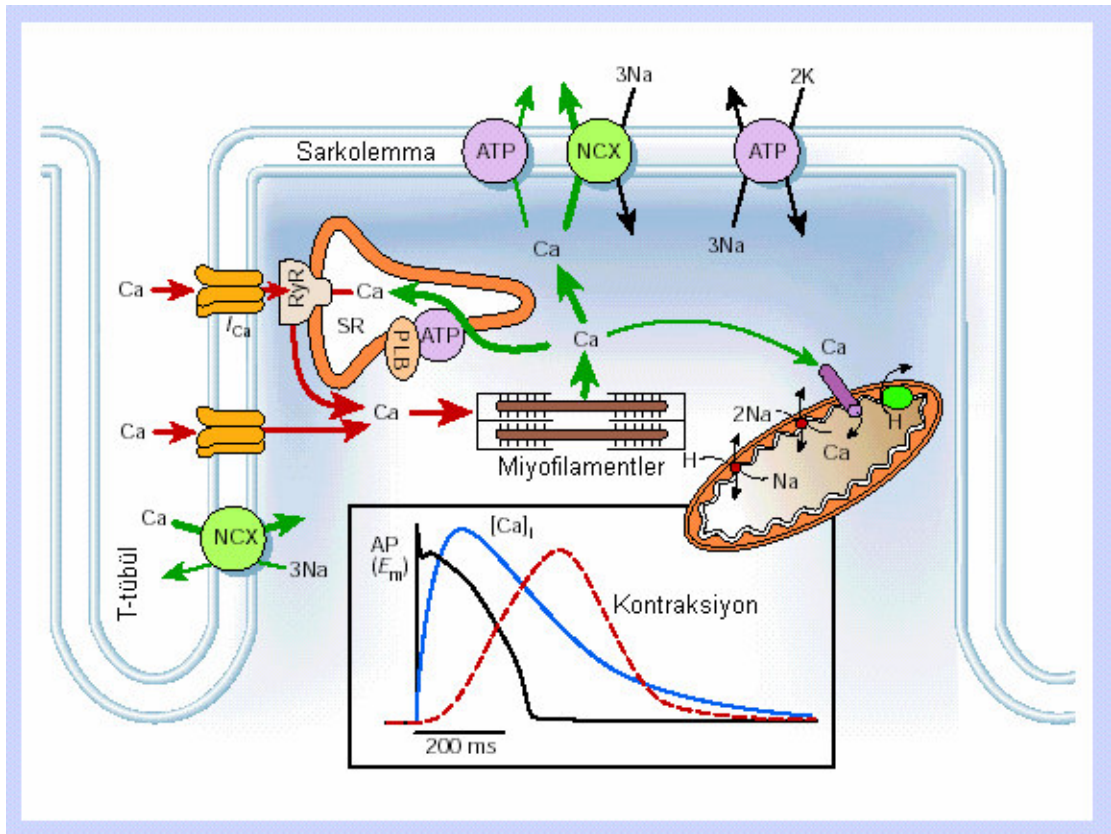
Şekil 1.1'deki AP'de 0 zarın depolarizasyon evresini, 1 erken repolarizasyon evresini, 2 plato evresini, 3 repolarizasyon evresini ve 4 ise zarın dinlenme potansiyel evresini işaret etmektedir.

Depolarizasyon evresi, voltaj-bağımlı Na^+ kanallarının aktivasyonu ile hücre içine büyük miktarlarda ve hızlı bir şekilde Na^+ girmesiyle gerçekleşir ve zar potansiyeli Na^+ nun denge potansiyeline doğru hızla değişir. Böylece Na^+ akımları zarın depolarizasyon evresinin temel elemanıdır. Erken repolarizasyon evresinde aksiyon potansiyelinin depolarizasyon evresini takip eden kısa süreli ve hızlı bir repolarizasyon evresidir. Depolarizasyon sürecinde, dışarı doğru geçici akım taşıyan K^+ kanallarının (transient outward K^+ current; I_{to}) aktive olması bu evrede önemli rol oynar. AP süresinde diğerlerine göre en uzun olan plato evresi voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının (I_{Ca}) aktivasyonuna dayalıdır. Buna karşılık plato fazının sonunda K^+ kanal akımları (I_{K}) maksimum değerine ulaşır ve böylece AP'nin repolarizasyon fazı başlamış olur. Daha sonra içeri doğrultucu K^+ kanal akımının (I_{K1}) da bu evreye katkıda bulunmasıyla repolarizasyonun hızı artar ve sarkolemma dinlenim zar potansiyeline hızlı bir şekilde geri döner. Dinlenim durumunda membran K^+ iyonlarına yüksek geçirgenlik gösterir ve bu yüzden dinlenim zar potansiyeli K^+ 'un denge potansiyeline yakın değerlerde olur. Kardiyomiyositlerde dinlenim zar potansiyelinin en önemli belirleyicisi K^+ iyonlarının oluşturduğu içeri doğrultucu akımdır (I_{K1}) (Mukherjee ve Spinale, 1999).

Ayrıca, AP'ye katkıda bulunan bir diğer elaman Na^+/K^+ pompasıdır. Küçük bir akım oluşturmakla birlikte elektrojenik olan Na^+/K^+ pompasının asıl işlevi akım üretmekten çok AP'yi oluşturacak iyonik gradyentleri korumaktır (Wahler, 1997). Bir diğer pompa Ca^{2+} pompasıdır. Diğer yandan, hücre zarında bulunan ve yine elektrojenik olarak çalışan ve sadece bir cins iyonun gradyentini kullanarak diğer iyonu yokuş yukarı taşıyan $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -değiştirici (NCX) normal modunda dışarı attığı her Ca^{2+} için içeri 3 Na^+ taşırken, plato evresinin başlangıcında ters yönde çalışarak önemli bir Ca^{2+} akımı oluşturmaktadır. Bu yüzden, NCX'in AP'nin şekline de etkisi olduğu ileri sürülmüştür (Janvier ve Boyett, 1996).

1.3. Ca^{2+} Uyarımlı Ca^{2+} Salımı

Genellikle, sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{2+} salımının temel mekanizması olarak kabul edilen bu olaya “ Ca^{2+} -uyarımlı Ca^{2+} -salımı” (CICR) denir (Bers, 2002; Bracken ve ark., 2003). Sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salımı kardiyomiyosit zarlarının depolarizasyonu sonucu açılan voltaj bağımlı L-tipi Ca^{2+} kanalları (I_{CaL}) aracılığıyla hücre içine Ca^{2+} ‘nun girişi ile başlar (Şekil 1.2). Küçük miktardaki bu Ca^{2+} ‘nu akışı SR yüzeyindeki ryanodin reseptörlerinden (RyR2) çok daha büyük bir Ca^{2+} salımını başlatır. SR aktivasyonunun ve Ca^{2+} salımının ardından, depolarizasyondan sonraki 20-40 ms’lik süreçte hücre içinde serbest Ca^{2+} konsantrasyonunda ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 100 nM olan diastolik seviyeden, 1 μM ’lık sistolik seviyeye ani bir artış gerçekleşir (Bracken ve ark., 2003).



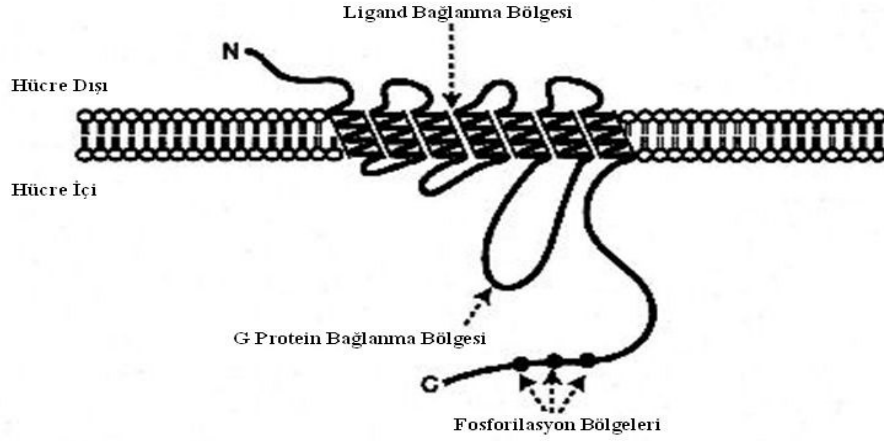
Şekil 1.2. Kardiyomiyositlerde hücre içi Ca^{2+} düzenlenim mekanizması. Küçük bölmedeki grafik aksiyon potansiyeli, Ca^{2+} transiyenti ve kasılmanın eş zamanlı değişimlerini göstermektedir (Bers, 2002).

Kasılma fonksiyonu, hücre içinde artan Ca^{2+} 'un troponin C miyofilamentine (Ca^{2+} 'una affinitesi yüksek) bağlanıp kontraktıl makine adı verilen aktin-miyozin-tropomiyozin kompleksini harekete geçirmesiyle başlar. Kısaca, troponin C- Ca^{2+} kompleksi tropomiyozin ile etkileşerek aktin ve miyozin miyofilamentleri arasındaki aktif bölgelerin açığa çıkmasını ve çapraz köprülerin oluşmasını sağlar. Böylece, sarkomer boyu kısalmır ve kasılma gerçekleşir (Bers, 2002; Bracken ve ark., 2003).

Ca^{2+} 'un SR Ca^{2+} -pomпасı (SERCA) ile SR içine geri alınması, Ca^{2+} pomпасı ve NCX ile hücre dışına atılmasıyla hücrede $[Ca^{2+}]_i$ dinlenme seviyesine değişir (Wahler, 1997; Bers, 2002; Bracken ve ark., 2003). Bu sırada Ca^{2+} troponin C'den ayrılır (kasın gevşeme süreci) ve kas başlangıçtaki dinlenme durumuna geri döner (Bers, 2002; Bracken ve ark., 2003).

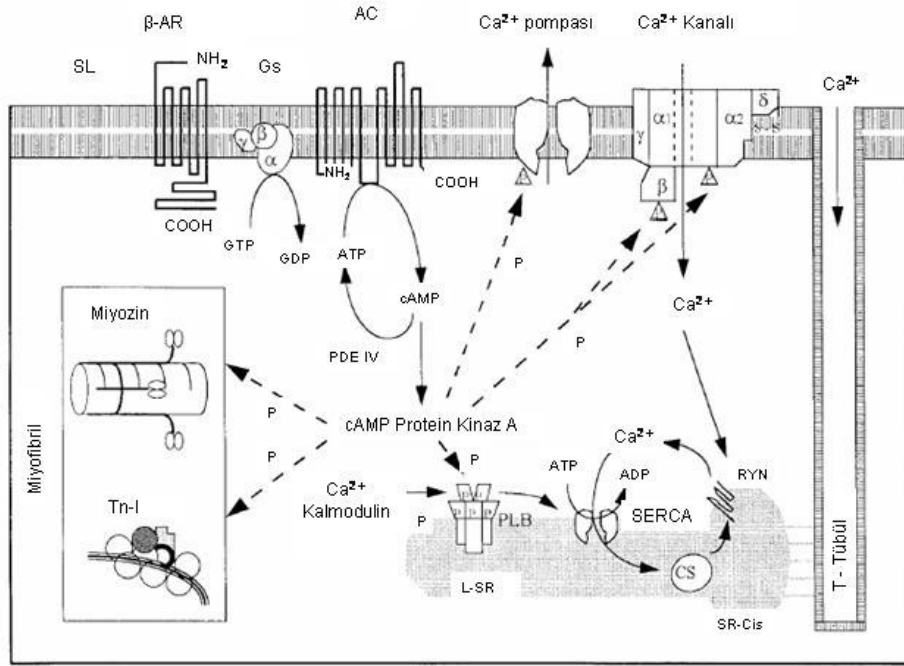
1.4. G protein-kenetli Reseptörler

G protein-kenetli reseptörlerin aktivite olabilmesi için, fosforilasyona uğraması sonucu GTP (guanozin trifosfat) oluşturan GDP (guanozin difosfat)'ın ortamda bulunması gerektiğinden, bu reseptörlere "G protein-kenetli reseptörler" adı verilmektedir. G protein-kenetli reseptörler, polipeptid yapısındadırlar ve mesaj molekül ile "bağlanma alanı" bulunduran bir ekstraselüler bölge, 7 helezonlu transmembran bölge ve reseptörün mesaj molekülden aldığı sinyalin iletimini (transduction) ve amplifikasyonunu sağlayan G proteinler ile temas eden intraselüler bölge olmak üzere 3 kısmı vardır (Şekil 1.3.) (Süzer, 2005).



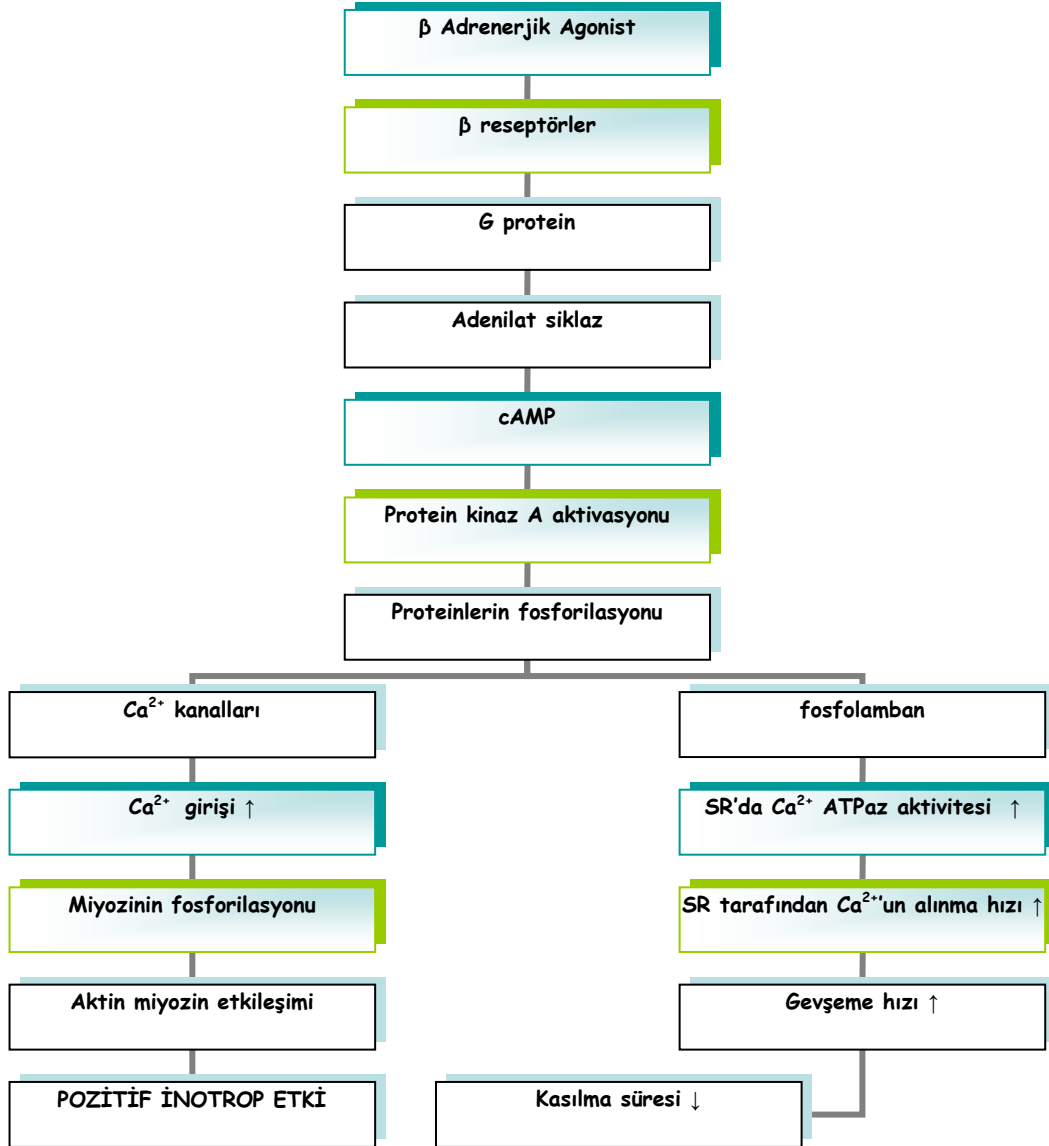
Şekil 1.3. G protein-kenetli reseptör yapısı (Katz, 2006).

Her bir G proteini α , β ve γ olmak üzere üç farklı alt üiteden oluşan heterotrimetrik bir yapıya sahiptir. α alt üite aktif olmadığında, bir guanozin difosfat (α -GDP) içerir ve β ve γ üitelere bağlı inaktif şekilde bulunur (Şekil 1.4). Reseptörün aktive olmasıyla α -GDP fosforilasyona uğrayarak β ve γ alt üitelerden ayrılır ve α -GTP oluşur. α -GTP alt ünitesi bazı enzimlerin aktivitesini modüle eder ve biyolojik etkilerinin ortaya çıkmasını sağlar. GTP-az enzimi α -GTP'nin alt ünitesinin defosforilasyonuna neden olur ve onu tekrar α -GDP'ye dönüştürerek β ve γ alt üitelere bağlanıp inaktif duruma geçmesine yol açar. Elde edilen etki, G proteinin α alt ünitesinin yapısıyla bağlantılıdır. Değişik α alt üite tipleri vardır. Özellikle α_s ve α_i tipleri hücrelerin pek çoğunda bulunmaktadır. G proteinlerin α alt ünitesi G_s , G_i , G_t ve G_o başlıca tipleri olarak simgelenebilir. (s: uyarıcı, i: inhibitör, t: transdusin, o: diğer anlamındadır). G_s proteinler adenilat siklaz aktivasyonu sonucu cAMP sentezinde bir artışa neden olur. G_i proteinler adenilat siklazı inhibe ederek cAMP sentezini azaltır (Dökmeci, 2000).



Şekil 1.4. β-adrenerjik sinyal iletim sisteminin şematik gösterimi. β-AR, beta-adrenerjik reseptörler; Gs uyarıcı (stimulatory) G protein; AC, adenil siklaz; PDE IV, fosfodiesteraz IV; Tn-I, troponin-I; PLB, fosfolamban; RYN, riyanodin reseptörü; CS, kalsekstrin; L-SR, boyuna sarkoplazmik retikulum; SR-Cis, sarkoplazmik retikulum sisterna; P, fosforilasyon; SL, sarkolema

Sitozoldeki konsantrasyonu artan cAMP, protein kinaz A'yı (PKA, cAMP bağımlı protein kinaz) aktive eder. Aktive olan PKA ise, seçilmiş olan hedef proteinlerin fosforilasyonunu katalizler (Şekil 1.4). Fosforilasyon bu proteinlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde etkili bir faktördür. Hücre fonksiyonlarının yerine getirilmesinde rol alan önemli proteinlerin fosforilasyonu, hücrenin faaliyetlerinin düzenlenmesini sağlamaktadır (Şekil 1.5) (Alberts ve ark., 1994).



Şekil 1.5. β-adrenerjik agonistin miyokard kasılmasına etkisi. Adrenerjik reseptörlere ek olarak muskarinik reseptörler, purinerjik reseptörler ve anjiyotensin reseptörleri de G protein-kenetli reseptör ailesinde yer alan bazı önemli reseptörlerdir (Katz, 2006).

1.4.1. Adrenerjik Reseptörler

Adrenerjik reseptörlerin iki alt grubu bulunmaktadır. Bunlar α ve β adrenerjik reseptörlerdir.

1.4.1.1. α -Adrenerjik Reseptörler

İki farklı α_1 ve α_2 olmak üzere α -adrenerjik reseptör alt tipleri tanımlanmıştır. α_1 adrenerjik reseptörleri postsinaptiktir ve etkileri G protein aracılı inositoltrifosfat, sonra da fosfolipaz C nin aktif hale gelmesi ile oluşur. α_2 reseptörleri ise presinaptiktir ve ayrıca pankreasın β hücrelerinde bulunur. Hücreiçi etkileri inhibitör türündendir ve G protein aracılı adenilat siklazın inhibe edilmesine bağlıdır (Süzer, 2005).

1.4.1.2. β -Adrenerjik Reseptörler

Dört farklı β -adrenerjik reseptör tipi tanımlanmıştır ve bunlar β_1 , β_2 , β_3 , β_4 olarak adlandırılır. Tüm β -reseptörlerin etkileri G protein aracılı adenilat siklaz/cAMP sisteminin uyarılmasına bağlıdır (süzer, 2005). Memeli ventrikül kardiyomiyositlerinde (kalp kası hücresi) en etkin olanları ise β_1 -adrenerjik reseptörlerdir (Steinberg, 1999).

β_1 -reseptörler taşikardi, miyokard kontraktilitesi ve renin salınmasında artıştan sorumludur. β_2 -reseptörler vazodilatasyon, bronkodilatasyon, kas ve karaciğer glikojenolizinde artış, insülin salgılanmasında artış ve uterus düz kasında gevşemeden sorumludurlar. β_3 -reseptörler lipolizden sorumludurlar. Hipotiroidi gibi kalp yetmezliği tablosu oluşturan bazı durumlarda kalpte eksprese olur. β_4 -reseptörler yeni tanımlanmışlardır. Sinoatrial nod, atrium ve ventriküldeki miyokardiyumda bulunur. Fizyolojik önemi henüz tam bilinmese de uyarılması ile pozitif inotropik ve pozitif kronotropik etkiler oluşur (süzer, 2005).

1.4.1.3. β -Adrenerjik Reseptör Blokerleri

Beta blokörler, pozitif inotropik ve kronotropik etkiyi bloke ederek miyokardial fonksiyonları bastırırlar. Böylece adrenerjik sinyal yolağını düzenlenmesine yardım ederek daha etkili çalışmasını sağlar. Aynı zamanda klinik araştırmalarda β blokör uygulamasının kalp rahatsızlıklarına bağlı olarak ölümleri %65 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Shiyam S. ve ark, 2004).

Timolol ve propranolol non-selektif β -blokerlerdir (Tablo 1.1). Timolol vücutta iyi absorblanır ve büyük ölçüde karaciğerde metabolize edilir. Timolol hipertansiyonda ve enfarktüs sonrasında kullanılmaktadır. Propranolol ise, kişiler arasında farklar olmasına karşın vücutta neredeyse tamamen absorblanır. Propranolol hipertansiyonda, enfarktüs sonrasında, anjinde ve aritmilerde kullanılmaktadır (Reiter, 2004).

β - blokeri	Bloke edilen reseptör
Atenolol	β_1
Asebutolol	β_1
Bisoprolol	β_1
Metoprolol	β_1
Nadolol	β_1, β_2
Penbutolol	β_1, β_2
Propranolol	β_1, β_2
Pindolol	β_1, β_2
Timolol	β_1, β_2
Sotalol	β_1, β_2
Labetalol	$\beta_1, \beta_2, \alpha_1$
Karvedilol	$\beta_1, \beta_2, \alpha_1$

Tablo 1.1. Bazı β blokerleri ve bloke edilen reseptörler.

β_1 selektif olanlar kalp atım gücünü (dolayısıyla kardiyak outputu) düşürürler. En kısa etkilisi (yarılanma ömrü) esmolol (10 dakika) en uzun etkilisi nadololdür (14-24 saat). Timololün etki süresi 4-5 saat, propranololün etki süresi ise 3,5-6 saattir. Sotalol beta bloker etkisinin yanı sıra K^+ kanal blokerdir. Bazı β blokerlerde membran stabilizatörü (lokal anestetik benzeri) etkisi vardır. Bu etki propranololde en güçlüdür asebutolol, labetalol, metoprolol ve pindololde de mevcuttur. Beta blokerler periferde T_4 'ün T_3 'e dönüşümünü inhibe ederler (süzer 2005).

1.5. Yaşlanma ve Kalpte β -Adrenerjik Sinyal İletim Sistemi

Kardiyovasküler yaşlanmadan β -adrenerjik sinyal iletim sistemi de etkilenmektedir. Hayvanlardaki yaşlanma modelleri üzerinde yapılan birçok çalışmada, yaşın artmasıyla birlikte β -adrenerjik stimülasyona karşı verilen kardiyak yanıtların azaldığı görülmüştür (Brodde and Michel, 1999).

Kardiyovasküler yaşlanma ilerleyici ve geri dönüşümsüz bir süreçtir. Yaşlı insanlar arasında kalp hastalıkları en sık görülen ölüm sebepleri arasındadır. (Ribera-Casado, 1999).

İzole sıçan kardiyomiyositleriyle yapılan çalışmalarda kasılma kuvvetindeki β -adrenerjik indüklemeli artış, yaşlı bireylerde genç bireylere göre daha düşüktür (Sakai ve ark., 1992; Lakatta ve ark., 1975). Katekolaminlere karşı böyle bir deprese yanıt yaşlı sıçan kalplerinde (Jiang ve ark., 1993) ve yaşlı domuzlardan izole edilen kardiyomiyositlerde de elde edilmiştir (Ferrara ve ark., 1995). Yaşlı sıçanlarda, kalp kasında β -adrenerjik reseptörlerin agonist bağlanmasına karşı affinitesi 3 ile 20 kat azalmıştır (Das ve ark., 1997).

Çeşitli araştırmacılar kalpte β -adrenerjik reseptör affinitesi, β_1/β_2 reseptör oranı, cAMP düzeyleri ve cAMP bağımlı protein kinaz aktivitesinde değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir (Das ve ark., 1997). Buna rağmen, başka bir çalışmada yaşlı sıçan sol ventrikülünde β_1 -adrenerjik reseptör mRNA'sı, G_{sa} protein mRNA'sı ve total miyozin ağır zincir mRNA'sında önemli ölçüde daha düşük değerler bulunduğu rapor edilmiştir (Hardoin ve ark., 1993). Farklı yaş gruplarındaki insan atriyumu farklı bölümlerinde reseptör yoğunluğu, agonist affinitesi ve β_1/β_2 reseptör oranında herhangi bir farklılık görülmemiştir (Brodde ve ark., 1995).

1.6. Çalışmanın amacı

Daha önceki yapılan çalışmalarda yaşlanmaya bağlı olarak kardiyak sistemde aksiyon potansiyelinin süresinin yaşlı sıçanlarda uzadığı ve I_{CaL} akımlarının ise azaldığı gözlenmiştir (Liu ve ark., 2000). Ancak β -adrenerjik reseptör blokörü olan timolol ve propanololün etkisi incelenmemiştir. Buna karşın daha önce bu bölümde yapılan çalışmada seçici olmayan iki farklı beta blokörün (timolol ve propanolol) uzun süreli kullanımlarında kısa ve uzun süreli kullanımlarda süreye bağlı olarak kendi agonistine (isoproterenol; ISO) karşı verdikleri yanıtlarda farklı türden etkilerin olduğu gözlemlenmiştir (Şam, 2006). Bu çalışmada her iki β -adrenerjik reseptör blokörünün sol ventrikül içi sistolik basınç genliğini artırdığı gözlenirken, timolol uygulamasının β agoniste karşı verilen ventrikül içi basınç değişimi yanıtlarında pozitif inotropik etkiye neden olduğu, buna karşın propanolol uygulamasının β adrenerjik reseptör yanıtlarında negatif inotropik bir etkiye neden olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında ilk kez olmak üzere 8 aylık dişi sıçanlarda papiller kası kasılma ve aksiyon potansiyellerinin simültane olarak incelenmesi ve 3 aylık dişi sıçan verileri ile karşılaştırılması yanında yine aynı yaştaki (8 aylık) dişi sıçan kardiyomiyositlerinde hücre içi serbest kalsiyum derişimi ($[Ca^{2+}]_i$) ve L-tipi Ca-kanal akımları (I_{CaL}) simültane olarak ölçülecektir. Böylece bu çalışmada, aynı koşullar altında yetiştirilen yaşlı sıçanların bulguları ile bu gruplara β -adrenerjik reseptör blokörlerinin olası farklı etkileri karşılaştırılacaktır. Karşılaştırmalar ilaç uygulanan gruplarla uygulanmayan gruplar arasında yapılacaktır. Böylece bu tez çalışmasında; yaşlanmanın kalbin mekanik ve elektriksel aktivitesine etkileri ve etki mekanizmaları ve β -adrenerjik reseptör sisteminin bu fonksiyonlardaki olası rolleri araştırılacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney Gruplarının ve Yaş Artışı Modelinin Oluşturulması

Deneyleerde Wistar Albino cinsi 200-250 gr ağırlığında dişi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar doğumlarından itibaren kontrollü olarak yetiştirilmiş, yetiştirme sırasında sıçanlar kafes başına üç hayvandan fazla olmamak koşulu ile barındırılmışlar ve hiçbir kısıtlama olmaksızın standart sıçan yemi ve su ile beslenmişlerdir.

Deney de kullanılacak hayvanlar 4 gruba ayrılmıştır. Gruplarından birincisi; 3 aylık normal sıçan grubu (K3), ikincisi; 8 aylık normal sıçan grubu (K8), üçüncüsü; 7 ay boyunca timolol (K8+TIM) ve dördüncüsü; 7 ay boyunca propranolol (K8+PROP) verilmiş olan dişi sıçanlardan oluşmuştur. İlaç verilen grupta olan sıçanlarda, doğumdan 1 ay sonra ilaç uygulamasına başlanmış ve 8 aylık oluncaya kadar ilaç uygulamasına devam edilmiştir (7 ay boyunca). Uygulamada kullanılan ilaçlardan biri β -Adrenerjik reseptör blokeri olan timolol suda çözerek her gün belirli saatlerde günde bir defa, 5 mg/ kg'lık olmak üzere oral yoldan verilmiştir. İlaçlardan diğeri yine β -Adrenerjik reseptör blokeri olan propranolol ise yine aynı protokol kullanılarak, 25 mg/kg/gün şeklinde uygulanmıştır. Bu ilaç miktarları literatür verilerine göre propranolol ve timolol için orta derecede antihipertansif dozlardır (Şam, 2006).

Deneyde toplam 48 hayvan kullanılmış, her grup için toplam 12 hayvan kullanılmış olup bunların 7 tanesi aksiyon potansiyeli ölçümleri için 5 tanesi ise hücre izolasyonu (kardiyomiyosit elde etmek için) için kullanılmıştır. Kalplerden izole edilen hücreler iki kısma ayrılarak bir kısmı L-tipi Ca^{2+} akım ölçmek için diğeri kısmı ise uyarı altında hücreiçi serbest Ca^{2+} derişimini (bazal Ca^{2+} miktarı) ve geçici Ca^{2+} değışimlerini ($[Ca^{2+}]_i$ transient) ölçmek için kullanılmıştır.

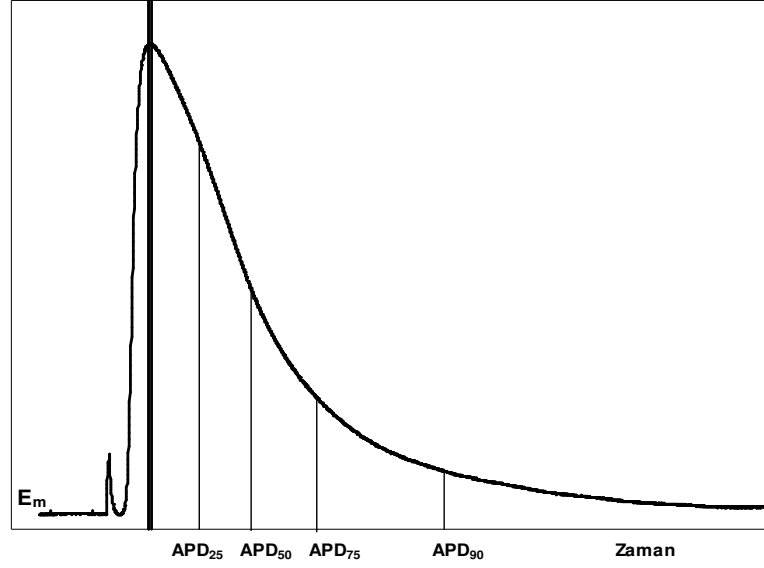
2.2. Aksiyon Potansiyellerinin ve Kasılma Yanıtlarının Kaydedilmesi

Sıçanlar heparinli pentobarbital ile (30 mg/kg) anestezi edildikten sonra kalpler hızlı bir şekilde çıkarılarak önceden gazlanmış (%95 O₂ ve % 5 CO₂ ile), soğutulmuş ve düşük Ca²⁺ içeren (0,5 mM CaCl₂) modifiye Krebs-Henseleit çözeltisi (mmol/l: 119 NaCl, 4,8 KCl, 1,8 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 20 NaHCO₃, ve 10 glukoz, pH 7.4) içerisine alınmışlardır. Aynı çözelti içerisinde kalbin sol ventrikül papiller kası herhangi bir zarara uğratılmadan izole edilerek organ banyosu içine yerleştirilmiştir. Papiller kas, sürekli oksijen karışımı (% 95 O₂ ve % 5 CO₂) ile gazlanan 1,8 mM CaCl₂'lük Krebs-Henseleit çözeltisi içeren organ banyosu içinde bir ucu uyaran elektrotuna diğer ucu ise ince bir iplikle bir kuvvet transdüserine bağlanarak çok fazla gerilmeden dinlenmeye (~ 1 saat) bırakılmıştır ve elektrofizyolojik kayıtlara hazır hale getirilmiştir. Tüm deneyler 37 °C' lik sabit organ banyosu sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

AP ve kasılma kayıtlarında, 3 M KCl ile doldurulmuş ve ölçülen direnci 25-30 MΩ'luk direnci olan filamanlı borosilikat cam elektrodlar (Clark Electromedical Instruments GC150F-15) kullanılmıştır. Elektrodun çıktısı bir ön yükselticiden geçtikten sonra osiloskoba (Gould 20 MHz digital storage type1421) ve örnekleme hızı 10 kHz olan bir kart aracılığıyla bilgisayara aktarılmıştır. Kayıtların ortalaması alınarak AP'nin repolarizasyon fazının % 25, 50, 75 ve 90'ına inme süreleri (APD₂₅, APD₅₀, APD₇₅, APD₉₀) belirlenmiştir. Papiller kasından kaydedilen hücre içi AP üzerinden ölçülen parametreler bir AP eğrisi üzerinde Şekil 2.1 de gösterilmiştir.

Kasılma ve aksiyon potansiyelinin simültane olarak kaydedilebilmesi, bir ucu çevirece bağlı olan papiller kas örneklerine hazırlanan mikroelektrotlar ile mikroskop altında tek hücreye girilerek elektriksel uyarı ile yapılır. Sistem 2-kanallı bir kayıtçı sayesinde online olarak kayıt yapabilmekte ve sonra bu bilgileri analiz edebilme olanaklarına sahiptir.

Elektrodlar hazırlanırken dikkat edilmesi gereken noktalar elektrodların direncinin etkilenmemesi için özellikle uç kısmının hiçbir yere temas ettirilmemesi, elektrotun uç kısmının tamamen 3 M KCl ile dolu vaziyette bulunması ve pipetin uç direncinin istenen değerlerde olması iyi bir aksiyon potansiyeli kaydedebilmek için mutlaka gereklidir.



Şekil 2.1. Sol ventrikül papiller kasından kaydedilen bir aksiyon potansiyeli eğrisi üzerinde ölçülen parametreler. Kalın çizginin eğriyi kestiği nokta tepe değeri ve E_m dinlenim potansiyeli olmak üzere, çizgiden sağa doğru repolarizasyon evresinin maksimum değerinin %25, 50, 75 ve 90'ına düşmesi için geçen süreler gösterilmektedir (Özdemir, 2005).

Elektrodların uç direnci yeterli büyüklükte ise ($>25 \text{ M}\Omega$) elektrodumuzu kasın en çok kasılan bölgesine yönlendirilir ve aksiyon potansiyeli kayıtları alınır. Kayıtlarda BIOPAC MP35 cihazı kullanılmıştır.

Her deney hayvanı için kasa girilen her noktada en az 10 kayıt ve kasın 3 veya 4 farklı bölgesinden girilerek kayıt alınır. Böylece her bir kas örneğinden kaydedilen 30-40 farklı aksiyon potansiyelinden ortalama bir değere ulaşılarak papiller kasın ortalama aksiyon potansiyeli parametreleri elde edilebilir.

Bu sonuçlar, aksiyon potansiyelinin repolarizasyon süreleri ve dinlenme membran potansiyeli hakkında bilgi verecektir.

2.3. Kardiyomiyositlerin İzolasyonu

Deney gruplarında bulunan hayvanların hafif anestezi altında (30 mg/kg sodyum pentobarbital) kalpleri hızlı bir şekilde çıkarıldıktan sonra Langendorff sistemine yerleştirilmiştir. Daha önce başka araştırmacıların kullandıkları enzimatik yöntem takip edilerek (O. Cazorla, 2003), asılmış olan kalpler önce içeriği (mM): 117 NaCl, 5,7 KCl, 4,4 NaHCO₃, 1,5 KH₂PO₄, 1,7 MgCl₂, 21 HEPES, 11,7 glukoz, 20 taurine olan ve pH 7,2 dengesinin sağlanması için % 5 CO₂ -% 95 O₂ ile gazlanan, yaklaşık 50 ml hacminde kalsiyumsuz perfüzyon solüsyonu ile yıkanmıştır. Arkasından, kalbin üzerinden 30-35 dakika süresince aynı solüsyon içinde hazırlanmış kollajenaz (Worthington, Collagenase typeIV) (1-1,3 mg/ml) ile perfüze edildikten sonra , kalp küçük bir kabın içine alınır ve bir makas yardımıyla küçük parçalara ayrıldıktan sonra, ince bir filtreden geçirilerek hücreler bir tüpün içerisine alınır ve birkaç yıkama işleminden geçirilir. Ortamdaki Ca²⁺ aşamalı olarak artırıldıktan sonra en son aşamada hücreler iki farklı ölçüm için farklı geniş yüzeyli petrilere aktarılır. Hücrelerin birinci kısmı 1 mM Ca²⁺ içeren solüsyonda hücreiçi serbest Ca²⁺ derişimi gözlemlemek için diğeri ise yine aynı solüsyona hücrelerin ölçüm sırasında kabın tabanına yapışmasını önlemek için % 5 bovine serum albumin (BSA) eklenerek 37 °C'de 1 saat kadar bekletildikten Ca²⁺ akımlarının ölçümler için ayrılmıştır.

2.4. L-tipi Ca²⁺ Akımlarının Kaydedilmesi

Çalışmanın bu bölümünde L-tipi Ca²⁺ kanal akımları (I_{CaL}) ölçülmüştür. Bu akımlar tüm hücre voltaj kenetleme konfigürasyonunda uç direnci 1,5-2,0 MΩ arasında değişen elektrotlar kullanılarak alınmıştır. Ölçümler için kullanılan pipet solüsyonu (mM): 110 Cs-aspartat, 20 CsCl, 1,0 MgCl₂, 5,0 fosfokreatin-Na₂, 5 ATP-Na₂, 10 EGTA ve 5 HEPES (pH= 7,4). Kayıt için, hücreler -80 mV düzeyinde kenetlenerek eğimli bir voltaj uygulaması ile zar potansiyeli -45 mV'a kenetlenmiş, bu seviyede bir süre beklenerek sodyum (Na⁺)

akımları inaktif hale getirilmiştir, hücrezarı elektriksel uyarı ve basınç etkisiyle açıldıktan sonra kapiler borulardan hücrenin bulunduğu ortama akıtılan CsCl₂ ile (K⁺) akımları bloke edilmiştir. Sonra -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla +60 mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 12 farklı voltaj seviyesinde kayıtlar alınmış ve bilgisayara kaydedilerek Clampfit 8.0 programı ile analiz edilmişlerdir. Tepe değerleri ölçülüp 200 ms'nin sonundaki kuyruk akımlarından çıkarılmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım değeri ölçüm yapılan hücrenin ölçülen kapasitansına bölünerek değerlendirilmiş ve tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak verilmiştir.

2.5. Hücre İçi Serbest Ca²⁺ Derişimi ([Ca²⁺]_i) Ölçümü

İzole edilen kardiyomiyositler fura-2 AM (4 µM) ile oda sıcaklığında 45-50 dakika inkübe edildikten sonra, 340 ve 380 nm'de eksite edilerek 510 nm' ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile [Ca²⁺]_i hesaplanmıştır (Grynkiewicz ve ark., 1985). Hücre içi serbest Ca²⁺ ölçüm deneylerinde kullanılan banyo çözeltisinin içeriği şu şekildedir (mM): 117 NaCl, 5,4 KCl, 1,7 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 10 HEPES ve 10 glukoz (pH= 7,4). İki ucuna elektrot yerleştirilmiş küvet içine alınan hücrelerden uyarılabilir olanı seçilerek bir pencere içine alınmıştır. Önce 20 s'lik bazal Ca²⁺ sinyali kaydedilmiş, sonra hücreler 25-30 V'luk pulslar ile 0,2 Hz frekansında uyarılarak 200 s süreyle geçici Ca²⁺ değişimleri (Ca²⁺ transient) kaydedilmiştir. Arkasından aynı pencere banyonun hücre bulunmayan bir bölgesine odaklanarak belli bir süre kayıt alınıp hücre içi sinyalden çıkarılmıştır. Böylece, banyo ortamının floresansından kaynaklanabilecek gürültünün ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Gözlenen Ca²⁺ değişimine ait sinyallerin ölçümü PTI (Photon Technology International) RatioMaster marka mikrospektroflorimetre ile yapılarak Felix (PTI) programı ile bilgisayara kaydedilip değerlendirilmiştir. Transientlerin kinetik analizi Micosoft Excell programı ile hazırlanan bir analiz algoritması ile gama dağılım fonksiyonuna uydurularak gerçekleştirilmiştir. Her hücre 200 s süresince kaydedilen transientlerin parametrelerinin ortalamasından elde edilen değer ile temsil edilmiştir. [Ca²⁺]_i sinyallerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen maksimum değeri ($\Delta F_{340/380}$), tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değer % 50'sine iniş süresi (DT₅₀) ölçülerek karşılaştırılmıştır.

2.6. İstatistiksel Yöntem

Tüm deney sonuçları ortalama \pm SEM (standart error of mean) olarak verilmiştir. Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılık seviyeleri ise student t-testi kullanılarak belirlenmiştir.

2.7. Kullanılan Kimyasallar

Timolol maleat Bilim İlaç'tan, propranolol Sanofi Synthelabo'dan, KCl, MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄, HEPES, glucose, Cs-aspartat, CsCl, MgCl₂, fosfokreatin-Na₂, ATP-Na₂, EGTA, Na₂GTP, NaCl, glucose Sigma (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany)'den ve KCl, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃ ise Merk (Darmstadt, Germany)'den satın alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Hayvanların Genel Durumları

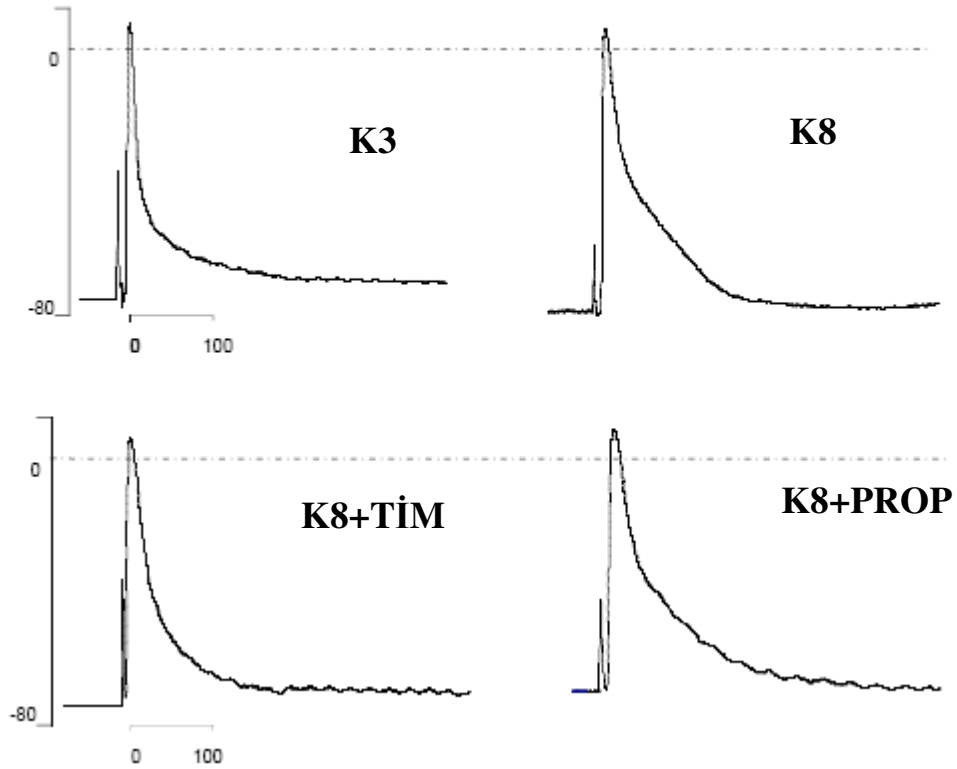
Doğumlarının sekizinci ayı dolduğunda deneye alınan hayvanlardan vücut ağırlıkları birinci aylarını doldurduklarında yaklaşık 75 ± 5 g (n = 48) civarında iken, sekizinci ay sonunda yaklaşık 3,1 kat artarak $230,3 \pm 6$ g (n = 12) değerine ulaşmıştır. Propranolol verilen hayvanların vücut ağırlıkları yaklaşık 3,2 kat artarak $237,0 \pm 4$ g (n = 12) ve timolol verilen hayvanların vücut ağırlıkları yaklaşık 3,3 kat artarak $244,5 \pm 5,0$ g (n = 12) olmuştur. Propranolol ve timolol gruplarının vücut ağırlıklarının ortalamasını, sekiz aylık sıçanlardan oluşan grubun vücut ağırlığı ile karşılaştırdığımızda propranolol grubunun vücut ağırlıkları yaklaşık % 3 'lük bir artış gösterirken timolol grubunun vücut ağırlıkları % 6,5 'luk bir artış göstermiştir. Grupların vücut ağırlık kazanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olmadığı görülmüştür. Kısaca, bu ilaçların 7-ay boyunca normal sıçanlara verilmesi sıçanların vücut ağırlık kazanımını etkilememiştir. 3 aylık sıçanlardan oluşan grubun vücut ağırlıklarının ortalaması ise $193,3 \pm 6,0$ g 'dır (n=12). Bu veriler bize dişi sıçanların 8 ay içinde yaklaşık 40 g vücut ağırlığı artışına sahip olduklarını ve ne propranolol ne de timolol bu süre ile almalarının vücut ağırlığı artışına önemli bir etki yapmadığını göstermiştir. Ayrıca bu veriler bize dişi sıçanların üç aydan sekiz aya kadar geçen sürede çok önemli değerlerde kilo almadığını diğer yandan bir aydan üç aya kadar geçen sürede ise gelişim dönemi olduğu için ortalama olarak 120 g ağırlık kazandıklarını göstermiştir (Tablo 3.1).

Gruplar	Vücut Ağırlığı (g)
K3 (n=12)	193,3 ± 6,0
K8 (n=12)	230,3 ± 6,0 *
K8+TİM (n=12)	244,2 ± 5,0
K8+PROP (n=12)	237,0 ± 4,0

Tablo 3.1. Deney gruplarındaki hayvanların vücut ağırlıkları. Tablo'da kullanılan kısaltmalar: 3 aylık normal sıçanlar (K3), 8 aylık normal sıçanlar (K8), timolol verilmiş sıçanlar (K8+TİM), propranolol verilmiş sıçanlar (K8+PROP). Hayvanların deneyden hemen önce ölçülmüş olan ağırlıkları g olarak verilmiştir. Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. n= hayvan sayısı; *p<0,05 K8 vs K3 grubu.

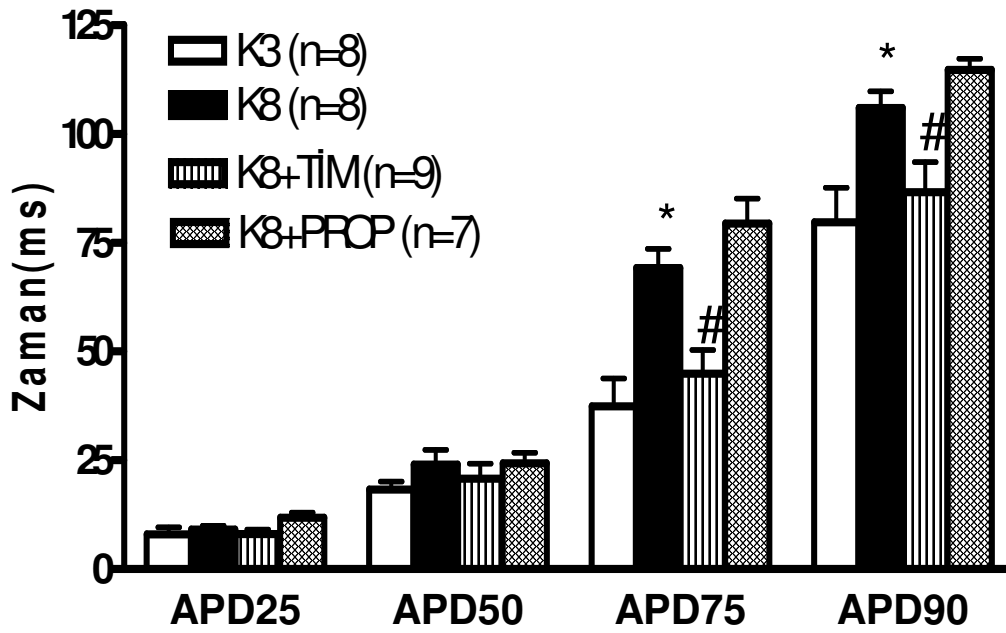
3.2. Aksiyon Potansiyeli ile İlgili Parametreler

Papiler kas üzerinde yapılan Aksiyon Potansiyeli (AP) ölçümleri sonucunda; dinlenim zar potansiyeli (Em), AP tepe değeri (Maks) ve repolarizasyon fazının % 25, 50, 75 ve 90'ına ulaşma süreleri gibi parametreleri ölçülmüştür. Repolarizasyon fazının %25, 50, 75 ve 90'nına ulaşma zamanları APD₂₅, APD₅₀, APD₇₅ ve APD₉₀ olarak temsil edilmiştir. Her bir gruba ait kaydedilmiş orijinal örnek aksiyon potansiyelleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Deney gruplarında bulunan hayvanlara ait orijinal datalardan elde edilen aksiyon potansiyeli kayıtları. 3 aylık grup (K3), 8 aylık grup (K8), timolol verilmiş grubu (K8+TİM), propranolol verilmiş grubu (K8+PROP) olarak gösterilmiştir.

Aksiyon potansiyeli kayıtlarının analiz edilmesiyle repolarizasyon süreleri sırasıyla K3 grubunda ($7,94 \pm 1,69$ ms; $18,30 \pm 1,87$ ms; $37,50 \pm 6,35$ ms; $79,71 \pm 7,93$ ms), K8 grubunda ($9,10 \pm 0,89$ ms; $23,98 \pm 3,42$ ms; $69,27 \pm 4,32$ ms; $106,00 \pm 3,82$ ms), K8+TİM grubunda ($8,470 \pm 1,20$ ms; $22,46 \pm 3,49$ ms; $48,46 \pm 4,76$ ms; $93,01 \pm 3,27$ ms), K8+PROP grubunda ise ($11,83 \pm 1,09$ ms; $24,34 \pm 2,36$ ms; $79,46 \pm 5,72$ ms; $114,80 \pm 2,53$ ms) olarak bulunmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Aksiyon potansiyeli parametrelerinin gruplardaki ölçülen ortalama değerleri. 3 aylık sıçan grubu (K3), 8 aylık sıçan grubu (K8), 7 ay boyunca timolol ile beslenmiş sıçan grubu (K8+TIM), 7 ay propranolol ile beslenmiş sıçan grubu (K8+PROP) ortalama değerleri için çizdirilmiş grafik. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. * $p<0,05$ K8 vs K3 grubu # $p<0,05$ vs K8 grubu

Elde edilen sonuçlara göre kontrol 3 aylık grupla kontrol 8 aylık grup karşılaştırıldığında APD_{25} VE APD_{50} değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark görülmemiştir. Bun karşın APD_{75} fazında %85'lik bir uzama, APD_{90} fazında ise %33'lük bir uzama görülmüştür. Timolol ve propranolol uygulaması yapılan grupları bu ilaçlar verilmemiş olan 8 aylık grupla karşılaştırdığımızda, timolol APD_{75} fazında %30'luk bir kısalmaya, APD_{90} fazında ise %12'lik bir kısalmaya neden olmuştur. Şekilden de görüldüğü gibi bu değerler kontrol 3 aylık grubun değerlerine yakın olup, AP deki geç fazda gözlenen uzamaları engellediği görülmektedir. Buna karşın, propranolol uygulaması 8 aylık grupta gözlenen AP deki uzamalara önemli bir etkiye neden olmadığı görülmüştür.

Aksiyon potansiyellerinin tepe maksimum değerleri karşılaştırıldığı zaman gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Dinlenim zar potansiyellerinde ise kontrol 3 aylık grubun dinlenim zar potansiyeli değerinin 8 aylık, timolol ve propranolol 8 aylık grubun dinlenim zar potansiyeline göre daha depolarize bir değerde olduğu görülmüştür.

Tablo 3.2' den görüldüğü gibi, dinlenim zar potansiyeli 8 aylık sıçanlarda 3 aylıklarla karşılaştırıldığında daha depolarize olduğu ve bu değer istatistiksel olarak 3 aylık grubunkinden farklı olduğu görülmektedir. Timolol ve propranolol uygulaması 8 aylık sıçanlardaki bu depolarizasyonu engelleyememiştir. Diğer yandan, 8 aylık sıçanların sıfır üstü AP genlikleri 3 aylıklardan farklı olmayıp her iki ilacın da bu değere herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

3.3. L-tipi Ca^{2+} Kanal Akımı Parametreleri

3 aylık, 8 aylık ve timolol ve propranolol uygulaması yapılmış 8 aylık sıçanlardan izole edilen kardiomyositlerden voltaj kenetleme tekniği ile L-tipi Ca^{2+} kanal akımları (I_{CaL}) kayıt edilmiştir. L-tipi Ca^{2+} kanal akımları hücre içi Ca^{2+} homeostazında önemli rol oynamakta olup miktarı hücreden hücreye hücrenin büyüklüğüne bağlı olarak değiştiğinden ortaya çıkabilecek farklılıkları ortadan kaldırmak amacıyla tüm gruplarda ölçülen her bir akım değeri hücre kapasitansına oranı alınarak akım yoğunlukları belirlenmiştir.

Akım yoğunlukları; 3 aylık normal sıçan grubu için (10.72 ± 1.54 pA/pF), 8 aylık normal sıçan grubu için ($6,82 \pm 0,70$ pA/pF), K8+TİM grubu (7 ay timolol verilmiş grup) grubu için ($10,47 \pm 1,10$ pA/pF) ve K8+PROP grubu (7 ay propranolol verilmiş grup) için ($6,08 \pm 0,31$ pA/pF) ölçülmüştür (Tablo 3.3., Şeki 13.3. ve Şekil 3.4.)

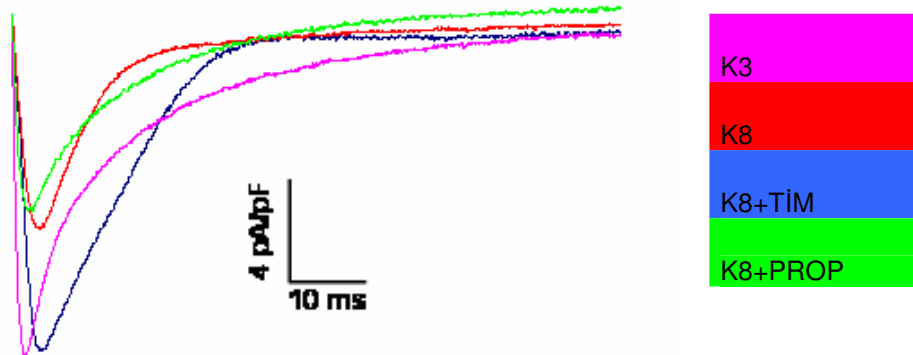
	E_m (mV)	Maksimum Genlik (mV)	APD ₂₅ (ms)	APD ₅₀ (ms)	APD ₇₅ (ms)	APD ₉₀ (ms)
K3 (n=8)	-78,79 ± 1,58	3,70 ± 1,62	7,94 ± 1,69	18,30 ± 1,87	37,50 ± 6,35	79,71 ± 7,93
K8 (n=8)	-70,05 ± 1,02*	2,35 ± 0,92	9,10 ± 0,89	23,98 ± 3,42	69,27 ± 4,32*	106,0 ± 3,82*
K8+TİM (n=9)	-71,56 ± 0,64	2,54 ± 0,49	8,47 ± 1,20	22,46 ± 3,49	48,46 ± 4,76 [#]	93,01 ± 3,27 [#]
K8+PROP (n=9)	-72,56 ± 0,63	3,92 ± 0,53	11,83 ± 1,09	24,34 ± 2,36	79,46 ± 5,72	114,80 ± 2,53

Tablo 3.2. Deney gruplarındaki hayvanların aksiyon potansiyeli parametreleri. Gruplara ait kısaltmalar Tablo 3.1'deki gibidir. Gruplara ait sol ventrikül papiler kasından kaydedilen aksiyon potansiyellerinin ortalama dinlenim membran potansiyeli (E_m), AP'nin sıfır potansiyel üzeri değeri (Maksimum Genlik), AP'nin repolarizasyon fazının % 25, 50, 75, ve 90 değerleri (APD₂₅, APD₅₀, APD₇₅ ve APD₉₀) hesaplanıp, ortalama±SEM olarak verilmişlerdir. n= Hayvan sayısı; *p<0,05 K8 vs K3 grubu, [#]p<0,05 vs K8 grubu.

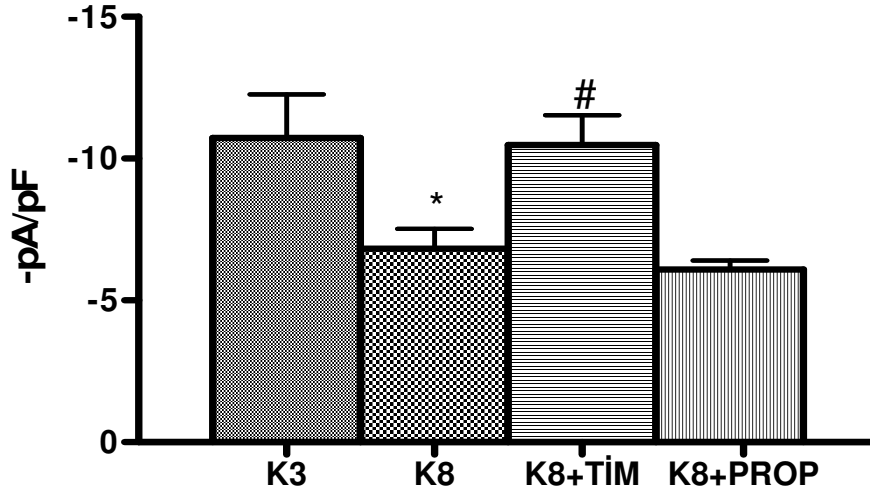
Hücre kapasitanslarını karşılaştırdığımızda 3 aylık grubunun ($147,10 \pm 2,96$ pF) ve 8 aylık grubun ($175,30 \pm 7,02$ pF) arasında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir. 8 aylık timolol grubunun ($165,12 \pm 9,03$ pF) ve 8 aylık propranolol grubunun ($184,41 \pm 15,24$ pF) ise yaşlanmayla membran kapasitanslarına etkisi olmadığı görülmektedir.

Gruplar	Akım yoğunluğu (pA/pF)	Hücre kapasitansı (pF)
K3 (n=15)	$10,72 \pm 1,54$	$147,10 \pm 2,96$
K8 (n=20)	$6,82 \pm 0,70^*$	$175,30 \pm 7,02^*$
K8+TİM (n=20)	$10,47 \pm 1,1^\#$	$165,12 \pm 9,03$
K8+PROP (n=20)	$6,08 \pm 0,31$	$184,41 \pm 15,24$

Tablo 3.3. Kardiyomiyositlerden kaydedilen I_{CaL} akım yoğunluğu ve hücrelerin kapasitansları. Gruplara ait kısaltmalar Tablo 3.1'deki gibidir. Gruplara ait ventrikül hücrelerinden kaydedilen ortalama akım yoğunlukları ve hücre kapasitansları. Değerler, ortalama \pm SEM olarak verilmişlerdir. n = hücre sayısı. *p<0,05 K8 vs K3 grubu, #p<0,05 vs K8 grubu



Şekil 3.3. L-tipi Ca^{2+} kanal akımları. K3, K8, K8+TİM ve K8+PROP gruplarına ait örnek I_{CaL} kayıtları. Kayıtlar depolarizasyon 0 mV'dan (maksimum akım) alınmış ve hücre kapasitanslarına oranlanarak verilmiştir. Bu hücrelerin kapasitansları sırası ile $146,45$ pF (K3) , $176,88$ pF (K8), $162,61$ pF (K8+TİM), $188,10$ pF (K8+PROP).

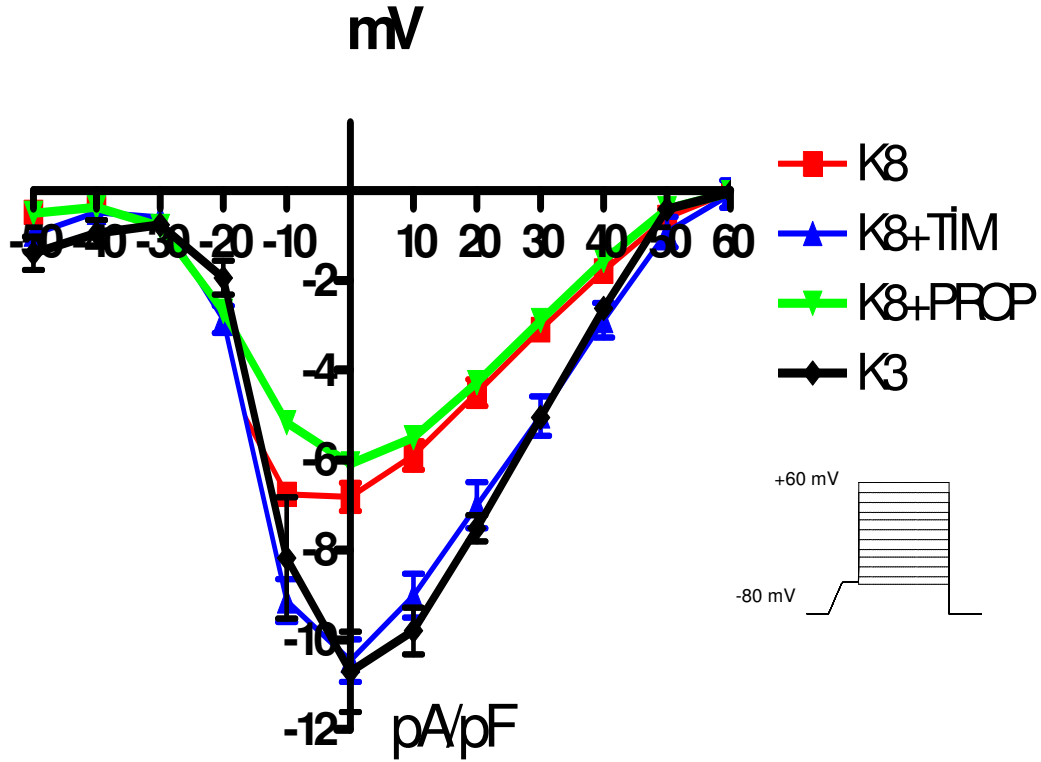


Şekil 3.4. L-tipi kalsiyum kanal akım yoğunlukları. K3, K8, K8+TİM ve K8+PROP gruplarına ait 0 mV'da ölçülen akım yoğunlukları ortalamasından elde edilen değerleri gösteren grafik. Değerler ortalama \pm standart hata ile temsil edilmiştir. * $p < 0,05$ K8 v.s K3 grubu ve # $p < 0,05$ v.s K8 grubu.

3 aylık sıçan grubu ile 8 aylık sıçan grubun maksimum akım yoğunluğu değerlerine baktığımızda yaşlanmanın kalpte I_{CaL} akımlarını önemli ölçüde azalmasına neden olduğu görülmektedir. Propranolol uygulaması azalmış olan maksimum akım yoğunluğuna herhangi bir etkiye neden olmazken, timolol uygulaması 3 aylık normal sıçan grubunun değerlerine yakın değerler almasına neden olmuştur (Şekil 3.4.).

Şekil 3.5'de I_{CaL} 'rının akım voltaj karakteristikleri görülmektedir. Dişi sıçanların 3 aydan 8 aya yaşlanmaları vücut ağırlıklarında önemli bir artışa neden olmadan ve hücre kapasitanslarını (hücre büyüklüğü ile orantılıdır) önemli derecede etkilemeden bu akımların maksimum değerlerinin yaklaşık 40% oranında azalmasına neden olmuştur. Diğer yandan bu kanallarının ne eşik değerleri ve de voltaj duyarlılıkları bu yaşlanmadan etkilenmemiştir. Şekilden açıkça görüldüğü gibi 7 ay süre ile timolol uygulaması bu deprese olan akımların 3 aylık sıçan akımlarına değiştirirken aynı süre propranolol uygulamasının önemli bir etkisi olmadığı görülmektedir. Aynı sınıf olduğu bilinen bu iki β -adrenerjik reseptör blokerlerinin I_{CaL} 'ları üzerindeki

etkilerinin farklı olması bu blokerlerin farklı yollar üzerinden veya farklı etki mekanizmalara sahip olmasından kaynaklanabileceğini işaret etmektedir.



Şekil 3.5. L-tipi Ca^{2+} kanallarının akım-voltaj karakteristikleri. Yukarıda K3, K8, K8+TIM VE K8+PROP gruplarına ait ölçülen akım yoğunluklarının ortalamasından elde edilen değerlerin değişimini gösteren grafik ve akımın kayıt protokolü görülmektedir. Değerler ortalama \pm SEM ile temsil edilmiştir.

3.4. Hücre içi Serbest Ca^{2+} Derişimleri

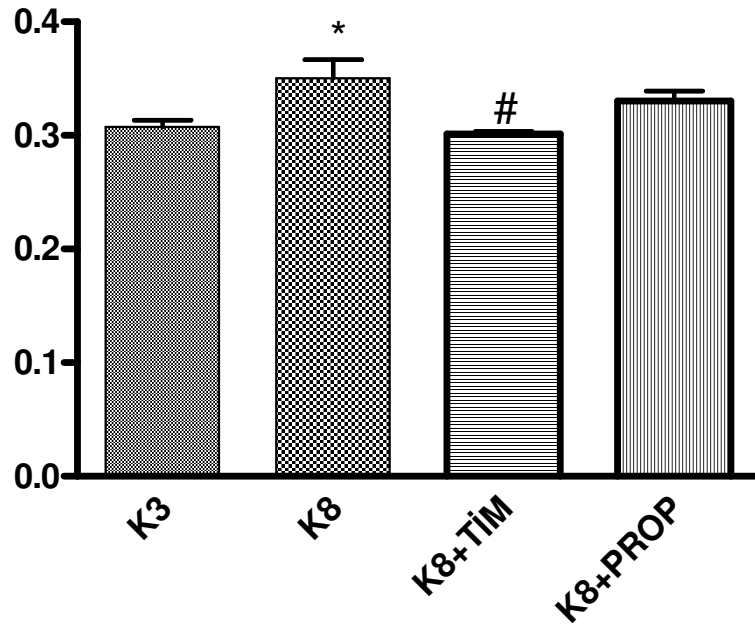
Hücre içi serbest Ca^{2+} derişimi ($[Ca^{2+}]_i$) ve derişimdeki derişimler kalbin mekanik aktivitesinde çok önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden, yaşlanmanın kardiyomiyositlerde $[Ca^{2+}]_i$ homeostazını derişirmiş olabileceği ve kalpte kasılma parametrelerini deriştirebileceği düşünülerek $[Ca^{2+}]_i$ derişimi ölçülmüştür. Bu derişimdeki derişimlerin incelenmesi, kasılma ve hücre içi sinyal iletimi ile ilgili problemlerin çözümünde ve gruplara uyguladığımız β -adrenerjik reseptör blokörlerinin yaşlanma ile bozulmuş olan elektriksel aktivitedeki pozitif/negatif etkileri altında yatan mekanizmaları incelemekte önemli role sahiptir.

3.4.1. Hücre İçi Serbest Bazal Ca²⁺ Seviyeleri

İzole edilmiş kardiyomiyositler Ca²⁺ 'a spesifik bir boya olan Fura 2-AM ile yüklendikten sonra iki ucuna elektrot yerleştirilmiş küvete az sayıda hücre alınarak kare-biçimli elektriksel uyarı ile (elektrik alan içinde) (elektriksel uyarıya cevap verebilenler seçilmiştir) Ca²⁺ 'transientleri ölçülmüştür. Dinlenim durumundaki hücreden alınan başlangıçtaki ~20 s'lik sinyallerin ortalaması alınarak iki dalga boyunun floresan şiddetlerinin oranı türünden ifade edilmiştir ($\Delta F_{340/380}$). Bu ölçümlerin sonucunda, 8 aylık sıçan grubunun hücre içi bazal Ca²⁺ seviyesinin 3 aylık sıçan grubuna göre anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Timolol uygulaması yapılmış grubun kardiyomiyositlerinde hücre içi serbest bazal Ca²⁺ seviyesinin 8 aylık kontrol gruba göre azaldığı ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Buna karşın, propranolol uygulaması yapılan grubun kardiyomiyositlerinin hücre içi bazal Ca²⁺ değerleri, 8 aylık kontrol grubunun değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. (Tablo 3.4 ve Şekil 3.6).

	K3 (n=24)	K8 (n=30)	K8+TİM (n=30)	K8+PROP(n=27)
Bazal Ca²⁺ Değerleri ($\Delta F_{340/380}$)	0,31 ± 0,01	0,35 ± 0,02*	0,30 ± 0,01 [#]	0,33 ± 0,01

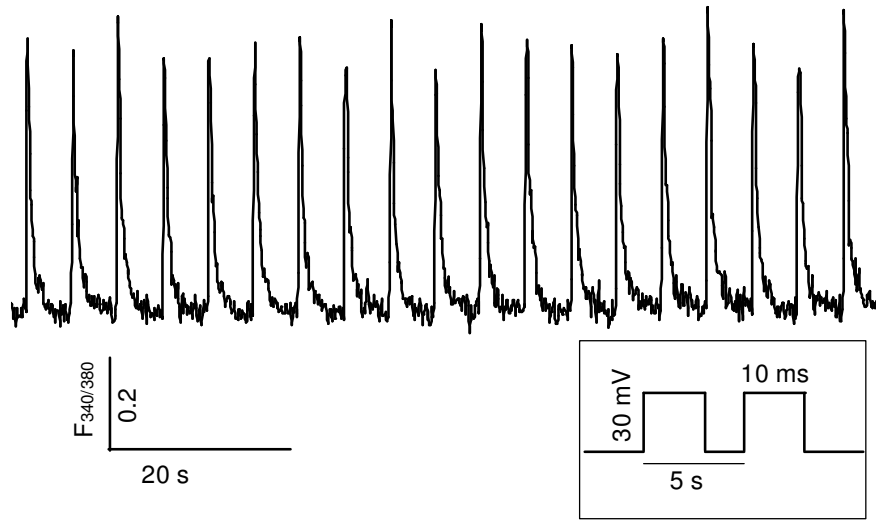
Tablo 3.4. Kardiyomiyositlerin kaydedilen hücre içi bazal Ca²⁺ değerleri. 3 aylık (K3), 8 aylık (K8), 7 ay boyunca timolol ile beslenmiş kontrol grubu (K8+TİM), 7 ay Propranolol ile beslenmiş kontrol grubu (K8+PROP) ortalama değerleri için çizdirilmiş grafik. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. *p<0,05 K8 vs K3 grubu, [#]p<0,05 vs K8 grubu.



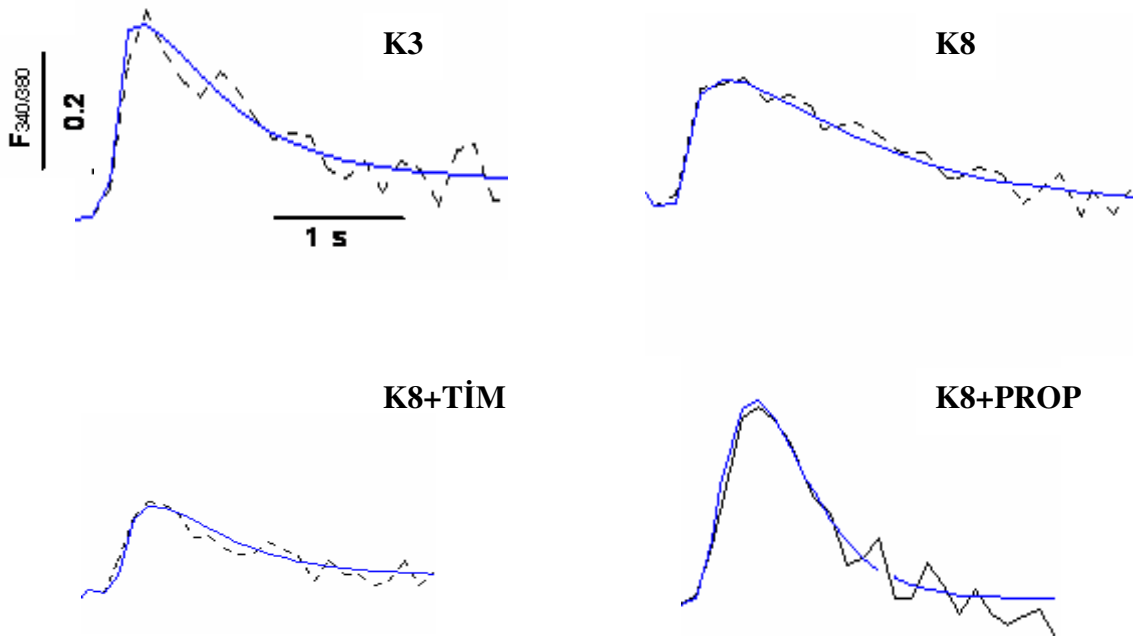
Şekil 3.6. Grupların hücre içi serbest bazal Ca^{2+} seviyeleri. Dinlenme durumundaki 3 Aylık (K3), 8 Aylık (K8), 7 ay boyunca timolol verilen (K8+TIM) ve 7 ay boyunca propranolol verilen (K8+Prop) kardiyomiyositlerinden kaydedilen ~20 s'lik sinyallerin ortalama değerleri ve standart hatalar (ortalama±SEM). * $p<0,05$ K8 vs K3 grubu. # $p<0,05$ vs K8 grubu.

3.4.2. Hücre içi Ca^{2+} Transientleri

Kardiyomiyositlerin kasılabilmesi için $[Ca^{2+}]_i$ miktarının dinlenme durumuna göre 10-100 kat artması gerekir ve $[Ca^{2+}]_i$ miktarındaki bu artışın büyük bir bölümü hücre içi depolardan (SR) salınır. Uyarılma durumunda $[Ca^{2+}]_i$ değişimi ve kinetiği kasılmanın seyri açısından büyük önem taşımaktadır. Hücrelerin elektriksel uyarımı ile SR'dan sitoplazmaya salınan Ca^{2+} 'un miktarını ve bunun geri alınımının kinetiğini belirleyebilmek için her hücreden 0,2 Hz frekansındaki uyarılar ile 200 s boyunca kayıt alındı. Her hücre için gözlenen Ca^{2+} sinyalleri (transient) Excel programıyla tek tek gama fonksiyonuna uyduruldu ve bu sinyallerle ilgili transientlerin maksimum tepe değeri (Mak), tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değer % 50' sine iniş süresi (DT_{50}) parametreleri ölçüldü. (Şekil 3.7'de bu türden örnek bir kayıt ve sağ alt köşesinde uyarının uygulama biçimi yer almaktadır).



Şekil 3.7. Hücre içi Ca^{2+} transientleri. Belirli bir süre boyunca bir kontrol kardiyomiyositinden kaydedilen hücre içi Ca^{2+} transientleri ve hücre uyarını olarak elektriksel alan uyarısının uygulama biçimi (Özdemir, 2005).

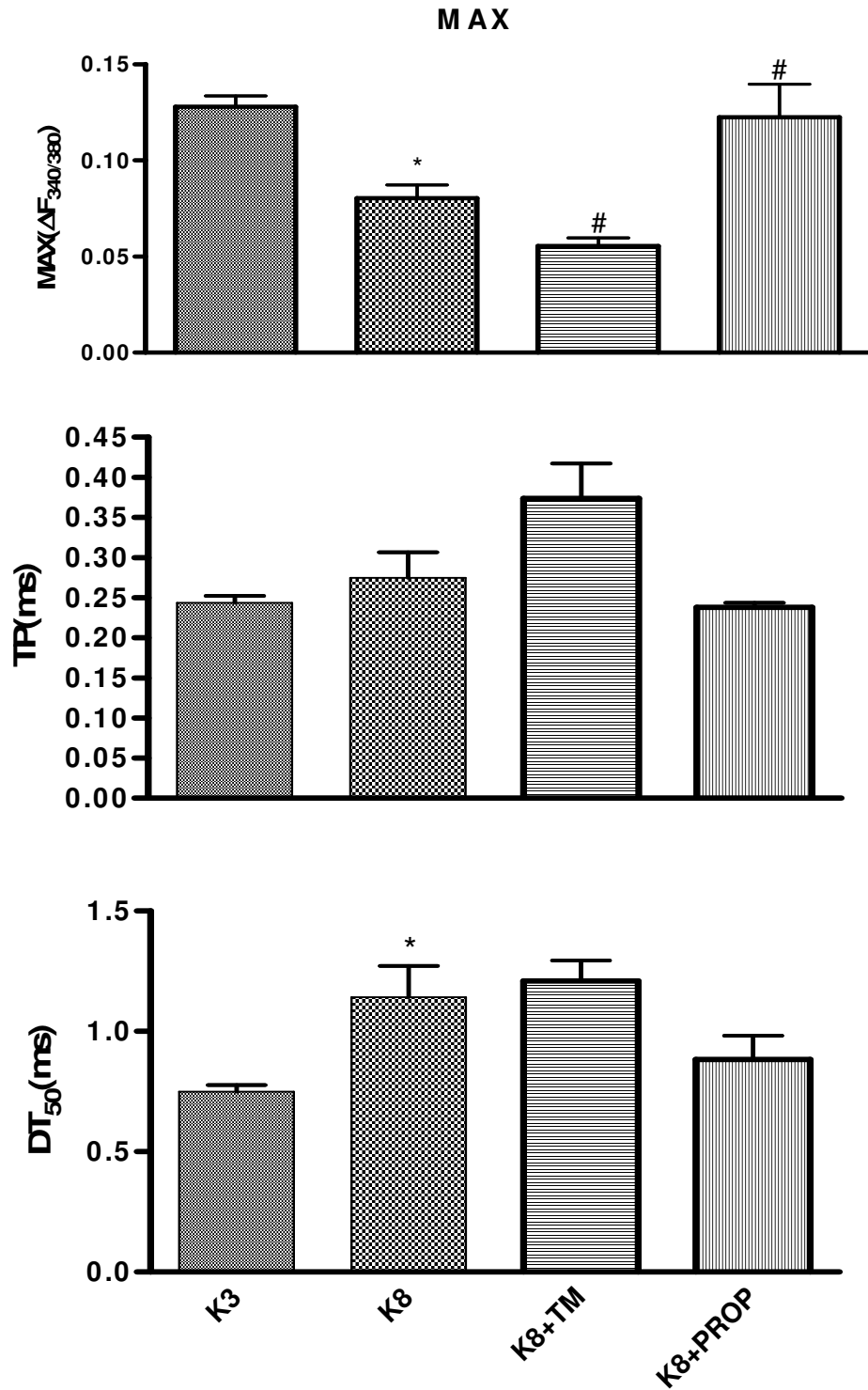


Şekil 3.8. Gruplara ait örnek Ca^{2+} transientleri ve üzerlerine uydurulmuş fonksiyon (gama dağılım fonksiyonu) eğrisi (kesikli çizgi). Transientler 10 ms süreli, 20-30 V'luk pulsların 0.2 Hz frekansında uygulanmasıyla elde edilmiştir.

Ortalama değerler karşılaştırıldığı zaman 8 aylık grupta Ca^{2+} transienlerinin maksimum değerinin 3 aylık gruba göre daha düşük çıktığını gözlenirken bu değerlerin timolol uygulamasının yapıldığı grupta 8 aylık gruba göre daha düşük çıktığı ve propranolol uygulamasının yapıldığı grupta değerlerin daha da çıktığı gösteriyor. TP değerlerinde ise 8 aylık grubun değerinin 3 aylık grubun değeriyle arasında anlamlı bir fark olmadığını görüyoruz, propranolol uygulaması ve timolol uygulaması yapılan grupların TP değeri 8 aylık grubun TP değeriyle herhangi anlamlı bir fark göstermediği görülmektedir. DT_{50} parametrelerinde ise 8 aylık grubun değerinin 3 aylık gruba göre daha yüksek çıktığı görülüyor, timolol uygulaması ve propranolol uygulamasının yapıldığı gruplarda anlamlı bir fark görülmemektedir (Tablo 3.5.ve Şekil 3.9).

	Max ($\Delta F_{340/380}$)	TP (s)	DT_{50} (s)
K3 (n=24)	0.13 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.75 ± 0.03
K8 (n=30)	0.08 ± 0.01*	0.27 ± 0.03	1.14 ± 0.13*
K8+TIM (n=30)	0.05 ± 0.01 [#]	0.37 ± 0.04	1.20 ± 0.09
K8+PROP (n=27)	0.12 ± 0.02 [#]	0.24 ± 0.01	0.88 ± 0.10

Tablo 3.5. Gruplara ait kısaltmalar Tablo 3.4'deki gibidir. Kardiyomiyositlerden kaydedilen Ca^{2+} transienlerinin kinetik parametreleri (Max, TP, DT_{50}). Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmişlerdir. n= Hücre sayısı, *p<0,05 K8 vs K3 grubu. [#]p<0,05 vs K8 grubu.



Şekil 3.9. Alan uyarısı ile kaydedilmiş Ca^{2+} transienleri. Transientlerden hesaplanan maksimum genliklerin ve kinetik parametrelerin ortalama değerleri (ortalama \pm SEM). **A**; maksimum genlik ($\Delta F_{340/380}$), **B**; tepeye çıkış süresi (TP), **C**; maksimum değer in %50'sine iniş süresi (DT₅₀). *p<0,05 K8 vs K3 grubu. #p<0,05 vs K8 grubu.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, yaşlanmaya bağlı olarak kalbin elektriksel aktivitesinde oluşan değişimler incelenmiş ve β -adrenerjik reseptör blokleri kullanarak bu değişimlerin yaşlanma üzerine etkisine bakılmıştır. Yapılan deneylerde 3 aylık ve 8 aylık herhangi bir ilaç uygulanmamış grup ve doğumununun 1. ayından itibaren 7 ay boyunca düzenli olarak her gün oral yoldan timolol (5 mg/kg) veya propranolol (25 kg/mg) verilmiş wistar türü dişi sıçanları içeren dört grup üzerinde incelemelerimiz gerçekleştirilmiştir.

Yapılan bu incelemelerde aksiyon potansiyeli, L-tipi Ca^{2+} kanal akımları (ICa_L) ve hücre içi serbest kalsiyum derişimi ($[Ca^{2+}]_i$) ölçülmüştür.

Literatürde yaşlanma sürecinde kalpte kalsiyum döngüsünde ve uyarılma kasılma çiftleniminin basamaklarında meydana gelen değişimlerin mevcut olduğu belirtilmiştir. Yaşlanmayla birlikte oluşan bu değişiklikler; SERCA sentezlenmesinde ve protein düzeyinde azalma (Lompre ve ark., 1989; Lompre ve ark., 1991; Taffet ve Tate, 1993; Schmidt, 1993), β_1 -adrenerjik reseptör yoğunluğunda azalma (White ve ark., 1994) ve desensitizasyon (Brodde ve Michel, 1999) sonucu cAMP düzeyinin azalması (Chiamvimonvat, 2002), RyR'lerinin, PLB'nin ve SERCA proteininin, translasyon sonrası modifikasyonunda (özellikle SERCA'nın Ca^{2+} kalmodülün bağımlı protein kinaz (CaM kinaz) aracılı fosforilasyonunda değişikliklerin olması, RyR'leri ve PLB'nin hayvan yaşlanma modellerinde önemli ölçüde azalması (Xu ve Narayanan, 1998) ve yaşa bağlı olarak miyozin ATPaz aktivitesinin azalması olarak özetlenebilir (Weisfeldt, 1998). Literatürde yaşlanmayla kalbin ATPaz aktivitesinde azalma olduğu gösterilmiştir (Schmidt ve ark., 1993).

Yaşlanan kalplerin katekolaminlere karşı inotropik yanıtlarının azalmasının, kalpteki miyosit sayısının azalmasından dolayı olduğu ifade edilmiş (Olivetti ve ark., 1991). Yaşlanma ile birlikte miyositlerin hacmi artarken sayılarında azalma görülmektedir ve bu azalmanın sebebi yaşlanmayla seyreden apoptoz olayının bir sonucu olarak gösterilmektedir (Lakata, 2003). SR kalsiyum döngüsünde görev alan proteinlerin CaM kinaz aracılı

fosforilasyonlarında ve dolayısıyla fosforilasyon bağımlı olarak SR'a kalsiyum giriş-çıkışı stimülasyonunda azalma olduğu, bunun sebebinin ise kardiyak sitozolde baskın düzeyde bulunan bir CaM kinaz II formu olan δ -CaM kinaz II'nin miktarının yaş artışıyla birlikte önemli ölçüde azalması olarak gösterilmiştir (Xu ve Narayanan, 1998).

Kalp yetmezliği olan hastalarda uzun süreli β -blokör terapisinin faydalı etkileri olduğu ve hayatta kalma oranını arttırdığı bilinmektedir (Bristow, 1997; Doughty ve Sharpe, 1997; Krum, 1997; Lechat ve ark., 1998; Packer ve ark., 1992). Kalp yetmezliğinde sempatik sistem aktivitesi aşırı derecede artmaktadır (Chidsey ve ark., 1962). Aynı durum yaşlanma sürecinde de gelişmektedir (Ziegler ve ark., 1976; Folkow ve Svanborg, 1993; Lakatta, 1993). Bu nedenle, bu çalışmada yaş artışıyla birlikte kalplerdeki kasılabilirlikte meydana gelen azalmanın kronik β -blokör uygulaması ile daha genç hayvanlardaki düzeye geri dönebileceği öngörülmüştür.

Hayvanların genel durumlarına bakıldığında β -blokör uygulamasının yaşlı sıçanların vücut ağırlıklarında anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlenmiştir. Literatürde daha önce yapılmış kronik β -blokör uygulamasının vücut ağırlığı üzerindeki etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır (Şam, 2006).

Aksiyon potansiyeli ölçümlerinde; dinlenim zar potansiyeli değerlerine baktığımızda (tablo 3.2) K8 grubunun dinlenim zar potansiyel değerinin K3 grubunun dinlenim zar potansiyeline göre daha depolarize olduğu görülmektedir ve timolol veya propranolol uygulamasının dinlenim zar potansiyel değerini K8 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği gözlenmiştir. AP'nin sıfır potansiyel üzeri (Maksimum Genlik) değerlerine baktığımız zaman gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Aksiyon potansiyelinin APD₂₅ ve APD₅₀ parametrelerinin değerlerinde de herhangi bir fark gözlenmezken APD₇₅ ve APD₉₀ parametrelerinin değerlerinde K3 grubuna göre K8 grubunda uzama gözlenmiştir aynı zamanda bu değerler timolol uygulamasıyla K3 grubunun değerlerine anlamlı bir şekilde yaklaşmış fakat propranolol uygulamasında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

AP ile $[Ca^{2+}]_i$ homeostazı arasındaki ilişki henüz açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte $[Ca^{2+}]_i$ 'nin kas aktivitesindeki rolü uzun zamandır bilinmektedir (Ishikawa ve ark., 1999;

Choi ve ark., 2002; Ye ve ark., 2003; Norby ve ark., 2004). Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda Wistar türü sıçanlarda yaşa bağımlı olarak aksiyon potansiyelinde uzama gözlenmiştir. (Di Gennaro M. ve ark, 1990 ; Di Meo S. ve ark, 1994 ; Cerbai E. ve ark, 1994 ; Huang C. ve ark., 2005 ; Janczewski AM ve ark, 2002).

Genç ve yaşlı sıçanların aksiyon potansiyeli parametreleri karşılaştırıldığında yaşa bağımlı olarak fizyopatolojik değişimler sonucunda kardiyak fonksiyon bozukluklarının olduğu gösterilmiştir. Özellikle APD₉₀ süresinde anlamlı bir değişikliğin olduğu gözlenmiştir (Garnier-Raveaud S. ve ark, 2002). Yaşlanmada AP sürelerinin uzaması bazı kanal akımlarındaki değişimlerin ve bazı kontraktil proteinlerin fonksiyonu veya ekspresyonundaki değişimlerin sonucu olduğu öne sürülmüştür (Lakatta, 2003). Başka bir çalışmada ise kardiyak AP süresinin uzamasına neden olabilecek iyon akımının L-tipi Ca²⁺ kanal akımı kaynaklı olduğu ve bugüne kadar yapılan çalışmaların AP repolarizasyon süresinin uzamasında Ca²⁺ kanal akımlarındaki artışın sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Hayashi ve Noda, 1997).

L-tipi Ca²⁺ kanal akımlarında (ICa_L) ise yaşlanma ile birlikte önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir (Tablo3.3. ve Şekil 3.5.). Doğumlarının birinci ayından itibaren 7 ay boyunca timolol verilmiş grubun (ICa_L) L-tipi Ca²⁺ kanal akım değerlerinde K8 grubuna göre anlamlı bir artış görülmektedir fakat yine doğumlarının birinci ayından itibaren 7 ay boyunca propranolol verilmiş grubun (ICa_L) değerlerinde K8 grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Ayrıca sıçanlarda yaş artışıyla hücrelerin membran kapasitansında bir büyüme görülmekte fakat β-adrenerjik reseptör bloker uygulamasının membran kapasitanslarını K8 grubuna kıyasla etkilemediği görülmektedir (Tablo 3.3.). Membran kapasitansında yaş ile bağımlı olarak bir artış gözlenmesi (Gomez J.P. ve 1994) burada yapılan deneylerdeki kapasitans değerleriyle paralellik göstermektedir.

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda yaşlanma ile L tipi Ca²⁺ kanal akımlarında anlamlı bir değişiklik gözlenirken membran kapasitanslarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Walker K.E. ve ark, 1993). Yine yaşlanma modeli uygulanmış sıçanlarda membran kapasitansları yaşlı ve hipertansif sıçanlarda membran kapasitansları daha yüksek

bulunmuştur (Cerbai E. ve ark, 1994). Sıçan kardiyomistlerinde yapılan başka bir çalışmada da yaşlanmayla birlikte L-tipi Ca^{2+} kanal akımlarında bir azalma olduğu gösterilmiştir (Liu SJ ve ark, 2000).

Erkek ve dişi fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise L-tipi Ca^{2+} kanal akımlarında erkek farelerde yaşlanma ile belirgin bir düşüş gözlenirken dişi farelerde, genç ve yaşlı farelerin L-tipi Ca^{2+} kanal akımları benzer değerler gözlenmiştir (Grandy S.A., Howlett S.E. , 2006). Bu sonuçlara ek olarak köpekler üzerinde yapılan bir başka yaşlanma modelinde yaşlı köpeklerin kardiyomiyositlerinde L-tipi Ca^{2+} kanal akımlarında %47'lik bir azalma görülmüştür (Wen Dun ve ark. , 2003).

Kardiyak kasılmanın beta adrenerjik modülasyonunda yaşa bağımlı olarak oluşan azalmanın en önemli nedenlerinden bir L-tipi Ca^{2+} kanal akımlarındaki azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir (Xiao RP ve ark, 1994).

Yaşlanmaya bağlı olarak kalsiyum akımlarının azalmasının cAMP bağımlı protein kinazlardaki değişimden kaynaklandığı söylenebilir. Yaşlanmaya bağlı olarak kas dokusundaki azalmanın kasın morfolojik yapısını etkilediği ve bu etkinin membranın iyonik akımlarının değişiminde önemli bir etken olabileceği düşünülmektedir (Chouabe C. ve ark, 2002). cAMP bağımlı protein kinaz aracılı etkilerde L-tipi Ca^{2+} kanal akımlarının çok büyük bir etkisi vardır (Aulbach F. ve ark, 1999).

Bizim bulgularımızda bu çalışmalarını doğrulayacak şekilde yaşlanma ile birlikte azalan Ca^{2+} akımlarının, bir β -adrenerjik reseptör blokleri olan timololle genç sıçanların seviyesine önemli ölçüde yaklaştığı ve aksiyon potansiyeli süresinin kısaldığı görülmüştür.

Hücre içi bazal Ca^{2+} seviyelerinde yaşlanmayla bir artış gözlenirken timolol uygulamasının hücre içi bazal Ca^{2+} seviyelerinde gözlenen bu artışı azaltıcı yönde etki gösterdiği fakat propranolol uygulamasının bu artışı anlamlı bir şekilde değiştirmediği gözlenmiştir (Tablo3.4).

Ca^{2+} transientlerinin maksimum değerlerinde yaşlanmayla önemli bir düşüş gözlenirken timolol veya propranolol uygulamasında farklı değişimler gözlenmiştir. Timolol uygulaması

Ca^{2+} transientlerinin maksimum değerini K8 grubunun maksimum değerine göre anlamlı düzeyde düşürmüş fakat propranolol uygulaması değerleri önemli lde yükseltmiş ve K3 grubunun değerlerine çekmiştir. Tepeye ıkış sürelerinde ise yaşlanmayla herhangi bir değişim gözlenmemiştir. DT_{50} değerlerinde ise yaşlanmayla bir uzama görülmekte ve timolol veya propranolol uygulamasının bu uzamaya bir etkisinin olmadığı görülmektedir (Tablo 3.5 ve Şekil 3.9).

β -adrenerjik reseptör agonisti isoproterenol kullanarak yaşa bağımlı olarak kalbin hem elektriksel ve kasılma aktivitesindeki değişiklik hem de kalsiyum homeostazındaki değişikliklerin kalpteki katekolaminlerin değişimlerine bağlı olduğu ve Ca^{2+} transientlerinde yaşa bağımlı olarak azalma olduğu gözlenmiştir. (Farrell S.R. ve ark, 2007). Koyun kardiyak miyositlerinde yapılan bir çalışmada aksiyon potansiyelinin APD90 fazında, Ca^{2+} transient genliklerinde ve kasılma sırasında oluşan hücre boyu kısalmasında yaşlı kalplerde artış görülmüştür (K.M. Dibb ve ark, 2004).

Erkek ve dişi fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise kasılma sırasında hücre boyunda meydana gelen değişim ve Ca^{2+} transient genlikleri llmş ve erkek farelerde yaşlanmayla hem kasılma anında hücrenin boyunda hem de Ca^{2+} transient genliklerinde yaşlılara göre daha düşük değerler vermesine rağmen dişi farelerde yaşlanmayla hem kasılma anındaki hücrenin boyunda hem de Ca^{2+} transient genliklerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Grandy S.A., Howlett S.E., 2006).

Aksiyon potansiyelinde repolarizasyon fazında gözlenen uzamanın ve kalsiyum akımı inaktivasyon süresinde yaşlanmayla birlikte gözlenen değişikliklerin hücre içi kalsiyum miktarındaki azalmadan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Walker K.E. ve ark, 1993).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, yaşlanma sürecinde kronik β -bloker uygulaması yapılan dişi sıçanların aksiyon potansiyeli, L-tipi Ca^{2+} kanal akımları ve hücre içi serbest Ca^{2+} derişimlerine bakılarak yaş artışı ve seçici olmayan β -adrenerjik reseptör blokörleri, timolol veya propranololün kalbin elektriksel aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.

Yaşlanma sürecinde aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazının APD_{75} ve APD_{90} fazlarında uzama görülmüştür. APD_{75} ve APD_{90} fazlarında yaşlanmayla oluşan bu uzamaları timolol uygulaması genç sıçanların değerlerine çekerken propranolol uygulamasında herhangi anlamlı bir düzelme görülmemiştir. Ölçümlerde gözlenen dinlenim membran potansiyellerinin yaşlanma ile daha depolarize olduğu ve β -blokeri uygulamasının bu durumu etkilemediği görülmektedir.

L-tipi Ca^{2+} kanal akımlarında, yaşlanma ile önemli ölçüde azalan akım yoğunluğu timolol uygulamasıyla genç sıçanların verilerine yakın değerlere gelmiştir, fakat propranolol uygulaması azalan akım yoğunluğuna bir etki de bulunmamıştır. Kardiyomiyositlerin membran kapasitanslarında ise yaşlanma ile anlamlı bir artış görülmekte ve β -blokeri uygulamasının membran kapasitanslarına istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkileri bulunmamaktadır.

Yaş artışıyla birlikte Hücre İçi Serbest Bazal Ca^{2+} Seviyelerinde artış gözlemledik ve timolol uygulamasıyla bazal Ca^{2+} Seviyelerinde anlamlı bir düşüş gözlenirken propranolol uygulamasında anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir.

Ca^{2+} transientlerinin Maksimum değerlerinde ise yaşlanma ile birlikte bir düşme görülürken timolol uygulamasıyla bu değer daha da düştüğü fakat propranolol uygulamasıyla maksimum değer genç sıçanların değerlerine yakın olduğu görülmektedir. Tepeye çıkış sürelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Maksimum değer %50' sine iniş sürelerine baktığımızda yaşlanmayla bir artış görülmekte ve β -blokeri uygulamasının bu değerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığını görüyoruz.

Literatürde, bu çalışmadaki gibi yedi ay süresince veya benzer şekilde uzun süreli β -blokör uygulaması yapılan ve kalp fonksiyonları incelenen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışma, kronik β -blokör uygulamasının kalp fonksiyonları üzerindeki etkisini incelemesi açısından önem taşımaktadır.

İleride daha uzun süreli tedavi ve farklı β -blokerleri kullanarak yapılacak benzer deneyler çalışmaların gelişmesine katkıda bulunabilir. Çünkü bizin kullandığımız Aynı sınıf olduğu bilinen bu iki β -adrenerjik reseptör blokerlerinin kalbin mekanik ve elektriksel aktivitesi üzerindeki etkilerinin farklı olması bu blokerlerin farklı yollar üzerinden veya farklı etki mekanizmalara sahip olmasından kaynaklanabileceğini işaret etmektedir.

Ayrıca, elde edilen sonuçların hangi mekanizmalar ile ortaya çıktığının anlaşılabilmesi için ek deneyler yapılması gerekmektedir. AP parametrelerini açıklayabilmek için K^+ ve NCX kanallarındaki akımlarının ölçülmesi kullanılan β -blokerlerin etkisini incelenmesi açısından faydalı olabilir, bu çalışmalara ek olarak β -adrenerjik reseptör yoğunluğu, β -adrenerjik sinyal iletim sisteminde ve uyarılma kasılma çiftleniminde rol alan çeşitli proteinlerin düzeyleri incelenmesi, adenilil siklaz aktivitesi ölçümü gibi teknikler de kullanılabilir.

ÖZET

Yaşlanmaya Bağlı Kalp Fonksiyon Değişikliklerinde Beta Adrenerjik Sistemin Rolünün Elektrofizyolojik Yöntemlerle İncelenmesi

Kardiyovasküler yaşlanmadan Beta-adrenerjik sinyal iletim sistemide etkilenmektedir. Hayvanlardaki yaşlanma modelleri üzerinde yapılan birçok çalışmada, yaşın artmasıyla birlikte Beta -adrenerjik stimülasyona karşı verilen kardiyak yanıtların azaldığı görülmüştür. Yaşlanma ile aksiyon potansiyelinde uzama, L-tipi Ca^{2+} kanal akımlarında azalma ve Ca^{2+} transienlerinin kinetiklerinin de değiştiği ifade edilmiştir. Mekanizması tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte, β -blokörlerin kronik kullanımı kalpteki çeşitli patolojik durumların düzelmesini sağlamaktadır. Bu çalışmanın amacı, yaş artışının kalbin mekanik ve elektriksel aktivitelerinde yol açtığı bozukluklarda Beta -adrenerjik reseptörlerin rolünü incelemektir. Elde ettiğimiz sonuçlarda, yaşlanmayla aksiyon potansiyelinin APD_{75} ve APD_{90} fazlarında uzama olduğunu gösterdi, timolol uygulamasının bu uzamayı düzeltici etki gösterdiği fakat propranolol uygulamasının etkisinin olmadığını gördük. L-tipi Ca^{2+} kanal akımlarının yoğunluğunda yaşlanmayla azalma görüldü. Timolol uygulaması akım yoğunluğunu önemli ölçüde artırırken propranolol uygulaması herhangi bir etkide bulunmadı. Yaş artışıyla birlikte Hücre İçi Serbest Bazal Ca^{2+} Seviyelerinde artış gözlemledik ve timolol uygulamasıyla bazal Ca^{2+} Seviyelerinde anlamlı bir düşüş gözlenirken propranolol uygulamasında anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir. Ca^{2+} transienlerinin Maksimum (Mak.) değerlerinde ise yaşlanma ile birlikte bir düşme görülürken timolol uygulamasıyla bu değer daha da düştüğü fakat propranolol uygulamasıyla maksimum değer genç sıçanların değerlerine yakın olduğu görüldü. Tepeye çıkış sürelerinde (TP) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Maksimum değer %50' sine iniş sürelerine (DT_{50}) baktığımızda yaşlanmayla bir artış görülmekte ve β -blokeri uygulamasının bu değerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığını gördük. Sonuç olarak timolol'ün kalbin elektriksel aktivitesini düzeltirken propranololün etkili olmadığını görüyoruz.

Anahtar Sözcükler: Beta -adrenergic reseptör, aksiyon potansiyeli , kalsiyum akımı, hücre içi kalsiyum, kalp, Beta -adrenergik reseptör blokörleri.

SUMMARY

Investigation of Role of Beta Adrenergic System in Age Related Alterations in Heart Functions by Using Electrophysiological Techniques

β -adrenergic signaling system is also affected by cardiovascular aging among other processes. In many study on animal aging models, it is observed that cardiac responses depending on Beta -adrenergic stimulation decreases with aging. It was expressed that elongation in action potential, decrease in L-type Ca^{2+} channel currents and alteration in Ca^{2+} channel kinetics are observed, related with aging. While the underlying mechanism is not clear, chronic utilization of β -blockers restores various pathological situations in heart. The aim of this study is to investigate the role of Beta -adrenergic receptors in the deficiencies caused by aging at the mechanical and electrical activities of heart. In the results that we obtained, it is shown that there was elongation at APD_{75} and APD_{90} phases of action potential with aging, timolol application compensated this elongation, while propranolol treatment had no effect. Decrease in the current density of L-type Ca^{2+} currents was observed with aging. Timolol treatment increased the current density evidently, while propranolol treatment had no effect. We observed an increase in intracellular basal Ca^{2+} levels with aging, and a significant decrease in basal Ca^{2+} levels was observed with timolol treatment, while a significant decrease was not observed after propranolol treatment. A decrease in the peak value of Ca^{2+} transients is observed with aging, and this value is shown to decrease further after timolol treatment, however; the peak value was close to the values of young animals with the propranolol treatment. In time to peak (TP) time courses, no statistically significant difference was observed among the groups. When the half peak value descend time (DT_{50}) was considered, an increase in these values with aging is observed, and neither timolol nor propranolol caused a statistically significant difference. As a conclusion, timolol restored the electrical activity of the heart, while propranolol had no effect.

Key words: Beta -adrenergic receptor, action potential, Calcium Current, heart, Beta -adrenergic receptor blockers.

KAYNAKLAR

- ALBERTS, B., JOHNSON A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. New York & London: Garland Publishing.
- AULBACH F., SIMM A., MAIER S., LANGENFELD H., WALTER U., KERSTING U., KIRSTEIN M. (1999). Insulin stimulates the L-type Ca²⁺ current in rat cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* **42(1)**:113-20.
- BERS, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* **415**: 198-204.
- BRACKEN, N.K., SINGH, J., WINLOW W., HOWARTH, F.C. (2003). Mechanisms underlying contractile dysfunction in streptozotocin-induced type 1 and type 2 diabetic cardiomyopathy. In: *Artherosclerosis, hypertension and diabetes*, Ed.: G.N. Pierce, M. Nagano, P. Zahradka, N.S. Dhalla. Boston: Kluwer Academic Publishers, p.: 386-407.
- BRISTOW, M.R. (1997). Mechanism of action of beta-blocking agents in heart failure. *Am. J. Cardiol.*, **80**: 26L-40L.
- BRODDE, O.E., MICHEL, M. C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological Reviews.*, **51(4)**: 651-689.
- BRODDE, O.E., ZERKOWSKI, H.R., SCHRANZ, D., BROEDE-SITZ, A., MICHEL-REHER, M., SCHÄFER-BEISENBUSCH E., PIOTROWSKI, J.A., OELERT, H. (1995). Age-dependent changes in the β -adrenoceptor-G protein(s)-adenylyl cyclase system in human right atrium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **26**:20–26.
- CAIN, B.S., MELDRUM, D.R., JOO, K.S., WANG, J.F., MENG, X., CLEVELAND, J.C., J.R. CHIAMVIMONVAT, N. (2002). Diastolic dysfunction and the aging heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **34**:607-610.
- CAZORLA O., LACAMPAGNE A., FAUCONNIER J., VASSORT G. (2003). SR33805, a Ca²⁺ antagonist with length-dependent Ca²⁺-sensitizing properties in cardiac myocytes. *British Journal of Pharmacology British Journal of Pharmacology*, **139**: 99–108.
- CERBAI E, BARBIERI M, LI Q, MUGELLI A (1994). Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. *Cardiovasc Res.* **28(8)**:1180-7.

- CHOI, K.M., ZHONG, Y., HOIT, B.D., GRUPP, I.L., HAHN, H., DILLY K.W., GUATIMOSIM S., LEDERER W.J., MATLIB M.A. (2002). Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in type 1 diabetic rats. *Am. J. Physiol.* **283**: H1398-H1408.
- CHOUABE C., AMSELLEM J., ESPINOSA L., RIBAUX P., BLAINEAU S., MÉGAS P., BONVALLET R. (2002). Reversibility of electrophysiological changes induced by chronic high-altitude hypoxia in adult rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **282(4)**:H1452-60.
- DAS, P.K., TEMSAH, R., PANAGIA, V., DHALLA, N.S. (1997). β -adrenergic signal transduction pathway in developing and aging hearts. *Heart Failure Reviews*, **2**: 23-41.
- DÌ GENNARO M, SGADARÌ A, PAHOR M, BERNABEÌ R, CARBONÌN PU (1990). Increased propensity of the aged myocardium to develop calcium-related electrophysiological alterations. *Arch Gerontol Geriatr.* **11(2)**:141-6.
- DÌ MEO S, DE MARTÌNO ROSAROLL P, PÌRO MC, DE LEO T (1994). Ventricular electrophysiological properties in normal and congenitally hypothyroid neonatal rats. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* **102(2)**:129-34.
- DOUGHTY, R.N., SHARPE, N. (1997). Beta-adrenergic blocking agents in the treatment of congestive heart failure: Mechanisms and clinical results. *Annu. Rev. Med.*, **48**: 103–114.
- DÖKMECİ, İ. (2000). Farmakoloji temel kavramlar. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi
- DUN W. , YAGİ T. , ROSEN M. R. , BOYDEN P. A (2003). Calcium and potassium currents in cells from adult and aged canine. *Cardiovascular Research.* **58**: 526–534
- FARRELL SR, HOWLETT SE (2007). The effects of isoproterenol on abnormal electrical and contractile activity and diastolic calcium are attenuated in myocytes from aged Fischer 344 rats. *Mech Ageing Dev.* **128(10)**:566-73.
- FERRARA, N., O'GARA, P., WYNNE, D.G., BROWN, L.A., DELMONTE, F., POOLE-WILSON, P.A., HARDING, S.E. (1995). Decreased contractile responses to isoproterenol in isolated cardiac myocytes from aging Guinea-pigs. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**:1141–1150.
- FOLKOW, B., SVANBORG, A. (1993). Physiology of cardiovascular aging. *Physiol Rev.*, **73**:725–764.

- GOMEZ JP, POTREAU D, BRANKA JE, RAYMOND G (1994). Developmental changes in Ca²⁺ currents from newborn rat cardiomyocytes in primary culture. *Pflugers Arch.* **428(3-4)**:241-9.
- GRANDY SA, HOWLETT SE(2006). Cardiac excitation-contraction coupling is altered in myocytes from aged male mice but not in cells from aged female mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **291(5)**:H2362-70.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., TSIEN, R. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450.
- GUYTON, A. C. (1996). Tıbbi Fizyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi
- HARDOUIN, S., BOURGEOIS, F., BESSE, S., MACHIDA, C.A., SWYNGHEDAUW, B., MOALIC, J.M. (1993). Decreased accumulation of the β_1 -adrenergic receptor, G_{sa} and total myosin heavy chain messenger RNAs in the left ventricle of senescent rat heart. *Mech. Aging Dev.*, **71**:169–188.
- HAYASHI, H., NODA, N. (1997). Cytosolic Ca²⁺ concentration decreases in diabetic rat myocytes. *Cardiovasc. Res.* **34**: 99-103.
- HUANG C, DING W, LI L, ZHAO D. (2006). Differences in the aging-associated trends of the monophasic action potential duration and effective refractory period of the right and left atria of the rat. *Circ J*, **70 (3)**:352-7.
- ISHIKAWA, T., KAJIWARA, H., KURIHARA, S. (1999). Alterations in contractile properties and Ca²⁺ handling in streptozotocin-induced diabetic rat myocardium. *Am. J. Physiol.* **277**: H2185-2194.
- JANCZEWSKI AM, SPURGEON HA, LAKATTA EG. (2002). Action potential prolongation in cardiac myocytes of old rats is an adaptation to sustain youthful intracellular Ca²⁺ regulation. *J Mol Cell Cardiol.* **34(6)**:641-8.
- JANVIER, N.C., BOYETT, M.R. (1996). The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. *Cardiovasc. Res.* **32**: 69-84.
- JIANG, MT., MOFFAT, M.P., NARAYANAN, N. (1993). Age-related alterations in the phosphorylation of sarcoplasmic reticulum and myofibrillar proteins and diminished contractile response to isoproterenol in intact rat ventricle. *Circ. Res.*, **72**:102–111.
- KATZ, A.M. (1992). Physiology of the Heart. Philadelphia: Raven Press

- K. DIBB M., RUECKSCHLOSS U., EISNER D.A., ISENBURG G., TRAFFORD A.W. (2004). Mechanisms underlying enhanced cardiac excitation contraction coupling observed in the senescent sheep myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **37**: 1171–1181
- KRUM, H. (1997). β -Adrenoceptor blockers in chronic heart failure. A review. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **44**:111–118.
- LAKATTA, E.G., GERSTENBLITH, G., ANGELL, C.S., SHOCK, N.W., WEISFELDT, M.L. (1975). Diminished inotropic response of aged myocardium to catecholamines. *Circ. Res.*, **36**:262–269.
- LAKATTA, E.G. (1993). Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol. Rev.*, **73**: 413–467.
- LAKATTA EG. (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises. *Circulation*. **107**(3): 490-7.
- LECHAT, P., PACKER, M., CHALON, S., CUCHERAT, M., ARAB, T., BOISSEL, J-P. (1998) Clinical effects of β -adrenergic blockade in chronic heart failure: A meta-analysis of doubleblind, placebo-controlled, randomized trials. *Circulation*, **98**: 1184–1191.
- LIU SJ, WYETH RP, MELCHERT RB, KENNEDY RH (2000). Aging-associated changes in whole cell K(+) and L-type Ca(2+) currents in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **279**(3): H889-900.
- LOMPRE A. M., LAMBERT F., LAKATTA, E. G., SCHWARTZ, K. (1991). Expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and calsequestrin genes in rat heart during ontogenic development and aging. *Circ. Res.*, **69**: 1380-1388.
- MUKHERJEE, R., SPINALE, F.G. (1999). Alterations in ionic current and relation to contractile dysfunction with severe cardiac hypertrophy and failure. *Heart Fail. Rev.*, **4**: 319-327.
- NORBY, F.L., ABERLE II, N.S., KAJSTURA, J., ANVERSA, P., REN, J. (2004). Transgenic overexpression of insulin-like growth factor I prevents streptozotocin-induced cardiac contractile dysfunction and β -adrenergic response in ventricular myocytes. *J. Endocrinol*. **180**: 175-182.
- OLIVETTI, G., MELISSARI, M., CAPASSO, J.M., ANVERSA, P. (1991). Cardiomyopathy of the aging human heart: Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ. Res.*, **68**: 1560-1568.

- OZDEMİR S., UGUR M., GÜRDAL H., TURAN B. (2005). Candesartan Treatment Restores Diabetes-Induced Alterations in Ca²⁺ Transients and Contractile Function of Rat Myocardium. *Arch. Biochem. Biophys.* **435(1)**: 166-174.
- PACKER, M. (1992). Pathophysiology of chronic heart failure. *Lancet*, **340**: 88–92.
- REITER, M. J. (2004). Cardiovascular drug class specificity: β -blockers. *Progress in Cardiovascular Disease*, **47(1)**: 11-33.
- RIBERA-CASADO J. M. (1999). Aging and the cardiovascular system. *Z. Gerontol. Geriat.*, **32**: 412-419.
- SAKAI, M., DANZIGER, R.S., XIAO, R.P., SPURGEON, H.A., LAKATTA, E.G. (1992). Contractile response of individual cardiac myocytes to norepinephrine declines with senescence. *Am. J. Physiol.*, **262**: H184–H189.
- SHIYAM, S., WILLIAM D. G., JAGAT N. (2004). β -Adrenergic Blockers in Heart Failure: Review of Mechanisms of Action and Clinical Outcomes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, **9(4)**: 243-255
- SCHMIDT, U., DEL MONTE, F., MIYAMOTO, M.I., MATSUI, T., GWATHMEY, J.K, TAFFET, G.E., Tate, C.A. (1993). Ca²⁺ ATPase content is lower in cardiac sarcoplasmic reticulum isolated from old rats. *Am. Physiol.*, **264**: H1609-H1614.
- STEINBERG, S.F. (1999). The molecular basis for distinct β -adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circulation Research*, **85**: 1101-1111.
- SÜZER, Ö. (2005). Süzer Farmakoloji. İstanbul: Klinisyentıp kitapevi
- ŞAM P. (2006). Yaşlanmanın kalpteki beta-adrenerjik reseptör blokör yanıtları üzerindeki etkisinin incelenmesi: Yüksek lisans tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- VANDER, A.J., SHERMAN, J.H., LUCIANO, D.S. (1994). Human physiology: The mechanism of body function. McGraw Hill. Inc., International Edition.
- WAHLER, G.M. (1997). Cardiac action potentials. In Cell Physiology, Ed.: Sperelakis. *New York, Academic Press*, p.:780-790.
- WALKER KE, LAKATTA EG, HOUSER SR (1993). Age associated changes in membrane currents in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* **27(11)**: 1968-77.
- WEISFELDT, M. (1998). Aging, changes in the cardiovascular system, and responses to stress. *Am. J. Hypertens*, **11**: 418-458.

- WHITE , M., LEENEN, F.H.H. (1994). Aging and cardiovascular responsiveness to β -agonist in humans: Role of changes in β receptor responses versus baroreflex activity. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **56**: 543-553.
- YE, G., METREVELI, N.S., REN, J., EPSTEIN, P.N. (2003). Metallothionein prevents diabetes-induced deficits in cardiomyocytes by inhibiting reactive oxygen species production. *Diabetes*. **52**: 777-783.
- XIAO RP, SPURGEON HA, O'CONNOR F, LAKATTA EG (1994). Age-associated changes in beta-adrenergic modulation on rat cardiac excitation-contraction coupling. *J Clin Invest*. **94(5)**: 2051-9.
- XU, A., NARAYANAN, N. (1998). Effects of aging on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -cycling proteins and their phosphorylation in rat myocardium. *Am. J. Physiol.*, **275**: H2087-H2094.
- ZIEGLER, M.G., LAKE C.R., KOPIN, I.R. (1976). Plasma noradrenaline increases with age. *Nature (Lond)*., **261**: 333-335.

ÖZGEÇMİŞ

I- BİREYSEL BİLGİLER

Adı: Ali Aytaç
Soyadı: SEYMEN
Doğum yeri ve tarihi: Mersin - 16.06.1979
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Bekar
İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik A.B.D.-0312 3103010/337

II- EĞİTİMİ

Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü (1998-2004)
Tevfik Sırrı Gür Lisesi (1994-1996)
Mersin Ortaokulu (1991-1993)
Abdulkadir Perşembe İlkokulu (1986-1990)
Yabancı dili: İngilizce

III- ÜNVANI

Fizikçi

IV- ÜYE OLDUGU BİLİMSEL KURULUŞLAR

American Biophysical Society

V- BİLİMSEL İLGİ ALANLARI

Yayımları:

Tuncay E, Seymen AA, Tanriverdi E, Yaras N, Tandogan B, Uluşu N.N, Turan B. Gender related differential effects of Omega-3E treatment on diabetes-induced left ventricular dysfunction. Mol Cell Biochem. 2007 May 26

VI – BİLİMSEL ETKİNLİKLERİ

Katılmış olduğu kongreler

- Selenium in Health and Disease (Tübitak, 2006)

Posterler

- Gender related differential effects of Omega-3E treatment on diabetes-induced left ventricular dysfunction. İtalya ISHR Kongresi
- Beneficial effect of sodium selenate on vascular dysfunction in diabetic rats. İtalya ISHR Kongresi