

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

Proje Türü : Lisansüstü Tez Projesi (Doktora)
Proje No : 13L3336008
Proje Yöneticisi : Prof.Dr. V. Melih Altan
Proje Konusu : Kardiak Hipertrofide Beta 3-AR'lerin Na⁺/K⁺-ATPaz Enzimi Üzerindeki Etkisi

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İSTİYORUM

İSTEMİYORUM

08.01.2016

PROF. DR.V. MELİH ALTAN

1946

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU

Kardiak Hipertrofide Beta 3-AR'lerin Na⁺/K⁺-ATPaz Enzimi Üzerindeki Etkisi

Prof. Dr. V. Melih Altan

Dr. Gizem Kaykı Mutlu

13L3336008

Başlama Tarihi: 11/12/2013

Bitiş Tarihi: 11/12/2015

Rapor Tarihi: 11/07/2015

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - " 2015 "

1946

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Kardiyak Hipertrofide Beta 3-AR'lerin Na⁺/K⁺-ATPaz Enzimi Üzerindeki Etkisi

Negatif inotropik etkiye aracılık eden β_3 -AR'lerin etkileri sağlıklı kalpte belirgin olmamakla birlikte, sempatik aşırı aktivasyonla ilişkili kardiyak patolojilerde ekspresyonunun arttığı ve etkilerinin güçlendiği öne sürülmektedir. β_3 -AR'lerin sağlıklı kalpte kardiyak Na⁺/K⁺ pompası (NKA) β_1 alt ünitesi üzerindeki oksidatif modifikasyonu geri döndürerek artan Na⁺/K⁺ pompa akımına aracılık ettikleri gösterilmiştir. Ne var ki, bir patoloji varlığında β_3 -AR'lerin NKA üzerindeki etkileri henüz bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda sempatik sistem aktivasyonu sonucu gelişen rat hipertrofi modelinde β_3 -AR'lerin Na⁺-K⁺ pompası üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Taze izole edilmiş rat kardiyomiyositlerinde kısa süreli(3 saat), *in vitro* noradrenalin inkübasyonunun Na⁺/K⁺ pompa akımını azalttığı ve istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte hücre içi Na⁺ floresans düzeylerinde hafif bir artış oluşturduğu gözlenmiştir. Ortama β_3 -AR agonisti BRL 37344 eklendiğinde ise pompa akımındaki azalma geri dönmekte ve Na⁺ düzeylerindeki artış ise azalmaktadır. Daha sonra ratlara 2 hafta süreyle noradrenalin ve noradrenalin+BRL 37344 tedavisi yapılmıştır. Süre sonunda kalpler homojenize edilerek protein izolasyonu yapılmış ve çeşitli protein ekspresyonları ölçülmüştür. Hipertrofi belirteci bir gen olan ANP düzeylerinin de noradrenalin tedavisiyle arttığı, β_3 -AR stimülasyonu ile ise azaldığı gözlenmiştir. Hipertrofik ratlarda ayrıca, β_3 -AR ekspresyonları artmakta, BRL tedavisiyle ise bu artış geri dönmektedir. Öte yandan, hipertrofide NKA alt ünitelerinden β_1 ekspresyonlarında bir değişiklik olmaksızın α_1 alt ünitesinde hafif bir artış, α_2 alt ünitesinde ise hafif bir azalma gözlenmiştir. β_3 -AR agonist tedavisi bu değişiklikleri de geri döndürmektedir. Spesifik β_3 -AR agonizminin Na⁺/K⁺ pompa stimülasyonu aracılı antihipertrofik etkilerinin gösterildiği çalışmamız, hipertrofi tedavisine yeni bir potansiyel terapötik yaklaşım sunmaktadır. Buna ek olarak, hipertrofi patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına da katkı sağlamaktadır.

The Effect of Beta 3-ARs on Na⁺/K⁺-ATPase in Cardiac Hypertrophy

β_3 -ARs mediate negative inotropic effects, the physiological role of which is not clear in healthy heart. They are known to be upregulated in cardiac pathologies associated with sympathetic overactivation and their effects become more prominent. β_3 -ARs are shown to stimulate cardiac Na⁺/K⁺ pump via the reversal of an oxidative modification in the regulatory β_1 subunit of the pump in healthy heart. However, their effects on the pump in the presence of a cardiac pathology are still not known. For this purpose, we aimed to investigate the effects of β_3 -ARs on Na⁺-K⁺ pump in hypertrophy related to sympathetic overstimulation. Firstly, we observed a decrease on Na⁺/K⁺ pump current and a slight increase on Na⁺ fluorescence on *in vitro*, short term (3 hours) noradrenaline incubated freshly isolated cardiomyocytes. When β_3 -AR agonist, BRL 37344 is added, pump current and Na⁺ fluorescence values returned to control values. To determine protein expressions, rats were treated with noradrenaline or noradrenaline+BRL 37344 for 2 weeks. ANP, which is an hypertrophy marker, was increased in hypertrophic hearts and decreased with β_3 -AR stimulation. In hypertrophic rats, an increase was observed in β_3 -AR expression which was decreased by BRL treatment. On the other hand, NKA β_1 subunit was not changed, however a slight increase in α_1 subunit and a slight decrease in α_2 subunit were determined. Our study which shows specific β_3 -AR agonism has an antihypertrophic effect via the stimulation of Na⁺/K⁺ pump may be a promising therapeutic option for hypertrophy and provides better understanding of the pathophysiology of hypertrophy.

1946

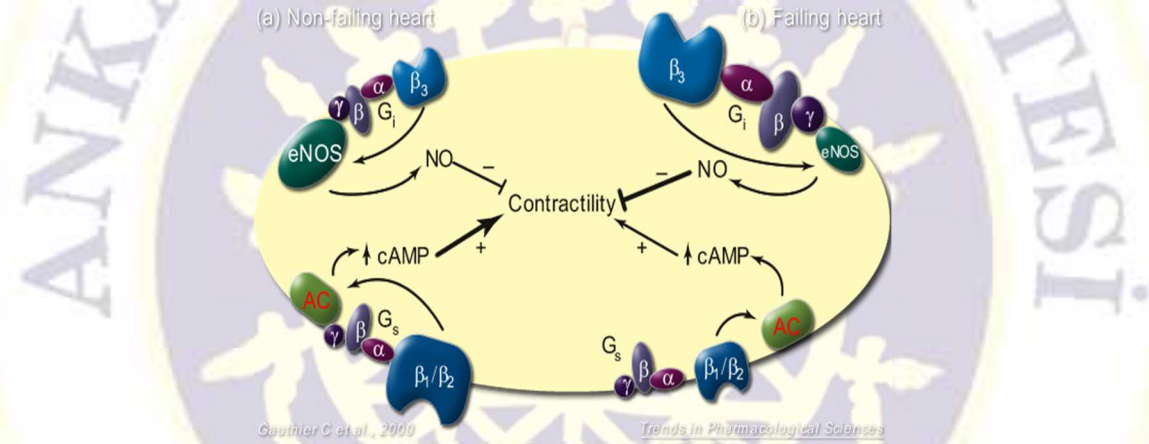
II. Amaç ve Kapsam

Sempatik sinir sistemi, savaş-ya da-kaç (fight-or-flight) yanıtları aracılığıyla kritik durumlarda hayatta kalım açısından son derece önemlidir. Akut bir hastalık durumunda da SSS aktivasyonu dokulara oksijen sağlması ve organ bütünlüğünü koruması yönünden yararlıdır. Ne var ki, kronik durumlarda devam eden aşırı aktivasyon kontrol dışına çıkarak yan etkiler oluşturmaktadır. Kalp kası kütesinin artışı olarak tanımlanan kardiyak hipertrofi durumunda da sempatik sistem aşırı aktivasyonunun rol oynadığı bilinmektedir. Kalp, yükünün arttığı durumlarda normal koşullara göre daha fazla çalışmalıdır. Duvar stresindeki kronik artışla başa çıkabilmek için kalp hücrelerinin boyut ve kütlelerinde artış ortaya çıkmaktadır (Hunter&Chien, 1999). Kalbin genişlemesinin esas nedeni miyositlerin hipertrofiye uğramasıdır. Bir başka ifade ile, mevcut durumdaki miyositler, sayıları değişmeksizin genişlemektedirler. Kardiyak hipertrofi, başlangıçta adaptif bir yanıt olarak gelişmektedir. Ne var ki, hipertrofinin uzun süre kalıcı olması kardiyak disfonksiyon ve kalp yetmezliğe neden olmaktadır. Hipertrofi ve devamında kalp yetmezliği gelişimi çok sayıda nedene bağlıdır. Gen ekspresyonundaki değişiklikler, hormonal faktörler, apoptoz, enerji metabolizmasındaki bozukluklar, aritmi, vasküler disfonksiyon, kollajen birikimi, fibronektin düzeyleri gibi nedenler diyastolik ve sistolik fonksiyonları etkileyerek kalp yetmezliğine yol açmaktadır (Gupta ve ark.,2007).

Öte yandan, β -adrenoseptörler kardiyak fonksiyonların düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. İnsan kardiyak miyositlerinde β_1 -AR > β_2 -AR >> β_3 -AR sırasıyla üç farklı tip β -AR bulunmaktadır. β_1 - ve β_2 -AR alttıplerinin uyarılmaları sonucu pozitif inotropik (kardiyak kontraktilitenin artması), pozitif kronotropik (frekansın artması), lusitropik (gevşeme hızı) ve pozitif dromotropik (atrioventriküler nod boyunca impuls iletimi) etkilere aracılık etmektedirler. β_3 -ARler ise normal fizyolojik durumlarda inaktif haldedir (Skeberdis ve ark., 2008). Uyarılmaları sonucu, β_1 - ve β_2 -AR'lerin tersine, nitrik oksit sentaz aracılı olarak (Gauthier ve ark., 1998) negatif inotropik etki oluşturmaktadır. Bu etkilerinin yoğun adrenerjik uyarı varlığında kalbi korumaya yönelik bir 'koruyucu vana' (safety valve) olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Rozec ve

ark., 2009).

β_3 -AR'ler moleküler yapısı ve farmakolojik özellikleri açısından β_1 -AR ve β_2 -AR alttiplerinden ayrılırlar. İlk olarak 1989 yılında tanımlanmalarının ardından başta beyaz ve kahverengi adipositler olmak üzere kalp, damarlar, safra kesesi, gastrointestinal kanal, prostat, mesane, beyin ve myometriyum gibi çok sayıda dokuda buldukları gösterilmiştir. Kalpteki varlıkları, yaklaşık 20 sene önce gösterilmiş ve fonksiyonel oldukları öne sürülmüştür (Gauthier ve ark., 1996). Hastalıklı kardiyovasküler dokuda sayılarının artmış bulunması ve desensitizasyona karşı dirençli olmaları nedeniyle ilgi çekmiştir. Günümüzde de, terapötik ajan olarak kullanılabilirleri düşüncesiyle yoğun çalışmalar devam etmektedir.



Şekil 2.1. Kardiyomiyositlerde zıt inotropik etkilere yol açan β -AR-aracılı yollar (Gauthier ve ark., 2000).

Kalp yetmezliğinde, β_1 - ve β_2 -AR- aracılı yanıtlar azalmaktadır. İnsan yetmezlikli sol ventrikülünde β_1 - ve β_3 -AR konsantrasyonlarında zıt değişiklikler gerçekleşmektedir (şekil 2.1). β_3 -AR'lerde gözlenen 2-3 katlık bir artış, bu reseptör alttipinin aracılık ettiği negatif inotropik yanıtların göreceli olarak artmasını sağlamaktadır (Moniotte ve Balligand, 2002; Germack ve Dickenson, 2006). Başlangıçta gelişen β_3 -AR upregülasyonunun kardiyomiyosit hasarını önlemeye yönelik koruyucu bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Gerçekten de, β_3 -AR overeksprese edilmiş farelerde histolojik olarak miyosit hipertrofisi ya da fibrojeniz gözlenmemesi, β_3 -AR aktivasyonunun kalp yetmezliğinin yol açtığı kardiyomiyosit hasarında rolü olmadığını düşündürmektedir (Tavernier ve ark., 2003). Miyokardın korunmasında şu hücresel mekanizmaların görev

aldığı düşünülmektedir: (1) L tipi Ca^{++} kanallarının aktivasyonunda ve buna bağlı olarak kalsiyum “overload”unda azalma, (2) NO üretimine bağlı olarak daha iyi diyastolik fonksiyon, (3) negatif inotropik etki ile ilişkili hücre içi ATP ve kreatin fosfat içeriğinin korunması, (4) vazodilatör etkiler sayesinde arter ve venlerde preload (önyük) ve afterload’un (ardyük) azalması ile oksijen sunumu/tüketimi oranında düzelme (Gauthier ve ark., 2007). Bu etkileri ile β_3 -AR stimülasyonunun stres, fiziksel efor gibi yoğun adrenerjik uyarımın olduğu durumlarda kalbi koruyucu (safety valve) görev yaptığı düşünülmektedir. Ne var ki, kalp yetmezliğinin ilerleyen dönemlerinde miyokardiyal depresyona yol açacak sürekli negatif inotropik etkileri nedeniyle β_3 -AR aktivasyonu zararlı hale gelebilmektedir. Yetmezlikli rat kalbinde, β_3 -AR agonistlerinin kardiyak fonksiyonları kötüleştirdiği ve kardiyak miyosit apoptozisini stimüle ettiği gösterilmiştir (Kong ve ark., 2004).

β_3 -AR’lerin kardiyak etkinlerinin düzenlenmesinde transmembran iyon kanalları aktivitesindeki ve eksitasyon-kontraksiyon kenetindeki değişikliklerin rol oynadığı düşünülmektedir (Rozec ve Gauthier, 2006). Tavşan kardiyomiyositlerinde yapılan bir çalışmada β_3 -AR stimülasyonunun nitrik oksid (NO) aracılı olarak Ca^{2+} transientleri (geçiş) ve L-tipi Ca^{2+} akımını (I_{CaL}) azalttığı, I_{Ks} akım şiddetini ise arttırdığı gösterilmiştir. Dışa doğru repolarize edici K^+ akımı olan I_{Ks} şiddetinin artışı ve I_{CaL} şiddetinin azalması tavşan ventriküler kardiyomiyositlerinde repolarizasyonun hızlanmasına yol açmaktadır (Audigane ve ark., 2009). Buna ek olarak, insan endomiyokardiyal biyopsilerinde β_3 -AR agonistlerinin ventriküler mekanik yanıtları değiştirdikleri konsantrasyonlarda, ventriküler aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazında bir hızlanma ve amplitüdde bir azalma oluşturduğu gözlenmiştir. (Gauthier ve ark., 1996).

Öte yandan, yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, tavşan kardiyomiyositlerinde BRL 37344 ve CL316243’ün kardiyak Na^+/K^+ pompasını (NKA), pompanın β_1 alt ünitesindeki glutatyonilasyonu azaltarak stimüle ettiği bildirilmiştir. Glutatyonilasyondan koruyucu etkinin NO üretimi aracılı olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak, β_3 -AR’lerin bu etkinliği, NOS aktivasyonu aracılı olarak etki göstermeleriyle örtüşmektedir. Kardiyak Na^+/K^+ pompa stimülasyonu intrasellüler Na^+ düzeylerinin azalmasına ve böylece Na^+/Ca^{2+} değiştokuşçusu aracılı olarak Ca^{2+}

atımının hızlanmasına ve sarkoplazmik retikulum (SR) alım için uygun diyastolik Ca^{2+} miktarlarının azalmasına yol açmaktadır (Bundgaard ve ark., 2010). Bu noktadan hareketle, Audigane ve arkadaşları tarafından söz edilen negatif inotropik etkiye, β_3 -AR agonistleri aracılı Na^+/K^+ pompa stimülasyonunun katkıda bulunabileceğini düşünmek mantıksaldır. Ne var ki, patoloji durumunda β_3 -AR'lerin NKA üzerindeki etkileri henüz bilinmemektedir. Bu noktadan yola çıkarak çalışmamızda sempatik sistem aktivasyonu sonucu gelişen hipertrofi modelinde β_3 -AR'lerin Na^+-K^+ pompası üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



III. Materyal ve Yöntem

Kardiyomiyosit İzolasyonu

Anestezi edilen ratların göğüs kafesleri açılarak kalpleri alınmış ve hızla aortalarından kanüle edilerek Langendorff sistemine asılmıştır. Kalpler sırasıyla şu solüsyonlarla perfüze edilmiştir: 1) kandan temizleninceye kadar (mmol/L) NaCl 143, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.5, HEPES-NaOH 5 ve glukoz 5.5, (pH=7.4) içeren Tyrode solüsyonu; 2) kalp atımı durana kadar Ca⁺⁺ free Tyrode solüsyonu; 3) enzimatik dissosiyasyon amacıyla, kalp saydam bir görüntü alana kadar 250 U/mL collagenase (Worthington, type II), 1 mg/ml BSA, 0.03 mg/ml proteaz içeren Ca⁺⁺ free Tyrode solüsyonu; 4) son olarak enzimin uzaklaştırılması amacıyla (mmol/L) KOH 70, Glutamik Asit 50, KCl 40, Taurine 20, KH₂PO₄ 20, MgCl₂ 3, EGTA KOH 0.5, HEPES 10 ve glukoz 10, (pH=7.35) Kraft-Brühe (KB) solüsyonu. Daha sonra ventriküller ayrılarak KB içinde mekanik olarak parçalanmıştır. 37°C'lik su banyosu içinde manyetik karıştırıcıyla düşük hızda çevrilerek 5 dakikada bir supernatant toplanmış ve naylon filtreden süzölmüştür. Toplanan supernatant 500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek non-kardiyomiyositler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet resuspense edilmiş ve giderek artan konsantrasyonlarda CaCl₂ ortama eklenerek hücrelerin Ca⁺⁺'a adaptasyonu sağlanmıştır.

Hücreler 3 gruba ayrılmıştır. İlk grup kontrol grubu olarak ayrılmış, ikinci grup 3 saat 10 µM noradrenalin (100 µM askorbik asit ile serum fizyolojik içinde hazırlanan) ile üçüncü grup ise 1 saat 100 nM BRL 37344 ve bunu takip eden 3 saat de BRL'ye ek olarak 10 µM noradrenalin ile 37°C'de inkübe edilmiştir.

Daha sonra protein ekspresyon ölçümünde kullanılmak üzere ratlar *in vivo* uzun süreli tedavi için 3 gruba ayrılmıştır. (i) İlk grup olan sham grubunda ratlara, tedavili gruplarla aynı cerrahi operasyon uygulanmış ancak pompa yerleştirilmemiştir. (ii) İkinci gruba hipertrofi modelinin gelişmesi amacıyla 14 gün süreyle 4 mg/kg/gün dozda noradrenalin tedavisi uygulanmıştır. (iii) Üçüncü gruba ise noradrenaline ek olarak BRL 37344, selektif β₃-AR agonisti (10 mg/kg/gün) uygulanmıştır. Tedaviler ratlara Alzet® marka (model no: 2002) osmotik mini pompa aracılığıyla uygulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, deney gününden 14 gün önce ketamin (60mg/kg)/ksilazin

(10mg/kg) (i.p.) kombinasyonu ile anestezi edilen ratların sırt bölgesine subkutan olarak pompalar yerleştirilmiştir.

Ozmotik minipompanın hazırlanması:

Öncelikle stok noradrenalin ve BRL 37344 çözeltileri hazırlanmıştır. Bu amaçla, 100 mg noradrenalin 300 µl; 5 mg BRL 37344 ise 1 ml serum fizyolojik içinde çözülmüş ve küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklanmıştır. Uygulama gününde stok çözeltilere 100 µM askorbik asit eklenerek, serum fizyolojik ile dilüe edilmiş ve özel enjektörü yardımıyla pompaya yerleştirilmiştir. Noradrenalin için 4 mg/kg/gün, BRL 37344 için ise 0.1 mg/kg/gün dozda tedavi uygulanmıştır.

Elektrofizyolojik Ölçümler

Patch Clamp

Na⁺/K⁺ pompa akımı (I_p); tüm hücre "patch klamp" tekniği ile ölçülmüştür. Hücreler öncelikle normal Tyrode solüsyonu ile perfüze edilmiştir (NaCl 140, KCl 4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, glukoz 10 ve HEPES NaOH 5 (mmol/L) (pH=7.4). Daha sonra Na⁺/K⁺ pompasını inhibe etmek amacıyla K⁺ içermeyen Tyrode solüsyonuna geçilmiştir (0 K⁺: NaCl 136, BaCl₂ 2, MgCl₂ 1, Glukoz 10, HEPES 5, NiCl₂ 5 ve TrisCl 4 (mmol/L) (pH=7.4)). 30 dakika sonra 4 mM K⁺ içeren Tyrode solüsyonuna geçilerek pompa aktive edilmiştir (4 K⁺: (mmol/L): NaCl 136, BaCl₂ 2, MgCl₂ 1, Glukoz 10, HEPES 5, NiCl₂ 5 ve KCl 4 (mmol/L) (pH=7.4)). 0 K⁺ ile 4 K⁺ öncesi ve sonrası akım farkı kaydedilmiştir. 4-5 MΩ genişliğindeki pipetler hücre içi patch pipet solüsyonu ile doldurulmuştur. Solüsyon içeriği (mmol/L) NaCl 10, KCl 20, K-Aspartat 100, TEACl 20, HEPES 10, Mg⁺⁺.ATP 5, MgCl₂ 0.7, EGTA 5 ve HEPES 5, (pH=7.4) şeklindedir. I_p, -30 mV sabit potansiyelde ölçülmüştür. Elde edilen akım değeri ölçüm yapılan hücrenin kapasitansına bölünerek değerlendirilmiştir. Axoclamp programı ile kayıtlar alınmıştır.

Hücre İçi Na⁺ Görüntüleme

Ratiometrik bir boya olan SBFI-AM (Sodium-binding benzofuran isophthalate-AM, Sigma) ile izole kardiyomiyositlerin hücre içi bazal sodyum düzeyleri ölçülmüştür. Hücreler 90-120 dakika süreyle oda sıcaklığında ve karanlıkta 5 µM SBFI-AM ile inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler 20 dakika Tyrode solüsyonuyla

yıkanmıştır. Tyrode solüsyonun içeriği şu şekildedir: 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glukoz, 5 mM HEPES (pH=7.4). SBFI, 340 ve 380 nm dalga boylarında uyarılmış, floresans 510 nm'de toplanmıştır. F₃₄₀/F₃₈₀ oranı background değerleri çıkarılarak hesaplanmıştır.

Tüm Kalp Dokusundan Protein İzolasyonu

Dondurulmuş sol ventriküller likit nitrojen ile toz edilip içinde RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer (1ml), Na₂VO₃ (sodyum ortovanadat, 200mM) ve PIC (protein inhibitör kokteyl, 100X) olan dibi konik tüpe alınmıştır. Ultrasonik homojenizatör ile homojenize edildikten sonra +4°C'de 2 saat boyunca çalkalanarak ajitasyon (agitation) sağlanmıştır. Sonrasında +4°C'de 1300g'de 5 dakika santrifüj edilerek selüler debris atılmıştır. Alınan supernatant kısmı +4°C'de 16.000g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmı alınarak küçük parçalara bölünerek -80°C'de saklanmıştır.

Bu numunelerin protein miktarları da yukarıda bahsedildiği gibi BCA yöntemi ile tayin edilmiştir. Protein konsantrasyonu hesabı yapılarak belli miktarda steril su ve laemmler eklenen numuneler 37°C'de 30 dakika bekletildikten sonra yüklemeye hazır olarak -20°C'de saklanmıştır.

Western Blot

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi:

İndüksiyonun kontrolü için 2 katmanlı denatüre poliakrilamid jel elektroforezinden yararlanmıştır. Mini protean 2 (BioRad) elektroforez sisteminde kullanılacak olan SDS-Page jeller aşağıdaki değerlere göre hazırlanmıştır.

1946

Ayırma (Seperation) jeli:

% 8 akrilamid jel hazırlanışı:

ddH ₂ O	10.20 ml
%30 akrilamid, %0.8 bis-akrilamid	6 ml
4X1.5M Tris-HCl	5.63 ml
pH:8.8/ %0.4 SDS	
Gliserol	560 µl
%10 luk amonyum persülfat	110 µl
TEMED	10 µl

1. Yukarıdaki tarifile hazırlanan %8'lik ayırma jeli hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki cam arasına, üstten 0.5cm boşluk kalacak şekilde doldurulduktan sonra üzeri hava ile temasını kesmek için, su ile kapatılmıştır. Yükleme jelinden önce bu su boşaltılmıştır.

Yükleme (Stacking) jeli:

%4 lük akrilamid jel hazırlanışı:

ddH ₂ O	5.895 ml
4X1.5M Tris-HCl	2.3475 ml
pH:6.8/ %0.4 SDS	
%30 akrilamid, %0.8 bis-akrilamid	1.03125
%10 luk amonyum persülfat	93.75 µl
TEMED	9.38 µl

2. Yukardaki şekilde hazırlanan %4'lük yükleme jeli (stacking jel) de cam levhaların üzerinde kalan boşluğa doldurulduktan sonra kuyuların oluşumunu sağlamak üzere tarak yerleştirilmiştir.
3. 1 saat süre ile jelin polimerizasyonunu tamamlaması beklenmiştir.
4. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartılarak, jelleri taşıyan parça elektroforez tamponu ile (1XTGS) doldurulduktan sonra numuneler kuyulara yüklenmiştir.
5. Sisteme önce 30 dakika 30 voltta, sonrasında 90 dakika 120 voltta elektroforez uygulanmıştır.

Membran Transferi:

Elektroforez sonunda transblotting aleti (BioRad) ile 100V'da proteinler jelden PVDF membrana 3.5 saatte transfer edilmiştir (1Xblotting tamponu ile ıslatılmış sünger-filtre kağıdı-jel-membran-filtre kağıdı-sünger). Transfer proteinlerin denatüre olmasını engellemek amacıyla transfer buz içinde gerçekleştirilmiştir.

Blotting Tamponu:

Tris	2.9 g
Glisin	14.5 g
ddH ₂ O	800 ml
Metanol	200 ml

Transfer işlemi bittikten sonra membran bloklama tamponu içinde 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bloklama tampon çözeltisi, %3 BSA PBS'de çözülüp steril olarak süzölmüş ve üzerine %0.05 Tween 20 eklenerek hazırlanmıştır. Sonrasında membranlar bloklama tamponu içerisinde dilüe edilen *primer* antikor ile +4°C 'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün membranlar oda ısısında 4 defa 15'er dakika PBS içindeki %0.05 tween 20 ile yıkanmıştır. Daha sonra membranlar bloklama tamponun içerisinde dilüe edilen *sekonder* antikor ile +4°C 'de 2 saat inkübe edilmiştir. Tekrar oda ısısında 4 defa 15'er dakika PBS içindeki %0.05 tween 20 ile yıkanan membranlara 2 dakika ECL çözeltisi uygulanarak karanlık odada X-Ray filmler üzerinde sinyaller belirlenmiştir.

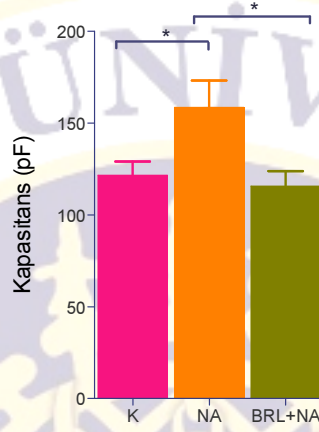
İstatiksel Analiz

Sonuçlar, belli sayıda (n) deney sonucundan elde edilen ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. İstatiksel analiz için GraphPad PRISM 5 (for Windows, Version 5.0) programı kullanılarak One-way ANOVA, post-hoc olarak da Bonferroni testi uygulanmıştır. İstatiksel anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

IV. Analiz ve Bulgular

Morfolojik Özellikler

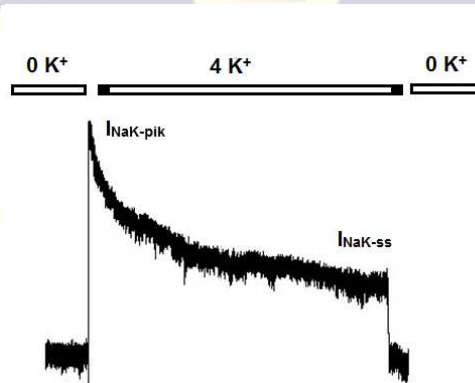
In vitro ölçümler için kısa süreli olarak inkübe edilen hücrelerin büyüklükleri ilk olarak kapasitans değerleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. (Kontrol: 121.6 ± 7.5 ; NA-tedavili: 158.6 ± 14.5 ; NA+BRL tedavili: 115.6 ± 8.2 (pF)).



Şekil 4.1. Hücrelerin kapasitans değerleri . *, $p < 0.05$

Na⁺/K⁺ ATPaz Akım Ölçümü

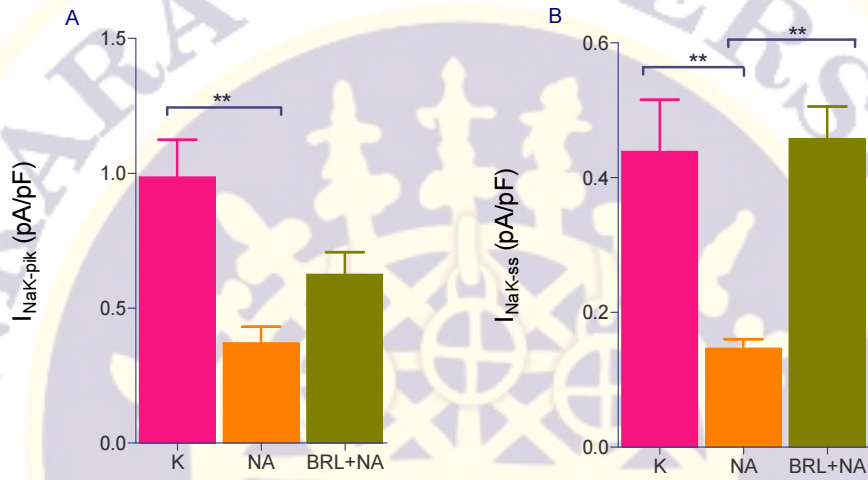
0 K⁺ perfüzyonu ile inhibe edilen Na⁺/K⁺ pompa akımı 4 K⁺ ile perfüzyona başlandığında tekrar aktive olmaktadır. Bu durum kontrol hücrelerde bifazik bir yanıtı açmaktadır. Pompa aktivasyonu önce hızlı bir dışı doğru akımla pik yapmakta ($I_{NaK-pik}$) ve devamında azalarak bir kararlı duruma (steady-state) ulaşmaktadır (I_{NaK-ss}) (Şekil 4.2).



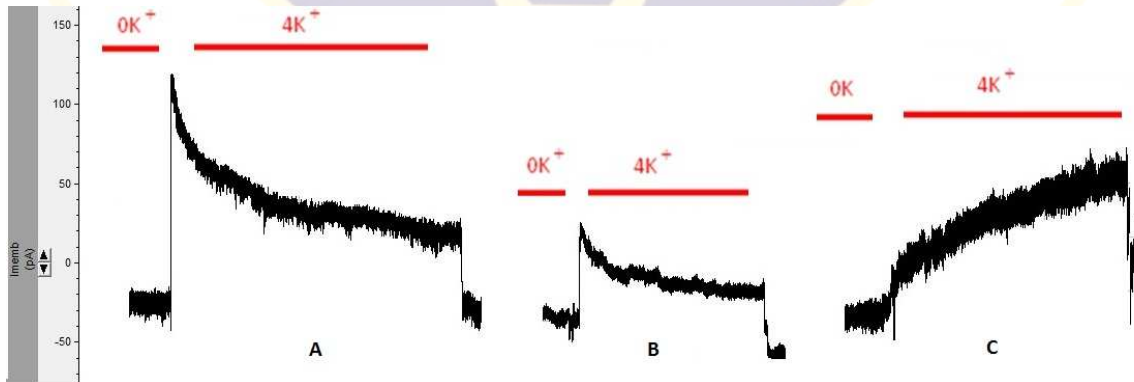
Şekil 4.2. Na⁺/K⁺ pompa akımının tekrar aktivasyonunu takiben membran akımında gözlenen yanıt.

Noradrenalinle 3 saat inkübe edilen kardiomyositlerde ise hem pik ($I_{NaK-pik}$) hem de

kararlı durum (I_{NaK-ss}) akımları azalmaktadır (Şekil 4.3). Diğer bir grup hücreye ise noradrenalinden 30 dakika önce β_3 -AR'leri selektif olarak uyarmak amacıyla BRL 37344 eklenmiştir. BRL 37344 kararlı durum akımlarını kontrol düzeylerine geri döndürmüştür (Şekil 4.3). İlginç olarak, bu hücrelerde 4 K^+ perfüzyonuna geçildiği anda gözlenen pik akımı tamamen kaybolmuştur. Pompa akımı yavaş olarak artmış ve kararlı duruma ulaşmıştır. Bu hücrelerin pik akım değeri olarak kararlı durumda ulaştığı pik akımı kabul edilmiştir. Bu akım profilinin kontrol ve noradrenalinle inkübe edilen kardiyomiyositlerden tamamen farklı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4).



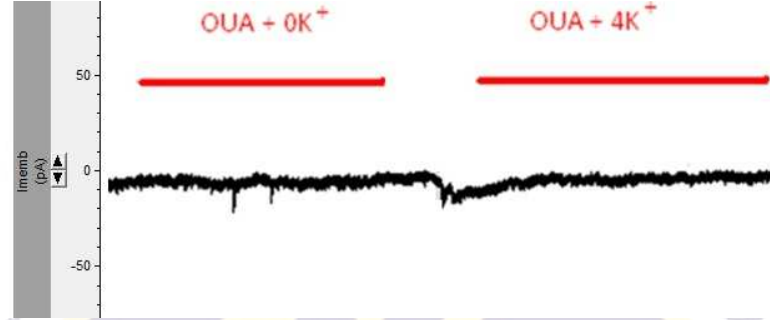
Şekil 4.3. Pik ($I_{NaK-pik}$ - A) ve kararlı durum (I_{NaK-ss} - B) akımları (pA/pF). (Ortalama \pm S.E. *, $p<0.05$ kontrol vs. noradrenalinle inkübe edilen kardiyomiyositler; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$.) n sayıları, K=9; NA=6; NA+BRL=6



Şekil 4.4. Kontrol (A), noradrenalinle inkübe edilen (B) ve BRL+noradrenalinle inkübe edilen (C) kardiyomiyositlerden kaydedilen örnek membran akım traseleri.

Gözlenen değişikliklerin Na^+/K^+ pompası aracılı olup olmadığının kontrolünü yapmak

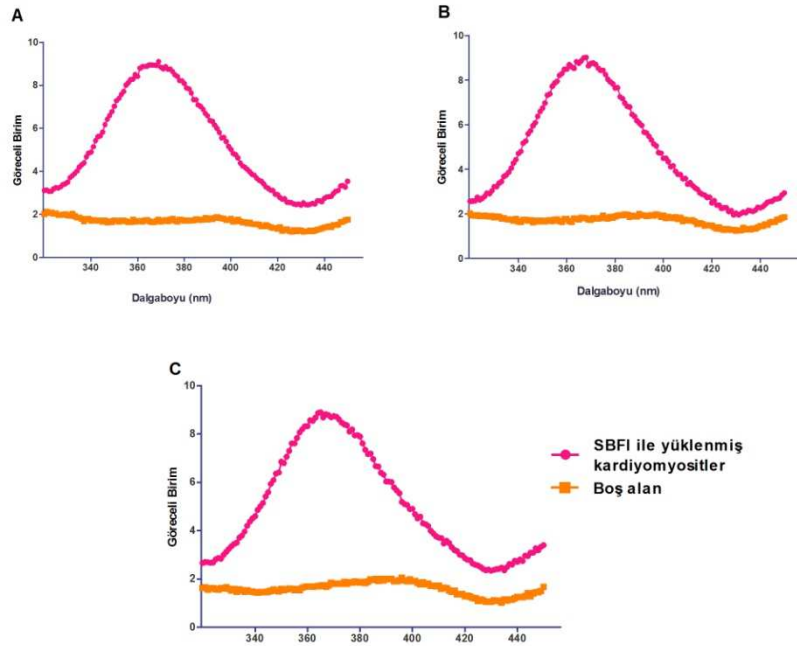
amacıyla aynı protokol pompayı inhibisyonunu sağlayan 20 μM ouabain varlığında da tekrarlanmıştır. Bu koşullar altında, ekstrasellüler K^+ konsantrasyonunun değişmesi pompa akımında herhangi bir farklılığa yol açmamaktadır (Şekil 4.5). Bu durum kaydedilen dışa doğru akımın tamamen Na^+/K^+ pompa aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 4.5. Ouabain varlığında kaydedilen membran akım trasesi örneği.

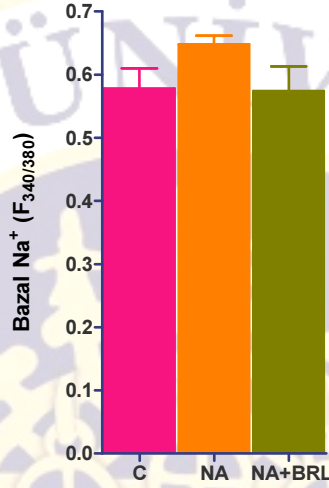
Hücre İçi Na^+ Konsantrasyon Ölçümü

Bazal $[\text{Na}^+]_i$ floresan şiddeti ölçümü öncesinde kardiyomiyositlerin boya ile yüklü olup olmadıkları kontrol edilmiştir. Bu amaçla öncelikle hücrenin daha sonra da boş bir alanın eksitasyon spektrumu ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda tüm gruplara ilişkin kardiyomiyositlerin yaklaşık 8 kat farkla yüklendikleri gözlenmiştir (Şekil 4.6).

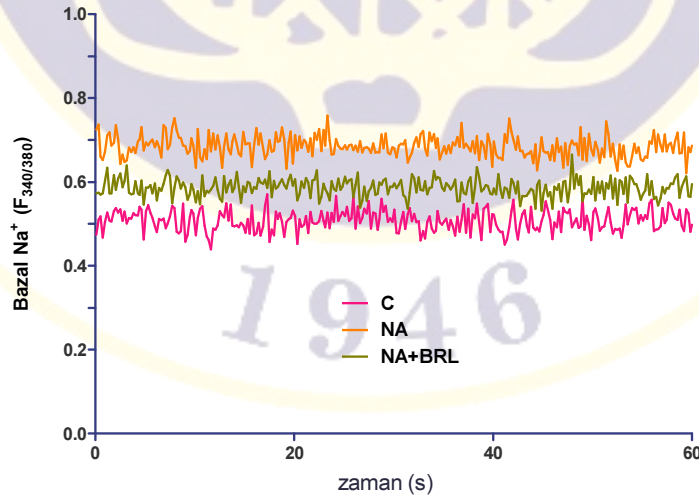


Şekil 4.6. Kardiyomiyositlerin SBF1 ile yüklenme durumunun gösterimi. (A) kontrol, (B) noradrenalin, (C) noradrenalin+BRL tedavili grup.

Daha sonra yüklenmiş kardiyomiyositlerde bazal $[Na^+]_i$ floresan şiddeti ölçülmüştür. Kontrol, noradrenalin ve noradrenalin+BRL 37344 tedavili hücrelerin bazal floresan şiddeti ortalama değerleri şekil 4.7’de gösterilmiştir. NA tedavili hücrelerde hafif bir artış olmasına karşın gruplar arası floresan şiddetleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.



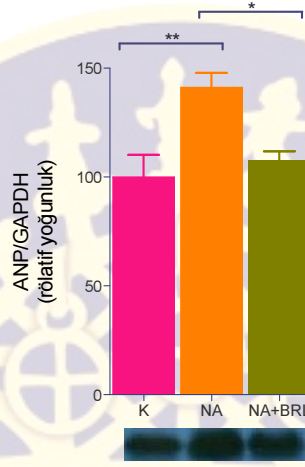
Şekil 4.7. Kardiyomiyositlerin bazal $[Na^+]_i$ floresan şiddeti ortalama değerlerinin gruplara göre dağılımı. Değerler ortalama \pm SEM olarak belirtilmiştir. n sayıları, K=4; NA=5, NA+BRL=6.



Şekil 4.8. Kardiyomiyositlerin bazal $[Na^+]_i$ floresan şiddeti örnek gösterimi.

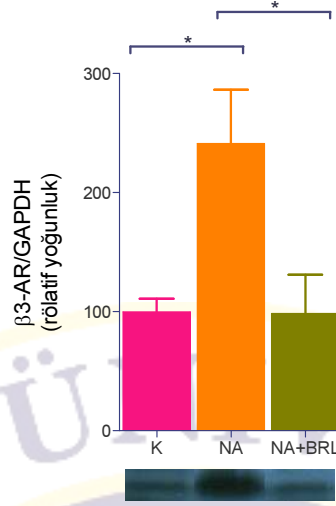
Protein Ekspresyonları

İlk olarak bütün kalp lizatlarından hipertrofi belirteci olan ANP protein ekspresyonları ölçülmüştür. Hipertrofik ratlarda ANP düzeyleri beklendiği gibi artmıştır. BRL tedavisi ise ANP ekspresyonlarını azaltmaktadır. (Kontrol: %100, NA-tedavili: %141; NA+BRL tedavili: %107).



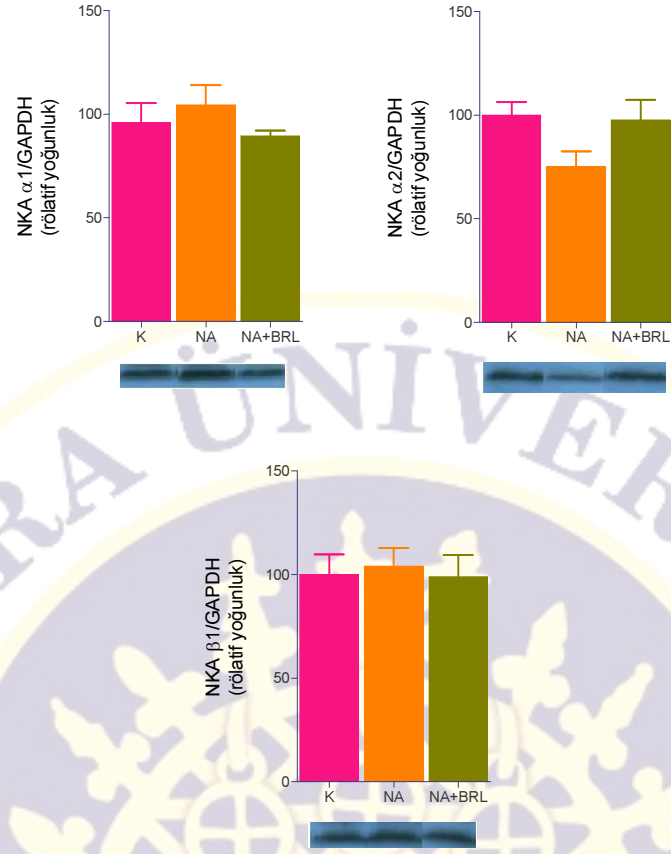
Şekil 4.9. ANP protein ekspresyonu. n sayıları, K=6; NA=5, Na+BRL=6. *, p<0.05, **, p<0.01 anlamlı farklılık.

Daha sonra hücre membran lizatlarında β_3 -AR ekspresyonları incelenmiştir. Aşırı sempatik aktivasyon beklendiği gibi β_3 -AR ekspresyonunu %140 oranında arttırdığı gözlenmiştir. Selektif β_3 -AR stimülasyonu ise bu oranı kontroler düzeyine geri döndürmüştür.



Şekil 4.10. β_3 -AR protein ekspresyonu. n sayıları, K=5; NA=6, Na+BRL=5. *, $p < 0.05$, anlamlı farklılık.

Çalışmamızda ayrıca tüm kalp homojenatlarında Na^+/K^+ pompa alt ünite ekspresyonları da incelenmiştir. İstaiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen hipertrofik rat kalplerinde $\alpha 1$ alt ünite ekspresyonunun artma, $\alpha 2$ alt ünite ekspresyonunun ise azalma trendinde olduğu gözlenmiştir. Bu değişiklikler, BRL tedavisiyle kontrol düzeylerine geri dönmektedir. $\beta 1$ alt ünite ekspresyonlarında ise gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.11. NKA alt ünite protein ekspresyonları. n sayıları, K=5; NA=6, Na+BRL=5. *, $p < 0.05$, anlamlı farklılık.

V. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda ratlardan izole edilen kardiyomiyositler *in vitro* olarak 3 saat süreyle 10 μM noradrenalin ile inkübe edilerek sempatik sinir sisteminin aktive edilmesi amaçlanmıştır. Daha önceki çalışmalarda, 2 saatlik noradrenalin inkübasyonunun β -AR desensitizasyonu ile artan α_1 -AR duyarlılığına yol açtığı gösterilmiştir (Chang ve ark., 1982). Bu nedenle, 3 saatlik inkübasyonun uygun olacağı düşünülmüştür. Oksidasyonu engellemek amacıyla noradrenalin dozları 100 μM askorbik asit ile hazırlanmıştır. Diğer bir grup hücrede ise noradrenalinden 1 saat önce ortama 100 nM BRL 37344 eklenerek β_3 -AR'ler uyarılmıştır.

Hücre büyüklüğünün bir göstergesi olan hücre kapasitans değerlerinin noradrenalinle inkübe edilen hücrelerde kontrollere göre anlamlı olarak arttığı, BRL varlığında ise geri döndüğü gözlenmiştir (Şekil 4.1). Bu bulgu, aşırı katekolamin varlığında hücrelerde hipertrofi geliştiğini, β_3 -AR stimülasyonunun ise bunu önlediğini düşündürmektedir.

Daha sonra hücrelerin NKA akımları ölçülmüştür. Bunun için önce hücreler K^+ içermeyen bir solüsyonla perfüze edilmiş böylece Na^+/K^+ pompası inhibe edilmiştir. Bir süre sonra 4mM K^+ içeren solüsyona geçilerek pompa aktive edilmiş ve ortaya çıkan akım değişikliği NKA akımı olarak kaydedilmiştir (Despa ve Bers, 2003). Bu koşullarda iki fazlı bir akım ortaya çıkmıştır: ilk olarak 4 K^+ a geçilir geçilmez gelişen bir pik akım ve sonrasında yavaşça azaldıktan sonra sabit bir değere ulaşan kararlı durum (steady state) akımı (Şekil 4.2). Noradrenalinle inkübe edilen hücrelerde her iki değer de azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.3). Bu bulgu, önceki çalışmalarla tutarlıdır. Gerçekten de aşırı katekolamin varlığında NKA'nın etkinliğinin azaldığını ve buna bağlı olarak Na^+ overloadu geliştiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Ellingsen ve ark., 1994; Jelicks ve Siri, 1995; Despa ve ark., 2002; Pogwizd ve ark., 2003).

Öte yandan ilginç olarak β_3 -ARler BRL ile uyarıldığında akım, pompa aktive edilir edilmez bir pik yapmak yerine yavaş yavaş artarak kararlı bir duruma ulaşmaktadır (Şekil 4.4). Akım süresi boyunca kaydedilen pik akım değerlerinde noradrenalinle inkübe edilen hücrelere göre bir değişiklik olmamasına karşın, kararlı durum akım değerlerinin BRL tedavisi ile kontrol değerlerine geri döndüğü gözlenmiştir.

Bu ilginç bulgu, β_3 -AR'lerin hücre içi Na^+ düzeyleri üzerinde nasıl bir etkisi olduğunu merak etmemize neden olmuştur. β_3 -AR aracılı olarak yavaşça arttıktan sonra kararlı

duruma ulaşan bu akım daha sonra intrasellüler Na^+ düzeylerini azaltabileceği gibi, β_3 -AR'lerin esas olarak hücre içi Na^+ düzeylerini arttırarak sekonder olarak Na^+/K^+ pompasını aktive etmesi de söz konusudur. Bundgaard ve arkadaşları (2010) Na^+ içermeyen süperfuzatlar kullanarak BRL ile indüklenen NKA aktivasyonunun değişmediğini göstererek β_3 -AR-aracılı Na^+ içe alım olasılığını elemişlerdir. Bu noktanın aydınlatılması amacıyla ayrıntılı hücre içi Na^+ konsantrasyonlarının ölçülmesi gerekmektedir. Ne yazık ki, çalışmamızda pompa inhibisyon/aktivasyon protokolü sırasında patch klamp ile eş zamanlı olarak görüntüleme deneyleri gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle yukarıdaki sorunun yanıtı elimizdeki bulgularla net olarak verilememiştir.

Çalışmamızda yalnızca bazal intrasellüler Na^+ düzeyleri ölçülmüştür (Şekil 4.7). Na^+ floresans değerleri, NA tedavili grupta artmış, BRL tedavisiyle ise azalmış görünmesine karşın gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Sözü edilen anlamsızlığın değişik nedenleri olabileceği de göz ardı edilmemelidir. Örneğin, sodyum görüntüleme deneylerinin her birinin sonunda farklı konsantrasyonlarda ekstrasellüler Na^+ kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi çizilmelidir. Böylece elde edilen Na^+ floresans değerlerinin karşılık geldiği bir intrasellüler Na^+ konsantrasyon değeri hesaplanmalıdır. Bu durumda 0.1 birimlik bir floresans farklılığı yaklaşık 10 mmol/L'lik bir konsantrasyon farklılığına denk gelebilmektedir (Despa ve ark., 2002). Ne var ki, elde edilen bulgular doğrultusunda sonradan planlanan kalibrasyon eğrisi çizim deneyleri bütçenin kullanılmış olması nedeniyle gerçekleştirilememiştir.

Öte yandan, $[\text{Na}^+]_i$ düzeylerindeki en ufak bir değişiklik pompa aktivitesinde çok daha büyük değişikliklere neden olmaktadır. Bu durum, pompanın algıladığı sodyum konsantrasyonunun sitozolik sodyumdan farklı olduğunu düşündürmektedir (Fuller ve ark., 2012). Gerçekten de, patch pipetiyle kontrol edilen sitozolik 'bulk' bölge ile 'bulanık bölge' (fuzzy space) diye adlandırılan sub-sarkolemmal bölge arasında bir Na^+ gradienti olduğundan söz edilmiştir (Bers ve ark., 2003). Kardiyak aksiyon potansiyeli sırasında Na^+ kanalları aracılı Na^+ akımı, subsarkolemmal bölgedeki $[\text{Na}^+]_{sm}$ konsantrasyonlarında, bulk $[\text{Na}^+]_i$ 'a göre 60 kat fazla bir artış oluşturmaktadır (Weber ve ark., 2003). Hücrelerin uyarılması sırasında $[\text{Na}^+]_{sm}$ 'nin 40 mM arttığı, bulk $[\text{Na}^+]_i$ 'de ise bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Bers ve ark., 2003). Pompa

aktivasyonu sırasında gözlenen pik akımın da bu konsantrasyon farkından kaynaklandığı öne sürülmüştür (Su ve ark., 1998). Pompa aktivasyonu sonrasında $[Na^+]_{sm}$ konsantrasyonları azalırken, bulk $[Na^+]_i$ konsantrasyonlarındaki değişimin ise ölçülemeyecek kadar küçük olduğu bildirilmiştir (Bers ve ark., 2003). Çalışmamızda Na^+ floresans değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemesinin bir nedeninin de bulk $[Na^+]_i$ 'un ölçümü olabileceği düşünülmektedir.

Gözlenen akımın gerçekten Na^+/K^+ ATPaz aracılı olup olmadığını anlamak için deneyler pompanın inhibitörü olan ouabain varlığında da yinelenmiştir. Ouabain varlığında gerçekten de $0 K^+ - 4 K^+$ protokolü akım değerlerinde herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. Bu bulgu, kaydedilen akımın Na^+/K^+ ATPaz aracılı olduğunu kanıtlamaktadır (Şekil 4.5).

Daha sonra, kısa süreli *in vitro* inkübasyonla gözlenen bulguların uzun süreli *in vivo* tedaviyle protein ekspresyonları üzerine etkilerinin incelenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, ratlara 14 gün süreyle 4 mg/kg/gün dozda noradrenalin uygulanarak hipertrofi modeli oluşturulmuştur. Çalışmamızda kontrol ve noradrenalin tedavili gruplara ek olarak üçüncü bir grubun tedavisine ise 10 mg/kg/gün dozda BRL 37344 eklenmiştir.

Patolojik hipertrofide fetal gen ekspresyonlarının arttığı bilinmektedir (Bernardo ve ark., 2010). Çalışmamızda da klasik bir patolojik hipertrofi belirteci olan ANP düzeylerinin noradrenalin tedavili ratlarda arttığı gözlenmiştir. Noradrenalinle indüklenen hipertrofi durumu BRL tedavisiyle geri dönmektedir (Şekil 4.9).

Öte yandan, normal fizyolojik koşullarda fonksiyonel olmamasına karşın, kronik katekolamin maruziyetinden sonra β_3 -AR etkinliğinin arttığı bildirilmiştir. Örneğin, neonatal kardiyomyositlerde 24 saat süreyle noradrenalin inkübasyonunun β_3 -AR mRNA ve protein ekspresyonlarını %156 ve %169 oranında arttırdığı gösterilmiştir (Germack ve Dickenson, 2006). Benzer şekilde çalışmamızda da hipertrofik rat kalplerinde β_3 -AR protein ekspresyonunun %141 oranında arttığı bulunmuştur. BRL tedavisi ise bu artışı tamamen geri döndürmektedir (Şekil 4.10).

Çalışmamızda birbirlerinden bağımsız olarak regüle oldukları ve farklı etkilere aracılık ettikleri bilinen Na^+/K^+ pompa alt ünite ekspresyonları da incelenmiştir (Şekil 4.11). NKA protein ekspresyonlarının plazma membranı yerine tüm kalp homojenatlarında

saptandıkları bildirilmiştir (Yin ve ark., 2014). Bu nedenle, çalışmamızda da tüm kalp homojenizasyonundan elde edilen lizatlar kullanılmıştır. Sitozoldeki 'bulk' $[Na^+]_i$ düzeylerini düzenledikleri bilinen α_1 alt ünitesinde anlamlı olmayan bir artış gözlenmiştir. α alt ünitesiyle birleşmeyi kolaylaştıran β_1 izoformlarının ekspresyon düzeylerinde ise bir değişiklik gözlenmemiştir. Öte yandan, α_2 alt ünite ekspresyonu ise hipertrofik ratlarda azalmaktadır. Ne var ki, bu azalma da istatistiksel olarak anlamlı değildir. α_2 alt ünite ekspresyonunda gözlenen azalma önceki çalışmalarla da tutarlıdır. Hipertrofik yetişkin rat kalbinde, α_1 ve β_1 alt ünitelerinde hiçbir değişiklik saptanmamasına karşın α_2 alt ünitesinin azaldığı gözlenmiş ve bu azalma miktarının hipertrofinin derecesiyle orantılı olduğu bildirilmiştir (Charlemagne ve ark., 1994). Öte yandan rat kardiyomiyositlerinde yapılan bir başka çalışmada noradrenalin ile uzun süreli α -AR aktivasyonunun, α_2 alt ünitesi mRNA ve protein düzeylerinde azalmaya; izoprenalinle β -AR aktivasyonunun ise α_1 alt ünitesi mRNA ve protein düzeylerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. α - ve β -AR aktivasyonu ile oluşan bu iki zıt etkinin kardiyak miyositlerin NKA fonksiyonu üzerinde bir denge sağlamaya yönelik olabileceği düşünülmektedir. α -AR aktivasyonunun PKC yolağı üzerinden yalnızca α_2 alt ünitesini hedef aldığı bildirilmiştir (Yin ve ark., 2014). Ayrıca, NKA α_2 alt ünitesindeki azalmanın, Ca^{2+} geçişindeki artışa bağlı olarak hiperkontraktil özellikler taşıdığı gösterilmiştir. Selektif α_2 inhibisyonu global $[Na^+]_i$ konsantrasyonunu değiştirmeksizin, NCX aracılı Ca^{2+} atımını yavaşlatarak kontraktiletiyi arttırmaktadır (Despa ve ark., 2012). Bu çalışmada total NKA ekspresyonları değiştirmeksizin inhibe olan α_2 alt ünitesini dengelemek üzere α_1 alt ünitesinin stimüle olduğu bildirilmiştir. Correll ve arkadaşlarına ait bir başka çalışmada ise α_2 overekspresyonunun pompa Na^+ affinitesini arttırdığı ve daha etkin bir Na^+ atılımı sayesinde antihipertrofik etki gösterdiği bildirilmiştir (2014). NCX ve NKA'nın birbirlerine yakın lokalize oldukları ve etkileşerek miyosit Na^+ ve Ca^{2+} konsantrasyonlarının düzenlenmesinde birlikte görev yaptıkları bilinmektedir. α_2 overekspresyonunun NKA aktive edici etkisi, NCX aktivasyonuna ve Ca^{++} atılımının da kolaylaştırılmasına yol açmaktadır. Çalışmamızda hipertrofik ratlarda gözlenen α_2 alt ünitesindeki azalmanın BRL tedavisiyle düzeldiği gözlenmiştir. β_3 -AR stimülasyonunun antihipertrofik etkinliğinin artan α_2 alt ünite etkisine de bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Kalp yetmezliği, gelişmiş ülkelerde görülen en önemli kardiyovasküler hastalıktır. Günümüzde yalnızca ABD'de her yıl 300.000 ölüme neden olan kalp yetmezliği sıklığı

her geçen gün artmaktadır. Öte yandan kalbin artan işyüküne yanıt olarak gelişen ancak zamanla kalp yetmezliği ve malign ritm bozukluklarına neden olan hipertrofi tablosunun yetmezlik gelişimi için en önemli risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Berenji ve ark., 2005). Kalbin yapısal, metabolik ve fonksiyonel 'remodeling'ine neden olan patolojik hipertrofinin önlenmesi kalp yetmezliği gelişimi ve ani ölüm riskinin engellemesi açısından önemlidir. Bu nedenle, β_3 -AR aktivasyonu aracılı olarak hipertrofinin önlenmesi kalp yetmezliği gelişiminin yavaşlatılması yönünden önem taşımaktadır.

Çalışmamızda β_3 -AR-aracılı NKA stimülasyonunun hipertrofide arttığı gözlenmiştir. Ne var ki, β_3 -AR'lerin koruyucu etki mekanizmalarının tam olarak anlaşılabilmesi amacıyla hücre içi Na^+ ve Ca^{2+} düzenlenmesindeki rolünün ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Öte yandan, hipertrofi ve kalp yetmezliğinde gözlenen $[\text{Na}^+]_i$ artışı için iki olası açıklama bulunmaktadır: hücre içine artan Na^+ girişi ya da hücre dışına azalan Na^+ atımı. Son yıllarda, kalp yetmezliği patolojisinde geç Na^+ kanallarının rolü üzerinde durulmaktadır. Çalışmamızda, tek hücre dışına atım mekanizması olan Na^+/K^+ pompasıyla β_3 -AR'lerin etkileşimi incelenmiştir. Ne var ki, β_3 -AR'lerin hücre içine Na^+ alımında rol oynayan mekanizmaların, özellikle de geç Na^+ kanalları üzerindeki etkilerinin de araştırılması bu reseptör alttipinin terapötik potansiyelinin anlaşılabilmesi açısından yararlı olacaktır.

VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Kalp yetmezliğinde eskiden kontraindike olan β -blokerlerin artık klinikte kullanılmaya başlanmasının temel mantığı sempatik sinir sistemi etkinliğinin aşırı arttığı durumlarda kardiyomyositlerin korunmasıdır. Sempatik sinir sistemi etkinliğindeki aşırı artışın myokarda progresif bir hasara neden olduğu ve bunun β -blokerle önlenmesinin bazı kalp yetmezliği tiplerinde yararlı olduğu gösterilmiştir. β_3 -AR'lerin de aslında β -blokerlerle sağlanmaya çalışılan bu etkiyi oluşturmak için kalpte yerleştiklerini düşünmek olanaklıdır. β_3 -AR'ler, β_1/β_2 -ARler için gerekenden çok daha yüksek katekolamin konsantrasyonlarında uyarılabilmekte ve negatif inotropik etkiye aracılık etmektedirler. Buna ek olarak, downregulasyona dirençlidirler ve kardiyak patolojilerde upregüle olurlar. Bu özelliklerine dayanarak bu reseptör alttipinin, yukarıda da belirtildiği gibi sempatik sinir sistemi etkinliğinin aşırı arttığı durumlarda kardiyomyositlerin korunması amacıyla devreye sokulan bir koruyucu mekanizma olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda üçüncü kuşak olarak adlandırılan vazodilatör etkili β -blokerler de hipertansiyon tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu ilaçların karakteristiği β_1 -(nebivolol) ve β_1/β_2 -(busindolol) AR'leri bloke etmeleri ve β_3 -AR'leri ise uyarıdır. Bir başka anlatımla, vazodilatör özellikleri β_3 -AR stimülasyonundan kaynaklanmaktadır. Benzer bir yaklaşımla, kardiyak β_3 -AR uyarısının myokarda NO salıverilmesine yol açarak kalbin oksijen tüketimini azaltacağı ve kalp yetmezliğinin erken aşamalarında yararlı olabileceği öne sürülmüştür (Rozec ve ark., 2006). Öte yandan, kardiyak β_3 -AR stimülasyonunun negatif inotropik etkiye de yol açması, bu bileşiklerin kalp yetmezliğinde tam tersine olumsuz sonuçlar doğuracağı yaklaşımına da yol açmaktadır. Ne var ki, negatif inotropiye neden olan β -blokerler uzun bir süredir kalp yetmezliği tedavisinde kullanılmaktadırlar. Bu noktadan yola çıkıldığında, paradoksal görünmesine karşın β_3 -AR agonistlerinin de yakın bir gelecekte kalp yetmezliği tedavisinde kullanılabileceğini düşünmek mantıksal görünmektedir. Gerçekten de, β_1/β_2 -AR blokerleriyle kombine kullanılarak β_3 -AR'lerin hedef dokudaki düşük ekspresyon düzeyleri, biyoyararlanım ve seçicilik sorunlarının oluşturabileceği sakıncaların üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır. Ancak insan çalışmalarıyla daha sağlam bilgiler elde edilebileceği göz önünde bulundurularak son yıllarda klinik çalışmalara ağırlıklı olarak yoğunlaşmaktadır.

VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

IX. Kaynaklar

- AUDIGANE, L., KERFANT, BG., EL HARCHI, A., LORENZEN-SCHMIDT, I., TOUMANIANTZ, G., CANTEREAU, A., POTREAU, D., CHARPENTIER, F., NOIREAUD, J., GAUTHIER, C. (2009). Rabbit, a relevant model for the study of cardiac beta3-adrenoceptors. *Exp Physiol*. **94**: 400–411.
- BERENJI, K., DRAZNER, MH., ROTHERMEL, BA., HILL, JA. (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **289**(1):H8–H16.
- BERNARDO, BC., WEEKS, KL., PRETORIUS, L., MCMULLEN, JR. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies *Pharmacology & Therapeutics*, **128**:191–227.
- BERS DM, BARRY WH, DESPA S. (2003). Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. **57**(4):897-912.
- BUNDGAARD, H., LIU, CC., GARCIA, A., HAMILTON, EJ., HUANG, Y., CHIA, KK., HUNYOR, SN., FIGTREE, GA., RASMUSSEN, HH. (2010). $\beta(3)$ adrenergic stimulation of the cardiac Na⁺-K⁺ pump by reversal of an inhibitory oxidative modification. *Circulation*. **21**;122(25):2699-708.
- BUNDGAARD, H., LIU, CC., GARCIA, A., HAMILTON, EJ., HUANG, Y., CHIA, KK., HUNYOR, SN., FIGTREE, GA., RASMUSSEN, HH. (2010). $\beta(3)$ adrenergic stimulation of the cardiac Na⁺-K⁺ pump by reversal of an inhibitory oxidative modification. *Circulation*. **21**;122(25):2699-708.
- CHANG, HY., KLEIN, RM., KUNOS, G. (1982). Selective desensitization of cardiac beta adrenoceptors by prolonged in vivo infusion of catecholamines in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. **221**(3):784-9.
- CHARLEMAGNE, D., ORLOWSKI, J., OLIVIERO, P., RANNOU, F., SAINTE BEUVE, C., SWYNGHEDAUW, B., LANE, LK. (1994). Alteration of Na,K-ATPase subunit mRNA and protein levels in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem*. **269**(2):1541-7.
- CORRELL, RN., EDER, P., BURR, AR., DESPA, S., DAVIS, J., BERS, DM., MOLKENTIN, JD. (2014). Overexpression of the Na⁺/K⁺ ATPase $\alpha 2$ But Not $\alpha 1$ Isoform Attenuates Pathological Cardiac Hypertrophy and Remodeling. *Circ Res*. **114**:249-256.
- DESPA, S., ISLAM, MA., WEBER, CR., POGWIZD, SM., BERS, DM. (2002). Intracellular Na⁺ Concentration Is Elevated in Heart *Circulation*, **105**:2543-2548.
- DESPA, S., BERS, DM. (2003). Na/K Pump Current and [Na]_i in Rabbit Ventricular Myocytes: Local [Na]_i Depletion and Na Buffering. *Biophysical Journal*, **84**:4157–4166.
- DESPA, S., LINGREL, JB., BERS, DM. (2012) Na/K-ATPase alpha2-isoform preferentially modulates Ca transients and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. **95**:480–486.
- ELLINGSEN, O., HOLTHE, MR., SVINDLAND, A., AKSNES, G., SEJERSTED, OM., ILEBEKK, A. (1994). Na,K-pump concentration in hypertrophied human hearts. *Eur Heart J*. **15**(9):1184-90.
- FULLER, W., TULLOCH, LB., SHATTOCK, MJ., CALAGHAN, SC., HOWIE, J., WYPIJEWSKI, KJ. (2012). Regulation of the cardiac sodium pump. *Cell Mol Life*

- Sci.* **70(8)**:1357-80.
- GAUTHIER, C., LEBLAIS, V., KOBZIK, L., TROCHU, J.N., KHANDOUDI, N., BRIL, A., (1998). The negative inotropic effects of beta 3 adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.*, **102(7)**:1377-1384.
- GAUTHIER, C., SEZE-GOISMIER, C., ROZEC, B., (2007). Beta 3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Clinical Hemorheology and microcirculation*, **37**:193-204
- GAUTHIER, C., TAVERNIER, G., CHARPENTIER, F., LANGIN, D., LE MAREC, H., (1996). Functional beta 3 adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest.*, **98(2)**:556-562.
- GERMACK, R., DICKENSON, J.M. (2006). Induction of β_3 -adrenergic receptor functional expression following chronic stimulation with noradrenaline in neonatal rat cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther.*, 316(1):392–402.
- GERMACK, R., DICKENSON, J.M. (2006). Induction of β_3 -adrenergic receptor functional expression following chronic stimulation with noradrenaline in neonatal rat cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther.*, 316(1):392–402.
- GUPTA, S., DAS, B., SEN, S. (2007). Cardiac Hypertrophy: Mechanisms and Therapeutic Opportunities Antioxidants & Redox Signaling, **9(6)**:623-652.
- HUNTER, J.J., CHIEN, K.R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med.* **341(17)**:1276–1283.
- JELICKS, L.A., SIRI, F.M. (1995). Effects of hypertrophy and heart failure on $[Na^+]_i$ in pressure-overloaded guinea pig heart. *Am J Hypertens.* **8(9)**:934-43.
- KONG, Y.H., LI, W.M., TIAN, Y. (2004). Effect of beta3-adrenoreceptors agonist on beta3-adrenoreceptors expression and myocyte apoptosis in a rat model of heart failure. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 16(3):142–147.
- MONIOTTE, S., BALLIGAND, J.L., (2002). Potential use of β_3 -adrenoceptor antagonists in heart failure therapy. *Cardiovascular Drug Reviews*, 20:19-26.
- POGWIZD, S.M., SIPIDO, K.R., VERDONCK, F., BERS, D.M. (2003) Intracellular Na in animal models of hypertrophy and heart failure: contractile function and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* **57(4)**:887-96
- ROZEC, B., ERFANIAN, M., LAURENT K., TROCHU JN., GAUTHIER C., (2009). Nebivolol, a Vasodilating Selective β_1 -Blocker, Is a β_3 -Adrenoceptor Agonist in the Nonfailing Transplanted Human Heart. *Journal of the American College of Cardiology*, **53**:1532-8.
- ROZEC, B., GAUTHIER, C., (2006). Beta 3 adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacology and therapeutics*, **111(3)**:652-73.
- ROZEC, B., GAUTHIER, C., (2006). Beta 3 adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacology and therapeutics*, **111(3)**:652-73.
- SKEBERDIS VA, GENDVILIENE V, ZABLOCKAITE D, TREINYS R, MACIANSKIENE R, BOGDELIS A, JUREVICIUS J, FISCHMEISTER R. (2008). Beta3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca^{2+} current. *J Clin Invest.* **118**:3219–27.
- SU, Z., ZOU, A., NONAKA, A., ZUBAIR, I., SANGUINETTI, M.C., BARRY, W.H. (1998). Influence of prior Na^+ pump activity on pump and Na^+/Ca^{2+} exchange currents in mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 275(5 Pt 2):H1808-17.
- WEBER, C.R., GINSBURG, K.S., BERS, D.M. (2003). Cardiac submembrane $[Na^+]$ transients sensed by Na^+-Ca^{2+} exchange current. *Circ Res.* May 92(9):950-2.
- YIN, J., GUO, H.C., YU, D., WANG, H.C., LI, J.X., WANG, Y.L. (2014). Mechanisms of isoform-specific Na/K pump regulation by short- and long-term adrenergic activation in rat ventricular myocytes. *Cell Physiol Biochem.* **33(6)**:1681-97.

X. Ekler

a. Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje kapsamında;

Taze kardiyomiyosit izolasyonu ve hücrelerin inkübasyonu için kullanılmak üzere:

- 1 NaOH
- 2 Noradrenaline
- 3 Ouabain
- 4 NaCl
- 5 KCl
- 6 MgCl₂
- 7 NaH₂PO₄
- 8 Hepes
- 9 KOH
- 10 Glutamic Acid
- 11 KCl
- 12 Taurine
- 13 KH₂PO₄
- 14 protease
- 15 BaCl₂
- 16 NiCl₂
- 17 K-aspartate
- 18 TEA-Cl
- 19 Mg.ATP
- 20 SR59230A
- 21 L-NAME
- 22 BSA
- 23 Collagenase typ 2

Na⁺ görüntüleme deneylerinde kullanılmak üzere:

- 24 SBFI-AM

Western blot deneylerinde kullanılmak üzere:

- 25 Proteaz inhibitor kokteyli
- 26 BCA protein assay kit
- 27 ECL Western Blotting Substrate
- 28 Stripping Buffer
- 29 PVDF membrane
- 30 Tris
- 31 Glycine
- 32 10XTris/Glycine/SDS
- 33 10XTris Buffered saline
- 34 Trizma base
- 35 Primer Antibody (ANP, NKA α 1, NKA α 2, NKA β 1)
- 36 Sekonder Antibody (anti-rabbit, anti-chicken)

malzemelerinin alımı yapılmıştır.

b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Projemiz kapsamında makine ve teçhizat alımı yapılmamıştır.

c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

- **Gizem Kayki-Mutlu**, Marcella Rocchetti, V. Melih Altan, Antonio Zaza, “The effect of β_3 -adrenoceptors on Na^+/K^+ -pump modulation in noradrenaline-incubated cardiomyocytes”, EHRA EUROPACE-CARDIOSTIM 2015, Haz 21-24 2015, Milan-İtalya.

e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

- Gizem Kayki Mutlu- Doktora Tezi- Haziran 2015

