ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

KALICI ATRİYAL FİBRİLASYONLU VE SİNÜS RİTİMLİ HASTALARDA APOPTOZİS İLİŞKİLİ GENLERİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZLERİ

Günseli Çubukçuoğlu Deniz

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Ahmet Rüçhan Akar

Aralık

2013

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Günseli Çubukçuoğlu Deniz

Prof. Dr. Ahmet Rüçhan Akar danışmanlığında, Günseli Çubukçuoğlu Deniz tarafından hazırlanan bu çalışma 25 / 12 / 2013 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : …….. İmza:

Üye :…… İmza:

Üye :…… İmza:

Üye :…… İmza:

Üye :…… İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut Özkul

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Kalıcı Atriyal Fibrilasyonlu ve Sinüs Ritimli Hastalarda Apoptozis İlişkili Genlerin Karşılaştırmalı Analizleri

Günseli Çubukçuoğlu Deniz
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü
Danışman: Prof. Dr. Ahmet Rüçhan Akar

Atriyal fibrilasyon (AF), klinikte en sık karşılaşılan kalp ritim bozukluğudur ve kalp kapak hastalıklarıyla birlikte gözlenebilir. Mitral kapak yetmezliği (MY) erişkinde ikinci sıklıkta görülen kalp kapak hastalığıdır. Ciddi mitral yetmezliği olan hastaların yaklaşık %70'inde patogenezden bağımsız olarak AF eşlik etmektedir. Yakın geçmişte medikal ve cerrahi yöntemlerde sağlanan aşamalara rağmen özellikle kalıcı AF'lu olgularda klinik sonuçlar tatmin edici düzeyde değildir. AF ile mücadelede yeni tedavi yaklaşımlarının bulunabilmesi hücresel ve moleküler mekanizmaların öğrenilmesi ile mümkün olacaktır. AF'lu hastalarda sinüs ritminin geri dönmesi ve idamesi mortalite, morbitide ve sağlık bakım giderlerini azaltılmasına büyük katkıda bulunacaktır.

Bugüne dek AF'un global moleküler analizine dair farklı çalışmalar yapılmıştır. Ancak bu çalışmalardaki en büyük sorun, heterojen gruplarla yapılan, kompleks hastalıkların araştırıldığı yüksek işlem hacimli çalışmalarda karşılaşılan gürültünün, sonuçlar üzerine gölgeleyici etkisinin olmasıdır. Heterojen bir patoloji olan AF'u, mikrodizin gibi yüksek işlem hacimli bir yöntemle araştırırken etiyoloji ve kontrol grubu açısından homojen örneklerin seçilmesi gerekmektedir. Bu nedenle AF'un moleküler patofizyolojisinin araştırıldığı bu tez çalışmasında hasta ve kontrol grupları son derece homojen tutulmaya çalışılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında dejeneratif mitral yetmezliği olan 15 kalıcı AF ve 15 sinüs ritimli hastadan operasyon sırasında örneklenen sağ ve sol atriyum dokularında (n=60) transkriptom boyu (54675 transkript) karşılaştırma yapılmıştır. Buradan sağlanan veriyle gerçekleştirilen biyoinformatik analizlerle gruplar arasında farklı ifade edilen gen setleri belirlenmiştir. AF grubunda 213 genin ifadesinin istatistiki olarak anlamlı düzeyde değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bu genler içinde CACNA1G, CSRP3, GNAO1, KCNJ18, CHL1, COL21A1, COL28A1, COLQ, FGF1, SLC1A3, VIT, ANGPTL2, BMP7, NPPB, TNNI1, CACNB2, GJC1, KCNK3, ATP1B4, SNX22, PRKAR1A, DNAJA4, BNIP3, FASTKD1, DAPK2, GADD45, BCL6, KLF10, NTRK2, AKAP3, AKAP6, ADAM11 gen ifadelerindeki değişim özellikle dikkat çekicidir. Farklı ifade olan genlerin fonksiyonel anotasyonları ve yolak analizleri ile kalıcı AF'la paralel olarak değişen yolaklar tespit edilmiş ve bu yolaklardaki değişikliğe sebep olan tetik genler irdelenmiştir. Bu çalışmayla kalıcı AF'na moleküler düzeyde transkriptom ebadında bakış sağlanmıştır. Ayrıca AF sürecine apoptozis mekanizmasının karıştığı bilindiğinden, fibrile atriyal miyokardda apoptozis incelemesi gerçekleştirilmiştir. Aynı hastalardan alınan doku kesitlerinde apoptozis immünohistokimyasal değerlendirilmiş, morfolojik inceleme amacıyla geçirmeli elektron mikroskobik araştırma gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmalarda hücre ölümüne işaret eden morfolojik farklılaşmalarda apoptozisle birlikte otofajinin de rolü dikkat çekmiştir.

Gerçekleştirilen araştırmaların tümü birlikte değerlendirildiğinde AF patogenezinde sorumlu olan yeni moleküler yolaklar tanımlanmıştır. Bu tez kapsamında elde edilen veriler, AF'un moleküler mekanizmalarının araştırıldığı ileriki çalışmalara temel oluşturacaktır.

2013, 131 sayfa
Anahtar kelimeler: Atriyal fibrilasyon, Dejeneratif mitral yetmezliği, Transkriptom analizi.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Comparative Gene Expression Profile Analysis of Apoptosis Related Genes Between Patients with Permanent Atrial Fibrillation and Normal Sinus Rhythm

Günseli Çubukçuoğlu Deniz
Ankara University Biotechnology Institute
Supervisor: Prof. Dr. A. Rüçhan Akar

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia seen in clinical practice and can be associated with valvular heart disease. Mitral valve regurgitation (MR) is the second most common valvular heart disease encountered in adults. Overall, 70% of the patients with severe MR are associated with AF independent from pathogenesis. Despite the recent advances in medical and surgical therapeutic strategies particularly in permanent AF patients, successful results still could not be obtained. Understanding the cellular and molecular mechanisms of AF is essential for the development of new-targeted therapeutic interventions. Recovery and maintenance of sinus rhythm would reduce mortality, morbidity, and health care expenditure costs.

To date, there has accumulated a variety of studies dissecting the molecular mechanisms of AF. The main issue, which overshadows these studies, is the noise that arises in high-throughput analyses, that is a consequence of utilizing heterogeneous groups in investigating complex diseases. While investigating AF -a heterogeneous pathology- by way of a high-throughput method such as microarray, etiology of the subject group and the homogenous selection of the control group is of utmost importance. In light of these important focus points, subject and control groups were selected meticulously to ensure a high level of homogeneity for the present thesis study.

The aim of this dissertation was to compare left and right atrial gene expression profiles in patients with degenerative MR and permanent atrial fibrillation (n=15) with degenerative MR and sinus rhythm (n=15). In brief, sixty human atrial samples were analyzed transcriptome wide by microarray analysis representing 54.675 transcripts. Through the span of the study, advanced bioinformatic analyses were performed on the gene expression data in order to spot the genes that have differential expression levels. Functional annotations and pathway analysis of differentially expressed gene sets were performed. 213 genes were differentially expressed between AF and sinus rhythm patients. Most remarkable genes were CACNA1G, CSRP3, GNAO1, KCNJ18, CHL1, COL21A1, COL28A1, COLQ, FGF1, SLC1A3, VIT, ANGPTL2, BMP7, NPPB, TNNI1, CACNB2, GJC1, KCNK3, ATP1B4, SNX22, PRKAR1A, DNAJA4, BNIP3, FASTKD1, DAPK2, GADD45, BCL6, KLF10, NTRK2, AKAP3, AKAP6, ADAM11. Target genes in the pathways involved in AF process were discussed. Apoptosis was also evaluated in fibrillating atrial myocardium and compared to controls. Immunohistochemistry of the protein families that function in the apoptotic pathways and morphological analysis of electron microscopy investigation were performed. Electron microscopic evaluations revealed morphological differentiations in the AF group, an indication of the existence of programmed cell death, which proves that there is an inclination towards apoptotic, processes as well as autophagy.

The evaluation of the overall outcomes of this study presents new molecular pathways that might be responsible for the pathogenesis of atrial fibrillation. Data acquired from the present finalized study is going to constitute a new ground for the following studies.

2013, 131 pages
Keywords: Atrial fibrillation, Degenerative mitral regurgitation, Transcriptome analysis.

ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR

Biricik kardeşim Murat Faik Çubukçuoğlu'na ithafen;

Bu tez çalışmasında dejeneratif mitral kapak yetmezliğine eşlik eden atriyal fibrilasyonun etiyopatogenezinde etkili olan moleküler mekanizmalar üzerine yoğunlaşılmıştır. Atriyal fibrilasyon; klinikte en sık karşılaşılan, yaşam kalitesini düşüren kalp ritim bozukluğudur. Bu ritim bozukluğuna neden olan hücresel ve moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılabilirse tedavide kullanılabilecek daha etkin hedef gen/protein/moleküller belirlenebilecektir.

Doktora tez çalışmam süresince bana destek olan Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ve Kalp-Damar Cerrahisi ABD çalışanlarına teşekkür ederim.

Öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum, yüksek lisansa başlarken elimden tutan, bugün ailem olan ağabeyim Prof. Dr. Ahmet Rüçhan Akar'a saygı ve sevgiyle teşekkür ederim. Sevgili dostum, ortağım, canım Doç. Dr. Serkan Durdu'ya hayatıma umut ve mutluluk getirdiği için teşekkür ederim. Kıymetli kardeşim Dr. Aynur Karadağ'a her zaman yanımda olduğu için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmama başladığım günden bu yana sıklıkla gözyaşlarımla omuzlarını ıslattığım sevgili hocalarım ve ablalarım Prof. Dr. Hilal Özdağ'a ve Dr. Yeşim Doğan Alakoç'a her zaman destek oldukları için çok teşekkür ederim. Sevgili arkadaşım ve BTEML Lab. Koordinatörü Devrim Aydın'a her sorunu hızlıca çözerek tüm işleri kolaylaştırdığı ve her konuda yardımcı olduğu için çok teşekkür ederim. Yıllardır dirsek dirseğe çalıştığım ve bundan büyük mutluluk duyduğum Genombilim ekibinden Dr. Nilgün Tekin, Zeynep Özkeserli, Hülya Sümer Çelebi, Dr. Nevin Belder, Semih Dalkılıç, Seda Yılmaz, Özge Cumaoğulları, Alp Aydos, Funda Demirsoy, Ali Emre Akpınar, Reza Dastouri, Mehmet Korkmaz'a çok teşekkür ederim.

Doktoram sırasında geçirdiğim zor zamanları atlatmamı sağlayan çok değerli hocam Prof. Dr. Günhan Gürman, Doç. Dr. Pervin Topçuoğlu, Prof. Dr. Çiğdem Evren Denker, Dr.

Sinem Civriz Bozdağ, Dr. Hilmi Yeşil, Hem. Rahime Mine Şen ve Hematoloji ABD çalışanlarına çok teşekkür ederim. Sayenizde bu tezi yazabiliyorum.

Sorularıma yılmadan cevap veren, bilimsel ve sosyal olarak her zaman desteğini gördüğüm Prof. Dr. Mustafa Kılıçkap, Prof. Dr. Mustafa Şırlak, Prof. Dr. Ömer Akyürek, Prof. Dr. Nalan Akyürek, Dr. Arzu Atalay, Dr. Bianca Brundel'e çok teşekkür ederim.

Doktora tezimin gelişme süresinceki emekleri ve bilimsel katkıları için Prof. Dr. Alp Can, Prof. Dr. Hakan Gürdal ve Prof. Dr. Esra Erdemli'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmamın ekonomik ve bilimsel destekleyicisi TUBİTAK'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında sevgi, destek ve ilgileriyle bana güven veren ve kendimi çok şanslı hissetmemi sağlayan canım annem Afife Çubukçuoğlu, canım babam Rauf Çubukçuoğlu, canım kardeşim Murat Faik Çubukçuoğlu, canım kocam Emre Deniz ve Deniz ailesi bu tezi de yazarken sabırla ve memnuniyetle hep yanımda durdunuz. İyi ki varsınız.

Son olarak Atatürk'ü hepimize sağladığı özgürlüklerden dolayı saygıyla anıyorum.

Ey büyük Atatürk, açtığın yolda gösterdiğin hedefe hiç durmadan yürüyeceğime ant içerim.

Günseli Çubukçuoğlu Deniz

Ankara, Aralık 2013

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ..... **i**

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iv**

ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR ..... **v**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xii**

SİMGELER DİZİNİ ..... **xiii**

2. KURAMSAL TEMELLER **6**

2.1. KALBİN ANATOMİ VE ELEKTROFİZYOLOJİSİ **6**

2.1.1. Kalbin Normal Çalışması 6

2.1.2. Kalbin İleti Sistemi 8

2.1.4. Kardiyak Aksiyon Potansiyelleri 11

2.2. ATRİYAL FİBRİLASYON **14**

2.2.1. Atriyal Fibrilasyona Tarihsel Bakış 15

2.2.2. Atriyal Fibrilasyonun Klinik Sınıflanması 17

2.2.3. Atriyal Fibrilasyona Tedavi Yaklaşımları 18

2.2.4. Atriyal Fibrilasyon ve Yeniden Biçimlenme (Remodeling) 21

2.2.5. Atriyal Fibrilasyon ve Atriyal Fibrozis 23

2.2.6. Atriyal Fibrilasyon ve Apoptozis 25

2.2.7. Kardiyak İleti Sistemi Hastalıkları ve Apoptozis İlişkisi 30

2.2.8. Atriyal Fibrilasyon Patofizyolojisinde Enflamasyon ve Oksidatif Stres 31

2.2.9. Atriyal Fibrilasyon ve Heat Shock Proteinler 31

2.2.10. Atriyal Fibrilasyonda Genetik Unsurlar 32

2.2.11. Atriyal Fibrilasyon ve Gen Ekspresyon Değişimleri 33

3. GEREKÇE VE AMAÇ **40**

4. MATERYAL VE YÖNTEM **47**

4.1. Materyal **47**

4.1.1. Hasta Kohortu 47

4.2. Yöntem **48**
4.2.1. Operasyon Detayları 48
4.2.2. Atriyum Dokularının İntraoperatif Preperasyonu 48
4.2.3. İmmünohistokimya ve DNA Fragmantasyon Analizleri 50
4.2.4. Geçirmeli (Transmission) Elektron Mikroskopik Çalışma (TEM) 51
4.2.5. Mitral Yetmezlik Etiyolojisinin Patolojik Tespiti 52
4.2.6. Atriyum Dokularından RNA İzolasyonu 52
4.2.7. RNA Kalite ve Konsantrasyonunun Tayini 54
4.2.8. Affymetrix GeneChip 3' IVT Express Kit ile RNA'nın Hibridizasyonu 56
4.2.9. Hibridizasyonu Tamamlanan Örneklerin Biyoinformatik Analizleri 60

5. ARAŞTIRMA BULGULARI **68**
5.1. Hasta Kohortu **68**
5.2. İmmünohistokimya ve DNA Fragmantasyon Analizleri **70**
5.3. Geçirmeli (Transmission) Elektron Mikroskopik Çalışma (TEM) **80**
5.4. Mitral Yetmezlik Etyolojisinin Patolojik Tespiti **82**
5.5. Mikrodizin Deneylerinin Bulguları **84**
5.5.1. İzole edilen RNA örneklerinin kalite ve miktar bulguları 84
5.2.2. Mikrodizin Analizi için cRNA Sentezlenmesi ve Fragmantasyonu 85
5.5.3. Hibridizasyon 86
5.5.4. Biyoinformatik analizler 86
5.5.5. Farklı ifade olan gen setleri 87
5.5.6. Genlerin anotasyonu, hiyerarşik kümelenmesi ve yolak analizleri 88

6. TARTIŞMA VE SONUÇ **95**
6.1. RNA İzolasyonu **96**
6.2. Mikrodizin Bulguları **97**
6.3. Apoptozis Bulguları **102**

KAYNAKLAR **105**

EKLER **121**
EK1: Hastanın Bilgilendirilmiş Onam (Rıza) Formu Örneği **121**
EK2: AF ve SR Grupları Arasında Farklı İfade Olan Gen Seti İçinden 35 örnek **123**
EK3: RA ve LA Grupları Arasında Farklı İfade Olan Gen Seti İçinden 35 Örnek **125**

ÖZGEÇMİŞ 127

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Kalbin anatomisi (4) 6

Şekil 2: Kalp kesitinde kapakların görünümü (5) 7

Şekil 3: Kardiyak Siklus (6) 8

Şekil 4: Kalbin ileti sisteminde otoritmik hücrelerin yerleşimi (7) 9

Şekil 5: EKG dalgaları ilişkili elektrofizyolojik aktiviteler (8) 11

Şekil 6: Kardiyak hücre tiplerinin aksiyon potansiyelleri (9) 12

Şekil 7: Atriyal ve ventriküler miyozitlerin aksiyon potansiyeli ile EKG eşleşmesi (10) .. 14

Şekil 8: Normal ritim ve atriyal fibrilasyon (13) 15

Şekil 9: Navigasyon ve ablasyon (9) 21

Şekil 10: Atriyumda fibrozis ve AF'a neden olan akımlar (13) 24

Şekil 11: Apoptotik yolakların birlikte gösterimi (91) 28

Şekil 12: AF etiyopatogenezi ve sistem biyolojisi 40

Şekil 13: Atriyal fibrilasyon grubu 42

Şekil 14: Kontrol grubu 43

Şekil 15: İntraoperatif atriyal mikrodiseksiyon tekniği 49

Şekil 16: Biyoinformatik analiz sürecinin akışı 60

Şekil 17: Çalışmanın genel akış şeması 67

Şekil 18: BCL2 immünohistokimya görüntüleri 72

Şekil 19: BAX immünohistokimya görüntüleri 73

Şekil 20: BAK immünohistokimya görüntüleri 74

Şekil 21: BCL2L1 immünohistokimya görüntüleri 75

Şekil 22: Calpain S1 immünohistokimya görüntüleri 76

Şekil 23: Caspase 3 immünohistokimya görüntüleri 77

Şekil 24: Caspase 8 immünohistokimya görüntüleri 78

Şekil 25: TUNEL görüntüleri 79

Şekil 26: AF ve SR örneklerine ait TEM görüntüleri 81

Şekil 27: AF ve SR örneklerine ait TEM görüntüleri 81

Şekil 28: AF ve SR örneklerine ait TEM görüntüleri 82

Şekil 29: Mitral kapaklarda hematoksilen eosin boyaması 83

Şekil 30: RNA örneklerinin % 1 agaroz jelde yürütülüp görüntülenmesi 84

Şekil 31: İzole edilen total RNA'lardan sentezlenen cRNA'ların fragmante edildikten sonraki agaroz jel görüntüleri 85

Şekil 32: Arraylerin ön işleme sonrası korelasyonu 87

Şekil 33: MAPK yolağı 89

Şekil 34: Müsin tip O-glikan biyosentez yolağı 90

Şekil 35: 2 kat ve fazla değişim gösteren genlerle hiyerarşik kümeleme ve heatmap 91

Şekil 36: Hiyerarşik kümeleme ve heatmape yakın bakış 92

Şekil 37: Farklı ifade olan genlerin volcano plotları 94

Şekil 38: Tez çalışması çerçevesinde kullanılan biyoinformatik analizler ve veri madenciliği algoritması 99

Şekil 39: Ekstrasellüler matriks ve reseptör etkileşim yolağı 102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1: AF 3P klinik sınıflaması 18

Tablo 2: İmmünohistokimyasal analizleri gerçekleştirilen antikorların gen ad ve sembolleri, HUGO ID'leri, protein ad ve sembolleri 51

Tablo 3: Hastaların preoperatif demografik ve hemodinamik verileri 68

Tablo 4: Sağ atriyum dokularında apoptotik proteinlerin immünohistokimyasal yöntemlerle ifade değerleri 70

Tablo 5: Sol atriyum dokularında apoptotik proteinlerin immünohistokimyasal yöntemlerle ifade değerleri 71

Tablo 6: RNA örneklerine ait konsantrasyon ve RIN değeri aralıkları 84

Tablo 7: İzole edilen total RNA örneklerinden sentezlenen cRNA örneklerinin spektrofotometrik ölçüm aralıkları 85

Tablo 8: Mikrodizini tamamlanmış arraylerin hibridizasyon yüzdeleri 86

Tablo 9: AF/SR arasında 2 kat ve daha fazla değişim gösteren genler 93

SİMGELER DİZİNİ

AF: Atriyal fibrilasyon

DNAJA4: DNAJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4

OXCT1: 3-oxoasit CoA transferaz 1

NTRK2: Neurotrofik tirozin kinaz, reseptör, tip 2

BNIP3: BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3

BCL6: B-cell CLL/lenfoma 6

MAPK14: Mitojen aktif protein kinaz 14

RPL3: Ribosomal protein L3

QRT-PCR: Kantitatif real time revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu

MY: Mitral kapak yetmezliği

SA düğüm: Sinoatriyal düğüm

AV Düğüm: Atriyoventriküler düğüm

EKG: Elektrokardiyogram

MD: Mitral darlığı

PV: Pulmoner Ven

RFA: Radyofrekans ablasyon

MRI: Magnetik rezonans görüntüleme

Bcl-2: B-hücreli CLL/lemfoma 2. İntegral dış mitokondriyal membran proteinidir. Antiapoptotiktir.

AIF: Apoptoz indükleyici faktör

Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

BH: Bcl-2 Homoloji

BAX: Mitokondriden sitokrom-c salınmasını indükleyen proapoptotik protein

MOMP: Mitokondrial dış membran permeabilization

BAX: BCL2-associated X protein

BAK1: BCL2-antagonist/killer 1

Bcl-xl (BCL2L1): BCL2-like 1

Caspase: Cycteine-dependent Aspartate-cleaving Proteases

IAPs: Apoptoz proteinerinin inhibitörleri

TUNEL: Tdt-mediated dUTP nick end-labeling. DNA fragmantasyonunu gösteren apoptozis deteksiyon yöntemi

CDKI1A: Cyclin-dependent kinaz inhibitörü 1A

MKP-1: Mitojen-aktive protein kinaz fosfataz-1

NF-IL6-beta: Nuclear faktör-interlökin 6-beta

MMIF: Makrofaj migrasyon inhibe edici faktör

VEGF-B: Vascular endothelial büyüme faktörü B

TBE: Tris-HCl, Borik asit, EDTA

cRNA: Komplemeter RNA

GO: Gene Ontology

NUSE: The Normalized Unscaled Standard Error

RLE: Relative Log Expression

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

TEM: Transmission (geçirmeli) elektron mikroskopi

1. GİRİŞ

Endüstrileşme ile ölüm nedenlerinde önemli değişiklikler olmuş, 1950'lerde mortalitenin ardındaki en ciddi sebepler olan nütrisyonel ve enfeksiyöz nedenler günümüzde yerini dejeneratif hastalıklara (kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi) bırakmıştır. Dünya Sağlık Teşkilatı'nın 1999 raporuna göre ölümlerin % 28-34'ünü (erkek ve kadın) kardiyovasküler hastalıklar oluşturmaktadır. Günümüzde kalp yetmezliğinin epidemik boyutlara ulaştığı, kalp ve damar hastalıklarının bir numaralı ölüm nedeni olduğu gözlenmektedir. ABD'de 2004 yılında tüm ölümlerin % 36.3'ü (871.517) kalp ve damar hastalıklarına bağlı olarak gelişmiş, diğer bir ifadeyle her 2.8 ölümden biri kardiyovasküler hastalıklara bağlanmıştır. Yalnızca ABD'de 79,4 milyon erişkinde (3 erişkinden biri) bir veya daha fazla kalp-damar hastalığı gelişmiştir. 18 yaşın üzerindeki Amerika'lılarda 72 milyon hipertansiyon, 15,8 koroner kalp hastalığı, 7.9 milyon miyokard infarktüsü, 8,9 milyon angina pektoris, 5,2 milyon kalp yetmezliği ve 5,6 milyon inme vakası 2004 yılı itibari ile tespit edilmiş bulunmaktadır.

Atriyal fibrilasyon (AF) en sık görülen sürekli kardiyak aritmidir. Endüstrileşmiş ülkelerde gelecek 50 yıl içinde bu ritim bozukluğundan etkilenen nüfus sayısının iki katına çıkacağı öngörülmektedir. Tanı ve tedavideki ilerlemelere rağmen, AF halen önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olmaya devam etmektedir. Tüm toplumda % 1 oranında görülen AF'un ortaya çıkma sıklığı yaşla artmaktadır. 65 yaş üzerindeki popülasyonda görülme sıklığı % 5 dolayındadır.

AF yalnızca hastalar üzerinde ciddi sağlık sorunları yaratmakla kalmaz aynı zamanda meydana getirdiği ciddi sonuçları nedeniyle sağlık sistemi üzerine önemli bir ekonomik yük getirir. Artmış morbidite ve mortalite ve gerekli tedavi girişimleri nedeniyle AF'un sağlık harcamaları üzerine önemli etkisi vardır. İngiltere'de 600.000'den fazla AF hastası bulunmaktadır ve bunların sisteme maliyetinin 459 milyon pound civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bu rakam İngiliz ulusal sağlık bütçesinin % 1'ini oluşturmaktadır. Ülkemizde AF'un oluşturduğu ekonomik yükle ilgili maliyet analiz çalışmaları maalesef bulunmamaktadır.

İnme, AF'un en ciddi komplikasyonudur. Kapak hastalığı olmadan gelişen AF, inme riskini 3-5 kat artırmaktadır. Framingham Kalp Çalışması yeni başlangıçlı AF'lu hastalarda inme riskini belirleyen bazı unsurlar ortaya koymuştur (1). Bu çalışmaya göre yaş, kadın

cinsiyet, sistolik kan basıncındaki yükseklik, diyabet ve daha önceki inme veya geçici iskemik atak öyküsünün varlığı önemli risk unsurlarıdır. AF hastalarının yaşadığı inmeler genellikle fibrilasyonu olmayanlara göre daha ağır klinik tablolarla seyretmektedir. Bu hastalarda daha ölümcül ve morbid inmeler gözlenir. Bilinç durumu daha zayıftır, kortikal defisit daha fazladır ve yatağa bağımlı kalma oranı daha sıktır. AF'lu hastalarda inme nüks oranı da yine daha fazladır. AF'da inmenin esas sorumlusu olarak, kanın atriyumlar içinda staza uğraması sonucu özellikle sol atriyal appendikste oluşan trombüs kaynaklı kardiyoemboliler gösterilmektedir. Ne var ki AF hastalarının tamamında inme kardiyoemboli kaynaklı değildir.

AF'u bulunan hastaların yaşam kalitesi normal sinus ritmindekilerie göre belirgin olarak düşüktür. Bu hastalar fiziksel, sosyal, zihinsel ve duygusal açıdan ve de fonksiyonel kapasite bakımından diğer hastalara göre daha zayıftır. Semptomatik olmayan hastaların bile sağlık durumlarını kötü hissettikleri ve yaşamsal tatminlerinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Framingham Kalp Çalışmasında, AF'un bağımsız olarak mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (1). AF'un bazı klinik durumlarda da mortaliteyi artırdığı gözlenmiştir. Akut koroner sendromlar, konjestif kalp yetmezliği, koroner arter bypass cerrahisine alınan hastalar ve özefajektomi yapılan hastalarda AF oluşması mortalite ile ilişkilidir (2, 3). Lone AF'un mortalite ile ilişkisi tartışmalıdır. Mortalite ve morbidite ile ilşikisi olduğuna işaret eden çalışmalar olmakla birlikte bulguların istatistiksel anlamlılığı sınırlıdır.

Bu ritim bozukluğu; ataklar halinde ortaya çıkan ve çoğunlukla kendiliğinden sonlanan aralıklı (paroksismal) AF, kendiliğinden sonlanmayan ve ilaç ya da elektriki kardiyoversiyonla sonlanan inatçı (persistent) AF, ilaç ya da elektriki kardiyoversiyonla geri döndürülemeyen kalıcı (permanent) AF olmak üzere üç alt gruba ayrılmıştır. Mitral kapak cerrahisine alınan hastaların % 60-84'ünde kalıcı AF bulunmaktadır. Bu hastalarda, aritmi cerrahisi yapılmaksızın yalnızca mitral kapağa yönelik müdahaleler sonrası sinüs ritmine dönme oranları ancak % 15-21 düzeylerindedir. Kalıcı AF hastalarına farmakolojik ve elektrik akımlarıyla yapılan kardiyoversiyon çoğunlukla etkisiz olduğu için, bu ritim bozukluğunun kalıcı olduğuna inanılır. AF'un açık kalp cerrahisi sonrasında devamına neden olan risk faktörleri arasında; hastanın yaşı, AF'un bir yıldan fazla süredir bulunuyor olması, sol atriyum çapının 5 cm'den fazla genişlemesi ve etiyolojide romatizmal kalp hastalığının bulunması sıralanabilir.

AF, çok uzun yıllar iyi huylu bir aritmi olarak algılanmış, bu nedenle hastalığın etiyopatogenezine yönelik araştırmalar ve tedavi seçenekleri kısıtlı kalmıştır. Ancak yakın tarihte yapılan çalışmalar AF'un inme ihtimalini 6 kat, kardiyovasküler sebeplere bağlı mortaliteyi de iki kat artırdığını göstermiştir. Böylece AF'un aslında iyi huylu bir aritmi olmadığı ve hemodinaminin bozulmasına neden olduğu kesinlik kazanmıştır. AF'un devam etmesi nedeniyle ortaya çıkan hemodinamik bozukluklar: 1. azalmış diyastolik doluş zamanı, 2. atriyal kontraksiyonun kalp debisine olan katkısının ortadan kalkması, 3. uzun dönemde atriyal kardiyomiyopati gelişmesi, 4. tromboembolik komplikasyonlar, şeklinde sıralanabilir. Her ne kadar AF uzun yıllardan beri tanımlanmış bir patoloji olsa da, bu hemodinamik bozukluklara sebep olduğunun açığa çıkmasıyla AF etiyopatogenezinin aydınlatılması önem kazanmıştır.

AF çoğunlukla mitral kapak hastalıklarına eşlik etmektedir. Mitral kapak yetmezliği (MY), aort darlığından sonra ikinci en sık görülen kalp kapak hastalığıdır. MY'ne neden olan hastalıklar arasında başlıca dejeneratif, inflamatuvar (romatizmal), iskemik, infektif (endokardit), konjenital, travma gibi etiyolojiler yer alır. Gelişmekte olan ülkelerde çocukluk çağında geçirilen akut eklem romatizmasının sekeli olarak MY ortaya çıkabilirken (romatizmal MY), gelişmiş ülkelerde mitral kapağın miksamatöz dejenerasyonu (dejeneratif MY) en sık karşılaşılan etiyopatolojik nedendir. Çocukluk çağında gelişen romatizmal ateşin sonucu olan romatizmal kalp hastalığının sıklığı, gelişmiş ve bazı gelişmekte olan ülkelerde 1970'li yıllardan beri çarpıcı şekilde azalmış, nadir rastlanan hastalıklar arasına girmiştir. Ancak ülkemizde hala küçümsenmeyecek boyuttadır. Ortalama % 50 romatizmal ateş olgusunda kardiyak tutulum gelişebileceği gerçeği durumun önemini daha arttırmaktadır. Romatizmal kalp hastalığının en sık görüldüğü 15-64 yaş kesimine ilişkin nüfusumuz, 1990 ile 2003 yılları arasında % 37 kadar artmıştır. Sosyoekonomik düzeyle ters ilişki gösteren hastalık prevalansının ülkemizde yavaş yavaş azaldığı düşünülebilir. Bu gözlemleri dikkate alarak yapılacak bir tahmin, halkımızda 200 bine yaklaşan bir yurttaş kitlesinde romatizmal kalp hastalığı bulunduğu yönünde olup, önümüzdeki 10 yılda giderek azalacağı varsayılabilir. Romatizmal kalp kapak hastalıklarındaki azalmaya karşılık dejeneratif etiyoloji rölatif olarak ön plana çıkmaktadır. "Floppy mitral kapak", "miksömatöz mitral kapak" ve "dejeneratif mitral kapak hastalığı" aynı patolojik spektrumun farklı evreleri olarak tanımlanabilir. A.B.D. ve Avrupa'da mitral kapak cerrahisi gerektiren MY'nin en sık nedeni dejeneratif mitral kapak hastalığıdır. Ülkemizde de sosyo-ekonomik gelişmeyle birlikte, sıklık açısından

romatizmal MY yerini dejeneratif etiyolojiye bırakmaya başlamıştır. Üçüncü sırada gözlenen iskemik MY ise, ciddi koroner arter hastalığı veya akut miyokard enfarktüsü sonrası kalbin bölgesel ya da global kasılma bozukluğuna ikincil olarak gelişir.

Primer patoloji ne olursa olsun, MY olan hastalarda temel fizyolojik anormallik sol ventrikülün atım volümünün bir kısmının sol atriyuma geri kaçmasıdır. Bu durum azalmış ileri kan akımına ve yükselmiş sol atriyum basıncına, sonuçta da pulmoner konjesyon ve sol ventrikülün volüm yüklenmesine neden olur. MY ilerledikçe, sol atriyum boyutları da genişler. Sol atriyumun genişlemesi atriyal aritmilere ve sonuçta AF gelişimine neden olur. Hastalık yıllar boyunca iyi tolere edilir ancak sonrasında sol ventrikül fonksiyonları da etkilenerek sol kalp yetmezliği ile sonuçlanır. MY olan hastalar, bu patolojik hemodinamik sürece karşı çeşitli savunma mekanizmaları geliştirerek MY'ni uzun süre tolere edebilirken, belirli bir süre sonunda gelişen AF semptomların ağırlaşmasına yol açar. Yapılan bilimsel çalışmalar, basınç ve volüm yükü nedeniyle genişleyen sol atriyal çapın (sıklıkla 5 cm'nin üzerine çıkması) AF için belirgin bir yatkınlığa yol açtığını göstermiştir.

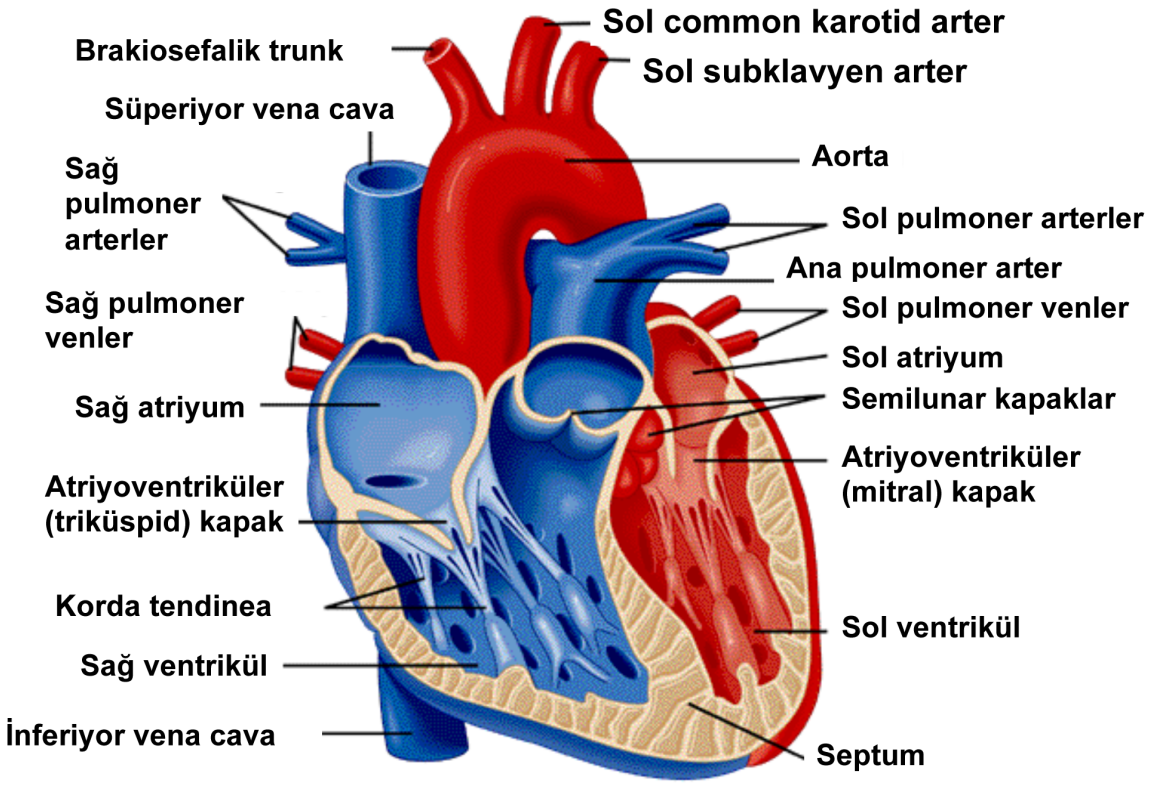
AF'un etiyolojisini ortaya çıkarmayı amaçlayan çalışmalar, çoğunlukla elektrofizyolojik araştırmalardır. Bu elektrofizyolojik araştırmalarla, kardiyak ileti sisteminin haritalanmasına yönelik geliştirilen teknikler sayesinde, AF'un radyofrekans, lazer, mikrodalga, kriyotermi veya yüksek-yoğunluk odaklı ultrason gibi çeşitli enerji kaynakları kullanılarak ablasyonla tedavisi günümüzde mümkün hale gelmiştir. Ayrıca antikoagülan, antiaritmik ve hız kontrolünü sağlayan ajanlarla medikal tedavisi de yapılmaktadır. Ancak bu tedavilerle sinüs ritmine dönme ve idamesinin sağlanma başarısı ancak % 80 düzeylerinde kalmıştır. Birçok AF hastası emboli dışında hemodinamik dengesizlik, çarpıntı ve baygınlık gibi şikayetlerin yanı sıra uygulanan farmakolojik tedaviye bağlı olumsuzluklardan da etkilenmektedir. Antikoagülasyon ile tromboembolik olay sıklığı azalırken, serebral hemoraji riski 3 kat artmaktadır. AF hastaları, bu nedenlerle AF'un yaşam kalitesi üzerindeki olumsuz etkilerine maruz kalmaya devam etmektedir. Hastalığın patogenezinin hücresel ve moleküler seviyede aydınlatılması ve AF'un hangi tetik gen ve yolaklar üzerinden geliştiğinin tespit edilmesi gerekmektedir. AF etiyopatogenezinin hücresel ve moleküler seviyede araştırılmasının hedeflendiği çalışmalar ancak son zamanlarda gündeme gelmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KALBİN ANATOMİ VE ELEKTROFİZYOLOJİSİ

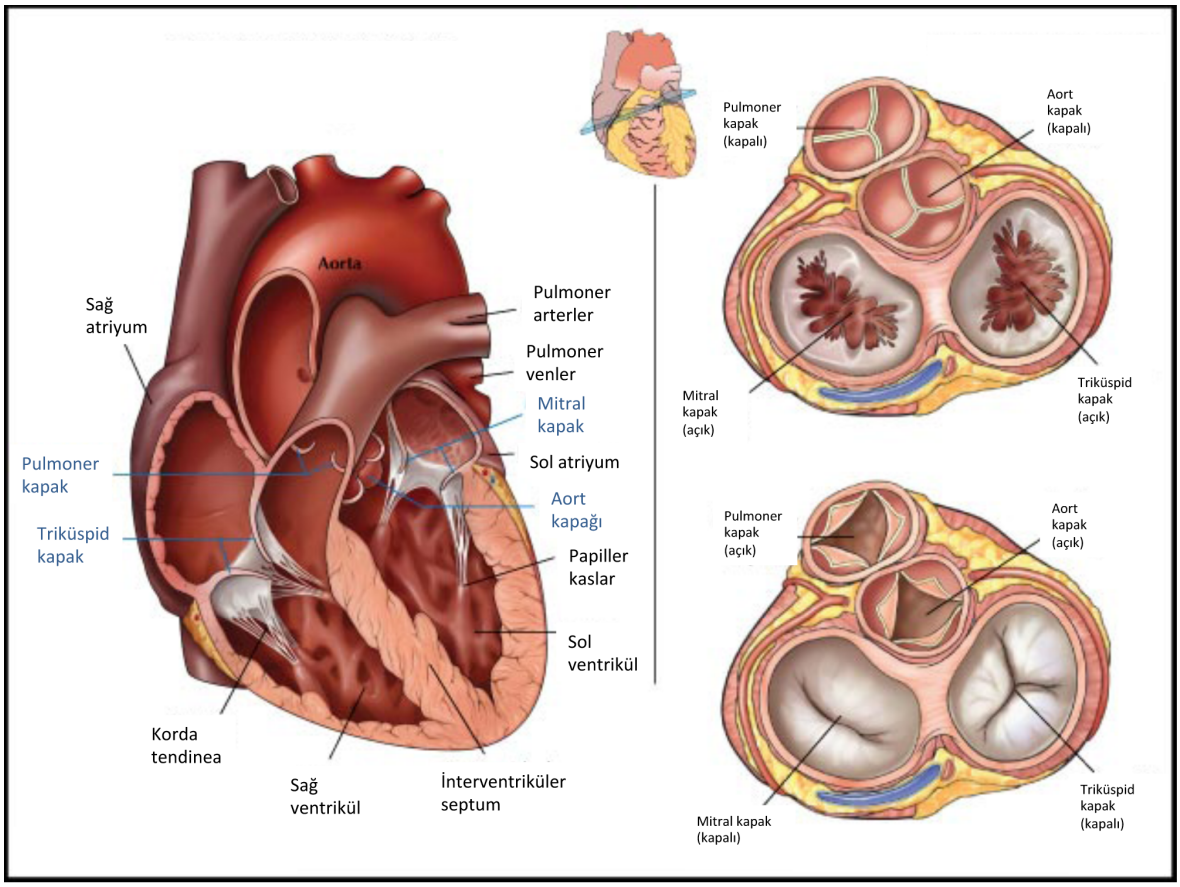
2.1.1. Kalbin Normal Çalışması

İnsan kalbi üstte iki atriyum altta iki ventrikül olmak üzere dört odacıktan oluşmuştur. Esasen kalbin pompa gücünü sağlayan odacıklar ventriküllerdir; ventriküller arasında da pompa gücünün büyük bölümü sol ventrikül tarafından gerçekleştirilir. Atriyum ve ventriküller eşzamanlı ve ardısıra kasılarak uyumlu çalışırlar. Her kalp atımının başında, sol atriyumda yerleşmiş özelleşmiş bir odaktan çıkan elektriksel sinyal tüm kalbe yayılarak miyokardın kasılmasını sağlar. Önce atriyumlar kasılarak açık olan kapakçıklardan ventriküle doğru kanı iter. Daha sonra elektriksel uyarı ventrikül kasına doğru ilerlediğinde, ventriküllerin kasılmasını sağlayarak kanı, kalpten akciğer ve tüm vücuda doğru yönlendirir. Ventriküller kasılırken atriyumlar gevşeyerek kanla dolar ve sonraki atımın başlamasına olanak sağlar.



Şekil 1: Kalbin anatomisi (4)

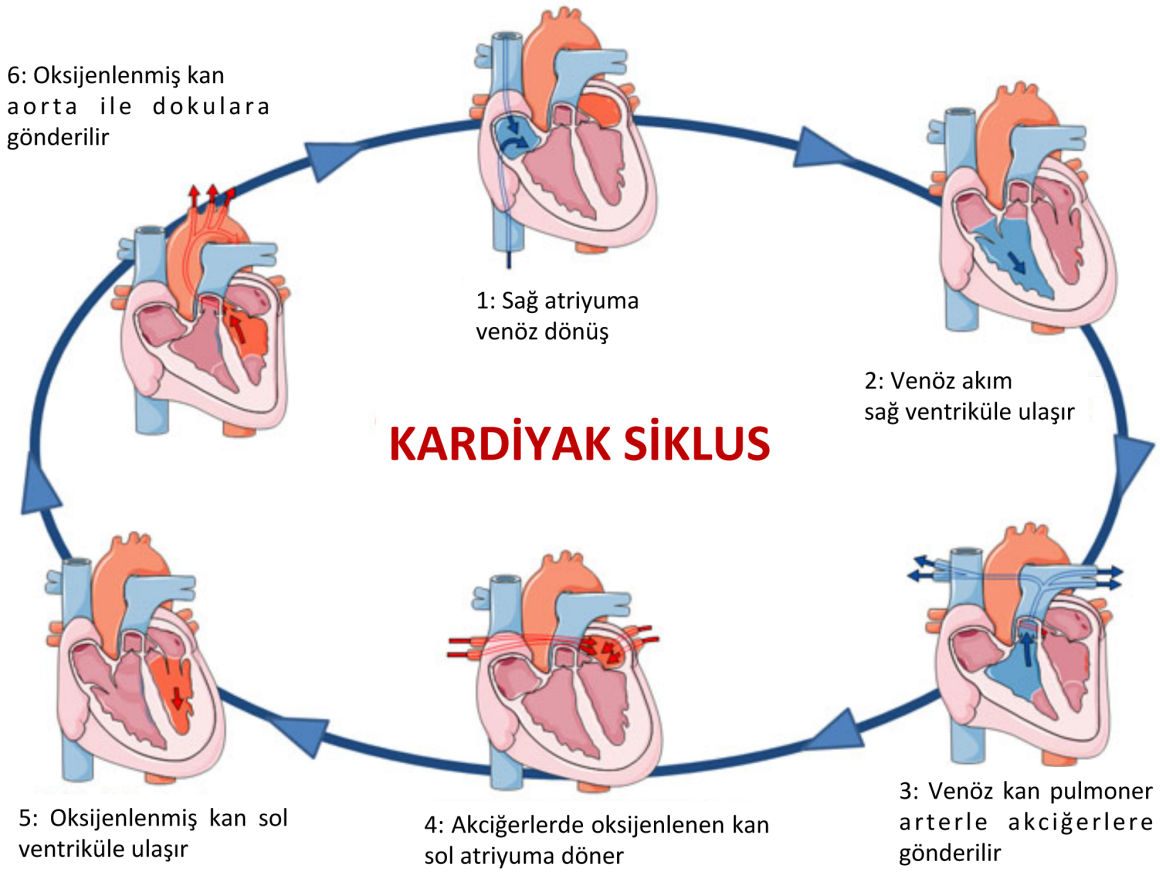
Her ventrikülde kanın geri kaçışını önlemek üzere giriş ve çıkış kısmında birer kapakçık bulunur. Atriyumlar ile ventriküller arasında ve ventriküllerin çıkışında birer tane olmak üzere kalbin içinde 4 tane kapak vardır (Şekil 2). Sağdaki atriyum ve ventrikülü triküspit kapak ayırırken soldaki boşlukları mitral kapak ayırmaktadır. Kalbin sol ventrikülünün bitimi ile kalpten çıkan ve insanın en büyük atardamarı olan aort damarının başlangıcı arasında aort kapağı bulunmaktadır. Benzer olarak pulmoner kapak sağ ventrikül ile pulmoner ven arasındadır. Mitral kapak; sol atriyum ve sol ventrikülü birbirinden ayıran, iki yaprakçıktan oluşan kalp kapakçığıdır. Mitral kapak fonksiyonunda; kapakçıkların yanı sıra kalbin fibröz iskeleti, subvalvüler yapılar olan korda tendinealar, papiller kaslar, atriyal ve ventriküler duvar hareketlerinin önemli rolü vardır ve bu birimlerin hepsi birlikte fonksiyonel bir ünite olarak çalışırlar.



Şekil 2: Kalp kesitinde kapakların görünümü (5)

Normal bir dolaşımda vücuttan toplanan kirli kan önce sağ atriyuma gelir. Buradan sağ ventriküle boşalır. Sağ atriyumun kasılması bu boşalmaya yardım eder. Sağ ventrikülün kasılmasıyla kan oksijenlenmek üzere akciğerlere gönderilir. Akciğer dolaşımını tamamlayan temiz kan sol atriyuma gelir ve buradan sol ventriküle boşalır. Sol atriyumun

kasılması bu boşalmaya yardım eder. Son olarak sol ventrikülün kasılmasıyla da oksijenlenmiş kan vücuda pompalanır (Şekil 3).

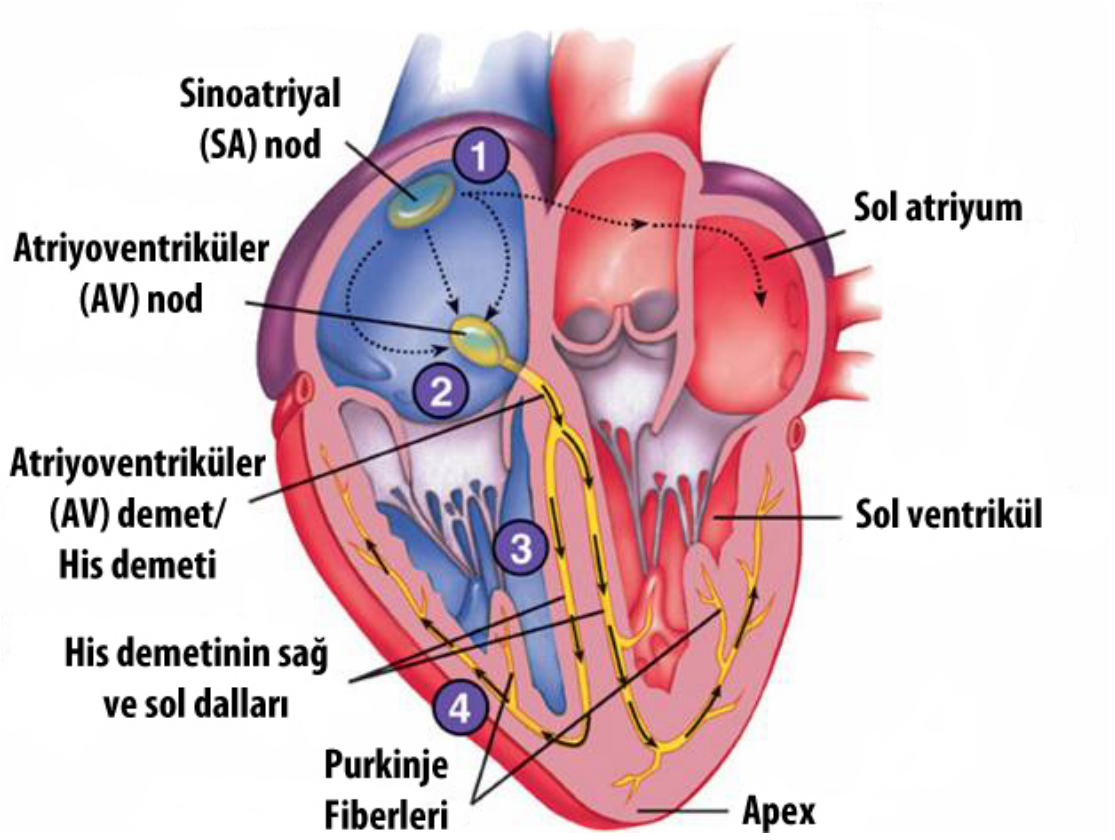


Şekil 3: Kardiyak Siklus (6)

2.1.2. Kalbin İleti Sistemi

Kalbin içinde yaygın bir sinir ağı şeklinde özel bir ileti sistemi mevcuttur. Kalp kasılması sağ atriyumun üst kısmında yer alan ve sinoatriyal (SA) düğüm olarak adlandırılan özelleşmiş, kendiliğinden impuls üretebilen (pacemaker) bir hücre grubunun çıkarttığı elektriksel uyarılar (impulslar) ile başlar. Buradaki otoritmik hücreler, sürekli olarak uyarı üretirler. SA düğümden çıkan uyarılar her iki atriyuma yayılarak atriyumların kasılmasını sağlarlar. Bu sırada ventriküller gevşemiş durumdadır. Bu uyarılar sağ atriyum ile ventrikül bileşkesinde bulunan ve atriyoventriküler (AV) düğüm adı verilen bölgeye gap junctionlar aracılığıyla ulaşırlar. AV düğüm ve bunun devamındaki His demeti, atriyumlar ile ventriküller arasındaki tek elektriksel bağlantıdır. AV düğüme gelen uyarı burada bir süre bekletilir ve daha sonra ventriküle geçişine izin verilir. Daha sonra özelleşmiş ileti yollarına impulsun taşınması sayesinde her iki ventrikülde kasılma başlar. AV düğümdeki

0,1 saniyelik bu gecikme, atriyumların kasılması sonlandıktan ve ventriküllere doluş tamamlandıktan sonra ventriküllerin kasılmasını sağlar. Ayrıca AV düğüm atriyumlardan belirli bir hızın üstünde gelen uyarıların ventriküllere geçişini engelleyerek bir filtre işlevi de üstlenir. İmpuls AV düğümden sonra His demetine, daha sonra His demetinin sağ ve sol dallarına geçerek sağ ve sol ventrikül kasındaki Purkinje liflerine ulaşır (Şekil 4). Atriyum sistolü ile atriyumların içindeki kan ventriküllere, ventrikül sistolü ile de ventriküllerin içindeki kan aort ve pulmoner arter içerisine pompalanır. Kalbin bu şekilde normal çalışması "sinüs ritmi" olarak adlandırılır.



Şekil 4: Kalbin ileti sisteminde otoritmik hücrelerin yerleşimi (7)

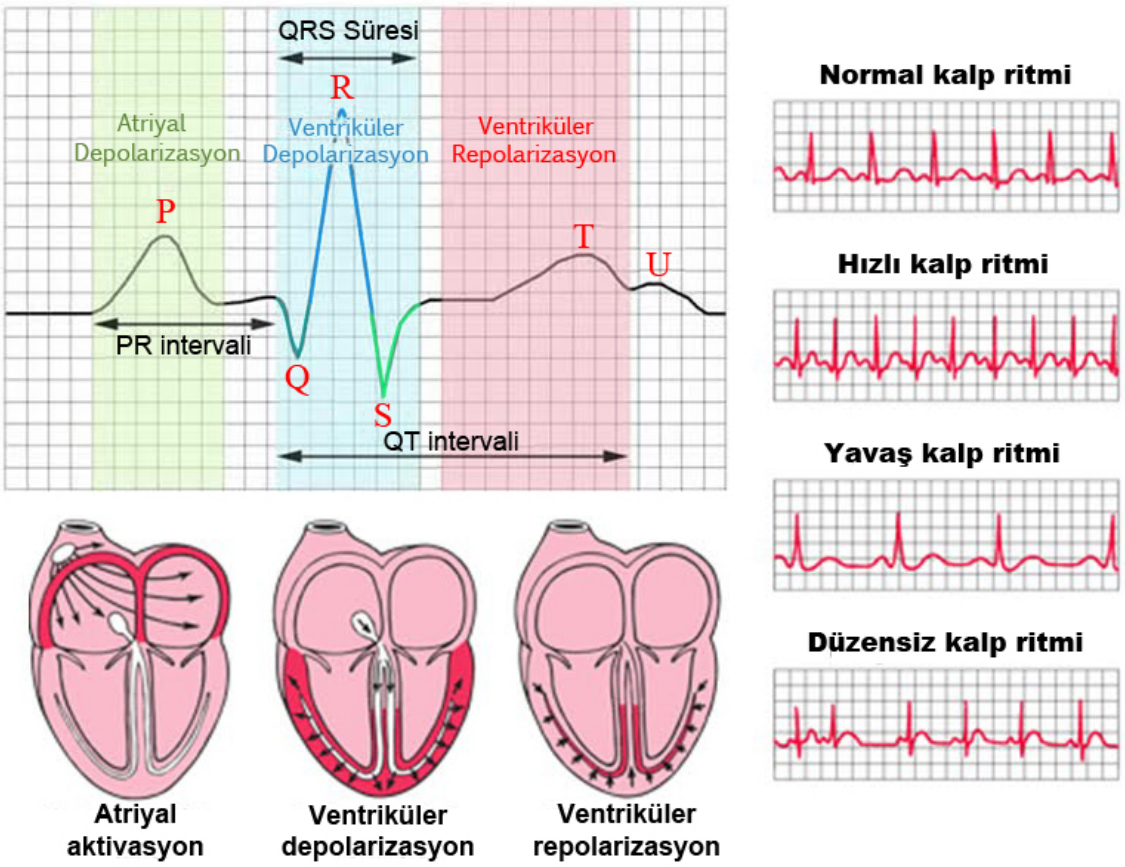
1: SA nod. Sağ atriyum duvarında yerleşmiştir. En hızlı depolarize olan uyarı yapıcı (pacemaker) hücrelerdir. Kalbin karakteristik sinüs ritmini oluşturur. Depolarizasyon başladıktan sonra, depolarizasyon dalgası gap junctionlar aracılığıyla atriyumun her yerine yayılır. **2:** AV nod. Triküspit kapak yakınında interatriyal septumda yerleşmiştir. İmpuls iletimini yavaşlatmak (0.1 s) ve atriyal kontraksiyonun tamamlanabilmesi için AV nod fiberlerinin çapları daha küçüktür. **3:** His demeti. Sağ ve sol dallar. İnferior interatriyal septumda yerleşmiştir. İmpuls atriyumdan ventriküllere geçer. Gap junctionlar yok. Kalbin apexine doğru gider. **4:** Purkinje fiberleri (lifleri). Kalbin apexinden ventrikül duvarlarına doğru dallanır. En güçlü pompalama etkisini sağlamak için fiberlerdeki impuls hücre-hücre temasıyla çok hızlı hareket eder.

SA düğüm dakikada 70-80 impuls oluştururken AV düğüm dakikada 40-60 impuls oluşturur. His demeti ve Purkinje lifleri ise daha düşük hızlarda (15-40 kez/dk) kendiliğinden impuls oluşturma özelliğine sahiptir. Kalbin normal çalışmasında uyarıların ilk çıktığı yer SA düğümdür. Dolayısıyla kalp ritmini ve hızını belirleyen de SA düğümden çıkan uyarılardır. Sinüs düğümünden çıkan uyarıların sıklığı vücudun ihtiyacı ile orantılı olarak artıp azalır. Yani egzersiz halindeki bir insanın kalbinin hızlı atmasının sebebi sinüs düğümündeki hücrelerin daha sık aralıklarla uyarı çıkartmasıdır.

Kalp çalışması, sempatik ve parasempatik sinir sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Sempatik sinir sistemi kalp çalışmasını stimüle ederken, parasempatik sinir uyaranlarını ileten vagus siniri SA düğümün impuls iletimini yavaşlatmaktadır. Kalp, SA düğüm hücrelerinde düzenli olarak oluşan impulsların atriyum miyokardına ve oradan sırasıyla AV düğüm, His demeti, sağ ve sol dallar ile Purkinje lif şebekesi üzerinden ventrikül miyokardına yayılması sonucu ritmik kontraksiyonlar yapmaktadır. Kalpte SA düğüm, AV düğüm ve çevresindeki atriyum kısmı, His demeti ve Purkinje lif hücrelerinin kendi kendilerine depolarize olabilme özellikleri bulunmaktadır.

Elektrokardiyografi (EKG), kalp kasının ve sinirsel iletim sisteminin çalışmasını kantifiye edip görselleştiren yöntemdir. Normal bir EKG'de p, QRS ve T diye adlandırılan 3 dalga ve bunlar arasında düz çizgiler vardır. P dalgası atriyumların depolarizasyonunu ve kasılmasını, QRS dalgası ventriküllerin depolarizasyonunu bunları kasmasını, T dalgası ventriküllerin repolarize (istirahat hali) hale gelmesini yansıtır. Dalgalar arasındaki mesafeler, dalgaların süresi, yükseklikleri, şekilleri, düzenli olarak birbirlerini takip etmelerindeki değişiklikler kalpte olabilecek yapı veya elektriksel değişiklikler hakkında bilgiler verir.

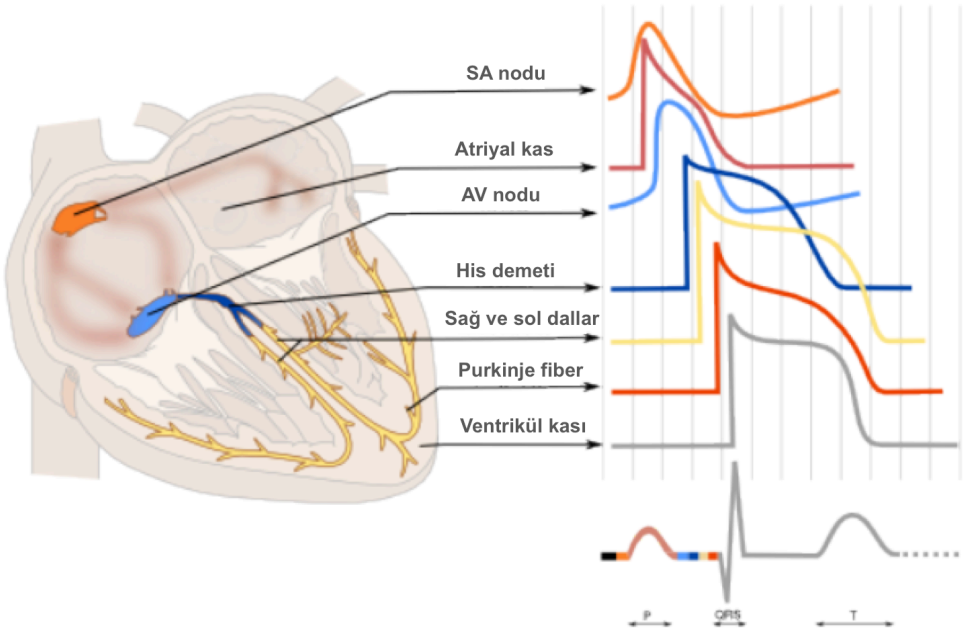
EKG dalgaları; atriyal depolarizasyonu yansıtan alfabetik olarak etiketlenmiş P dalgası ile başlar. QRS kompleksi ventriküler depolarizasyonu yansıtırken, ST-T-U dalga kompleksi (ST segment, T dalgası ve U dalgası) ventriküler repolarizasyonu temsil etmektedir (Şekil 5). J noktası QRS kompleksinin bitişiyle ST segmentinin başlangıcı arasında yer almaktadır. Atriyal repolarizasyonun amplitüdünün çok düşük olması nedeniyle sıklıkla tespit edilemez, ancak akut perikardit veya atriyal enfarktüs gibi durumlarda belirgin hale gelebilir.



Şekil 5: EKG dalgaları ilişkili elektrofizyolojik aktiviteler (8)

2.1.4. Kardiyak Aksiyon Potansiyelleri

Hücre herhangi bir impuls ile uyarıldığında hücre membranının potansiyeli; iyon konsantrasyonlarının milisaniyeler içerisinde değişmesiyle istirahat veya aksiyon potansiyeli (AP) olarak değişir. Hücre membranında yerleşmiş iyon kanallarından iyonların geçişiyle hücre membranı pozitif veya negatif yüklenebilir. Kardiyomiyositlerde iki tip kardiyak aksiyon potansiyeli gözlenir. Birincisi olan; "pacemaker olmayan aksiyon potansiyelleri"ne aynı zamanda hızlı cevap aksiyon potansiyelleri de denir (non-nodal AP). Bu tür aksiyon potansiyeli gösteren hücreler hızlı depolarize olabilen hücrelerdir. Atriyal miyozitler, ventriküler miyozitler ve Purkinje hücreleri gibi kalpteki pacemaker olmayan tüm hücreler bu tür AP gösterirler. İkinci tip; pacemaker hücrelerdir ve kendiliklerinden spontan AP oluşturabilirler. Bu tipe aynı zamanda yavaş cevap AP de denir (nodal AP). Çünkü depolarizasyon hızları yavaştır. Pacemaker hücreler kalbin SA ve AV düğümlerinde yer alırlar. Bir AP tamamlandıktan sonra yeni bir AP başlayabilmesi için gerekli olan minimum süre "refrakter periyot" diye adlandırılır.



Şekil 6: Kardiyak hücre tiplerinin aksiyon potansiyelleri (9)

Pacemaker Olmayan Kardiyak Hücrelerin Aksiyon Potansiyelleri:

Faz 4: İstirahat halindeki hücrenin membran potansiyelidir. Ventriküler miyokardiyumda normal istirahat membran potansiyeli -85 ila -95 mV arasındadır. Membran üzerinde yerleşmiş olan potasyum kanalları tamamen açıktır. Pozitif potasyum iyonları hücre dışına çıkmaya başlar ve membranın iç yüzeyini daha negatif hale getirir. Eş zamanlı olarak hızlı sodyum kanalları ve L-tipi yavaş kalsiyum kanalları kapalıdır.

Faz 0: Bu hücreler, bitişik hücreden gelen uyarıyla hızlı depolarize olduklarında eşik voltaj değerini (-70 mV) geçer geçmez hızlı sodyum kanalları açılmaya başlar ve hücre içine Na^+ iyonları girmeye başlar. Hücre içi yönlü depolarize Na^+ akımları "hızlı cevap aksiyon potansiyelleri"nin oluşumundan sorumludur. Bu sırada K^+ kanalları kapandığı için dışarı yönlü K^+ akımları durur.

Faz 1: Başlangıç repolarizasyonunun olduğu fazdır. Özel tip K^+ kanallarının (K_{to}) açılmasıyla dışarı yönlü hiperpolarize K^+ akımı (I_{Kto}) olur.

Faz 2: İçeri yönlü yavaş Ca^{2+} kanalları açılmasıyla repolarizasyon gecikir ve aksiyon potansiyelinde bir plato fazı oluşur. L-tipi kalsiyum kanalları aracılığıyla gerçekleşen içeri yönlü Ca^{2+} hareketi membran potansiyelini yaklaşık -40 mV yapar.

Faz 3: Kalsiyum kanallarının inaktivasyonu ve potasyum akımının artışıyla repolarizasyon gerçekleşir.

Pacemaker olmayan hücrelerin aksiyon potansiyelleri primer olarak hızlı Na^+, yavaş Ca^{2+} ve K^+ akımlarıyla yönlendirilir.

Pacemaker Kardiyak Hücrelerin Aksiyon Potansiyelleri:

Nodal veya pacemaker aksiyon potansiyelleri ise 3 fazdan oluşur: Faz 4, faz 0 ve faz 3.

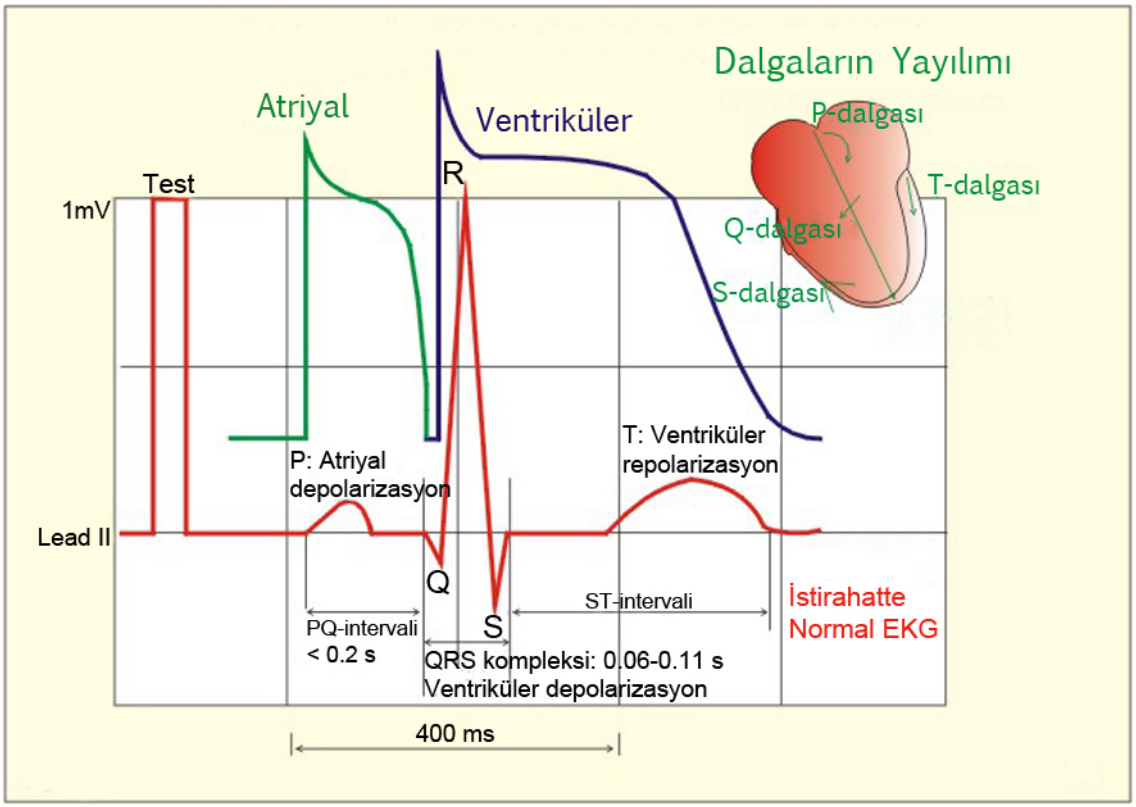
Faz 4: Spontan depolarizasyon (pacemaker potansiyeli) fazıdır. Aksiyon potansiyelini eşik membran potansiyeli olan -40/-30 mV olması için tetikler. Membran potansiyeli -50 mV'a ulaştığında (transient) T-tipi kalsiyum kanalları açılır. Bu kanallardan hücre içine Ca^{2+} girmesiyle hücre daha fazla depolarize olur. Hücre membranı -40 mV olduğunda (long-lasting) L-tipi kalsiyum kanalları açılır. Bunların açılmasıyla daha fazla Ca^{2+} hücre içine girer. Pacemaker kanalların aktive olabilmesi için hiperpolarizasyon gereklidir. Faz 3'ün sonunda membran voltajı çok negatif olmazsa pacemaker kanalları inaktif kalır. Bu durum pacemaker akımların baskılanmasına sebep olur. Hücresel hipoksi hücreyi depolarize ederek faz 3 hiperpolarizasyonunu değiştirerek pacemaker hızını düşürmek suretiyle bradikardiye sebep olur. Ayrıca faz 4 sırasında yavaş dışa yönelmiş K^+ akımında da düşüş gözlenir. K^+ akımındaki bu düşüş depolarize pacemaker potansiyeline katkıda bulunur.

Faz 0: Depolarizasyon fazıdır. Primer olarak, faz 4'ün sonunda açılmaya başlayan L-tipi Ca^{2+} kanallarından Ca^{2+} akımlarıyla depolarizasyon gerçekleşir. T-tipi Ca^{2+} kanallarından Ca^{2+} ve I_f akımları bu fazda sonlanır. Ca^{2+} iyonlarının bu kanallardan geçişi yavaş olduğu için, depolarizasyon hızı pacemaker olmayan kardiyak hücrelere gore çok daha yavaştır.

Faz 3: Repolarizasyon fazıdır. Pacemaker hücre bir kez yaklaşık -60 mV'a kadar repolarize olduğunda bu siklus spontan olarak tekrarlanır. Repolarizasyonun sonunda, membran potansiyeli çok negatifleştiğinde (-60 mV) iyon kanalları içeri yönlü yavaş depolarize Na^+ akımlarına açılır. Bu akımlara "funny currents" denir (I_f). Bu depolarize akımlar membran potansiyelinin spontan depolarizasyonuna sebep olur ve böylece faz 4 başlar.

Kardiyak aksiyon potansiyelindeki hızlı yükseliş (faz 0) EKG'de QRS dalgasının başlangıcına karşılık gelir (Şekil 7). Aksiyon potansiyelindeki plato (faz 2) izoelektrik ST

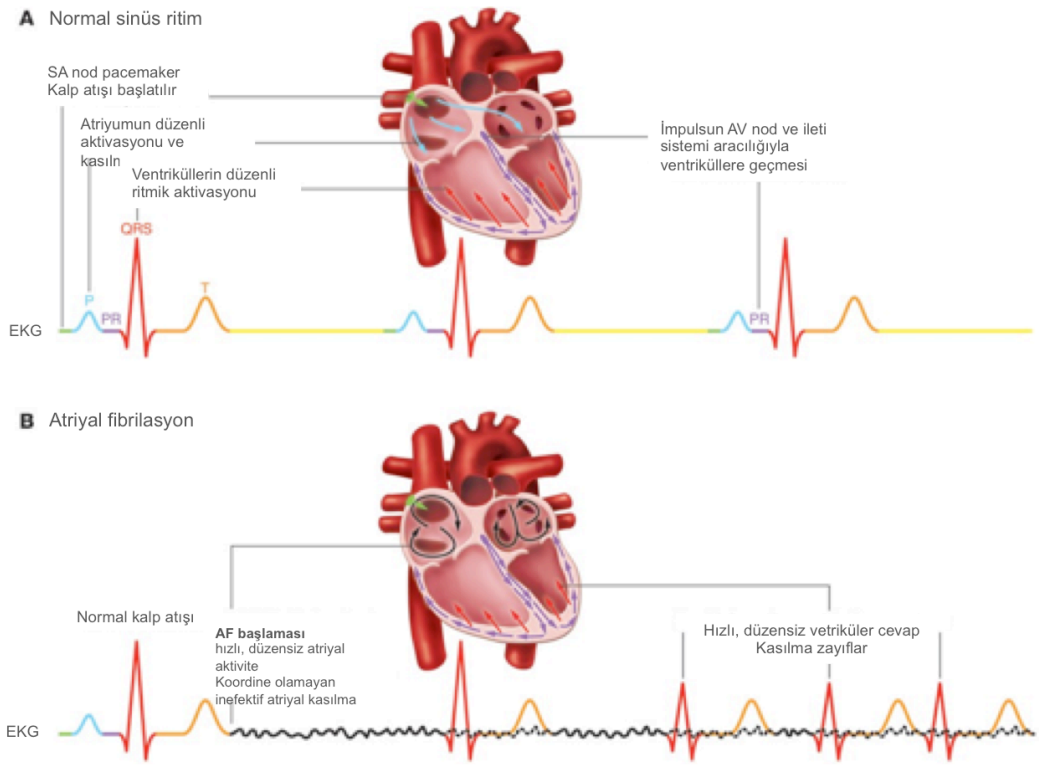
segmentine, aktif repolarizasyon (faz 3) T dalgasının oluşumuna neden olmaktadır. Na^+ girişini azaltarak faz 0 eğimini azaltan faktörler (hiperkalemi, flekainid gibi) QRS süresini uzatırlar. Faz 2'yi uzatan kondisyonlar (amiodaron kullanımı, hiperkalsemi) QT intervalinin uzamasına neden olmaktadır. Buna karşılık ventriküler repolarizasyonu kısaltan (faz 2) dijital kullanımı veya hiperkalsemi gibi durumlar ST segmentini kısaltmaktadır.



Şekil 7: Atriyal ve ventriküler miyozitlerin aksiyon potansiyeli ile EKG eşleşmesi (10)

2.2. ATRİYAL FİBRİLASYON

Kalpte impuls oluşumu veya impuls iletimindeki bozukluklar aritmilerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Klinikte en sık karşılaşılan aritmi AF'dur. AF, bir çok kardiyak ve bazı pulmoner hastalıklarla, çeşitli metabolik, toksik, endokrin veya genetik anormalilerle birlikte görülür; insidansı yaşla artmaktadır (11, 12).



Şekil 8: Normal ritim ve atriyal fibrilasyon (13)

2.2.1. Atriyal Fibrilasyona Tarihsel Bakış

AF ile ilgili en eski kayıt 17. yüzyılda Yellow Emperor's Classic of Internal Medicine'de yayınlanmıştır. Bu kayıt, 1628'de William Harvey'in, hayvanlarda "oriküler fibrilasyon" adıyla tanımladığı bir hastalık ile ilgilidir (14). 1863'te Chauveau ve Marey, kalp atışlarını grafik olarak kaydeden sfigmograf denilen aleti kullanarak kardiyak fizyoloji üzerine çeşitli çalışmalar yapmışlardır ve AF'lu hastalarda nabız izlerini takip etmişlerdir (15). Daha sonraları, düzensiz nabız için ''intermission of the pulsation of the heart'' (Laennec), ''ataxia of the pulse'' (Bouilland), ''delirium cordis'' (Nothnagel), ve son olarak ''pulsus irregularis perpetuus'' (Hering) şeklinde çeşitli tanımlamalar yapılmıştır (16). AF ile ilgili ilk vaka raporu, 1907'de University College of London'da Cushny ve Edmunds tarafından, bir ovarian fibroid hastasında cerrahiden sonra "Jacques sfigmokronografi" ile kaydedilmiş ve yayınlanmıştır (17). Bu aynı zamanda AF'daki düzensiz nabız ve elektriksel kaydın korele olduğu ilk rapordur. 1909'da kalbin ürettiği çok küçük elektriksel iletileri bile algılayıp kaydedebilen ilk pratik EKG olan "String galvanometre"nin geliştirilmesi, AF'un elektriksel doğasıyla, fizik muayene arasında daha ileri ilişkilerin araştırılmasına olanak sağlamıştır.

AF, çoğunlukla mitral kapak hastalıklarıyla birlikte görülen bir ritim bozukluğudur. Jean Baptiste Senac 1783'te ‘‘rebellious palpitation’’ olarak nitelendirdiği AF ile mitral darlığı (MD)'nın birbiriyle bağlantılı olduğunu belirlemiştir (18). 1827'de Robert Adams, MD ile birlikte düzensiz nabız görüldüğünü rapor etmiştir (17). 1897'de James Mackenzie, MD olan hastalarda AF sırasında jügüler "A dalga"sının kaybolduğunu ve hasta düzensiz bir ritim geliştirdiğinde MD'lığının presistolik üfürümünün yok olduğunu ilk kez göstermiştir (17).

Daha yeni literatürde, MD olan hastaların % 29'unda; MY olan hastaların % 16'sında AF meydana geldiğini; romatizmal etiyolojiyle MY ve MD birleştiğinde insidansın % 52'ye yükseldiği rapor edilmiştir (19).

Lewis 1909'da AF'u tanımlayan klasik "P dalgalarının yokluğu" ve "f dalgalarının düzensizliği" ni göstermiştir (17). 1928'de EKG kayıtlarını çoğaltabilecek teknik gelişmeler olması sayesinde, fibrilasyondaki bir hastada EKG frekans analizleri yapılmış, paroksismal AF'un habercisi olan atriyal siklus uzunluğu çalışılabilmiş ve AF'un kardiyoversiyondan sonra tekrar edip etmediği araştırılabilmiştir (20).

AF'un altında yatan esas mekanizma olarak çok sayıda odağın oluşturduğu rastgele yayılan multiple dalgalar (multiple wavelet reentry) olduğu teorisini 1960'larda Moe öne sürmüştür (21). Moe'nin teorisine göre; "…fibrilasyon, refrakter doku grupları ve adacıkları çevresinde miyokard boyunca rastgele gezinen bir dizi bağımsız dalgacık sayesinde sürer gider. Fibrilasyonun sürebilmesi için çok sayıda birbirinden bağımsız reentran odağın birbirini izleyen her eksitasyonda pozisyon, biçim, büyüklük ve sayıca değişmesi zorunludur. Fibrilasyon aktivitesinin yayılabilmesi için kritik kütlede bir miyokard dokusu gereklidir. Fibrilasyonun kendiliğinden sonlanması ortamdaki ortalama dalgacık sayısına bağlıdır" (21). Moe'nun teorisi, Allessie ve arkadaşları tarafından AF sırasında çeşitli atriyal bölgelerden kayıt yapılarak doğrudan test edilmiş ve çok sayıda birbirinden bağımsız reentry elektrisel iletilerin varlığı gösterilmiştir. Fibrilasyonun devam edebilmesi için her iki atriyumda bulunması gereken kritik odak sayısının 3 ila 6 arasında olması gerektiği tahmin edilmiştir. Daha sonra hem hayvanlarda hem insanlarda yapılan çalışmalar bu bulguları büyük ölçüde doğrulamıştır (22, 23). Bu önemli çalışmalarda genel olarak iki tip reentran eksitasyon gözlenmiştir: 1) Dokunun daha önceden aynı odaktan çıkan dalga ile yeniden uyarıldığı "leading circle reentry". Bu durumda reentran dalgalar

çoğunlukla stabil değil doku boyunca yer değiştiren özellikte olurlar. 2) Yayılmakta olan farklı bir dalga kümesinin çok kısa bir süre önce başka bir dalga tarafından uyarılmış olan bir bölgeyi yeniden uyardığı "random reentry" (22).

Yeni AF episodunun başlatılması için; atriyumda tetikleyici anormal bir odak olan "stabil background devre"nin önceki AF episodu sona erdiğinde yenisini başlatabileceği; AV düğümden veya bir aksesuar yoldan yeni bir impuls olması olasılığı gibi çeşitli açıklamalar getirilmiştir. Bugünkü anlayışa göre, AF'un devamı için kritik bir atriyal kütleye ve üstüne çıkıldığında organize atriyal aktivitenin devam edemeyeceği kritik bir atriyal hıza ihtiyacı vardır.

1966'da Nathan ve Eliakim, pulmoner ven (PV)'lerin proksimal tarafının, bitişik atriyal dokudan direk uzanan ve atriyumla elektriksel olarak eşleşen bir devamlılık gösterdiğini, insan kalplerinde yaptıkları sol atriyum-PV bağlantısını anlatan anatomik bir çalışmayla yayınlamışlardır (24). Haissaguerre ve arkadaşları, bazı AF vakalarında, tetikleyici odaklar olarak PV'lerin aritmojenisitesini rapor etmişlerdir (25). Sol atriyumdan PV'lerin üzerine uzanan miyokardiyal kollar aritmojenik odağın patolojik korelasyonu olarak görülmüştür. 1998'de PV'lerin, paroksismal AF'u tetiklemek gibi önemli bir rolü olduğu kabul edilmiştir. PV bölgesinin ablasyonu, bu venlerin anatomik ve elektriksel karakteristiklerinin daha iyi belirlenmesini sağlamıştır. P dalgalarının belli EKG morfolojileri, paroksismal AF'u öngörebilmektedir ve PV'leri "zanlı" olarak tanımlayabilmektedir (26). Bundan sonra, AF'un potansiyel odakları olan; superior vena cava (27), koroner sinüs (28) ve Marshall veni (29) dahil atriyuma bağlı olan torasik ven yapıları keşfedilmiştir.

2.2.2. Atriyal Fibrilasyonun Klinik Sınıflanması

Klinik AF'un alt tipleri, aritmi episodunun nasıl sonlandığına göre şu şekilde sınıflandırılabilir (Tablo 1):

1. **Paroksismal AF:** Birkaç günden fazla sürmeyen ve genellikle spontan olarak sonlanan AF atağıdır.

2. **İnatçı (Persistant) AF:** Paroksismal AF'dan daha az sıklıkta meydana gelen ve sinüs ritme geri dönmek için, kendi kendine sonlanmak yerine kardiyoversiyona gereksinim duyan AF atağıdır.

3. **Kalıcı (Permanent) AF:** Medikal ajanlarla veya kardiyoversiyon ile tekrar sinüs ritme döndürülemeyen AF'dur (30, 31).

Tablo 1: AF 3P klinik sınıflaması

Paroksismal (Aralıklı)	Persistant (İnatçı)	Permanent (Kalıcı)
Spontan olarak genellikle 48 saat içinde sonlanır	Spontan olarak sonlanmaz, elektriki kardiyoversiyon veya ilaçlarla sıklıkla sonlanır	Spontan olarak sonlanmaz, kardiyoversiyona sıklıkla dirençlidir

Mitral kapak hastalıklarında AF'un ortaya çıkması, hastalığın meydana getirdiği patolojik progresif değişikliklerin bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Patolojik zamanlama açısından mitral kapak hastalıklarında AF gelişimi, hasta cerrahiye alınmadan önce oluşabildiği gibi, aktive olan patolojik ritim bozukluğu süreci sonunda, operasyon sonrası döneme de rastlayabilmektedir. Kalp operasyonları sonrasında % 17-33 oranında AF gelişebilmektedir (32). Sinüs ritminde olan hastalarda operasyon öncesinde başlayan gen ekspresyon değişimleri sonucunda postoperatif AF gelişebileceği düşünülmektedir (33).

2.2.3. Atriyal Fibrilasyona Tedavi Yaklaşımları

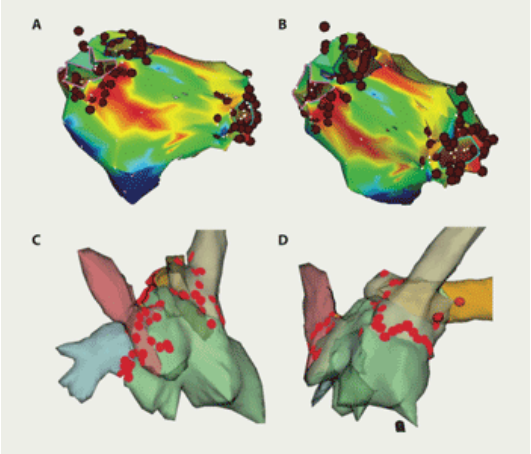
AF hastalarının tedavisi AF ile ilişkili ağır komplikasyonların önlenmesini ve semptomların azaltılmasını amaçlamaktadır. AF ile ilgili komplikasyonların önlenmesi antitrombotik tedaviye, ventrikül hızının kontrolüne ve eşlik eden kardiyak hastalıkların yeterli tedavisine dayanmaktadır. Bu tedaviler halihazırda semptomları hafifletebilir ancak semptomların ortadan kalkması kardiyoversiyon, antiaritmik ilaç tedavisi veya ablasyon tedavisi ile yapılacak ilave bir ritim kontrolü tedavisi gerektirmektedir.

AF tedavisi için ilk cerrahi yaklaşım 1980'de sol atriyum izolasyonuyla gerçekleştirilmiştir (34). Sol atriyum içerisinde AF izole edilinirse kalbin diğer kısımları normal sinüs ritimine dönebilir diye düşünülmüştü. Ancak kardiyak outputun düşmesi, AF'nin devam etmesi ve sistemik tromboemboli riski devam etti. Bundan bir kaç yıl sonra His demeti ablasyonuyla AF'a hızlı ventriküler cevap kontrol altına alınmaya çalışıldı ancak His demeti ablasyonu tromboemboli oluşumunu azaltmadı (35). Sonrasında ilk kez bir hastada PV izolasyonu ile birlikte atriyum içerisinde insizyonlar yapıldı ve bu hasta operasyondan sonraki 5 ay normal sinüs ritminde kaldı (36). Cox ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntem "cut-and-sew maze" tekniği olarak geliştirildi ve ilk kez 1987'de uygulandı (37). Etkili olmasına rağmen Maze I prosedürü bazen sol atriyal disfonksiyonla sonuçlandı. "Cut-and-sew maze" tekniğinin evolüsyonunda sonraki basamak Maze II prosedürü SA düğüm insizyonlarının çıkarılmasıyla gerçekleştirildi. Atriyum içi iletimi artırmasına rağmen, superior vena cava kesileri gerekmekteydi. Tekniğin gelişim sürecinde Maze III prosedüründe superior vena cava orifisine septal insizyon eklendi. Bu teknik; uzun dönem atriyal transportu ve SA düğüm fonksiyonunun devamını, operasyon sonrası sinüs ritminin idamesini geliştirdi. 1999'da Cox ve arkadaşları, Maze III tekniğini minimal invazif bir yaklaşımla modifiye ettiler. Konvansiyonel Cox Maze III prosedürü, çok fazla kompleks atriyal insizyon gerektirmekteydi. Çeşitli enerji kaynaklarının kullanıma girmesiyle cerrahi insizyonların yerini transmural nekrozis çizgilerinin oluşturması aldı. Bu modifiye Maze IV tekniğinde, baştaki bilateral PV izolasyonu ve kutu lezyonları yerine bağlı lezyonlar uygulandı (38). Damiano ve arkadaşları Cox Maze IV tekniğini bipolar radyofrekans ablasyon (AtriCure, Inc.; Cincinnati, OH) kullanarak yenilediler (39). Günümüzde radyofrekans, kritotermi gibi alternatif enerji kaynaklarının kullanımıyla AF ablasyonu sayesinde Maze IV çok daha az kompleks ve uygulanabilir bir hale gelmiştir. AF cerrahi tedavisinde en çok kullanılan yöntem Maze IV radyofrekans ablasyondur.

Kardiyak ileti sisteminin haritalanmasındaki tekniklerinin gelişmesi, AF'un ablasyonla tedavisinin başarılmasını sağlamıştır (40). Bu amaçla geliştirilen ve nonfloroskopik bir yöntem olan CARTO haritalaması; veya elektro-anatomik haritalama; lokalizasyonu belirlemek, haritalamanın oryantasyonu ve kateter ucundan kayıt alınırken eşzamanlı olarak kateter ablasyonu için manyetik teknolojiyi kullanır (Şekil 9). EnSite sistemi, bir balon veya mutlielektrot array ile nonkontakt intrakaviter elektrotlarıyla endokardiyal aktivasyonu kaydeder ve aktivasyon noktalarını bilgisayarlı elektrogramlar veya izopotansiyel haritalar olarak gösterir. ICE, miyokardiyal dokuda lokalize bölgeleri

dondurarak AF'un kateterle ablasyon tedavisi için kullanılan bir başka yöntemdir (41). Ayrıca AF'un odaksal RF ablasyonu için önemli bir teknik olan manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yöntemi ile PV anatomisi görüntülenebilir (42). AF'un tetikleyici odakları PV'ler üzerinde yoğun olduğu için, bu bölgenin anatomisinin ve elektriksel işlevselliğinin doğru bir şekilde tanımlanmasına ihtiyaç vardır. PV bölgesinin ablasyonu çok risklidir (43), bu nedenle en kısa zamanda bu prosedürün mümkün olan en güvenli şekilde başarılması sağlanmalıdır. Bu amaçla yeni teknolojiler geliştirilmeye devam edilmektedir. Bunlardan bazıları, elektriksel aktivasyon haritalarıyla korele ablasyon katater imajı üzerine, 3-D anatomik görüntünün (bilgisayarlı tomografi-CT- veya MRI) konmasıyla oluşturulan haritalamadır. Bir 3-D elektroanatomik haritalamayla kombine multislays multidedektör CT kullanılarak bu prosedür başarıyla gerçekleştirilebilir (44). Ayrıca PV anatomisi, yüksek frekanslı intravasküler ultrasound kullanılarak da çalışılabilir. Bu alandaki en son gelişmeler; robotik cerrahi (45) ve elektroanatomik haritalamayla kombine uzaktan navigasyon (46) kullanımıdır. Haritalama teknolojisi, ablasyon tekniklerinin daha güvenli ve daha başarılı olması için gelişmeye devam etmektedir.

Cerrahi ya da kateter ablasyon stratejileri çeşitli hasta gruplarında AF'un tamamen iyileştirilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Bu hastaların uzun vadeli izlemi, sinüs ritminin antiaritmik ilaçlar ile olduğundan daha iyi korunduğunu ancak, geç nükslerin seyrek olmadığını düşündürmektedir. Ardışık, "noktadan noktaya" lezyon yaratılmasının ve tam olmayan lezyonlara bağlı muhtemel risklerin üstesinden gelmek için, ideal olarak bir (veya birkaç) enerji uygulaması ile, PV izolasyonunun sağlanmasına yönelik olarak çeşitli "tek vuruşluk" cihazlar önerilmiştir. Çoğunlukla yapısal kalp hastalığı veya sol atriyumun anlamlı dilatasyonunun yokluğunda paroksismal AF'u olan hastalarda, balon teknolojisine, veya genişletilebilir çevresel veya ağ şeklinde dizaynlara dayalı farklı cihazlar çalışılmıştır. Bu cihazlar en çok monopolar veya bipolar şekilde radyofrekans akımı kullanarak çalışırken, kriyotermi, ultrason ve lazer enerjisi gibi alternative enerji kaynakları mevcuttur. Hiçbir randomize çalışma verisi mevcut olmadığından, "konvansiyonel" ardışık ablasyona göre üstünlük gösterilmemiştir. Atrio-özofageal fistül oluşumu gibi aşırı kollateral hasara neden olma potansiyeline sahip tüm bu cihazların güvenli ve basit olduğu hala gösterilmemiştir.



Şekil 9: Navigasyon ve ablasyon (9)

A ve **B** CARTO-XP (Biosense Webster Inc., CA, USA) **C** ve **D** NavX-ESI (St Jude Medical Inc., St Paul, USA) haritalama sistemleri. Ablasyon lezyonları her PV etrafında ayrı ayrı görülüyor

AF'un ortaya çıkardığı tromboembolik komplikasyonların engellenmesinde birincil tedavi Vitamin-K antagonisti olan Warfarin tedavisidir. Warfarinle hedef INR (international normalized ratio) değeri 2.5-3.5 aralığında tutulmasıyla major tromboembolik olay riskinde % 64'lük bir risk azalması sağlanılmaktadır.

AF'un başlamasından sonraki ilk tedavi her zaman yeterli antitrombotik tedaviyi ve ventrikül hız kontrolünü içermelidir. Eğer nihai hedef sinüs ritminin yeniden sağlanması ve sürdürülmesi ise, sürekli sinüs ritmi bulunmadığı sürece, hız kontrol ilacına izlem boyunca devam edilmelidir. Hedef, nükseden AF'un meydana geldiği zamanlarda ventrikül hızının yeterli düzeyde kontrol edilmesidir. Hastanın seyrine bağlı olarak, başlangıçta seçilen strateji yetersiz kalabilir ve ardından ritim kontrol ilaçları veya girişimleri ile desteklenmesi gerekebilir. Ventrikül hızının kontrol edilmesi için beta-blokerler (metoprolol, sotalal, atenolol), Ca^{2+} kanal blokerleri (verepamil, diltiazem), digoksin, amiodaron medikal tedavi alternatifleridir. Dirençli olgularda AV nod ablasyonu sonrasında pacemaker implantasyonu pek istenmeyen bir tercih olsa da uygulanabilmektedir.

2.2.4. Atriyal Fibrilasyon ve Yeniden Biçimlenme (Remodeling)

AF sıklıkla paroksismal formundan daha inatçı ve kalıcı formuna progresif olarak ilerler. Hastalığın zamanla oluşan bu evolüsyonu, yapısal kalp hastalığının progresyonunun AF'un devamına izin vermesine bağlı olarak meydana gelen atriyal yeniden biçimlenmeyle

(remodeling) açıklanabilir. Elektriksel, yapısal ve kontraktil olmak üzere 3 çeşit atriyal yeniden biçimlenme olduğu öne sürülmüştür (47). Wijffels ve ark., bir keçi modeli aracılığıyla yaptıkları araştırmanın sonucunda "Atriyal fibrilasyon, atriyal fibrilasyonu doğurur" (atrial fibrillation begets atrial fibrillation) tezini ortaya atmışlardır (48). AF'un bu doğal progresyonu, daha sonraları paroksismal AF olan hastalarda persistent AF gelişmesi ve hatta bu hastalarda ilerleyen süreçte permanent AF'un geliştiğinin gözlenmesiyle de kanıtlanmıştır.

AF ile yeniden biçimlenme sırasında farklı zaman domeinleri mevcuttur (47, 48). Saniyelerle dakikalar arasında olan "kısa dönem"de; iyon konsantrasyonu, pompa aktivitesi ve fosforilasyon gibi metabolik değişimler görülmektedir. Saatlerle günler arasında gerçekleşen "orta dönem", gen ekspresyon değişimleri ve kalsiyum downregülasyonu ile karakterizedir. Haftalardan aylara kadar süren "uzun dönem"in etkileri dediferansiyasyon ve miyolzis gibi hücresel değişimleri içerir. Son olarak da kalıcı AF'un dahil olduğu "çok uzun dönem" aylardan yıllara kadar sürer; fibrozis, yağ dejenerasyonu ve hücre ölümü gibi histolojik değişimlerin olduğu geri dönüşümsüz doku hasarı gözlenir.

AF oluşumunda ve idamesinde hem elektrofizyolojik alterasyonların hem de anatomik değişikliklerin kritik etkisi olduğu uzunca süredir bilinmektedir (48, 49).

Elektriksel yeniden biçimlenme ile iyon kanalı gen ekspresyonlarındaki değişimler kastedilmektedir. İyon kanallarının gen ekspresyonlarının değişimi; efektif refrakter periyodununun kısalmasına ve kısa süreli hızlı atriyal hızlara cevapta bile hız adaptasyonunun kaybedilmesine neden olmaktadır (50). Bu durum; "multiple re-entrant wavelet"lerin ortaya çıkmasına ve AF'un başlamasına neden olmakta ve idamesine katkıda bulunmaktadır (51).

Sadece elektriksel yeniden biçimlenme edinilmiş AF gelişimini tamamen açıklamaya yeterli olmaz (52). AF ile indüklenmiş efektif refrakter periyot alterasyonları, AF edinilmiş ve idame edilen hale gelmeden önce tamamen normale döner. Bu aritminin idamesinde mutlaka başka faktörlerin de etkisi bulunmalıdır. AF idamesinin ve stabilizasyonunun primer iştirakçisi iyonik yeniden biçimlenmedense yapısal yeniden biçimlenmedir.

Yapısal yeniden biçimlenmenin ayırıcı bileşeni atriyal fibrozistir. Atriyal fibrozis yeni bir altbaşlık olarak ayrıca değerlendirilecektir.

Yeniden biçimlenmeyle oluşan yapısal değişimler atriyal apendajın genişlemesi, atriyal kontraktilitenin azalması, kardiyak outputun düşmesi ve pıhtı oluşumu için eğilimin artması olarak sayılabilir. Schotten ve ark., AF'un sonlanmasından 48 saat sonra bile atriyal yeniden biçimlenmenin devam edebildiğini rapor etmişlerdir (53). AF'dan bir kez dönüş olduğunda sadece atriyal refrakter periyot normale dönmez, aynı zamanda atriyal iş indeksi ve kontraktil fonksiyon da geri döner. Atriyumun dilatasyonuyla sinüs ritim AF'a döner ve sinüs ritim geri döndüğünde atriyum tekrar normal boyutuna gelir (54). Sinüs ritmin korunması yeniden biçimlenme progresyonunu yavaşlatabilir.

Atriyal dilatasyon, reentry akımların yerleşebileceği atriyal doku miktarının artması demektir. Daha geniş atriyal boyut; normal boyutlu atriyumun destekleyebileceğinden daha geniş uzun dalgaboylu akımların yerleşebileceği alan oluşması demektir. "Multiple circuit reentry" oluşmasında atriyal ölçüler çok önemli ve belirleyici rol oynar (55).

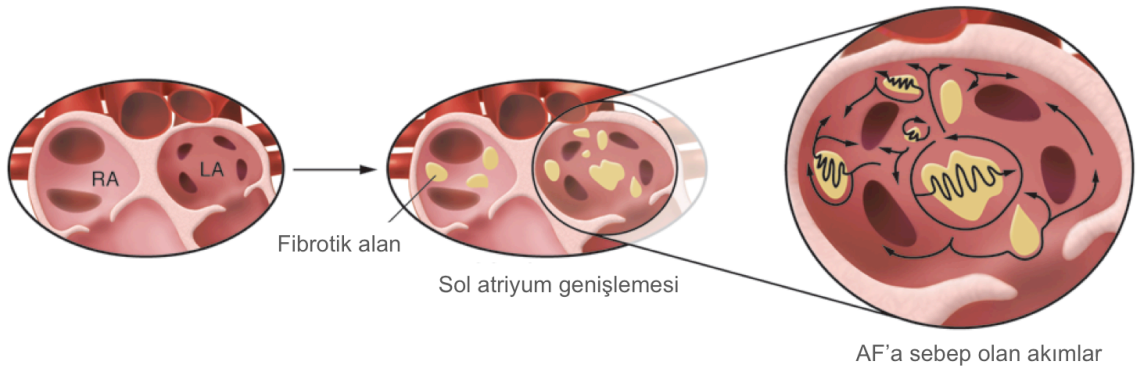
Özellikle uzun süredir devam eden edinilmiş AF'un farklı formlarda yeniden biçimlenmelere neden olup olmadığı araştırılmaya devam edilmektedir (56).

2.2.5. Atriyal Fibrilasyon ve Atriyal Fibrozis

Fibroziste, hem kollajen sentezindeki artışla hem de dokuda mekanik yüklenmeyle doku hasarının sonucunda kolajen degradasyonundaki düşüş nedeniyle ekstrasellüler matriks (ECM) bileşiminde ciddi bir alterasyon olur (57). İnterstisyal fibrozis, kardiyomiyosit yerleşim paternini, atriyal miyosit bileşimlerini, hücre-hücre interaksiyonlarını ve iletişimlerini değiştirmektedir. Ayrıca, atriyal dokudaki fibrozis, ektopik pacemakerların gelişimine de neden olmaktadır (58). Atriyal interstisyal fibrozisin yaşla (59), mitral kapak hastalığıyla (60), dilate kardiyomiyopatiyle (61) ve miyokardiyal iskemiyle (62) arttığı gösterilmiştir. İnterstisyal fibrozis iletimde gecikmelere, elektriksel impulsun alternatif yollara yönelmesine ve "re-entrant" akımların sayısının artmasına neden olmaktadır (Şekil 10) (58, 63).

AF'lu hastalarda atriyumdaki yapısal değişimler ECM'deki yapısal değişimler şeklinde gözlenmektedir. ECM başlıca kollajen tip I ve tip III, fibril, fibronektin, laminin, entaktin ve fibromodulin içermektedir. ECM içeriğinin değişmesi bir başka değişle ECM yeniden biçimlenmesi; matriks metalloproteinazlar (MMPler) ve bunların endojen inhibitörleri (TIMPler) arasındaki hassas denge ile dinamik bir şekilde düzenlenir. MMPler

fibroblastlardan, düz kas hücrelerinden, endoteliyal hücrelerden ve miyositlerden salınır. AF hastalarında MMPler ve TIMPlerin ekspresyonlarında değişim olduğu rapor edilmiştir (64, 65). Mekanik gerilime uğramış atriyal kardiyomiyositlerde MMP-2 ve MMP-9 protein ifadesi ve aktivitesi yüksek bulunmuştur (66). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada 20 SR'li ve 30 AF'lu romatizmal etiyolojili mitral kapak hastasından alınan sağ ve sol atriyal biyopsilerde eş zamanlı-RT-PCR ile MMP ve TIMPlerin ifade düzeyleri ölçülmüş. AF grubu örneklerinde MMP-3, MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 TIMP-3 ve TIMP-4 ifadeleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuş. MMPlerin ve TIMPlerin ekspresyonu ve aktivitesinin düzenlenmesi atriyal yeniden biçimlenmenin önlenmesinde hatta gerilemesinde hedef olarak kullanılabilir (67).



Şekil 10: Atriyumda fibrozis ve AF'a neden olan akımlar (13)

Atriyal fibrozisin tetikleyicileri; renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS), enflamasyon ve oksidatif strestir.

Önemli bir profibrotik molekül olan anjiyotensin II (Ang II), kollajen üretiminde merkezi rol oynar. Ayrıca transforme büyüme faktörü-β1 (TGF-β1), konnektif doku büyüme faktörü (CTGF) ve platelet derive büyüme faktörü (PDGF) fibroproliferatif proseste önemli roller üstlenirler.

Yapısal yeniden şekillenme ve miyokardiyal fibrosis gelişimde ve dolayısıyla AF patogeneizde RAAS katkısı çok fazladır (68). Atriyal fibrozisin ekstrasellüler sinyal-regüle protein kinaz (ERK) ve anjiyotensin tip I reseptör (AT1) aktivasyonuyla desteklendiği kanıtlanmıştır (69). AF'da progresif interstisyal değişimler mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) ve Ang II regülatör yolakları üzerinden tetiklendiği için RAAS, AF yeniden biçimlenme sürecinde kritik rol üstlenmektedir. Aldosteronun bloklanmasıyla atriyal fibrozisin gerilediği ve AF'un baskılandığı gösterilmiştir (70, 71). Kardiyomiyositlerin ve

fibroblastların, parakrin ve otokrin fonksiyonları kollajen üretimine etki etmektedir. Kardiyak fibroblastlardaki mekanik gerilme Ang II ve TGF-β1 ekspresyonlarını ve kollajen sentezini artırmaktadır (72, 73).

Mineralkortikoid reseptör aktivitesinin yükselmesi; MAPK sinyal yolağının aldosteron aracılı aktivasyonunda en önemli faktör olduğu ve HL-1 atriyal hücrelerinde bu yol üzerinden profibrotik etki gösterdiği belirlenmiştir (74, 75). Mineralkortikoid, AT1 ve MAPK sinyal yolakları etkileşerek atriyal fibrotik cevabı tetiklemektedir. Mineralkortikoid reseptörünün baskılanmasının, AT1 baskılanmasıyla birlikte olduğunu ve AF oluşumunu engellediği gösterilmiştir (76).

Kiryu ve arkadaşlarının yapmış oldukları deneysel modellemede 6 haftalık AF sonrasında konnektif doku büyüme faktörü aracılı atriyal fibrozis tespit edilmiştir (77). Yapılan çalışmada 6 haftalık AF sürecinin kollajen 3 ve fibronektin ifadelerindeki artış aracılığıyla ekstrasellüler matriks proteinlerindeki artışın sebep olduğu interstisyal fibrozise neden olduğu tespit edilmiştir.

Atriyal dokuda kollajen birikiminin AF patofizyolojisinde rol oynadığı bir gerçektir. Çeşitli nedenlerle atriyal dokuda miyozit kaybı, atriyal dokuda kollajen birikimi ve fibrozise neden olmaktadır (13). Reperatif fibrozis, miyozit lifleri arasında interstisyal fibrozisin genişlemesine yol açmakta ve dejenere olan miyozitlerin yerini almaktadır (78). Mekanik gerilmenin yol açtığı hücre kaybı ve birbirini takip eden etkileşimler sonrasında fibrozisin meydana gelmesi miyozit kaybının hangi hücre ölüm tipiyle oluştuğu sorusunu gündeme getirmiştir. Yapılan çalışmalarda mekanik gerilme sonrasında ortaya çıkan atriyal hücre kaybının apoptozis sonucu oluştuğu elektron mikroskopisiyle gösterilmiştir (79).

2.2.6. Atriyal Fibrilasyon ve Apoptozis

AF patofizyolojisinde apoptozisin etkin bir mekanizma olduğu bugüne kadar yapılan immünohistokimya, gen ifade analizi, protein analizi gibi çeşitli moleküler tekniklerin kullanıldığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu noktada apoptozisin detaylarına girmek gerekir.

Apoptozis; programlı hücre intiharı olarak ifade edilir. Apoptozis; inflamatuar bir yanıtı tetiklemeden hücre ölümünü kontrol eden bir sinyal kaskadının aktifleştiği, çok iyi regüle edilen ve evrimsel olarak korunmuş, enerji bağımlı bir "hücre intiharı" programıdır (80). Bu program normal doku gelişimi sırasında ihtiyaç duyulmayan yapıların uzaklaştırılması

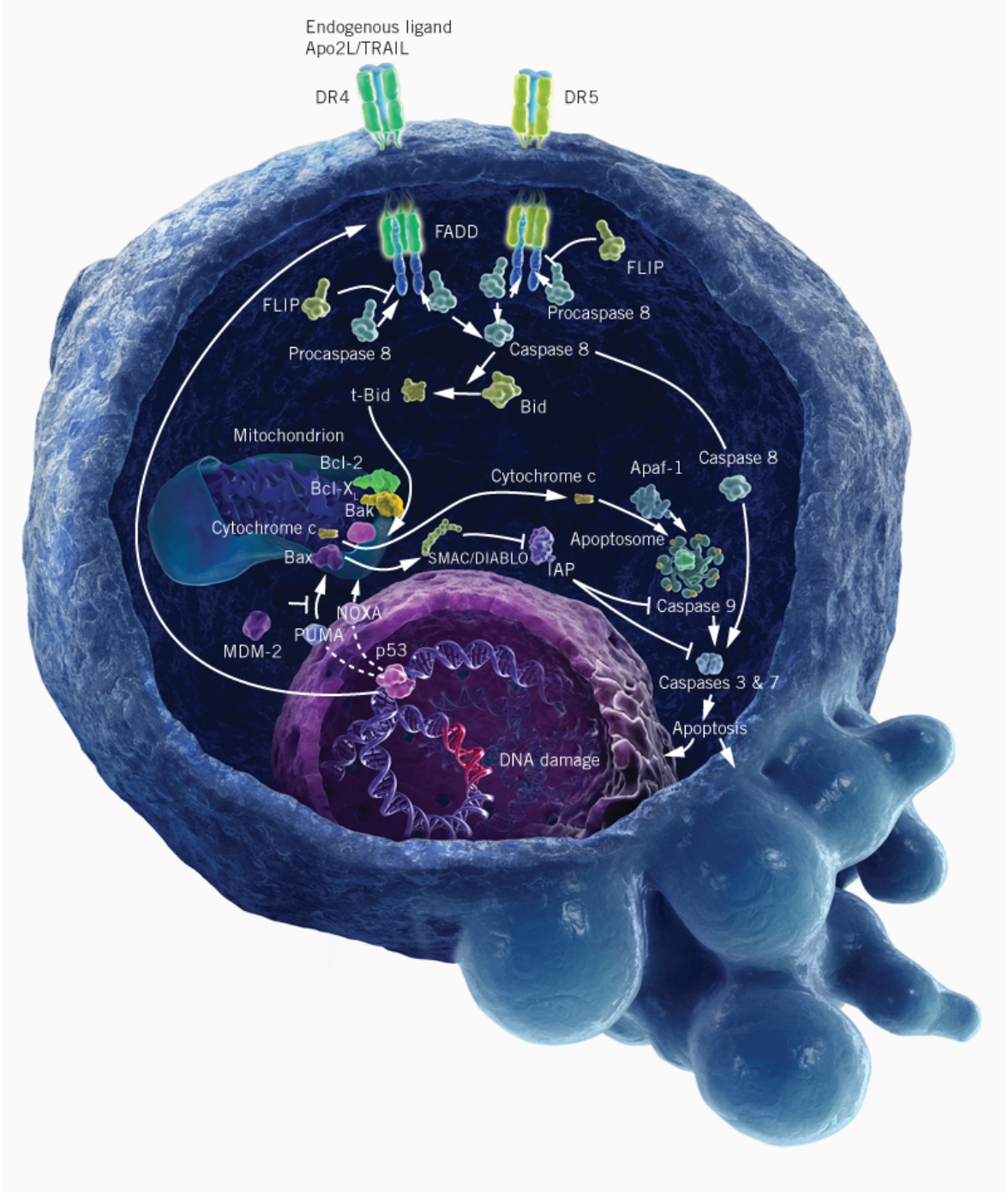
ve dokunun şeklini alabilmesi için çalışır (81). Ayrıca yetişkin organizmalarda, hücresel hasarlara yanıt olarak, hasar görmüş hücrelerin çevre dokuya zarar vermeden uzaklaştırılması için de aktive olur. Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik bir hücre ölümü şeklidir. Apoptozis sırasında, tipik olarak hücre büzüşmesi, hücre şeklinin kaybolması, membran baloncuklanması, organellerin morfolojilerini kotumarı, kromatin degredasyonu ve nükleer fragmantasyon görülmektedir.

Büyüme faktörlerinin azalması, hipoksi, oksidatif stres, DNA hasarı, mitokondrilerin geri dönüşümsüz hasarı, iskemi/reperfüzyon hasarı gibi apoptotik uyarılar sonucunda hücrede apoptotik sinyal kaskadı başlar. Apoptozis, 2 ayrı evrimsel olarak korunmuş biyokimyasal yolakla meydana gelir: 1-ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen ekstrinsik yolak; 2-Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığı ile gerçekleşen intrinsik yolak (82). Apoptozisin her iki yolağında da spesifik proteazlar olan kaspazların aktivasyonu ve kaspaz kaskadı ortaktır. Kaspaz kaskadı hücre yüzeyi reseptörleriyle aktive olduğunda ekstrinsik yolak, mitokondriyel depolarizasyonla aktive oluyorsa intrinsik yolak hücreyi apoptozise götürür (83).

İntrinsik yolakta, mitokondriler apoptozis için gerekli olan enerjiyi üretir ve sitokrom-c, endonükleaz G ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi proapoptotik proteinlerin salınmasını sağlar. Sitorkom-c'nin mitokondriden sitozole salınımı, Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) aracılığıyla kaspaz-9'un aktifleşmesine neden olur. Apoptozom, prokaspaz-9'a bağlanarak konformasyonel değişim aracılığı ile aktifleşmesini yani kaspaz-9 oluşumunu indükler (84). Sitokrom-c; elektron transport zincirinde önemli rolü olan, antioksidan savunmasında ve intrinsik apoptosis yolağında anahtar rolleri olan multifonksiyonel bir proteindir (85). Embriyonik gelişim sırasında intrinsik apoptozis yolağı fonksiyoneldir ve sitokrom-c olmazsa çalışamaz. Apoptozisin bu yolakta devam edebilmesi için Apaf-1'in apoptozom oluşumu için aktive olması gerekmektedir. İntrinsik yolağın kritik basamağı olan mitokondriden sitokrom-c salınımı BCL2 ailesi proteinleri tarafından regüle edilmektedir (86).

BCL2 protein ailesinde hem pro- hemde anti-apoptotik üyeler bulunmaktadır. Bu protein ailesinin tüm üyeleri, BH (Bcl-2 homology) dilimleri (domeinleri) diye bilinen 4 korunmuş bölgeyi paylaşırlar (87). Pro-apoptotik proteinler olan BAX ve BAK BH3-only proteinlerdir ve mitokondri dış membranında por oluşturmak suretiyle sitokrom-c

salınımında esansiyel rol üstlenirler. BAX ve BAK tarafından başlatılan MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization) prosesi, sitokrom-c ve diğer çözünebilir proteinlerin sitozole salınımıyla sonuçlanır (88). Sitorkom-c salınımı sırasında BAX ve BAK mitokondrinin fragmanlara bölünmesini indükler. Çözünebilir proteinler permeabilize mitokondri membranından diffüze olduğunda, kaspaz aktivasyonu teşvik edilir. BH3-only proteinleri transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyelerde yüksek oranda düzenlenmektedir (89). Anti-apoptotik BCL2 proteinlerinin esas görevleri BAX ve BAK proteinlerinin aktivasyonuna karşı koyarak hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlamak ve hücreyi çeşitli apoptotik uyarılara karşı korumaktır (90). BCL2 ve BCL2L1 gibi antiapoptotik üyeler 4 BH dilimini de içermektedir (Şekil 11).



Şekil 11: Apoptotik yolakların birlikte gösterimi (91)

FAS'ın ligandına bağlanması. Prokaspaz-8'in kaspaz-8'e dönüşerek aktifleşmesi. Aktif kaspaz-3'ün substratlarına yönelmesi. BID'in mitokondriye transportu. BCL2'nin apoptozom oluşumu için prokaspaz-9 ve Apaf-1'i uyarması. Mitokondriden sitokrom-c salınımı. Apoptozom oluşumu. Hücrenin apoptozise girmesi.

Ekstrinsik yolak; transmembran bir protein olan ve TNF süper ailesinin üyesi, endojen ligand TRAIL (Tumor Necrosis Factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand)

tarafından aktive olur (92). Fizyolojik olarak TRAIL'in otoimmünitede rol oynar ve antiinflamatuvar bir etkisi vardır. Ölüm reseptörleri TRAIL ile aktive olduğunda bu reseptörler homo-trimerize olurlar. Bu trimer; FADD (Fas associated death domain), pro-kaspaz-8 ve pro-kaspaz-10 ile birlikte DISC (death inducing signaling complex) oluşturur. Bu kaspazların aktive olması kaspaz-3'ün aktifleşmesine ve kaskadın başlamasında ve apoptozisle sonlanmasına sebep olur. Aktif kaspaz-8 ayrıca BID (BCL2-interactin domain)'in tBID (truncated BID) olmasına ve kaspaz-9 aracılığıyla intrinsik yolağın da aktifleşmesine neden olur. Ekstrinsik apoptotik yolağın önemli inhibitörleri arasında kaspaz-8'le yarışan cFLIP, IAPlar (inhibitor of apoptosis proteins) sayılabilir (93).

"Genom gardiyanı" tabir edilen p53 tumör süpresör geni; hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptozis yolaklarının çeşitli basamaklarında bir çok apoptotik hedef geninin indüksiyonunu sağlar. p53, iki yolakta da çalışan apoptotik hedef genlerini transkripsiyonel olarak aktifleştirerek apoptozisi tetikler. İntrinsik yolakta p53; pro-apoptotik BAX, BID, PUMA, NOXA gibi BCL2 ailesi BH3-only proteinlerini indükler. Ayrıca sitokrom-c salınımını da teşvik eder. Ekstrinsik yolakta; ölüm reseptörü Fas (CD95) ve DR5 (TRAIL reseptör 2) ekspresyonlarını indükler. Ek olarak, TNFSF10 (TRAIL) ölüm ligandının ve Fas ligandının (TNFSF6/FasL) da eksprese olmalarını indükler (94).

Hücre stres altındayken membran geçirgenliği azalmaya ve yeniden biçimlenmeye başlar; bu süreci hücre ölümü takip eder. Sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunun yükselmesi kalpain ve kaspaz aktivasyonu aracılığıyla sitoskeleton yıkımını başlatır (95).

Atriyum içerisindeki entotelyal hücreler, fibroblastlar ve kardiyomiyositler gibi tüm hücreler apoptozise uğrayabilir. AF'lu insan atriyal dokularında apoptozis olduğu bildirilmiştir (96). Sinüs ritimli doku örneklerine göre fibrile atriyum dokularında anlamlı farklılıkta yüksek miyolzis, nükleer degradasyon ve apoptozis olduğu bulunmuştur (97). Fas gibi apoptotik belirteçlerin serum seviyeleri AF hastalarında yüksek bulunmuştur (98). Postoperatif AF gelişiminde miyolzisin ve apoptozisin artması önemli belirteçlerdir (99).

Apoptotik proses, AF sürecinin erken safhalarında başlar ve atriyal yeniden şekillenmeye katkıda bulunur. Pacing-indüklenmiş hayvan AF modellerinden elde edilen veri, apoptozis ve lökosit infiltrasyonunun aritmojenik yapısal yeniden şekillenmeden önce başladığını göstermektedir (99).

Yakın zamanda yayınlanan bir araştırmada kardiyak operasyona alınan hastalarda yapılan bir çalışmada, preoperatif serum apoptotik belirteçleri değerlendirmişler ve postoperatif AF ile ilişkili olup olmadığını araştırmışlar (100). Atriyal biyopsilerde histopatolojik inceleme ve serumda Fas konsantrasyonunu değerlendirmişler ve sağ atriyal dokuda apoptozis ve fibrizisin saptandığı ve preoperatif serum Fas düzeyi yüksek olan hastalarda anlamlı farklılıkta postoperatif AF geliştiğini belirlemişler. Bu çalışma apoptozisin atriyal yeniden biçimlenme ve fibrozis üzerine önemli katkısı olduğunu kanıtlamaktadır.

AF sırasında hücresel hasarın esas sebebi büyük olasılıkla kalp hızıdır. Birçok klinik çalışmada, yüksek kalp hızı sebebiyle oluşan hücresel hasarın, medikal olarak veya katater ablasyonla kalp hızının kontrol alınması sonucu tamamen geri döndürülebilir olduğu rapor edilmiştir (101). AF sırasında yüksek kalp hızı, mekamik gerilme, hipoksi, enflamasyon ve oksidatif stres gibi atriyal hücreleri apoptozise götüren mekanizmalar bulunmaktadır (102).

AF'lu insan atriyal dokularında ve deneysel AF modellerinde artmış programlanmış hücre ölümünün (apoptozis) ve bu patolojik mekanizmanın sonucu olan atriyal fibrozisin tetikleyici mekanizma olduğuna dair gözlemler yapılmıştır (103-105). Sistein proteaz grubu olan kaspazlar apoptozis sürecindeki hücrede aktive olmaktadır. AF'lu insan atriyal dokularında ve deneysel AF modellerinde apoptotik süreçte anahtar rolü oynayan bir protein olarak kaspaz-3 aktivite artışı tespit edilmiştir (96, 106). Bu gözlemlerden hareketle yapılan deneysel bir çalışmada, kaspaz-3 aktivitesinin adenovirus aracılı siRNA yöntemiyle baskılanması sayesinde AF gelişminin engellendiği bildirilmiştir (107).

2.2.7. Kardiyak İleti Sistemi Hastalıkları ve Apoptozis İlişkisi

Kalpteki ileti sistemi hastalıklarının bazılarında apoptozis olduğu tespit edilmiştir. Afrika'da familyal olarak rastlanan progresif kalp bloğu ve fatal aritmilerle seyreden Brink Sendromu'nda SA düğümü ve AV düğümde selektif apoptozise bağlı destrüksiyon olduğu gösterilmiştir (108). Benzer bir destrüksiyon Brugada Sendrom'lu hastaların postmortem histolojik incelemelerinde de ortaya konulmuştur (109). Potasyum kanallarında fonksiyon bozukluğu olduğu bilinen uzun QT sendromu (LQTS) olan hastaların örneklerinde apoptozisi işaret eden bulgular saptanmıştır (110). LQTS'lu olgulara ait SA düğümlerinin histolojik incelemesinde, düğümde nekroz olmaksızın fokal noninflamatuar dejenerasyon, lokal intranodal ve perinodal kardiyonöropati bulunduğu saptanmıştır (111). Daha sonraki çalışmalarda LQTS'lu hastalarda pleomorfik mikromitokondrozis ve sinoatriyal hücrelerde apoptozis bulguları gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlardan anlaşılacağı gibi fokal sessiz bir

apoptotik odak, tıpkı nekrotik hücreler gibi ileti sistemini etkileyerek aritmi veya bloklara yol açabilmektedir.

2.2.8. Atriyal Fibrilasyon Patofizyolojisinde Enflamasyon ve Oksidatif Stres

AF patofizyolojisine enflamasyon da karışmaktadır. 1997 yılında yayınlanan bir çalışmada lone AF hastalarının atriyal biyopsilerinde enflamatuvar infiltratlar olduğu gösterilmiştir (112). Ayrıca hem lone AF hastalarında hem de diğer AF hastalarında enflamatuvar belirteçlerin serum düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (113). Atriyal flutter ve AF hastalarında CRP ve Il-6 gibi enflamatuvar sitokin düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (114). AF hastalarının atriyal dokularında nötrofillerin bir bileşeni olan miyeloperoksidaz birikimi olduğu tespit edilmiştir (115). Miyeloperoksidaz infüzyonunun fibrozisi indüklediği ve atriyal fibrozis aracılığıyla AF'a sebep olduğu düşünülmektedir. Atriyal yeniden biçimlenme ve enflamasyon arasında nedensel bir ilişki olduğu, atriyal taşikardileri prednisone veya statinler kullanarak engellemeye çalışılan çalışmalarda da önerilmiştir (116, 117). Ek olarak bir basınç yükü modelinde, atriyal fibroziste mast hücrelerinin rolü olduğu da gösterilmiştir (118).

Ayrıca oksidatif stres, oksidanların miktarındaki artış, reaktif oksijen ve nitrojen türleri de AF patofizyolojisinde rol oynamaktadır (106, 119). Reaktif oksijen türlerinin salınımıyla mitokondriyal disfonksiyon olması, K_{ATP} kanal aktivitesini artırarak iletim yollarını inhibe eder ve reentran aritmilere yol açar (120). Bu nedenle yakın zamanda mitokondri hedefli antioksidanlar ve c-Src inhibitörleri klinikte antiaritmik ajanlar olarak kullanılabilecektir. Oksidize Ca^{2+} ve kalmodulin-bağımlı protein kinaz II (CaMKII) Ang II/pacing indüklenmiş AF'da önemli olduğunu insan dokularında ve fare modeli olarak gösterilmiştir. Bu çalışma oksidatif stresin AF'a sebep olduğunu gösteren güçlü kanıtlar sunmaktadır (121). RAAS aktivasyonuyla indüklenmiş oksidatif stres, hücre içi Ca^{2+} değiştirerek AF'u indükleyebilir. Ayrıca bu durum angiotensin-converting enzim inhibitörlerinin ve angiotensin reseptör blokerlerinin antiaritmik etkilerini de açıklamaya yardım etmektedir.

2.2.9. Atriyal Fibrilasyon ve Heat Shock Proteinler

Heat Shock Protein (HSP)'ler, protein katlanmasında ve degredasyonunda fonksiyon gösteren stres-indüklenmiş şaperonlardır. Bu moleküler şaperonlar, yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin hücrede birikimini engellerler. HSPlerin yükselmiş ekspresyonunun kalp üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir (122). AF

hastalarının da sağ atriyal apendajlarında HSP27 ve HSP70 ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir (123, 124). HSPlerin indüklenmesiyle AF eğiliminin ve idamesinin azaldığı, ayrıca kalbi AF'a karşı koruduğu da belirlenmiştir (125).

HSP şaperonları, iskemi/reperfüzyon hasarı sonrasında kadiyomiyositlerde, mitokondriyal fonksiyon ve ATP oluşum kapasitesi gibi survey için kritik olan olaylarda kardiyoprotektif etki gösterirler. Ayrıca katlanmamış protein gibi toksik agregasyonları engelleyerek atriyal yeniden biçimlenmeyi de önlerler (126). HSP72 ve HSP27'nin yeni gelişen AF'un engellenmesi ve paroksismal AF'dan persistant AF'a progresyonda geciktirici etkisi olduğu gösterilmiştir (127). HSP70 postoperatif AF oluşmasını engellemektedir. İntrasellüler HSPlerin ekspresyonundaki artış AF'da koruyucu etki gösterirken dolaşımdaki HSPlerin AF patogenezine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. AF'da dolaşımdaki HSP seviyelerine ilişkin çok az veri bulunmaktadır (128).

2.2.10. Atriyal Fibrilasyonda Genetik Unsurlar

Geleneksel olarak AF'nun genetik temellerinin olduğu düşünülmezdi. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar aritminin bazı türlerinin, özellikle "lone AF"un, genetik temelleri olduğunu gösterdi (129-132). AF'un ailelerdeki genetik temelinin araştırılması, Wolff-Parkinson-White sendromu (133) ve hipertrofik kardiyomyopati (134) gibi genetik temelli diğer aritmik patolojilerle ilişkilendirilmesi ile başladı. AF ailelerinde yapılan gözlemler, AF patogenezinde kalıtılan genetik defektler olabileceği fikrini doğurdu. Ailesel AF için ilk vaka sunumu 1936'da yayınlanmıştır (135). Ailesel AF ile ilgili bu kadar eski bir kayıt olmasına rağmen, ailesel AF prevalansı ancak son 10 yılda daha sistematik olarak değerlendirilmeye başlanmıştır.

Lone AF'lu 2 hasta serisinde sırasıyla %15 ve 38 vakada aile hikayesi olduğu bildirilmiştir (130, 131). 2004'te 2243 katılımcıyla gerçekleştirilen Framingham Kalp Çalışması verileri, herhangi bir ebeveynde AF görülmesi halinde standart AF risk faktörleri ayarlandığında alt nesilde AF gelişme olasılığının anlamlı düzeyde arttığını göstermiştir (odds ratio: 1,85; %95 CI 1,12-3,06 p=0,02) (136).

Ailesel AF ile ilişkilendirilmiş ilk gen 2003 yılında Chen ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Araştırıcılar 4 jenerasyon boyunca otozomal dominant olarak geçen AF olgularında kardiyak I_{Ks} kanallarının α-altünitesini kodlayan KCNQ1 geninde S140G

missense mutasyonunu saptamışlardır (137). KCNQ1 fonksiyon kaybı (loss-of-function) gen mutasyonu, daha öncesinde kalıtımsal bir ventriküler aritmi olan LQTS'na sebep olduğu gösterilmişti (138). Ailesel AF'de saptanan KCNQ1 genindeki S140G mutasyonunun, kardiyak I_{Ks} kanallarının aktivasyonuyla atriyal aksiyon potansiyeli süresini kısaltmasına neden olarak fonksiyon kazanımı (gain-of-function) etkisi gösterdiği tahmin edilmektedir (139).

Brugada ve arkadaşları, ailesel AF'u 10. kromozom üzerindeki bir genin etkilediğini göstererek AF için ilk monogenik nedeni rapor etmişlerdir (11). 4 AF ailesinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada 10q22-q24 kromozomuyla bağlantılı olduğu ve en az 2 genin AF ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (130). Ellinor ve arkadaşları 6. kromozom üzerinde bir geni ailesel AF için haritalamışlardır (140). AF'lu ailelerde iyon kanallarında çeşitli mutasyonlar belirlenmiştir (137, 141-143). Moleküler biyolojik metodolojiler ve popülasyon temelli çalışmalardaki artışların paralelinde AF genetik patogenezinde rol alan atriyal natriüretik peptid geninde çerçeve kayması (frame shift) mutasyonu (144), gap junction ve connexin 43 proteini kodlayan genlerde mutasyonlar (145), idiyopatik AF olgularında GATA4 geninde mutasyon (146) gibi çeşitli genetik varyasyonlar tespit edilmiştir. AF'dan sorumlu olan ve potasyum kanallarını kodlayan genlerde de mutasyonlar keşfedilmiştir (137). AF ile ilişkili daha fazla gen keşfedilmeye devam edilmektedir ve belki bir gün genetik terapi, AF tedavisinde veya korunmasında bir çözüm yolu olabilecektir.

2.2.11. Atriyal Fibrilasyon ve Gen Ekspresyon Değişimleri

AF'da hücresel ya da gen ekspresyonu değişimleri ve dolayısıyla ortaya çıkan patogenezin mekanizmalarını tanımlamaya yönelik transkriptom ebadında moleküler çalışmalar bildirilmiştir. Bu kapsamda 2002-2013 yılları arasında 20 çalışma yayınlanmıştır.

2002 yılında ***48 dişi keçide***, birçok elektrot içeren silikon striplerin atriyum ve Bachmann demeti üzerinde epikardiyal yüzeye tutturulması ve operasyon sonrasında elektrotların eksternal otomatik fibrilatöre (50 hz) bağlanmasıyla geliştirilen AF modeli üzerinde yapılan bir çalışmada; dot-blot analizi gerçekleştirilmiş ve AF sırasında 125 fragmentin ekspresyon seviyesinin değiştiği tespit edilmiştir. Bu 125 fragment içinden 34 fragmenti klonlayıp sekanslamışlar ve ***hipoksi indükleme faktör 1α*** (HIF1A) ifadesi AF edinildikten 1 hafta sonra arttığı, ***β-miyozin ağır zincir*** (β-MHC) AF grubunda bir miktar artarken α-

MHC ifadesinin AF grubunda azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışma yapıldığı sırada keçi-spesifik mikroarrayler bulunmadığı için "differential display" yöntemi kullanılmıştır (147).

Kim ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada oldukları bir çalışmada (148), mitral kapak patolojisi nedeniyle cerrahiye alınan ***AF olgularında (n=26)*** sağ atriyal doku örnekleri, ***koroner bypass (CABG) operasyonu*** yapılan kontrol grubuyla ***(n=26)*** karşılaştırılmıştır. Yapılan cDNA mikrodizin analizinde bilinen 1152 gen incelenmiş ve 55 genin ekspresyonunda değişim izlenmiştir. Özellikle 5 genin ekspreyonundaki değişim, AF patogenezinde ***oksidatif stresin*** rolü olabileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Çalışmaya alınan mitral kapak hastalarının etiyolojilerinin farklı olması ve kontrol grubu olarak seçilen hastaların mitral kapak patolojisinden tamamen farklı olan koroner arter olgularından seçilmesi bu çalışmanın sınırlanma noktasıdır.

2004 yılında ***12 yetişkin domuzda*** gerçekleştirilen cDNA mikroarray çalışmasında, 6 domuzda yüksek hızlı pacemaker (600 beats/dk) implante edilerek AF modeli geliştirilmiş ve 6035 cDNA klonu içeren mikroarray yöntemi kullanılarak iki grup arasındaki mRNA alterasyonları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmadaki en önemli sınırlama o dönemde domuz-spesifik mikroarray bulunmadığı için, domuzlardan elde edilen örneklerin 6035 insan cDNA klonu içeren mikroarraylere hibridize edilmesidir. Araştırıcılar sol atriyumda 387 genin, sağ atriyumda 81 genin AF grubunda istatistiki anlamlılıkta değiştiğini belirlemişlerdir. Bu genler içerisinde en fazla değişimi ***miyozin hafif zincirinin ventriküler izoformu (MLC-2V)*** AF grubunda SR grubuna göre sol atriyumda 9.4, sağ atriyumda 7.3 kat artarak göstermiştir (149).

Yine Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada mitral ve aort kapak replasmanına alınan 6 aydan uzun süredir ***AF olan hastaların (n=9)*** sol atriyal doku örnekleri, normal sinüs ritimli hastalarınkilerle ***(n=9)*** karşılaştırılmıştır. Çalışmaya alınan hastalar, primer patolojileri açısından uniformite göstermezken, odaklanan esas nokta AF'dur. Yapılan mikrodizin analizi ile 8167 gen analizi sonucunda kronik AF olan hastalarda 66 gende ekspresyon değişimi (31 gende azalma, 35 gende artış) tespit edilmiştir. Atriyal dokuda ***BCL2*** ve ***p27*** ekspresyonlarında azalmanın yanında, ***AT2 reseptör*** ve ***p21*** ekspresyonlarında artış, ***apoptotik*** sürecin AF patogenezinde rol alabileceğini düşündürmüştür (97). Ancak bu çalışma da, primer hastalık (mitral ve aort kapak hastaları) açısından homojenite göstermemesi sebebiyle çalışmanın sınırlanma noktasıdır.

2005 başlarında Ohki ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer AF-mikrodizin çalışmasında; ***koroner arter hastalığı, aort yetmezliği, aort darlığı, atriyal septal defekt, mitral yetmezliği ve mitral darlığı sebepleriyle operasyona alınan 7 AF ve 10 SR*** hastasından sağ atriyal apendaj örneklemesi yapılmış; ***12000*** insan geninin temsil edildiği Affymetrix HGU95A mikroarrayleri kullanılmıştır. 33 AF-spesifik, 63-SR spesifik genin istatistiki anlamlı düzeyde 1,5 kat ve üzeri değişim gösterdiğini tespit etmişlerdir. 33 AF spesifik genin, özellikle enflamatuvar cevabın önemli regülatörlerinden biri olan transkripsiyonel aktivatör NF-IL6-β (nuclear factor-interleukin 6-β), enflamasyon genlerinden MMIF (macrophage migration inhibitory factor), bir protoonkogen olan A-raf-1 onkogen, hücre gelişimi genlerinden VEGF-B (vascular endothelial growth factor B), hücre sinyal genlerinden RhoC ve bir antioksidan olan glutatyon peroksidazın AF grubunda, normal sinüs ritimli hastaların örneklerine oranla fazla eksprese olduğunu belirlemişlerdir. Buna karşılık normal sinüs ritimli örneklerde AF grubuna göre 63 sinüs-ritim spesifik genin, özellikle sarkoplasmik retikulum Ca^{2+}-ATPase 2 ve bazı hücre solunumu ve enerji üretimi ile ilgili olan genlerin ekspresyonlarının AF grubuna göre önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir (150).

2005 yılında yayınlanan AF'un moleküler mekanizmalarının yüksek işlem hacimli mikroarray teknolojisiyle araştırıldığı bir başka çalışmada; ***kontrol grubu olarak NYHA sınıf IV olan 3 iskemik kardiyomiyopati ve 3 dilate kardiyomiyopati sebebiyle kalp transplantasyonuna alınmış 6 hastanın çıkarılan kalplerinden*** sol atriyum ve sol ventrikül örneklemesi yapılmış, doku örneklerinden elde edilen RNA'lar, ***22215*** genin temsil edildiği Affymetrix HGU133A arraylerine hibridize edilip atriyum ve ventrikül transkriptomları karşılaştırılmıştır. Ek olarak CABG operasyonuna alınan 8 SR ve 5 kalıcı AF (>5 ay) hastasından sağ atriyum örneklemesi yapılmış bu örneklerde potasyum kanal proteinlerine ilişkin QRT-PCR ile mRNA, Western blot ile protein ifadeleri araştırılmıştır (151). Bu çalışmada AF örnekleri mikrodizin analizine alınmadığı için sadece ventrikül ve atriyum arası gen ekspresyon değişiklikleri mikrodizinle araştırılmıştır.

2005 yılında yayınlanmış, ***kapak tamiri veya CABG operasyonuna alınmış 30 hastanın sağ atriyal apendajında*** gerçekleştirilmiş olan bir mikrodizin çalışmasında, 3 aydan uzun süredir AF olan ***10 kalıcı AF hastası ile 20 SR hastası*** karşılaştırılmıştır. Birlikte ***44928*** prob seti temsil eden Affymetrix HGU 133 A+B çipleri kullanılmıştır. AF grubunda; 174 ventriküler spesifik gen ifadesinin artarken 35 tanesinin azaldığını, 56 atriyal spesifik gen

ifadesi artarken 564 tanesinin azaldığını tespit etmişledir. Bu veriyle, fibrile atriyumda ***ventrikül-benzeri dediferansiyasyon*** olabileceği sonucuna varmışlardır (152).

2005 yılında yayınlanan bir başka çalışmada kapak hastalığı (***aort darlığı, aort yetmezliği, mitral darlığı, mitral yetmezliği***) sebebiyle opere edilen ***7 SR***, 1 yıldan uzun süredir AF'da olan ***11 kalıcı AF*** ve kontrol grubunu oluşturan ***11 CABG*** hastasından açık kalp ameliyatı sırasında sağ atriyum örneklemesi yapılmış; 315 genin 4116 oligonükleotitle temsil edildiği cDNA mikroarraylerine hibridize edilmiştir. Grupların yine heterojen olduğu bu çalışmada kapak hastalığının ***kardiyak iyon kanalı ve transport*** gen ifadelerinde alterasyonlara sebep olduğu tespit edilirken özellikle farklı hasta gruplarında kullanılmak zorunda kalınan farklı türde ilaçların çalışmanın en önemli sınırlaması olduğu yazarlar tarafından da vurgulanmıştır (153).

Rusya'da yapılmış ve 2006 yılında yayınlanmış bir diğer çalışmada CABG, mitral kapak replasmanı ve sol atriyal miksoma eksizyonu operasyonuna alınan ***12 AF*** hastasından ve kontrol grubunu oluşturmak üzere kardiyovasküler hastalığı bulunmayan ***10 kişiden postmortem*** (sokak kazası sebebiyle ex) sağ atriyal apendaj örneklemesi yapılmış, sağ atriyum dokularından izole edilen RNA örnekleri ***4100*** genin temsil edildiği insan cDNA ekspresyon arraylerine (Clontech) hibridize edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Altta yatan yapısal kalp hastalığından bağımsız olarak 39 genin ifadesinin farklı olduğunu, bunlar içerisinde ***sinyal iletimi, gen ifade regülasyonu, hücre proliferasyonu ve apoptozise*** işaret eden AF patofizyolojisinde etkin olabileceği düşünülen genler bulunmuştur (154).

Benzer bir AF-mikrodizin çalışması Lamirault ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (155). Çalışmada kapak hastalığı ***(mitral yetmezlik, mitral darlık, triküspit yetmezlik, aort darlık) olan AF'lu 11 hastanın sağ atriyal doku örnekleri, normal sinüs ritimli 18 hastanın*** örnekleriyle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada analiz edilen 3863 genden, 169'unun ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir. Ekspresyonu artan dokuz genin ***fibrozis*** ile ilişkili (transforming growth factor beta1), sekiz genin ise ***tromboembolik*** olaylarla ilişkili genler (α2 macroglobulin) olduğu tanımlanmıştır. Yine bu çalışmada da hastalık grubunun üniformite göstermemesi ve kontrol grubu olan hastaların koroner arter hastalarından seçilmesi nedeniyle primer patolojileri farklı hastalık gruplarının karşılaştırılması sorunu mevcuttur.

2007 yılında AF ilişkili daha önceden tanımlanmış 84 gen (kardiyomiyopati ve AF ilişkilendirilmiş) cDNA klonlarıyla hazırlanmış arrayler, ***domuzlarda yüksek hızlı atriyal pacemaker implante edilerek oluşturulmuş 6 AF modeli ve 6 SR domuzun sağ ve sol atriyum*** doku örnekleriyle çalışılmıştır. Düşük yoğunluklu cDNA arrayleriyle gerçekleştirilen bu çalışmada 31 genin AF grubunda ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir (156).

Gen ekspresyon değişimlerinin değerlendirilmesinde AF süresi de önem kazanmaktadır. AF süresinin de değerlendirildiği bir çalışmada 2 köpek AF modeli geliştirilmiştir: 1- ATP: atriyal taşikardi 2- VTP: ventriküler taşikardi. Bu iki modelde de hem 24 saatlik hem de 1 haftalık, ayrıca ATP modelinde bir de 2 haftalık olmak üzere ***5 (n=5/grup)*** grup köpekte ***21700*** transkriptin 25 merlik prob setlerle temsil edildiği "Affymetrix GeneChip Canine Genome Array"ler kullanılmıştır. ***VTP grubunda ekstrasellüler matriks ilişkili transkriptler yüksek oranda ifade edilirken ATP modelinde iyonik yeniden biçimlenme*** ilişkili transkriptlerin ifadesi artmıştır. AF süresinin gen ekspresyon değişimlerine etkisinin de değerlendirildiği bu çalışmada AF süresi ile değişen gen ekspresyonu paternleri araştırılmıştır (157). İnsanlarda AF süresi ile ilgili gen ekspresyon değişimlerinin araştırıldığı bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

2008 yılında ***47 mitral tamiri ve CABG hastasından alınan sağ atriyal apendaj*** örneğinde ***2900*** genin temsil edildiği DNA mikroarray çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada AF grubu örneklerinde kardiyak kas LIM domain proteini (CSRP3), kardiyak kas miyozin ağır zincir β izoformu (MYH7), kalmodulin (CALMS) ve homeobox protein (PKNOXI) genlerinin ifadesi artarken; metallotiyonein (MT1/2), mitokondriyal aldehit dehidrogenaz 2 (ALDH2), ras-ilişkili protein (RapIA) ve guanin nükleotid bağlanma proteini G (GNAL) genlerinin ifadeleri azalmıştır (158).

2009 yılında yayınlanan ve ***HL-1 fare atriyal miyositleri hücre serisiyle yapılan bir başka çalışmada, atriyal miyozitlerin hızlı stimüle edilmesiyle (300 bpm)*** elde edilen model normal olanıyla karşılaştırılmıştır. "Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array"ler kullanılarak yapılan çalışmada kontrol ve çalışma grubu hücre örnekleri havuzlanarak her gruba 2 array olacak şekilde hibridize edilmiştir. Bu çalışmada da AF süresi dikkate alınmıştır. ***AF ile BNP (brain natriuretic peptide) ve ANP (atrial natriuretic peptide) prekürsörlerinin, HSPlerin (heat shock proteins) ifadelerinin***

arttığını tespit etmişlerdir. 24 saat AF sürecinde 758 gen ifadesi anlamlı şekilde değişmiştir (159).

2010 yılında yayınlanan Hollanda'da yapılan bir çalışmada rat atriyal ve ventriküler miyozit hücre serilerinin karşılaştırılmasıyla atriyal biyobelirteç arayışına gidilmiş ve bu biyobelirteçin AF'da hedef olabileceği iddia edilmiştir. Illumina platformunda gerçekleştirilen mikrodizin analizinde 80 genin iki hücre grubu arasında farklı ifade olduğunu, ANP atriyal miyozitler için biobelirteç olarak kullanılabilirken BNP'nin kullanılamayacağını, AF hastalarında BNP mRNA seviyesi yüksekliğinin strese bağlı olduğunu düşünmüşlerdir. Bu çalışma örnek seçimi, örnek sayısı, deney tasarımı ve sonuçların sunumu açısından yetersiz bir çalışmadır (160).

3 aydan uzun süredir AF'da olan 10 kalıcı AF ve 20 SR hastasından mitral kapak tamiri veya CABG sırasında sağ atriyal doku örneklemesi yapılan bir başka çalışmada Affymetrix HGU 133 A ve B arrayleri kullanılarak mikrodizin analizi gerçekleştirilmiş ve ***AF ile hücre adhezyon, doku şekillenmesi ve enflamasyon*** proseslerinin yüksek oranda aktive olduğunu belirtmişlerdir. 2010 yılında yayınlanan bu çalışmada kullanılan kontrol grubu örnekleri diğer AF/mikroarray çalışmalarında olduğu gibi koroner arter hastalarından seçildiği için uygun değildir (161).

2011 yılında ***44928*** prob setin temsil edildiği Affymetrix HGU 133 A ve B arrayleri kullanılarak; ***3 aydan uzun süredir AF'da olan 10 kalıcı AF ve 20 SR*** hastasından açık kalp ameliyatı (operasyon detayı bildirilmemiş) sırasında doku örneklemesi (doku tipi bildirilmemiş) yapılmış ve mikrodizin analizi gerçekleştirilerek AF ilişkili DNA-motif araştırması yapılmıştır. İki grup arasında ***86 genin ifadesinin farklı olduğunu*** tespit etmişler ve bu genleri motif paternlerinin araştırılmasında kullanılmıştır. AF ilişkili genlerin ekspresyonunda fonksiyon gösteren 3 korunmuş DNA dizi motifinin aday olabileceğini iddia edilmiştir (162).

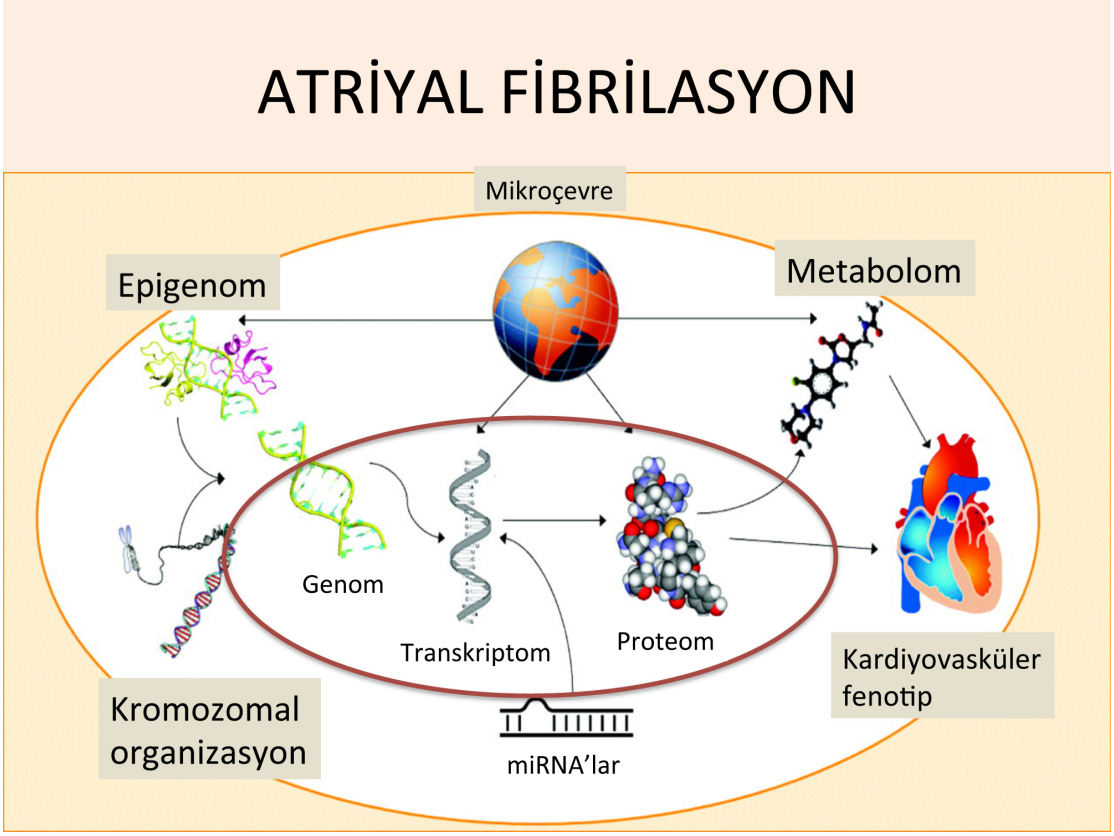
AF'un moleküler temellerini araştıran bir grup; Barth ve ark. (152) ile Censi ve ark.'nın (161) yayınladığı verileri birlikte değerlendirip 2013'te yayınlamışlardır. Bu iki çalışmanın farklı ifade edilen gen setlerini kullanarak 42 yeni farklı ifade olan gen tespit etmişler ve bu genlerin PPAR sinyal yolağı, fokal adhezyon ve dilate kardiyomiyopati ile ilişkili genler olduğunu belirlemişlerdir (163).

Anjiyotensin II tip I reseptörü (AT1) atriyal fibrozis ve yeniden şekillenmede önemli engelleyici rolü olan bir moleküldür. AT1 antagonisti olan irbesartanın AF'da transkriptom üzerine etkisini araştıran ve 2013'te yayınlanan bir çalışmada domuz modeli kullanılmıştır. ***3 domuza 600 bpm hızda 7 saat boyunca hızlı atriyal pacing (RAP) yapılmış, ek olarak 5 domuza aynı şekilde RAP yapılırken irbesartan uygulanmış, 4 domuz da kontrol grubunu*** oluşturmuştur. Sol atriyum doku örnekleri alınmış, "Affymetrix GeneChip Porcine Genome Array"ler kullanılarak mikrodizin analizi gerçekleştirilmiştir. ***Oksidatif stres, doku yeniden şekillenmesi ve enerji azalması*** ile ilgili genlerde RAP grubunda maladaptif değişiklikler saptanmış, irbesartan verilen grupta bu değişikliklerin bir miktar azaldığı tespit edilmiştir (164).

2013 yılında yayınlanan bir diğer AF-mikrodizin çalışmasında ***kapak operasyonuna (mitral yetmezliği, mitral darlığı, aort darlığı) 16 AF ve 3 SR hastasından sol atriyal apendaj (LAA) ve sol atriyum-pulmoner ven bağlantısından (LA-PV)*** doku örneklemesi yapılmış Affymetrix HGU 133A arrayleri kullanılmıştır. AF örneklerinde LAA ve LA-PV dokuları arasında gen ekspresyon profili farklılıkları tespit edilen bu çalışmada AF dokuları SR dokularıyla karşılaştırıldığında ***apoptozis, fibrozis, hipertrofi, enflamasyon*** ile ilişkili genlerin ifadelerinde farklılıklar görülmüştür. Bu çalışmada aritmogenez ve trombogenezle ilgili bölge-spesifik gen ekspresyonları elektroanatomik haritalama ile eşleşmemiştir. Kontrol grubu için yeterli örnek bulunamaması bir diğer sınırlama noktasıdır. Ayrıca bu çalışmada da diğerlerinde olduğu gibi AF altında yatan primer sebep önemsenmemiş ve çalışma grubu heterojen örneklerden seçilmiştir (165).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Atriyal fibrilasyon, çok uzun yıllar iyi huylu bir aritmi olarak algılanmış, bu nedenle hastalığın etiyopatogenezine yönelik araştırmalar ve tedavi seçenekleri kısıtlı kalmıştır. Her ne kadar AF uzun yıllardan beri tanımlanmış bir patoloji olsa da, hastalığın patogenezinin hücresel ve moleküler seviyede araştırılmasının hedeflendiği çalışmalar ancak son zamanlarda gündeme gelmiştir. Kompleks ve heterojen bir patoloji olan AF'da etkin olan moleküler yolakların net olarak ortaya konabilmesinin yolu sistem biyolojisi yaklaşımından geçmektedir (Şekil 12).



Şekil 12: AF etiyopatogenezi ve sistem biyolojisi

Klinikte en çok karşılaşılan aritmi AF'dur. AF tek başına gelişebileceği gibi (lone AF) diğer patolojilere eşlik de edebilmektedir. Geniş bir yelpazede karşımıza çıkabilen AF'dan etkilenen nüfus sayısının endüstrileşmiş ülkelerde önümüzdeki 50 yıl içerisinde iki katına çıkacağı öngörülmektedir.

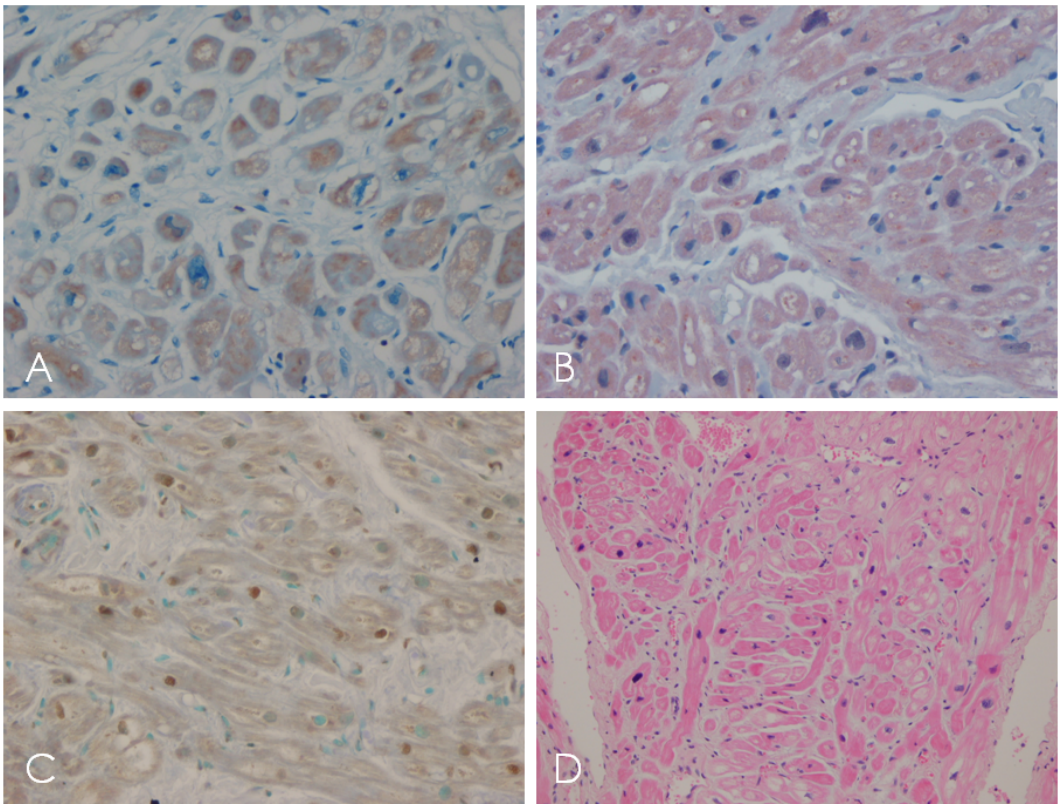
Kuramsal temeller bölümünde özetlenen çalışmalar temel alındığında şu gerekçe ve tespitleri yapmak mümkündür:

Tespit ve gerekçe 1: AF ortaya çıkış, prognoz, ve tedaviye verdiği cevaplar açısından heterojen ve kompleks bir patolojidir.

Tespit ve gerekçe 2: Fibrozis, apoptozis, enflamasyon ve oksidatif stres yolak ve mekanizmaları ile bazı genetik polimorfizmlerin AF ile olan ilişkisi 1990-2013 yılları arasında yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur.

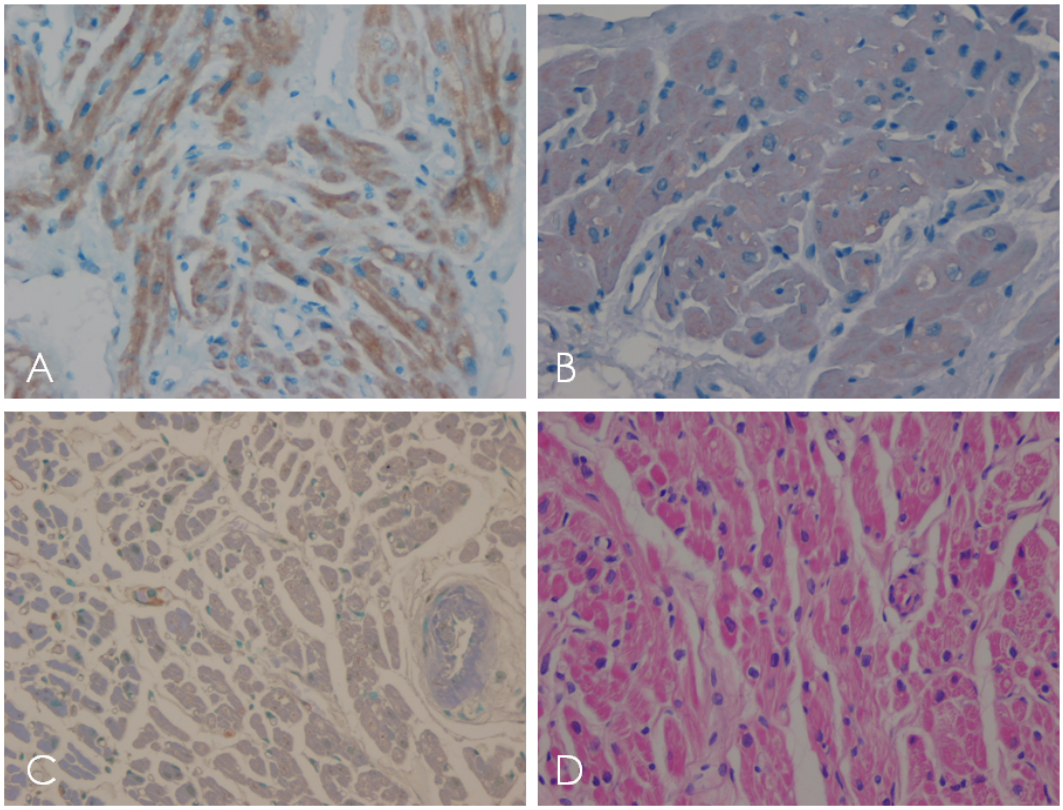
Tespit ve gerekçe 3: Ekibimizin AF patogenezinde apoptozisin rolünü araştırdığı 30 hasta ile gerçekleştirilen immünohistokimya temelli analizlerde, AF'da etken mekanizmalardan birinin apoptozis olduğunu biz de gösterdik.

Yaptığımız pilot çalışmada; kalıcı AF'u olan hastalarla (n=11) normal sinüs ritminde olan hastaların (n=19) sağ atriyal doku örneklerinde pro-apoptotik BAX ve anti-apoptotik BCL2 protein ifadeleri ile apoptozisin terminal belirteci olan DNA fragmantasyonu (TUNEL) araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda; AF'lu hastalardan alınan kesitlerde TUNEL reaksiyonunun pozitifliği % 21.86 oranında tespit edilirken kontrol grubunda bu oran % 11.82 oranında (p= 0.002) belirlenmiştir. AF'lu hastalar belirgin şekilde uniform olarak apoptozisin terminal belirteci olan TUNEL pozitifliği gösterirken kontrol grubundaki hastaların büyük çoğunluğu (11 hasta) TUNEL negatif, geri kalan hastalar düşük yoğunlukta TUNEL pozitifliği paterni sergilemişlerdir. Öte yandan bu ön çalışmada AF grubu ile kontrol grubu arasında pro-apoptotik BAX ve anti-apoptotik BCL2 dengesi arasında da farklılıklar tespit edilmiştir. Bu pilot çalışmadan elde ettiğimiz immünohistokimyasal sonuçlar aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 13 ve Şekil 14).



Şekil 13: Atriyal fibrilasyon grubu

A; Atriyal fibrilasyonlu bir hastanın kalp kasında yaygın sitoplazmik Bcl-2 ekspresyonu (AEC, x400), **B**; Kalp kasında yaygın sitoplazmik Bax ekspresyonu (AEC, x400), **C**; TUNEL metoduyla nukleusları kahverengi boyanan apoptotik kardiyak miyozitler (TUNEL, x400), **D**; Kalp kasında miyokardiyal yapı bozulmuş olup, bizar nukleuslar içeren ve nükleer büyüme gösteren miyozitler izleniyor. (HE, x400). (*Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Arşivinden alınmıştır.)*



Şekil 14: Kontrol grubu

A; Kalp kasında yaygın sitoplazmik BCL2 ekspresyonu (AEC, x400), **B**; Kalp kasında yaygın sitoplazmik BAX ekspresyonu (AEC, x400), **C**; Miyozitlerde apoptotik nükleer boyanma izlenmemektedir. (TUNEL, x400), **D**; Kalp kasında nükleer büyüme gösteren miyozitler izleniyor (HE, x400). (*Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Arşivinden alınmıştır.)*

Yaptığımız ön çalışmanın sonuçları, AF ile apoptozis arasında ilişki olduğunu göstermektedir.

Tespit ve gerekçe 4: Yukarıda da ifade edildiği üzere, birçok farklı moleküler mekanizmanın etkin olduğu AF patofizyolojisinin bütününe bakabilmek, süreçte etkin olan tetik ve aracı molekül ve yolakları belirleyebilmek üzere genom projeleri çağında moleküler analiz yaklaşımları içinde önemli bir araç olan mikroarray teknolojisiyle 2002-2013 yılları arasında 20 tane çalışma yayınlanmıştır.

Bugüne kadar AF'la ilgili yapılan gen ekspresyon değişimlerinin araştırıldığı çalışmalarda, mitral yetmezliğinin patolojik nedeni göz önüne alınmadan örnek seçimi yapılmıştır. Öngörülebileceği gibi, farklı etiyopatogenezlerin sorumlu olduğu mitral yetmezliklerde, dolayısıyla AF'da, atriyal dokuların transkriptom profillerinin de farklı olması beklenmektedir. Genom ebadında ifade profillerinin belirlenmesinin amaçlandığı

çalışmalarda, çalışmaların tasarım ve planlama aşamaları elde edilecek sonuçların "gerçek" durumu ne kadar yansıtacağını belirleyen kritik basamaklardır. Bu çerçevede karşılaştırılacak olan grupların belirlenmesi en önemli birinci aşamadır. Bütün transkriptomun bir anlamda iz düşümünün alınacağı bu tip çalışmalarda yanlış karşılaştırma ve tasarım, sonuçların bir büyük gürültü içinde kaybolmasına neden olur. İşte bu nedenle bu tez çalışmasına alınan ***hasta ve kontrol grupları izole dejeneratif mitral yetmezliği*** olgularından oluşturulmuştur. Böylelikle sonuçları etkileme ihtimali olan farklı etiyolojik nedenlerin, potansiyel farklı ekspresyon paternleri ekarte edilmeye çalışılmıştır. Öte taraftan bugüne kadar AF'un patofizyolojisinin aydınlatılmasına yönelik yapılan genom ebadında analizlerde, kontrol grubu olarak seçilen örnekler çoğunlukla koroner arter (CABG) hastalarından oluşmuştur. Koroner arter hastalarında primer patoloji ateroskleroz orijinli olduğundan bu hastalar, mitral yetmezliği hastalarına kontrol grubu oluşturma özelliğini taşımamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında kontrol grubu olarak belirlenen hastalar, dejeneratif mitral yetmezliği olan sinüs ritimli hastalardır. AF ile ilgili gen ekspresyon değişimlerinin tanımlanmasına yönelik çalışmalarda primer kalp patolojisinin uniform olduğu ve kontrol grubunu oluşturan örneklerin primer patoloji açısından benzer olduğu genom ebadında karşılaştırmalı bir çalışma bugüne kadar yapılmamıştır.

Literatürdeki AF'a neden olan biyokimyasal yolakların belirlenmesine yönelik yapılan mikrodizin çalışmalarında; fibrozis, enflamasyon, apoptozis, oksidatif stres, hücre gelişimi ve sinyal iletimi, dediferansiyasyon ve iyon kanalları ile ilgili genlerin ekspresyonlarında farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmaların sonuçları, hem hasta ve kontrol grubunun homojen olmaması, hem de örnek sayılarının yetersiz olması nedenleriyle çelişkilidir. Ayrıca bu çalışmalarda AF grubuna alınan hastaların AF süreleri de net olarak belirtilmemiştir. Bugüne kadar insanlar üzerinde yapılan genom ebadında ifade analizi çalışmalarında AF süresi dikkate alınmamıştır. Bu tez çalışmasında; çalışma grubunu oluşturan hastalar, üzerinde uluslararası konsensus oluşmuş ve kılavuzlara girmiş tanımlamalara uygun olarak seçilen izole, kalıcı (permanent) AF olgularından seçilmiştir. Bu sayede araştırmadan elde edilen sonuçlar üniform bir patolojiye ait olma özelliğini taşımaktadır.

Görüldüğü üzere yayınlanan 20 AF-gen ekspresyon analizi çalışmasında AF'un primer sebebine bakılmaksızın birden fazla alt grubu içeren heterojen hasta grupları çalışmalara

dahil edilmiştir. Mikroarray gibi genom ebadında transkriptom araştırması yapabilen yüksek işlem hacimli bir teknoloji kullanırken karşılaştırma yapılacak gruplar ne kadar homojen olursa gürültü de o kadar az olacaktır.

Hipotez: Birçok moleküler mekanizmanın etken olduğu heterojen bir patoloji olan AF'da etken moleküler yolakların belirlenmesinde, bu heterojen patoloji grubu içerisinde belirlenen en homojen alt grubun transkriptom ebadında analiz için kullanılması, AF moleküler analizlerinin yürütülmesi için daha iyi bir model oluşturur mu?

Bütün bu tespit ve gerekçelerden hareketle bu tez çalışmasının amacı; dejeneratif mitral yetmezliğinin ilerleyen patolojik süreci sonrasında ortaya çıkan AF'lu olgular ile yine dejeneratif mitral yetmezliği olan ancak kalp ritmi açısından korunmuş normal sinüs ritimli hastaların atriyal doku örneklerinde genom ebadında analiz ile karşılaştırma yapılmasıyla AF patofizyolojisinde etkili olabilecek tüm yolakların araştırılmasıdır. AF sürecindeki atriyal kalp kası dokularında özellikle apoptozis ile ilişkili gen ekspresyonları değişiminin araştırılması birincil hedef noktasını oluşturmuştur. Bu kapsamda transkriptom profilinde belirlenen gen seti içinde apoptozisle ilişkilendirilmiş genler bu araştırmanın öncelikli hedefleri arasında yer almıştır. Bu amaçla cerrahi tedavi endikasyonu bulunan kalıcı AF hastalarıyla normal sinüs ritimli hastalardan alınan atriyal dokularda, apoptozisi regüle eden proteinler ayrıca araştırılmıştır. AF'lu hastaların atriyal dokularında apoptotik hücrelerin varlığı geçirmeli elektron mikroskopiyle de incelenmiştir. Çalışmanın ikincil amacı, araştırmada kullanılan genom ebadında ifade analizine olanak veren mikrodizin yöntemi sayesinde, ekspresyon paterni değişen diğer moleküler yolaklarla ilişkili genlerin de değerlendirilmesi olmuştur. Bu sayede hastalığın patogenezinden sorumlu olabilecek apoptozis dışında etiyolojik nedenler de araştırılabilmiştir. Her iki grup hastaların, ameliyat sonrası hastanede geçirdikleri dönemde sürekli EKG ile ritim takibi yapılmıştır. Böylelikle klinik izlemde tespit edilen ritim değişimleri ile gen ekspresyon değişimleri birlikte takip edilmiştir. Yeni gelişen ritim problemleri ile gen ekspresyon değişimleri arasında da ilişki kurulmaya çalışılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında; dejeneratif mitral kapak yetmezliğine eşlik eden AF'un etiyopatogenezinde etkili olan moleküler mekanizmalar üzerine yoğunlaşılmıştır. AF'un etiyopatogenezinden sorumlu olabilecek genlerin ifadesi genom ebadında analiz edilmiş ve ayrıca apoptozisle ilişkisi araştırılmıştır. Toplam 30 dejeneratif MY olan; 15'i AF'lu, 15'i sinüs ritimli hastanın sol ve sağ atriyum doku örneklerinde 54.675 transkriptin temsil

edildiği mikrodizin analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gen ekspresyon verisi üzerinde farklı ifade düzeyi gösteren genlerin belirlenmesi amacıyla biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, R/Bioconductor platformu üzerinde lineer modeller yaklaşımını kullanan limma paketi kullanılmıştır. Toplam 60 örnekte gerçekleştirilen transkriptom analizi sonrasında sinüs ritimli ve AF'lu doku örneklerinde farklı diferansiye olan gen setleri belirlenmiş, fonksiyonel anotasyon ve yolak analizleri gerçekleştirilmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

Tez çalışması için Ankara Üniversitesi lokal etik kurulundan 14 Ağustos 2008 tarihinde 136-3994 karar numarasıyla onay alınmıştır. Çalışmanın kapsamını genişletmek amacıyla sol atriyum doku örneklerinin çalışmaya dahil edilmesi için protokol değişikliği başvurusu 30 Ocak 2012 tarihinde 02-57-12 karar numarasıyla kabul edilmiştir. Örnekleme öncesinde tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam formu alındıktan sonra, bu hastalar çalışmaya dahil edilmiştir (Ek 1: Bilgilendirilmiş onam formu örneği).

4.1.1. Hasta Kohortu

Dejeneratif mitral kapak yetmezliği (MY) nedeniyle kalp cerrahisine alınan 15 kalıcı AF'lu ve 15 normal sinüs ritimli hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya Alınma Kriterleri:

1. Ciddi dejeneratif MY nedeniyle kalp cerrahisine alınan kalıcı AF'lu veya sinüs ritmindeki hastalar,
2. Transtorasik ekokardiyografi ile regürjitan volümü 45 ml üzerinde olan dejeneratif MY olan hastalar,
3. Pulmoner arter basıncı 45 mmHg'nın üzerinde olan hastalar (orta ve ciddi pulmoner hipertansiyon)
4. AF grubunda olan hastaların sol atriyum çapı 5 cm üzerinde olanlar.

Çalışmadan Dışlanma Kriterleri:

1. Kontrol grubu için daha önceden geçirilmiş paroksismal AF ya da atriyal flutter hikayesi,
2. İkinci ya da üçüncü derece kalp bloğu,
3. Pacemaker takılma hikayesi,
4. Wolff-Parkinson-White Sendromu,
5. Tanımlanmış Brugada Sendromlu hastalar,
6. Romatizmal kalp hastalığı hikayesi, geçirilmiş miyokard infarktüsü, konjenital MY,

7. İnfektif endokardit hikayesi,
8. Künt veya penetran toraks travması hikayesi
9. Dilate kardiyomiyopati.
10. HBV, HCV enfeksiyonu, geçirilmiş tüberküloz enfeksiyonu,
11. Kronik böbrek yetmezliği,
12. EF %30'un altında olması,
13. Otoimmun hastalık,
14. Vaskulit,
15. Miyokardit,
16. Genetik orjinli hastalık,
17. Geçirilmiş ya da mevcut malignite hikayesi,
18. Hastanın yazılı onam vermemesi.

4.2. Yöntem

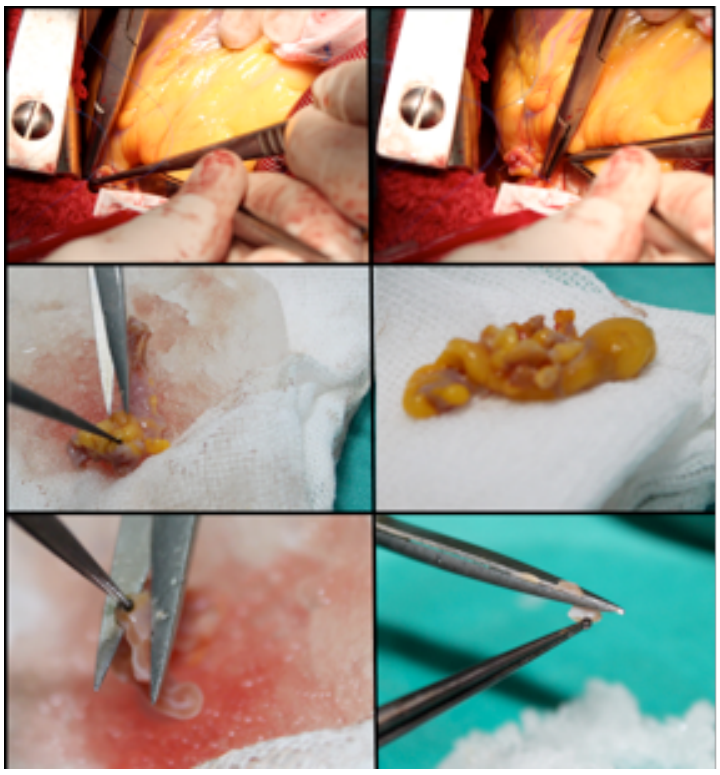
4.2.1. Operasyon Detayları

Operasyona alınacak hastalara, operasyon öncesi premedikasyon amacıyla Midazolam (Dormicum® 5 mg/5 ml ampul, Roche, Türkiye) 2 mg i.v, Sefazolin sodyum (Cefamezin® 1000 mg Flakon, Fujisawa-Eczacıbaşı, Türkiye) i.v uygulanmıştır. Genel anestezi amacıyla 5 mg Midazolam i.v, 20 mg Etomidat i.v (20 mg), 500 mcg Fentanyl i.v (Fentanyl®, Janssen-Cilag, Türkiye), % 1-1.5 İsofluran inhaler ve 4 lt/dk 02 kullanılmıştır. Kardiyopulmoner bypassa girilmeden önce kontrol ve çalışma grubundaki tüm hastalarda sağ atriyuma 4/0 polypropilen sütür ile purse-string sütür konulduktan sonra, örnek alınacak dokuyu travmatize etmemek amacıyla minimum manipülasyonla yaklaşık 1.5×1.5×0.5 cm^3 boyutlarındaki sağ atriyum dokusu eksize edilmiştir. Kardiyopulmoner bypassa girildikten sonra uygun zamanda kross-clamp konulmasını takiben 1.5×1.5×0.5 cm^3 boyutlarındaki sol atriyum appendajı eksize edilmiştir. Sol atriyum appendajı 4/0 polypropilen sütür ile devamlı dikiş tekniği kullanılarak kapatılmıştır.

4.2.2. Atriyum Dokularının İntraoperatif Preperasyonu

Kardiyopulmoner bypassın gen ekspresyonu profili üzerine olası etkilerinden kaçınmak amacıyla atriyum doku örneklemesi için bir strateji geliştirmiştir. Mümkün olan en az manipülasyon ile 1.5x1.5x0.5 cm^3 ebadındaki atriyum dokusunun eksize edilerek sıvı azot tankı aracılığıyla ameliyathaneden laboratuvara transfer edilmesi, örneklenen atriyumda

meydana gelebilecek hasarı ve değişimleri minimuma indirmektedir. İlk aşamada atriyal doku üzerinde yer alan ve total RNA içeriği açısından fakir olduğu bilinen epikardiyal yağ dokusu ince diseksiyonla hariçlenmiştir. İkinci aşamada, operasyon esnasında örneklenen atriyal dokuda, sonraki total RNA izolasyonu aşamasında ikinci bir mekanik homojenizasyon gereksinimini ortadan kaldıracak ve araştırma ekibimiz tarafından tariflenmiş olan "intraoperatif atriyal mikrodiseksiyon" tekniği kurgulanmıştır (Şekil 15). Epikardiyal yağ dokusu ince diseksiyonla hariçlenen atriyal doku yaklaşık 15 mg'lık parçalara ayrıldıktan sonra, koroner mikrocerrahi penset ve makasıyla mikrodiseksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu aşamada iki bistüri kullanılarak, bistüri-bistüri mikrodiseksiyon da yapılabilmektedir. Bu şekilde atriyum dokuları dondurulmadan önce mekanik olarak homojenize edildiğinden sonraki aşamalarda yeterli miktarda ve iyi kalitede RNA izolasyonu sağlanabilmiştir.



Şekil 15: İntraoperatif atriyal mikrodiseksiyon tekniği

4.2.3. İmmünohistokimya ve DNA Fragmantasyon Analizleri

İmmünohistokimya Analizleri: Atriyum dokularından alınan örnekler %10 formaldehitte fikse edildikten sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler 56°C'lik etüvde deparafinize edildi. Endojen peroksidazı bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksitte 10 dk süre ile bekletildi. Fosfat buffer solüsyonu ile yıkandıktan sonra "antijen retrieval" işlemi için BCL2L1, BAX, BAK, CAPNS1, CASP3 ve CASP8 antikorları ile boyanacak kesitler Tris EDTA (pH 9.0), BCL2 antikoru ile boyanacak kesitler 0.01 M sodyum sitrat buffer (pH 6.0) solüsyonu içinde toplam 20 dk süre ile mikrodalga fırında işlemden geçirildi. İmmünohistokimyasal boyama streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi kullanılarak yapıldı. Kesitler **BCL2** (1:80 dilüsyon, monoklonal mouse, klon Bcl-2/100/D5, Novocastra, Newcastle Upon Tyne, İngiltere), **BCL2L1** (1:50 dilüsyon, monoklonal rabbit, klon E18, ab32370, Abcam, Massachusetts, A.B.D.), **BAX** (1:100 dilüsyon, poliklonal rabbit, ab7977), **BAK** (1:250 dilüsyon, monoklonal rabbit, klon Y164, ab32371), **CAPNS1** (1:250 dilüsyon, monoklonal rabbit, klon EPR3324, ab92333), **CASP3** (1:80 dilüsyon, monoklonal mouse, klon JHM62, Novocastra) ve **CASP8** (1:80 dilüsyon, monoklonal mouse, klon 11B6, Novocastra) ile oda sıcaklığında iki saat süre ile inkübe edildi (Tablo 2). Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla 3-amino-9-etilkarbazol (AEC, Novocastra) ile 10 dk süre ile inkübe edildi. Kesitler Mayers hematoksilen ile zemin boyaması yapılarak kapatıldı. Ayrıca primer antikorun uygulanmadığı negatif kontrol boyama yapıldı. Pozitif doku kontrolü olarak BCL2, BAX, ve CASP3 için tonsil, BCL2L1 için prostat karsinomu, BAK için meme karsinomu, CAPNS1 için böbrek ve CASP8 için testis dokusu kullanıldı. İmmünohistokimyasal incelemede miyositlerin yoğun olarak izlendiği rastgele beş mikroskobik alan taranarak yapıldı. %10'dan fazla sitoplazmik boyanma gösteren miyositler pozitif olarak kabul edildi.

In Situ DNA Fragmantasyon Analizi (TUNEL): Kardiyak dokularda in situ DNA fragmantasyonu, TdT-(terminal deoksinükleotidil transferaz) aracılı floresan-dUTP işaretleme (TUNEL) yöntemiyle belirlendi (Tablo 2). TUNEL, üreticinin talimatlarına göre ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis detection kit (S7110, Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) kullanılarak uygulandı. Apoptotik hücrelerin görüntülenmesi için peroksidaz substrat 3.3-diaminobenzidin kullanıldı. Nükleer boyama için methyl green (%0.5) kullanıldı. TUNEL-pozitif hücreler ışık mikroskobu (Olympus, Bx51, Japan)

altında görüntülendi. TUNEL pozitif hücreler sayıldıktan sonra her kardiyak dokudaki apoptotik hücrelerin oranı, toplam kas hücre çekirdek sayısına göre hesaplandı.

İmmünohistokimya ve TUNEL sonuçlarının hesaplanması, örneklere kör iki araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.

Tablo 2: İmmünohistokimyasal analizleri gerçekleştirilen antikorların gen ad ve sembolleri, HUGO ID'leri, protein ad ve sembolleri

Approved Name (HGNC)	Approved Gene Symbol (HGNC: HUGO Gene Nomenclature Commitee)	HGNC ID	Recommended Protein Name (UniProt)	UniProt ID (UniProt Symbol)
B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	HGNC:990	Apoptosis regulator Bcl-2	P10415 (BCL2_HUMAN)
BCL2-associated X protein	BAX	HGNC:959	Apoptosis regulator BAX	Q07812 (BAX_HUMAN)
BCL2-antagonist/killer 1	BAK1	HGNC:949	Bcl-2 homologous antagonist/killer	Q16611 (BAK_HUMAN)
BCL2-like 1	BCL2L1	HGNC:992	Bcl-2-like protein 1	Q07817 (B2CL1_HUMAN)
caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP3	HGNC:1504	Caspase-3	P42574 (CASP3_HUMAN)
caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP8	HGNC:1509	Caspase-8	Q14790 (CASP8_HUMAN)
calpain, small subunit 1	CAPNS1	HGNC:1481	Calpain small subunit 1	P04632 (CPNS1_HUMAN)
deoxynucleotidyltransferase, terminal	DNTT	HGNC:2983	DNA nucleotidylexotransferase	P04053 (TDT_HUMAN)

4.2.4. Geçirmeli (Transmission) Elektron Mikroskopik Çalışma (TEM)

Elektron mikroskobik inceleme için kullanılacak atriyum dokuları, %2 (w/v) parafolmaldehit ve %2,5 (v/v) gluteraldehit içeren 0,2 M fosfat tamponu içerisinde 40°C'de 3 saat süreyle bekletilerek fikse edildi. Örnekler, 3 defa 0,1 M fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra, %1'lik osmium tetroksit içeren 0,1 M'lık fosfat tamponu ile 1 saat süreyle oda sıcaklığında muamele (post-fiksasyon) edildi. 3 defa tamponla yıkama yapılmasını takiben, örnekler dereceli etanol solüsyonları kullanılarak dehidrate edildi ve sonrasında Araldite gömüldü. 1 μm kalınlığında elde edilen yarı ince kesitler üzerinde, %1'lik toluidin mavi boyaması yapıldı. Elektron mikroskobik olarak incelenek bölgeler tespit edildi. Seçilen bölgelerden, Leica Ultracut R mikrotom kullanılarak 60 ila 80 nanometre inceliğinde ultra ince kesitler elde edildi, kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat kullanırak boyandı. Kesitler, LEO 906 E (80 kV- Oberkohen- Almanya) elektron mikroskobu kullanılarak fotoğraflanıp, incelendi.

4.2.5. Mitral Yetmezlik Etiyolojisinin Patolojik Tespiti

Tez çalışmasında izole dejeneratif mitral yetmezliği olan atriyal fibrilasyonlu ve sinüs ritimli hastaların gen ekspresyon paternleri karşılaştırılmıştır. Bu nedenle mitral kapak replasmanı operasyonu yapılan hastalarda çıkarılan anterior ve/veya posterior mitral kapakçık örneklerinde mitral yetmezlik etiyolojisi açısından patolojik değerlendirme yapılmıştır. Anterior ve/veya posterior mitral kapakçık örneklerinin patolojik incelenmesi Gazi Üniversitesi Patoloji ABD'da gerçekleştirilmiştir. Mitral kapak yetmezliği etiyolojisinin dejeneratif olduğu tüm örneklerde doğrulandı. Parafinli mitral kapak doku örnekleri 5 dakika boyunca ksilen içerisinde bekletildi. Örnekler her biri 5'er dakika olacak şekilde sırasıyla % 100, % 75 ve % 50 etil alkol içerisinde bekletildi. Daha sonra örnekler distile su içerisinde yıkandı. Daha sonra örnekler 2 dakika boyunca hematoksilen içerisinde bekletildi. Örnekler musluk suyu içerisinde yıkandı. Örnekler birkaç saniyeliğine % 1 asit alkolde bekletildi. Daha sonra tekrar musluk suyu içerisinde yıkandı. Örnekler amonyum içerisinde 30 saniye bekletildi. Örnekler tekrardan musluk suyu içerisinde yıkandı. Daha sonra örnekler eozin içerisinde 1 dakika bekletildi. Örnekler tekrardan musluk suyu içerisinde yıkandı. Dehidrasyon işlemini gerçekleştirebilmek için örnekler sırasıyla % 50, % 75 ve % 100 etil alkolde bekletildi. Son olarak lam üzerindeki örnekler % 50 gliserol kullanılarak lamel ile kapatıldı. Kesitler, ışık mikroskobunda incelendi ve fotoğraflandı.

4.2.6. Atriyum Dokularından RNA İzolasyonu

Mikrodizin analizleri için yeterli miktarda ve yeterli kalitede total intakt RNA izolasyonu için yukarıda tanımladığımız homojenizasyon metodolojisi sonrasında "Ambion MELT^{TM} Total Nucleic Acid Isolation System (Ambion, katalog no: AM1983)" kullanılmıştır.

MELT Reaktifleri:

- Wash I Solution Concentrate içine 8.25 ml absolut etanol eklenerek dilüe edildi (oda sıcaklığı (RT)'nda saklandı).
- Wash II Solution Concentrate içine 48 ml absolut etanol eklenerek dilüe edildi (RT'da saklandı).
- Vorteks adaptor takılarak, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 100 µl MELT Buffer (denge su ile) koyup en yüksek hızın hemen altında MELT Buffer'ın köpürmediği seviyeye vorteks ayarlandı.
- 6 Tube Magnetic Stand "tilted" pozisyona getirildi.

Doku Lizatının Hazırlanması:

1. Her örnek için 100 µl Binding Solution (taze hazırlanması, RT'da saklanması ve 24 saat içerisinde kullanılması gerekmektedir)
2. Her örnek için 96 µl MELT Buffer, 4 µl MELT Coctail RT'a gelince hazırlandı.
3. Her örnek için ayrı 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 96 µl MELT Buffer + 4 µl MELT Coctail hazırlandı. Alt üst, spin down yapıldıktan sonra içlerine doku örnekleri konuldu.
4. Doku örneklerini içeren tüpler, enzimatik homojenizasyon amacıyla ayarlanan hızda 10 dk vortekslendi. Vorteksleme sırasında 0.5 cm'lik köpük (foam) kabul edilebilir sınırlar içerisindedir.
5. Oluşan MELT lizatı (homojen ve opak görünümlü) oda ısısında maksimum 6 gün saklanabilir.

RNA Pürifikasyonu:

1. Binding Bead Master Mix: Her bir örnek için ayrı ayrı hazırlandı

- 10 µl Binding Beads (önce votrekslendi)
- 100 µl Binding solution (içine 4.8 µl β-merkaptoetanol konuldu)
- 100 µl % 80 Etanol

2. MELT lizatları 10.000 G'de 3 dk santrifüj edildi.
3. Binding Bead Master Mix içeren tüplere MELT lizatları eklendi. (Santrifüj sonrası tüpün dibinde oluşan debrisin alınmamasına dikkat edildi.)
4. 5-10 kez nazikçe pipetaj yapıldı.
5. 2 dk RT'da inkübasyon
6. Tüpler manyetik standa konuldu. RT'da 3-4 (max 5 dk) beklendi.
7. Binding beadlere zarar vermeden standden kaldırmadan süpernatan atıldı.
8. Manyetik standden alınarak 300 µl wash solution I ile yıkandı.
9. Tüpler tekrar manyetik stande konularak, capture olması beklendi.
10. Süpernatan atıldı.
11. Standden alınarak 300 µl wash solution II ile 1 kez yıkandı.

RNA Elüsyonu:

1. Tüpler manyetik standden alınarak wash solution II ile 1 kez yıkandı ve süpernatan atıldı.
2. Tüpler manyetik stand üzerindeyken kapaklar açılarak 5 dk RT'da kurutuldu (bu esnada overdry olmamasına özellikle dikkat edildi).
3. Kuruma işlemi sonrasında tüpler manyetik standden alındı.
4. Elution buffer kısaca vortekslendi.
5. Her örneğe 40 µl Elution Buffer eklendi. Bubble oluşturmadan nazikçe pipetaj yapıldı.
6. 2 dk RT'da inkübasyon yapıldı.
7. Tüpler manyetik standde 5 dk bekletildi.
8. Binding beadler pelet olunca, transparan RNA içeren elution buffer kitle verilen 0.5 ml'lik elution tube içerisine alındı.

RNA'lar aliquotlandıktan sonra -80 °C kaldırıldı.

4.2.7. RNA Kalite ve Konsantrasyonunun Tayini

RNA Agaroz Jel Elektroforezi ve Spektrofotometrik Analiz:

İzole edilen RNA örnekleri % 1'lik agaroz jel elektroforezinde bütünlük analizine alınmıştır. Agaroz istenilen yüzdede hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) çözünmesi sağlandı. Çeker ocak altında üzerine 5 µl etidyum bromid ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra jel tablasına dökülerek donması için 20-30 dakika bekletildi. %1'lik agaroz jel elektroforez tankına yerleştirildi. 3 µl RNA, 3 µl 6x loading dye ile karıştırılarak jele yüklendi. Örnekler 100 voltta 30 dakika yürütüldü. UV görüntüleme sistemi (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) kullanılarak görüntülendi ve termal yazıcı (SonyUP-D895) ile fotoğraf çıktısı alındı. İntakt total RNA görüntüsünde 18S ve 28S bantları görülmelidir. 28S bandı 18S bandının yaklaşık iki katı kalınlıkta olmalıdır.

RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (NanoDrop ND 1000) kullanılarak ölçüm yapıldı. 260 nm RNA'nın, 280 proteinin ve 230 ise fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyudur. RNA'nın saflığı

değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakılmaktadır. Saf RNA'nın A260/A280 oranı 1,8-2 arasında olması gerekirken A260/A230 oranının 2'ye çok yakın olması gerekmektedir.

Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması:

5xTBE (Tris-HCl, Borik asit, EDTA)

54 g Trisma Base (Sigma T6066)

27,5 g Borik asit (Sigma B6768)

20 ml 0,5 M EDTA (Sigma E5134)

deiyonize suyla (ddH_2O) 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Ethidium Bromid (10 mg/ml)

Etidyum bromid (Scharlau ET0109) son konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde

sulandırıldı.

DNA Ladder (Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus)

DNA Ladder'a 166 µl 6x Loading Dye (Fermentas 0611) ve 734 µl distile su eklenerek vortekslendi.

%1'lik Agaroz Jel

Agaroz (Sigma A 5093-500G) 1 g/100 ml (%1) olacak şekilde hassas terazide (Shimadzu BX320H) tartıldı. Üzerine 1xTBE (Tris-HCl, Borik asit, EDTA) ilave edildi. 1xTBE solüsyonu stok olarak 5xTBE solüsyonundan ddH_2O ile 1/5 oranında seyreltilerek hazırlandı.

Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Picochip'te RNA Analizi:

1. Aliquotlanmış 65 µl RNA 6000 Pico Gel Matrix içerisine 1 µl RNA 6000 Pico Dye Concentrate eklendi, iyice vortekslendi ve 10 dk, RT'da, 13000 g'de santrifüj edildi.
2. RNA Picochip açıldı. İçi boyalı olan jel kuyusuna 9 µl Gel-Dye mix konulup Chip Priming Station üzerine yerleştirildi.

3. Şırınga 1 ml yavaşça itildi, 30 sn beklendi, plunger'a basılıp kendiliğinden yükselmesine izin verildi. 10 sn daha beklenip RNA Picochip istasyondan çıkarıldı.
4. Diğer 2 jel kuyusuna da 9 µl Gel-Dye mix konuldu.
5. CS işaretli kuyuya 9 µl RNA 6000 Pico Conditioning Solution konuldu.
6. Örnek yüklenecek tüm kuyulara ve ladder kuyusuna 5 µl RNA 6000 Pico Marker yüklendi.
7. Yürütülecek RNA örnekleri ve picoladder 70°C'de 2 dk denatüre edildi ve hemen buz üzerine alındı.
8. 1 µl RNA örnekleri ve 1 µl picoladder picochip üzerindeki kuyulara yüklendi.
9. Picochip 1200 rpm'de, RT'da, 2 dk vortekslendi.
10. Bioanalyzer RnaseZap ve ddH_2O ile temizlendi. Picochip Bioanalyzer'a yerleştirildi.
11. Eukaryot PicoRNA programında RNA'lar yürütüldü.

4.2.8. Affymetrix GeneChip 3' IVT Express Kit ile RNA'nın Hibridizasyonu

Çalışmaya dahil edilen 15 AF'lu ve 15 sinüs ritimli hastanın sağ ve sol atriyal doku örneklerinden (n=60) mikrodizin analizi gerçekleştirilmiştir. Böylece 30 AF ve 30 sinüs ritmi doku örneği (sağ ve sol atriyum örneklerinden) mikrodizin analizine tabii tutulmuştur.

cRNA Sentezi: cRNA sentezlenmek istenen RNA örnekleri 3 µl hacimde 500 ng olacak şekilde ayarlandı. 500 ng RNA örneği alınıp hacmi 3 µl olana kadar suyu SpeedVac Nükleik asit konsantratöründe uçuruldu veya ddH_2O eklendi.

PolyA kontrollerinin seri dilüsyonları aşağıdaki şekilde hazırlandı:

500 ng için:

- Dil 1: 1/20
- Dil 2: 1/50
- Dil 3: 1/50
- Dil 4: 1/2

Total RNA+ PolyA Kontrol Karışımı:

Total RNA (500 ng) 3 µl + Dil 4 2 µl V_T= 5 µl

cDNA 1. iplik sentezi için revers transkripsiyon:

First-Strand Buffer Mix 4 µl + First-Strand Enzyme Mix 1 µl V_T= 5 µl

Total RNA+ PolyA kontrol karışımına eklenip (V_T= 10 µl)

42°C'de 2 saat inkübe edildi.

cDNA 2. iplik sentezi:

Nuclease Free Water 13 µl + Second-Strand Buffer Mix 5 µl + Second-Strand Enzyme Mix 2 µl (V_T= 30 µl)

16°C'de 1 saat inkübasyon, sonra 65°C'de 10 dk inkübe edildi.

Etiketli cRNA sentezi için *In Vitro* Transkripsiyon:

IVT Biotin Label 4 µl + IVT Labeling Buffer 20 µl + IVT Enzyme Mix 6 µl (V_T= 60 µl)

40°C'de 4 saat inkübe edildi.

Elde edilen cRNA, ertesi gün pürifiye edilmek üzere -20°C'ye kaldırıldı.

cRNA Pürifikasyonu: cRNA örnekleri bir gece -20°C'de bekledildikten sonra devam edildi.

cRNA Binding Mix:

RNA Binding Beads 10 µl + cRNA Binding Buffer Concantrate 50 µl

- cRNA'nın üzerine eklendi.
- 120 µl %100 etanol eklendi. Plate çalkalayıcı vorteks üzerinde 4. derecede 2 dk vortekslendi.
- Tüp manyetik stand üzerine yerleştirildi. 5 dk beadlerin yakalanması beklendi.
- Süpernatan atıldı.
- Beadler 100 µl Wash Solution ile yıkandı. Plate çalkalayıcı bu sefer 7. dereceye ayarlandı ve 1 dk vortekslendi.
- Tüp manyetik stande yerleştirildi. Beadler yapıştıktan sonra süpernatan atıldı.
- Yıkama işlemi tekrarlandı.

cRNA Elüsyonu:

cRNA Elution Buffer'dan 50 µl tüpün içine konulup pürifiye cRNA elüe edildi.

Pürifiye cRNA Fragmantasyonu: 15000 ng olacak şekilde pürifiye cRNA alındı. 5X Array Fragmantation Buffer'dan 8 µl eklendi. Toplam hacim 40 µl olacak şekilde Nuclease Free Water ilave edildi. 94°C'de 35 dk fragmantasyon reaksiyonu yapıldı.

Hibridizasyon: Kullandığımız array 49/64 formatında olduğu için hibridizasyon kokteyli aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Hibridizasyon Kokteyli:

Fragmante ve etiketli cRNA 33,3 µl

Kontrol oligonükleotid B2 4,2 µl

20X Hibridizasyon kontrolleri (bioB, bioC, bioD, cre) 12,5 µl

2X Hibridizasyon Buffer 120 µl

Herring Sperm DNA 2,5 µl

BSA 2,5 µl

DMSO 25 µl

Nuclease Free Water 50 µl

V_T= 250 µl

- Hibridizasyon kokteyli 99°C'de 5 dk inkübe edildi.
- 2X hibridizasyon buffer, 1:1 oranında dilüe edildi. 1X hibridizasyon buffer'dan 200 µl array içerisine doldurudu.
- Array 45°C'de 60 rpm'de 10 dk ön ısıtmaya tabi tutuldu.
- Hibridizasyon kokteyli 5 dk 45 °C'de ısıtıldı.
- Hibridizasyon kokteyli 5 dk maksimum hızda santrifüj edildi.
- Arrayin içindeki 1X hibridizasyon buffer atıldı.
- Array 200 µl hibridizasyon kokteyli ile doldurudu.
- Array hibridizasyon fırınına yerleştirildi.
- 45°C'de 60 rpm'de 16 saat hibridize edildi.

Yıkama, Boyama, Tarama: Array hibridizasyon fırınından alındı ve içindeki hibridizasyon kokteyli atıldı.

SAPE Solution Mix:

2X Stain Buffer 600 µl

50 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) 48 µl

1 mg/ml SAPE 12 µl

DI H_2O 540 µl

V_T= 1200 µl

SAPE Solution mix, 2'ye bölündü ve boyama solüsyonlarının 1. ve 3.'sü hazırlanmış oldu.

Antibody Solution:

2X Stain Buffer 300 µl

50 mg/ml BSA 24 µl

10 mg/ml Goat IgG Stock 6 µl

0,5 mg/ml biotinlated antibody 3,6 µl

DI H_2O 266,4 µl

V_T= 600 µl

Böylece 2. boyama solüsyonu da hazırlanmış oldu.

Array; yıkama, boyama, tarama istasyonuna yerleştirildi. EukGE- WS2v5_450 programı seçildi. Array yıkandı ve boyandı. Sonra çıkarılıp scanner'a yerleştirildi ve tarandı.

4.2.9. Hibridizasyonu Tamamlanan Örneklerin Biyoinformatik Analizleri

AF ve sinüs ritimli hastalara ait örneklerin mikrodizin deneylerinden elde edilen tüm genom gen ifade verisi (whole genome gene expression data), R platformunda veriye özel geliştirilmiş analiz yöntemlerini uygulamak üzere tasarlanmış ve literatürde defalarca verifikasyonu gerçekleştirilmiş R paketleri kullanılarak analiz edilmiştir. Veri üzerinde;

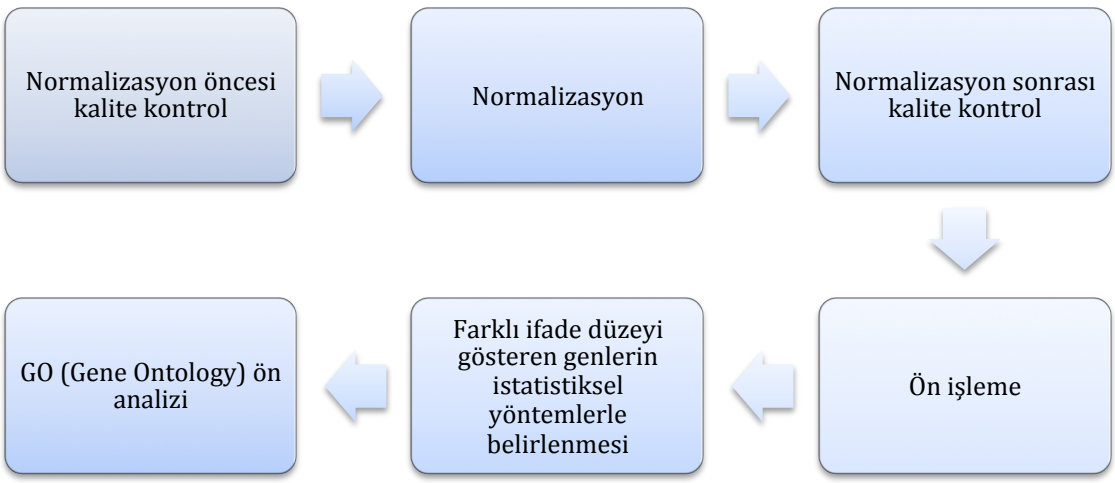
- Kalite Kontrol Analizi
- Ön işleme

    ⇒ Görüntü analizi
    ⇒ Arkaplan düzeltmesi (Background correction)
    ⇒ Normalizasyon (Normalization)
    ⇒ Özetleme (Summarization)

- Farklı ifade düzeyi gösteren genlerin istatistiksel yöntemlerle belirlenmesi
- GO (Gene Ontology) ön analizi

işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Analiz süreci aşağıdaki Şekil 16'da özetlenmiştir.



Şekil 16: Biyoinformatik analiz sürecinin akışı

Kalite Kontrol Analizi:

Mikrodizin verisinden sonuç çıkarımına yönelik analizlerden, yani farklı ifade düzeyi gösteren genlerin istatistiksel yöntemlerle belirlenmesi işleminden önce ön analizlerden geçirilmesi gerekmektedir. Mikrodizinden elde edilen verinin biyoinformatik analiz sürecinin akışı Şekil 16'da özetlenmiştir.

Bu analizlerden ilki, elde edilen verinin ıslak laboratuvar çalışmaları sonrasında sonuçların eldesinde yan (bias) yaratmayacak nitelikte olduğuna karar vermek üzere gerçekleştirilen kalite kontrol analizleri; ikincisi ise, kalite kontrol aşamasını takiben gerçekleştirilen ön işleme aşamasıdır.

Kalite kontrol analizi boyunca aşağıda bahsi geçen yöntemlerden yararlanılmıştır.

Histogram: Her örnek için gen ekspresyonunu ölçmek amacıyla gerçekleştirilen mikrodizin deney sonuçlarından elde edilen gen ekspresyon sinyallerine ilişkin dağılımları bir arada incelemek amacıyla kullanılmıştır.

Saplı kutu grafiği (box-whiskers plot): Histogramlar gibi saplı kutu grafikleri de her örnek için gen ekspresyonunu ölçmek amacıyla gerçekleştirilen mikrodizin deney sonuçlarından elde edilen gen ekspresyon sinyallerine ilişkin dağılımları bir arada incelemek amacıyla çizilmiştir. Fakat saplı kutu grafiklerinde verinin kartilleri de gösterilmektedir. Böylece histogramdan elde edilen bilgiyle birleştirilerek veride kalite yönünden bir sorun olup olmadığı ya da normalizasyon işleminin başarıya ulaşıp ulaşmadığı gibi sınamaların yapılması sağlanmıştır.

RNA Degradasyon Grafiği: RNA degradasyon grafiği, mikrodizin deneyinden elde edilen gen ekspresyon verisinden yararlanarak, ıslak laboratuvar aşamasında meydana gelmiş olabilecek RNA degradasyonunun mikrodizin deneyinden elde edilen verinin kalitesini düşürüp düşürmediğiyle ilgili kontrolün gerçekleştirilmesi amacıyla çizilmiştir. Bu bilgiye erişmek üzere prob dizaynının esaslarından yola çıkılarak "olması gereken" teorik eğriye karşılık veriden elde edilen eğri görsel olarak karşılaştırılmıştır. Affymetrix çiplerinde her bir "hedef" (gen) için bir prob seti tasarlanmıştır. Her bir prob seti, birden fazla probdan (genellikle on bir prob) oluşmaktadır. Her biri de prob setinin hedef dizisine yönelik tasarlanmıştır. RNA degradasyon grafiğinde prob setini oluşturan problar 5' ucundan 3' ucuna doğru sıralandıktan sonra (tüm probsetler ve tüm problar için) her bir probun

ortalama sinyal yoğunluğunu gösteren bir eğri çizilmektedir. Degradasyon molekülün 5' ucundan başladığı için problardan alınan sinyal yoğunluklarının, 5' ucuna denk gelen problarda, 3' ucuna denk gelen problardan daha düşük olması beklenmektedir. Grafiklerin yorumlanmasında aynı deneyden elde edilmiş çiplerden elde edilen eğrilerin benzer olması gerektiği beklentisinin yanı sıra, laboratuvardan alınan mikrodizin sonuçlarıyla ilgili bir geçmiş bilgiye de sahip olunması gereklidir. Zira RNA degradasyon grafiklerinde referans olarak kullanılabilecek evrensel bir eğri yoktur.

NUSE (The Normalized Unscaled Standard Error) Grafiği: NUSE grafiğinde verinin PLM'ye (probe level model) oturtulmasından sonra elde edilen prob hata değerleri prob seti seviyesinde standardize edilerek çizdirilmektedir. NUSE değerleri tüm mikrodizinler boyunca prob seti seviyesinde her bir prob seti için medyan değerleri 1 olacak şekilde standardize edilmiştir. Bu değerlerin saplı kutu grafiğinin gözlenmesi, tüm mikrodizinlerden elde edilen değerlerin dağılımının 1 civarında merkezlenmiş olup olmadığının ve tüm mikrodizinlerin NUSE dağılımlarının benzer olup olmadığının incelenmesini sağlanmıştır. Böylece mikrodizin deneyinin kalitesiyle ilgili bilgi edinilmiştir.

RLE (Relative Log Expression) Grafiği: RLE değerleri, her bir prob setinden elde edilen ekspresyon değerlerinin tüm deney boyunca bu prob setinde yer alan tüm problardan elde edilen ekspresyon değerlerinin medyanına oranlanmasıyla elde edilmiştir. Deney boyunca bir çok probsetinden elde edilen ekspresyon değerinin değişmeyeceği varsayılarak RLE grafiğinde tüm medyan değerlerinin logaritmik ölçekte 0'a yakın ve tüm dağılımların benzer olması beklenmektedir.

MA Grafiği: MA grafikleri (MA plots) incelenerek, elde edilen gen ekspresyon verisinde sinyal yanlılığı olup olmadığı hakkında bilgi edinilmiştir. MA grafiklerinde deneyde yer alan mikrodizinlerden "medyan" olan mikrodizine (y ekseninde - M) karşılık her bir mikrodizinden elde edilen gen ekspresyon verisi ve bu medyan mikrodizinden elde edilen gen ekspresyonlarının ortalaması (x ekseninde - A) gözlenmiştir. MA grafiklerinde 0'ın etrafında bir bulut görülmesi beklenir. MA grafikleri sinyal yanlılığının incelenmesinde oldukça verimli bir yöntemdir.

Ön İşleme

Mikrodizin teknolojisi, nükleik asitlerin hibridizasyon özelliğinden yararlanır. Örneklerden elde edilen transkriptler (target) ile çip üzerine iliştirilmiş nükleik asitlerden (prob) komplementer olanların hibridizasyonundan elde edilen ışıma sinyalleri, gen ekspresyonu miktarını temsil etmektedir. Bu yöntemle elde edilen veride doğrudan gen ifadesine ilişkin büyüklüğün ölçülmesini engelleyen optik gürültü ve spesifik olmayan bağlanmalar bulunmaktadır. Dolayısıyla bu ışıma verisinin gen ifadesi verisine dönüştürülebilmesi amacıyla, optik ve deneysel "gürültü"den arındırılması gerekmektedir. Bu arındırma işlemleri matematiksel ve istatistiksel yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Tüm bu işlemlere ön işleme (preprocessing) adı verilmektedir.

Görüntü İşleme: Görüntü işleme aşamasında, çip üzerinde gerçekleşen hibridizasyon neticesinde meydana gelen ışımalar cihaz tarafından tespit edilip ışıma sıklığını ifade eden bir değere, dolayısıyla da ekspresyon verisine dönüştürülmektedir. Affymetrix'in bildirdiği koordinatlar doğrultusunda her bir transkriptin o çipe yüklenen örnekte ölçülen ekspresyon değeri, problar düzeyinde elde edilmektedir.

Arka-Plan Düzeltmesi: Elde edilen veriye arka-plan düzeltmesi yapılması gereklidir, çünkü bu düzeltme yapılmadan önce ölçülen prob yoğunlukları, spesifik olmayan hibridizasyon ve optik tespit sistemindeki gürültüyü içermektedir. Ölçülen veriler, spesifik hibridizasyonu etkin şekilde ifade eden veriye dönüştürülmek amacıyla düzeltilmelidir. Bu çalışmada elde edilen veri, konvolüsyon arka-plan düzeltmesi yöntemiyle düzeltilmiştir.

Normalizasyon: Farklı mikrodizin çiplerinden elde edilen verinin karşılaştırılabilir hale gelmesi için normalize edilmesi gerekmektedir. Bunun nedeni, veriye etki eden çok sayıda varyasyon kaynağı olmasıdır. Bu varyasyon kaynakları, ters transkripsiyonun (reverse transcription) verimi, etiketleme ve hibridizasyon reaksiyonları, çiplerdeki fiziksel problemler, reagent batch etkisi ve laboratuvar şartları gibi etkenlerdir. Bu çalışmada elde edilen veri, quantiles yöntemiyle normalize edilmiştir.

Özetleme: Çip verisinin özetlenmesi gerekmektedir çünkü her bir gen, birden fazla prob ile temsil edilmektedir. Her bir gen için ekspresyon düzeyi, arka-plan düzeltmesi ve normalizasyonu yapılmış yoğunluklar RNA transkriptinin miktarıyla orantılı olacak şekilde tahmin edilmektedir. Çalışmada elde edilen veri, median polish yöntemiyle özetlenmiştir.

LIMMA ve Farklı Eksprese Olan Gen Seti

Bu aşamada hedeflenen, AF'li ve SR'li hastalardan alınan sağ ve sol atriyum örneklerinde, varsa, gen ifadesinde anlamlı farklılık gösteren genlerin belirlenmesidir. Bu amaca yönelik analizler R platformu üzerinde limma (Linear Models for Microarray Data) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Limma'da gerçekleştirilen işlem, en genel tanımıyla, mikroarray üzerinde bulunan her bir gen için ekspresyon verisini bir lineer modele oturtmaktır. Matematiksel olarak $E[y_j] = \boldsymbol{X}\alpha_j$ şeklinde bir lineer model olduğunu varsayalım. Burada, y_j, $j.$ gen için gen ifade verisini, $\boldsymbol{X}$ modelin tasarım matrisini, α_j de katsayılar vektörünü ifade etmektedir. y_j^T ekspresyon matrisinin $j.$ satırıdır ve logaritmik olarak ekspresyon değerini içermektedir. Araştırılmakta olunan kontrastlar $\boldsymbol{C}$ kontrast matrisi olmak üzere $\beta_j = \boldsymbol{C}^T\alpha_j$ ile verilmektedir. Limma ilk olarak veriyi lineer modele oturtmakta, ardından elde edilen α_j'ler aracılığıyla β_j değerleri tahmin edilmektedir. Analiz için yapılan lineer modelleme, Affymetrix mikroarray'leri gibi tek kanallı mikroarrayler için, her bir gen için bir lineer model oluşturulması haricinde, ANOVA ya da çoklu regresyon ile benzerlik göstermektedir.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen limma analizinde, deneyin tasarımına uygun olarak modelleme gerçekleştirilmiş ve her bir transkriptin gruplar arasındaki ifade değişiminin anlamlılığı test edilmiştir. Bu test gerçekleştirilirken, çoklu testlerde artış gösteren hatalı tespit oranını (FDR: False Discovery Rate) kontrol altına almak üzere Benjamini – Hochberg düzeltmesi kullanılmış ve anlamlılık düzeyleri bu yöntemle düzeltilmiş p değerleri (adj. p value) kullanılarak belirlenmiştir. Analizde hatalı tespit oranı % 5 olarak belirlenmiştir. Düzeltilmiş p değeri <0.05 olan değerler, logFC (logaritmik kat artışı) değerleri ve B değerleri gibi istatistikler de göz önünde bulundurularak sonraki analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Farklı İfadelenen Genlerin Fonksiyonel Anlamlandırılması

Limma analizi sonucu elde edilen AF ve SR grupları arasında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren transkriptler belirlenmişti. Ancak bu transkriptlerin fonksiyonel anotasyonu yapılsa bile, inceleme altına alınan çok sayıda genin bu anotasyonlar kullanılarak biyolojik süreçler bazında anlamlandırılması mümkün değildir. Bunun için

elde edilen genlerin hangi biyolojik süreçlerde ne şekilde yer aldığını ve bu özelliğin farklı ifade edilen genler kümesinde ne kadar tekrar ettiğini araştıran biyoinformatik yöntemler geliştirilmiştir.

Mikrodizin gen ekspresyon verisini görünür hale getiren ve istatistiksel yöntemlerle bu veriyi işlemeye yarayan dChip ve BRB array tools programları kullanılmıştır. Bu programlar geri planda R, Java, C ve Foran programlama dillerini çalıştırırlar. BRB array tools excel tabanında çalışan bir eklenti paketidir.

Çalışmada bu araştırmalar pek çok veri tabanından bilgi çekerek yukarıda bahsi geçen değerlendirmeleri belirli istatistiksel süreçlere dayalı olarak gerçekleştiren DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) kullanılmıştır. DAVID yalnızca klasik Gene Set Enrichment Analizi ile kısıtlı kalmaması, anotasyon terimlerini elde ederken pek çok veri tabanı kullanması ve analizin sonraki basamaklarını esnek şekilde gerçekleştirmeye elverişli olması nedenleriyle çeşitli araçlar arasından seçilmiştir.

Genlerin Fonksiyonel Sınıflandırılması

Mikroarray verisi üzerinde gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda AF ve SR grupları arasında gen ifadesi yönünden anlamlı farklılık gösteren genler elde edildikten sonra, bu genlerin biyolojik çerçevede anlamlandırılması hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik olarak geliştirilen analizler genel olarak Gene Set (term) Enrichment Analizi olarak anılmaktadır (166).

Bu analiz sayesinde gruplar arasında ifade değeri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren genler fonksiyon sınıflarına göre değerlendirilmektedir. Bu gerçekleştirilirken de bu genlere literatürde atfedilmiş tüm fonksiyonlar ve genlerin çalıştığı saptanan yolaklar göz önünde bulundurulmaktadır.

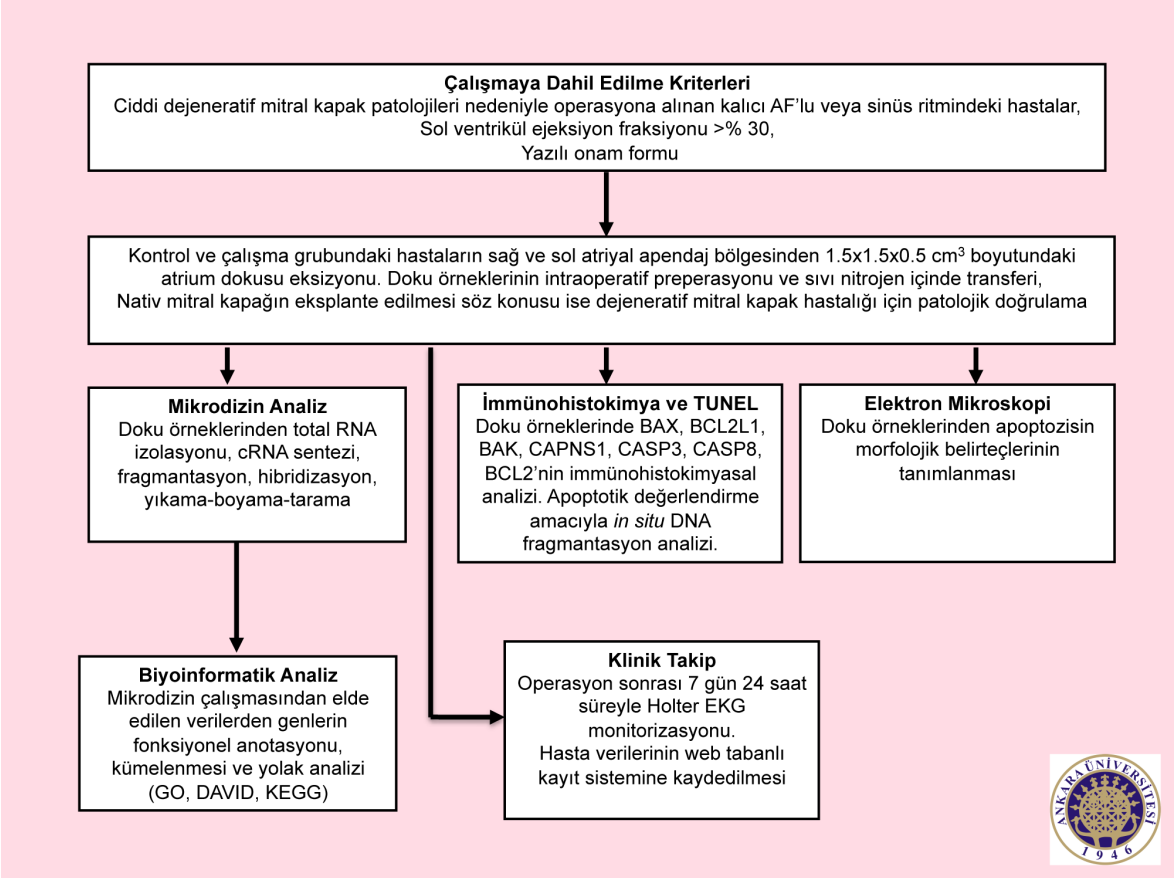
DAVID'de bu analiz gerçekleştirilirken temel ilke, bir fonksiyonun 'arka plan'da gözlenme sıklığı ile, istatistiksel olarak anlamlı ifade değişimi gösteren gen kümesinde gözlenme sıklığının karşılaştırılmasıdır. Burada örneğin, eğer deney insan genomu ile ilgiliyse, 'arka plan' insan genomunda ifadelenen genlere atfedilen fonksiyonların genler bazında sıklığıdır. Daha reel bir örnek vermek gerekirse örneğin insan genomundaki genlerin %1'i kinazlardır. Eğer analiz edilmekte olan istatistiksel olarak anlamlı ifade değişimi gösteren gen kümesindeki genlerin %10'unun kinazlar olduğu gözlenirse, bu

kümenin kinazlar yönünden 'yoğun' (enriched) olduğunu ifade eder. Bu 'yoğunluk' (enrichment), Fisher's Exact Test, Binom olasılığı ve Hipergeometrik dağılım gibi bilindik istatistiksel yöntemlerle kantifiye edilmektedir. Ardından enrichment p değerleri, araştırılan gen setindeki önemine göre bir 'enrichment score'a dönüştürülmektedir. Çalışmada enrichment değeri (enrichment score) 1,3 ve üzeri olan gen grupları ileri incelemelere tabi tutulmuştur. Bu değer DAVID için araştırmacılar tarafından optimize edilmiş değerdir ve üzerinde çalışılan gen kümesi için verimli şekilde çalışmıştır (167).

Genlerin Fonksiyonel Anotasyonu, Kümelenmesi ve Yolak Analizi

DAVID'de genlerin fonksiyonel anotasyonu kırkın üzerinde anotasyon kategorisinde gerçekleştirilmektedir. Bu kategoriler GO (Gene Ontology) terimleri, protein-protein interaksiyonu, protein fonksiyonel domainleri, hastalık asosiyasyonları, biyo-yolaklar, dizi bileşenleri (sequence features), homoloji, genlerin fonksiyonel özetleri (gene functional summaries), dokuda gen ekspresyonları ve literatürdür. DAVID analize tabi tutulan her bir geni bu özelliklerle ilişkilendirmekte, ardından bu özelliklerin görülme sıklığına göre kümelendirmektedir.

Bu gruplandırmanın ardından grup içinde yer alan genlerin hangi yolaklarda yer aldığı bilgisi KEGG ve BioCarta gibi veritabanlarından DAVID tarafından elde edilmektedir.



Şekil 17: Çalışmanın genel akış şeması

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Hasta Kohortu

Eylül 2008 ile Eylül 2012 tarihleri arasında operasyona alınan 30 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Kalıcı AF'u olan 15 hasta (ortalama yaş; 65.9 ± 12.8, 4E/11K) çalışma grubunu oluştururken, normal sinüs ritmindeki 15 hasta (ortalama yaş; 53.5 ± 14.3, 5E/10K) kontrol grubuna alınmıştır (p= 0.007). AF grubundaki hastaların ortalama sol atriyum çapı 55.9 ± 6.2 mm iken kontrol grubundaki sinüs ritimli hastaların ortalama sol atriyum çapı 47.7 ± 6.3 mm olarak ölçülmüştür (p< 0.0001). Hastaların preoperatif demografik ve hemodinamik verileri Tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 3: Hastaların preoperatif demografik ve hemodinamik verileri

		Atriyal Fibrilasyon (n = 15)	**Sinüs Ritmi (n = 15)**	**%95 CI**	***P değeri****
Yaş (yıl)	Ortalama ± SD	65.9 ± 12.8	53.5 ± 14.3	(-21.2;-3.5)	0.007
	Min-Max	28-80	22-82		
Erkek cinsiyet	n (%)	4 (26.6)	5 (33.3)		0.8
BSA (m^2)	Ortalama ± SD	1.81 ± 0.17	1.87 ± 0.17	(-0.06;0.17)	0.341
	Min-Max	1.39-2.05	1.66-2.31		
Sigara hikayesi	n (%)	7 (46.6)	8 (53.3)	-	0.9
KOAH	n (%)	5 (33.3)	4 (26.6)	-	0.8
Diabetes mellitus	n (%)	3 (20)	4 (26.6)	-	0.20
SVH	n (%)	4 (26.6)	1 (6.6)	-	0.134
Hipertansiyon	n (%)	11 (73.3)	4 (26.6)	-	0.015
Hiperlipidemi	n (%)	8 (53.3)	5 (33.3)	-	0.148
Total Kolesterol (mg/dl)	Ortalama ± SD	185.8 ± 7.1	185.8 ± 7.6	-	0.999
LDL Kolesterol (mg/dl)	Ortalama ± SD	116.5 ± 5.6	115.7 ± 6.3	-	0.93

HDL Kolesterol (mg/dl)	Ortalama ± SD	44.4 ± 4.2	39.5 ± 1.9	-	0.35
SVDSÇ (mm)	Ortalama ± SD	54.6 ± 6.9	54.3 ± 12	(-7.1;6.5)	0.927
SVSSÇ (mm)	Ortalama ± SD	34.7 ± 6.2	35.5 ± 9.4	(-4.5;6.2)	0.748
DKB (mmHg)	Ortalama ± SD	86.8 ± 11.4	89 ± 9.6	(81.25; 95)	0.07
LVEF (%)	Ortalama ± SD	54.4 ± 8.1	51.5 ± 7.6	(-8.1;2.1)	0.247
Sistolik PAP (mmHg)	Ortalama ± SD	54.7 ± 9	43 ± 16	(-20.2;-3.2)	0.008
LA çapı (mm)	Ortalama ± SD	55.9 ± 6.2	47.7 ± 6.3	(-12.2;-4.1)	>0.0001
NYHA (Klas 2 üzeri)	n (%)	10 (66.6)	9 (60)	-	0.3
Trikuspit Yetmezliği (2+)	n (%)	6 (40)	2 (13.3)	-	>0.0001
Euroscore	Ortalama ± SD	5.8 ± 3.5	3.8 ± 2.4	(-4;0.1)	0.051
Logistic Euroscore (%)	Ortalama ± SD	8.2 ± 8.1	4.1 ± 4.8	(-8.5;0.3)	0.07
Medikasyon					
Antihiperlipidemik	n (%)	7 (46.6)	7 (46.6)		1
Digoxin	n (%)	5 (33.3)	2 (13.3)		0.184
Ca kanal blokeri	n (%)	5 (33.3)	0 (0)	-	0.014
Beta Bloker	n (%)	11 (73.3)	10 (66.6)	-	0.621
ACE/ARB inh.	n (%)	9 (60)	8 (53.3)		0.224

BSA; vücut yüzey alanı, KOAH; kronik obstrüktif akciğer hastalığı, SVH; serebrovasküler hastalık, SVDSÇ; sol ventrikül diyastol sonu çapı, SVSSÇ; sol ventrikül sistol sonu çapı, DKB; diyastolik kan basıncı, LVEF; sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu, PAP; pulmoner arter basıncı, LA; sol atriyum, NYHA; New York Kalp Cemiyeti, ACE; anjiotensin converting enzim, ARB; anjiotensin reseptor blokeri.

Kontrol ve çalışma grubu hastalarının preoperatif özellikleri değerlendirildiğinde, sistolik PAP ve sol atriyum çapının AF grubunda istatistiki anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bu durum, artan sol atriyum çapıyla birlikte AF görülme eğiliminin artması bilgisiyle paralel olan bir bulgudur.

5.2. İmmünohistokimya ve DNA Fragmantasyon Analizleri

İmmünohistokimyasal incelemelerde sağ/sol atriyal doku örneklerinde proapaptotik ve antiapoptotik protein ifadeleri ve apoptozisin terminal belirteci olan DNA fragmantasyon analizi TUNEL yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Her iki atriyum dokusunda protein ifadeleri Tablo 4-5'de gösterilmiştir. Sağ atriyal doku örneklerinde proapoptotik BAX ifade düzeyi AF grubunda (% 26.36 ± 23.7) SR grubuna oranla (% 8.75 ± 6.7) istatistiki olarak anlamlı düzeyde (p= 0.019) artış tespit edildi. Benzer istatistiki anlamlı sonuçlar sol atriyal dokularda da BAX protein ifadeleri açısından tespit edildi (AF: % 37.27 ± 27.2, SR: % 12.08 ± 19.02, p= 0.004). AF grubunda istatistiki anlamalı olmasa da antiapoptotik protein ifadelerinde azalma eğilimi ve sonuç olarak da TUNEL oranlarında artış tespit edildi.

Tablo 4: Sağ atriyum dokularında apoptotik proteinlerin immünohistokimyasal yöntemlerle ifade değerleri

	Atriyal Fibrilasyon (n = 15)	**Sinüs Ritmi (n = 15)**	***P* değeri**
BCL2 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	13.64 ± 22.5	12.08 ± 23.1	0.947
BCL2L1 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	35.45 ± 28.7	10.83 ±9.7	0.053
BAX pozitifliği (%) Ortalama ± SD	26.36 ± 23.7	8.75 ± 6.7	0.019
BAK1 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	64.17 ± 25.7	32.73 ± 27.2	0.012
Calpain S1 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	2.27 ± 3.4	1.25 ± 2.2	0.491
Caspase 3 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	17.08 ± 14.9	6.82 ± 5.6	0.07
Caspase 8 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	25 ± 26.07	16.67 ± 19.1	0.507

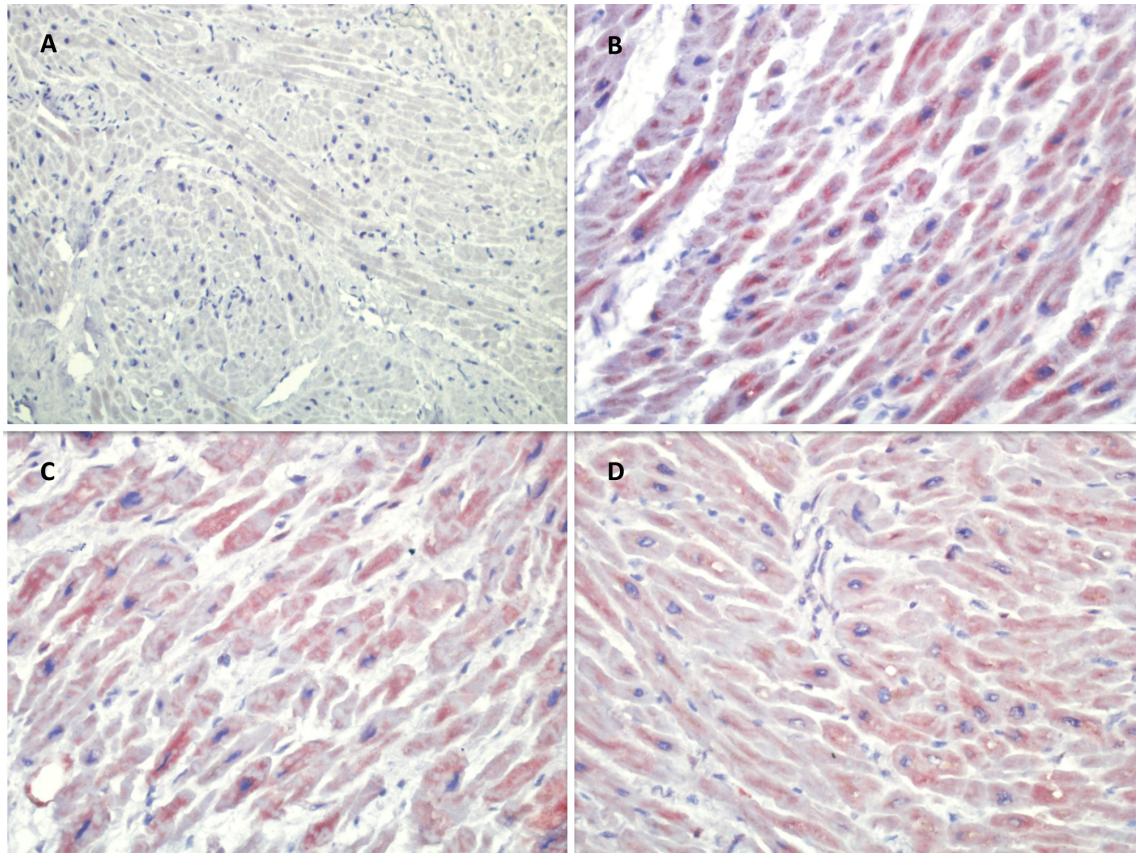
TUNEL pozitifliği (%) Ortalama ± SD	8.08 ± 6.5	4.91 ± 7	0.071

BCL2 = B-cell CLL/lymphoma 2, BCL2L1:BCL2-like 1, BAX: BCL2-associated X protein, BAK1: BCL2-antagonist/killer 1, TUNEL: terminal transferase deoxyuridine triphosphate nick-end labeling

Tablo 5: Sol atriyum dokularında apoptotik proteinlerin immünohistokimyasal yöntemlerle ifade değerleri

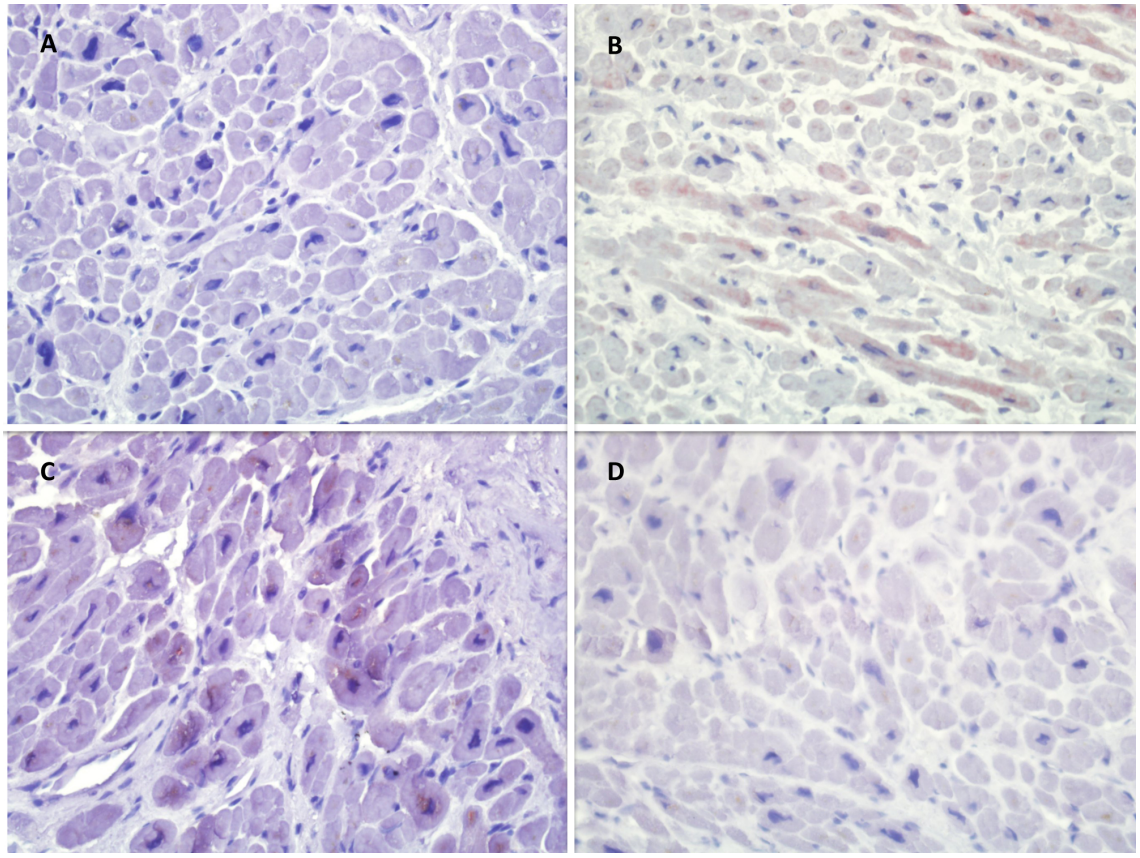
	Atriyal Fibrilasyon (n = 15)	**Sinüs Ritmi (n = 15)**	***P* değeri**
BCL2 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	31.82 ± 37.8	32.08 ± 34.4	0.777
BCL2L1 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	20 ± 28.6	11.6 ± 14.4	0.764
BAX pozitifliği (%) Ortalama ± SD	37.27 ± 25.7	12.08 ± 19.2	0.004
BAK1 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	72.50 ± 24.1	43.64 ± 26.9	0.01
Calpain S1 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	1.36 ± 2.3	2.08 ± 2.5	0.479
Caspase 3 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	7.73 ± 9.8	10 ± 11.8	0.630
Caspase 8 pozitifliği (%) Ortalama ± SD	20 ± 23.1	24.17 ± 34.6	0.508
TUNEL pozitifliği (%) Ortalama ± SD	6.58 ± 7.5	2.36 ± 3.3	0.134

BCL2 = B-cell CLL/lymphoma 2, BCL2L1:BCL2-like 1, BAX: BCL2-associated X protein, BAK1: BCL2-antagonist/killer 1, TUNEL: terminal transferase deoxyuridine triphosphate nick-end labeling



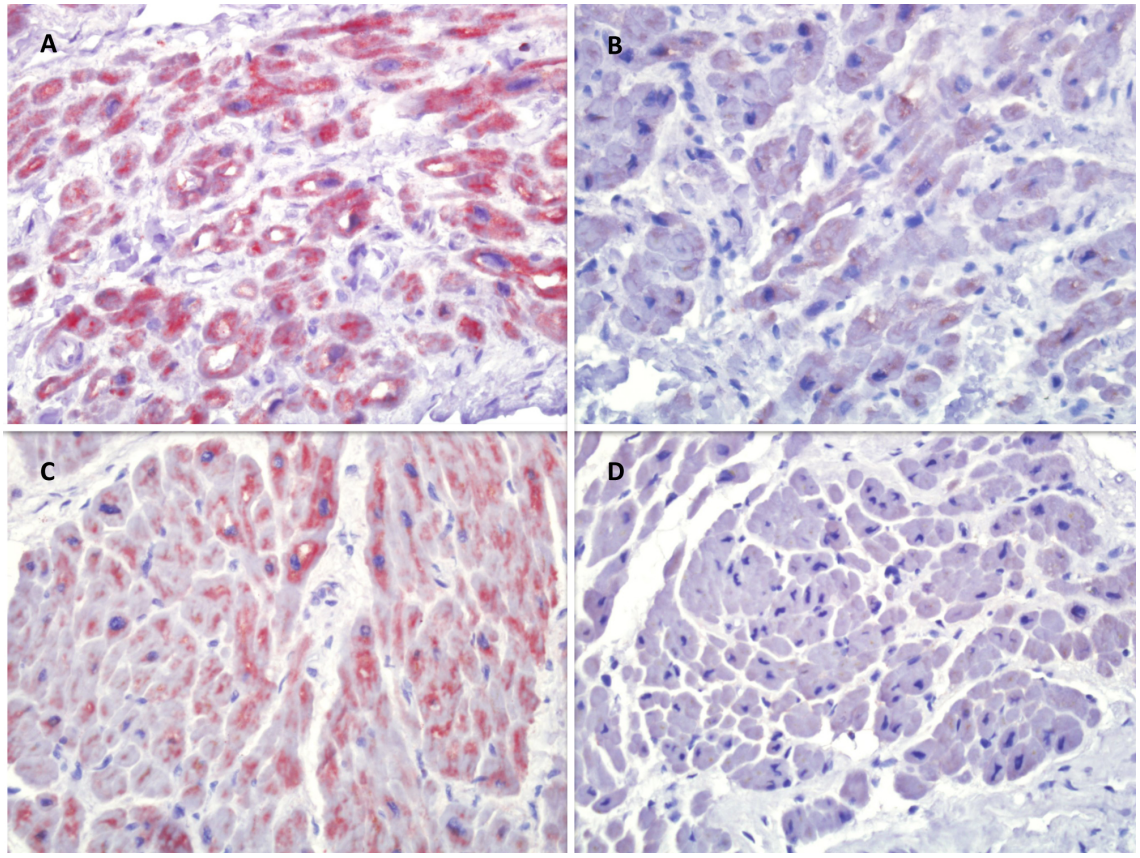
Şekil 18: BCL2 immünohistokimya görüntüleri

A: Normal sinüs ritmindeki hastanın sol atriyal dokularında anti-apoptotik yoğun BCL2 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renk BCL2 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X20), **B:** Normal sinüs ritmindeki hastanın sağ atriyal dokularında anti-apoptotik yoğun BCL2 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BCL2 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **C:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sol atriyal dokularında anti-apoptotik daha az yoğunluklu BCL2 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BCL2 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **D:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sağ atriyal dokularında anti-apoptotik daha az yoğunluklu BCL2 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BCL2 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40).



Şekil 19: BAX immünohistokimya görüntüleri

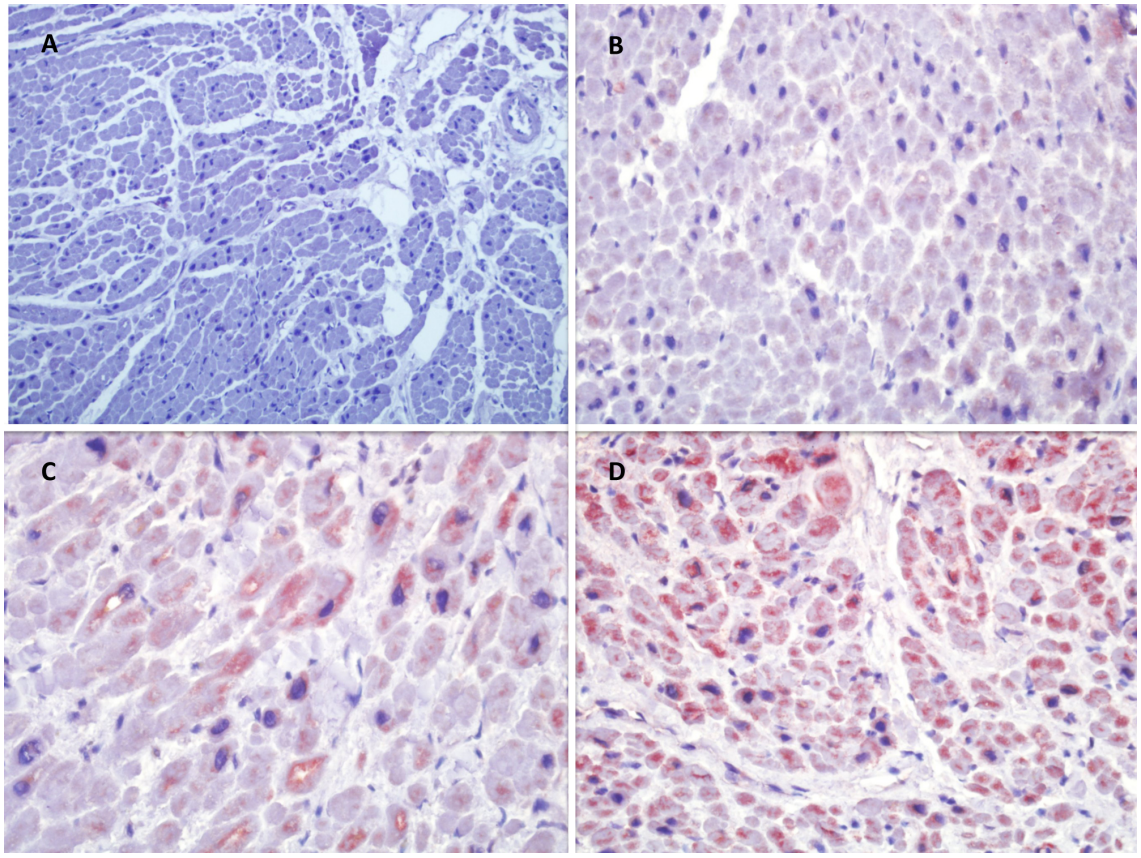
A: Normal sinüs ritmindeki hastanın sol atriyal dokularında pro-apoptotik BAX protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BAX protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **B:** Normal sinüs ritmindeki hastanın sağ atriyal dokularında pro-apoptotik yoğun BAX protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BAX protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **C:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sol atriyal dokularında pro-apoptotik yoğun BAX protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BAX protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **D:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sağ atriyal dokularında pro-apoptotik yoğun BAX protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BAX protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40).



Şekil 20: BAK immünohistokimya görüntüleri

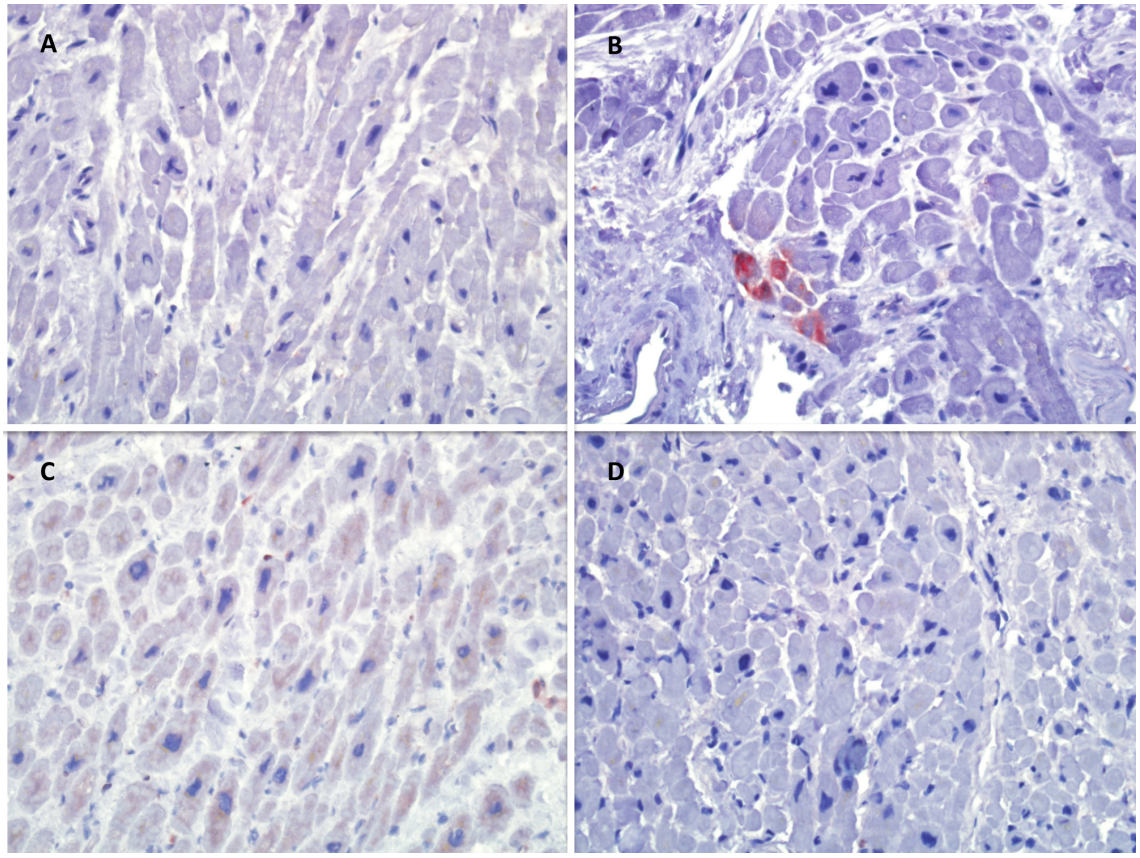
A: Normal sinüs ritmindeki hastanın sol atriyal dokularında pro-apoptotik BAK protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BAX protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **B:** Normal sinüs ritmindeki hastanın sağ atriyal dokularında pro-apoptotik yoğun BAK protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BAK protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **C:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sol atriyal dokularında pro-apoptotik yoğun BAK protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BAK protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **D:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sağ atriyal dokularında pro-apoptotik yoğun BAK protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BAK protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40).

Şekil 20-A SR grubu örneği Şekil 20-B'deki SR örneğinden daha yoğun BAK ekspresyonu gösterirken; Şekil 20-C AF grubu örneği Şekil 20-D'deki AF grubu örneğinden daha yoğun BAK ifadesi göstermektedir.



Şekil 21: BCL2L1 immünohistokimya görüntüleri

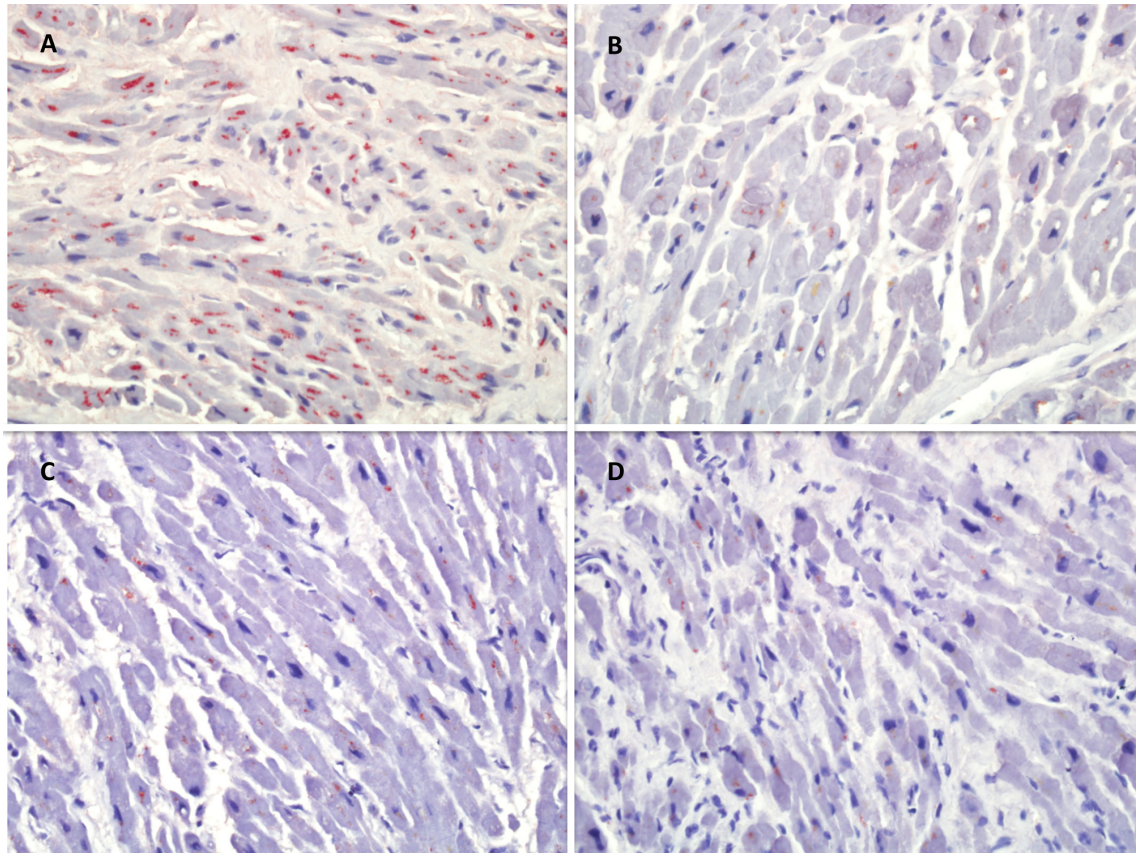
A: Normal sinüs ritmindeki hastanın sol atriyal dokularında anti-apoptotik yoğun BCL2L1 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BCL2L1 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X20), **B:** Normal sinüs ritmindeki hastanın sağ atriyal dokularında anti-apoptotik yoğun BCL2L1 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BCL2L1 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **C:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sol atriyal dokularında anti-apoptotik daha az yoğunluklu BCL2L1 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BCL2 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **D:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sağ atriyal dokularında anti-apoptotik daha az yoğunluklu BCL2L1 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler BCL2 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40).



Şekil 22: Calpain S1 immünohistokimya görüntüleri

A: Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sağ atriyal yoğun Calpain S1 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı ekspresyon Calpain S1 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **B:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sol atriyal dokularında Calpain S1 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı ekspresyon Calpain S1 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **C:** Normal sinüs ritmindeki hastanın sağ atriyal dokularında daha az yoğunluklu Calpain S1 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı ekspresyon Calpain S1 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **D:** Normal sinüs ritmindeki hastanın sol atriyal dokularında Calpain S1 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı ekspresyon Calpain S1 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40).

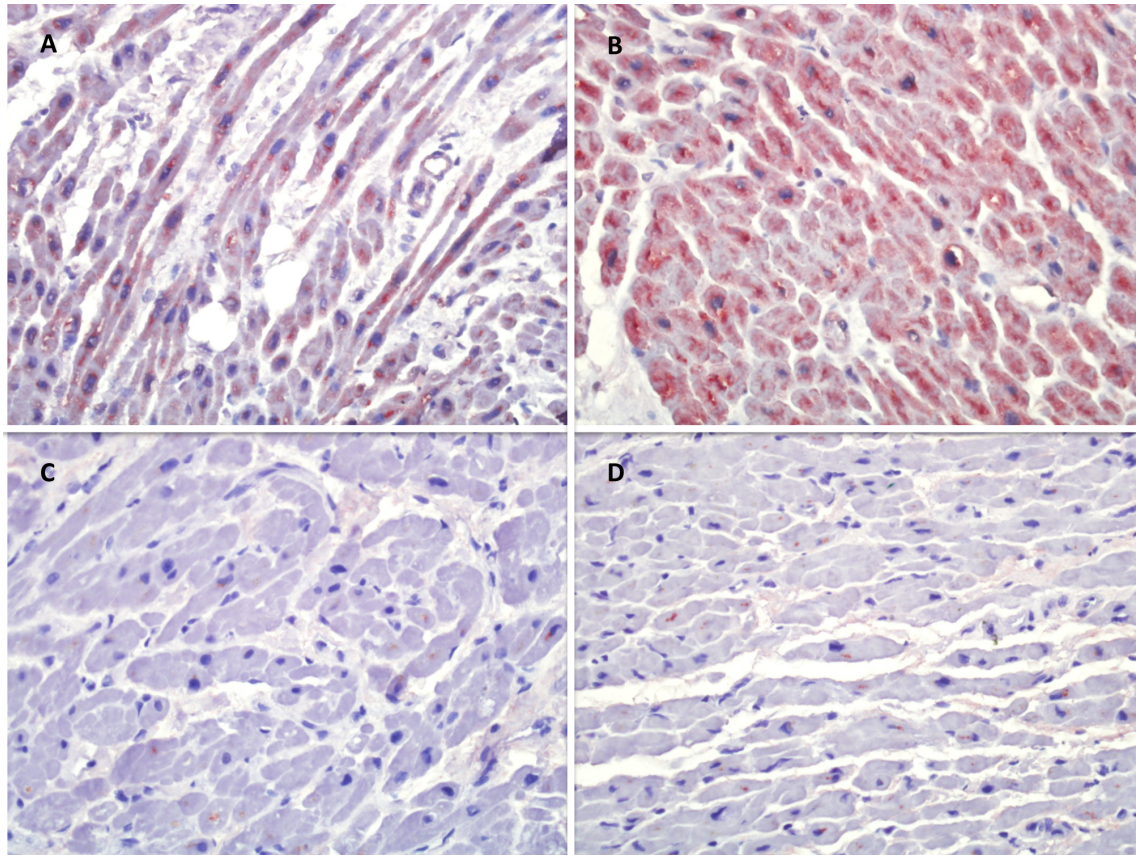
Şekil 22-B pozitif Calpain S1 ifadesi gösterirken Şekil 22-D negatiftir. Şekil 22-A ve C ise hafif yoğunlukta Calpain S1 ekspresyonu göstermektedir.



Şekil 23: Caspase 3 immünohistokimya görüntüleri

A: Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sağ atriyal yoğun Caspase 3 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler Caspase 3 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **B:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sol atriyal dokularında Caspase 3 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler Caspase 3 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **C:** Normal sinüs ritmindeki hastanın sağ atriyal dokularında daha az yoğunluklu Caspase 3 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler Caspase 3 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **D:** Normal sinüs ritmindeki hastanın sol atriyal dokularında oldukça az yoğunluklu Caspase 3 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı renkler Caspase 3 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40).

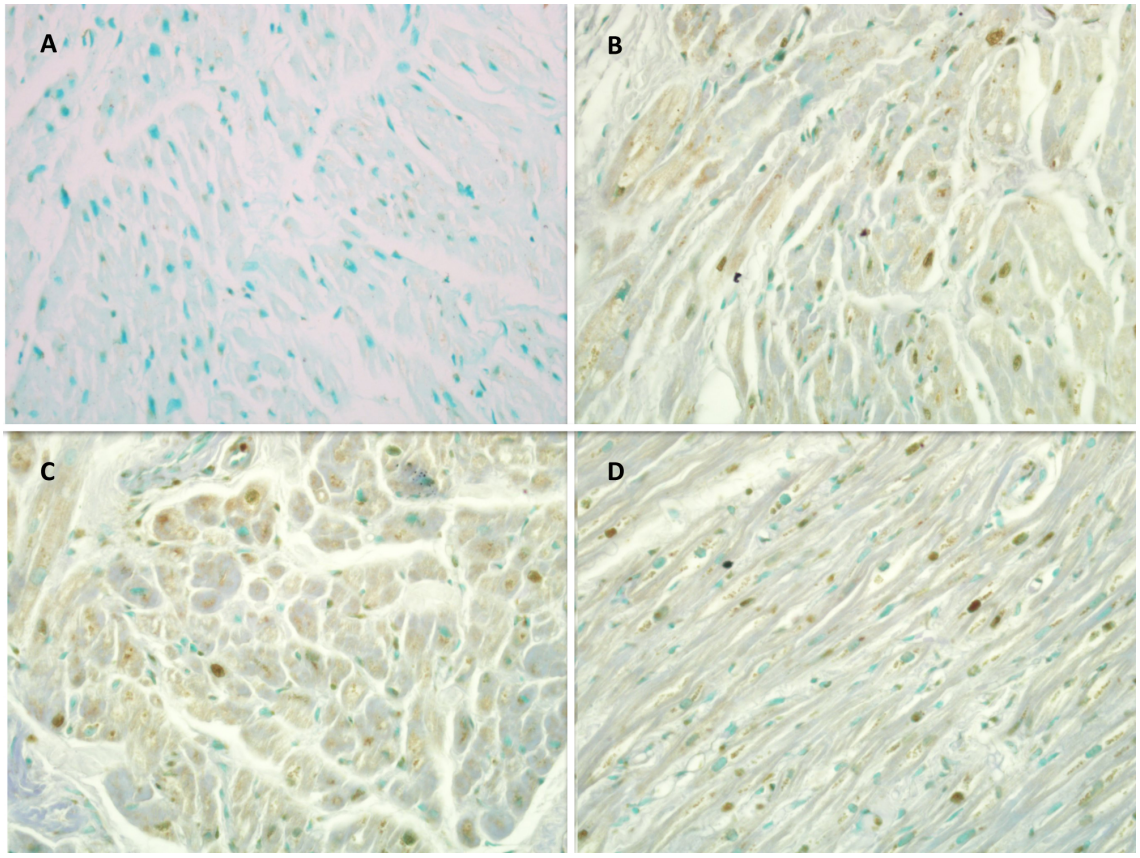
Şekil 23-B, C ve D daha az yoğunlukta CASP3 ekspresyonu gösterirken Şekil 23-A daha yopun CASP3 ifadesi göstermiştir.



Şekil 24: Caspase 8 immünohistokimya görüntüleri

A: Normal sinüs ritmindeki hastanın sağ atriyal dokularında daha az yoğunluklu Caspase 8 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı ekspresyon Caspase 8 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **B:** Normal sinüs ritmindeki hastanın sol atriyal dokularında oldukça az yoğunluklu Caspase 8 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı ekspresyon Caspase 8 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **C:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sağ atriyal yoğun Caspase 8 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı ekspresyon Caspase 8 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40), **D:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sol atriyal dokularında Caspase 8 protein ifade görüntüsü, sitoplazmik kırmızı ekspresyon Caspase 8 protein ifadesini göstermektedir (AEC, X40).

Şekil 24-A ve B daha yoğun CASP8 ifadesi gösterirken, Şekil 24-C ve D daha düşük yoğunlukta CASP8 ifadesi sergilemiştir.



Şekil 25: TUNEL görüntüleri

A: Normal sinüs ritmindeki hastanın sol atriyal dokularında daha az yoğunluklu TUNEL pozitif hücre görüntüsü, nükleer kahverengi renkler TUNEL pozitif hücreleri göstermektedir (AEC, X20), **B:** Normal sinüs ritmindeki hastanın sol atriyal dokularında oldukça az yoğunluklu TUNEL pozitif hücre görüntüsü, nükleer kahverengi renkler TUNEL pozitif hücreleri göstermektedir (AEC, X20), **C:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sol atriyal yoğun TUNEL pozitif hücre görüntüsü, TUNEL pozitif hücre görüntüsü, nükleer kahverengi renkler TUNEL pozitif hücreleri göstermektedir (AEC, X40), **D:** Kalıcı atriyal fibrilasyon grubundaki hastanın sağ atriyal dokularında oldukça yoğun TUNEL pozitif hücre görüntüsü, TUNEL pozitif hücre görüntüsü, nükleer kahverengi renkler TUNEL pozitif hücreleri göstermektedir (AEC, X20).

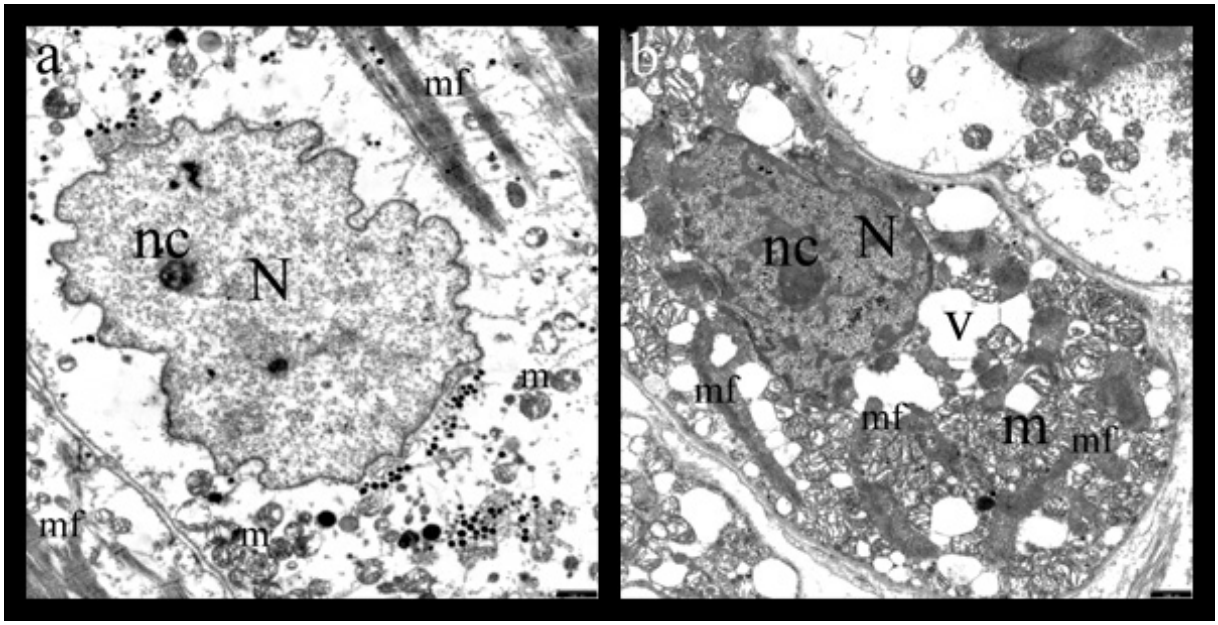
Tüm İHK boyamaları ve TUNEL analizleri sonucunda kalıcı AF grubu örneklerinde, SR grubu örneklerine göre apoptozisin daha yoğun olduğu gözlenmektedir.

5.3. Geçirmeli (Transmission) Elektron Mikroskopik Çalışma (TEM)

Kontrol grubuyla (K), Atriyal Fibrilasyon (AF) grubunun ince yapı (ultrasütrüktürel) düzeyinde karşılaştırmasında, K grubunda çekirdeklerin ökromatin aktif ve tipik görüntüsü içlerinde tipik nükleolus yapılarıyla izlenirken, AF grubunda bazı miyosit çekirdeklerinde heterokromatin özellik dikkat çekmiştir. Kromatin materyal özellikle nuclear membran altında apoptosizi işaret eden kümelenmeler göstermiştir. Bu hücrelerde belirgin olarak büzüşme dikkat çekmiştir, mitokondriyonlar ve mikrofilamanlar yoğun kümelenmiş olarak izlenmiştir. Sitoplazmada bu yoğun organel grupları arasında yer yer vakuoller bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 26).

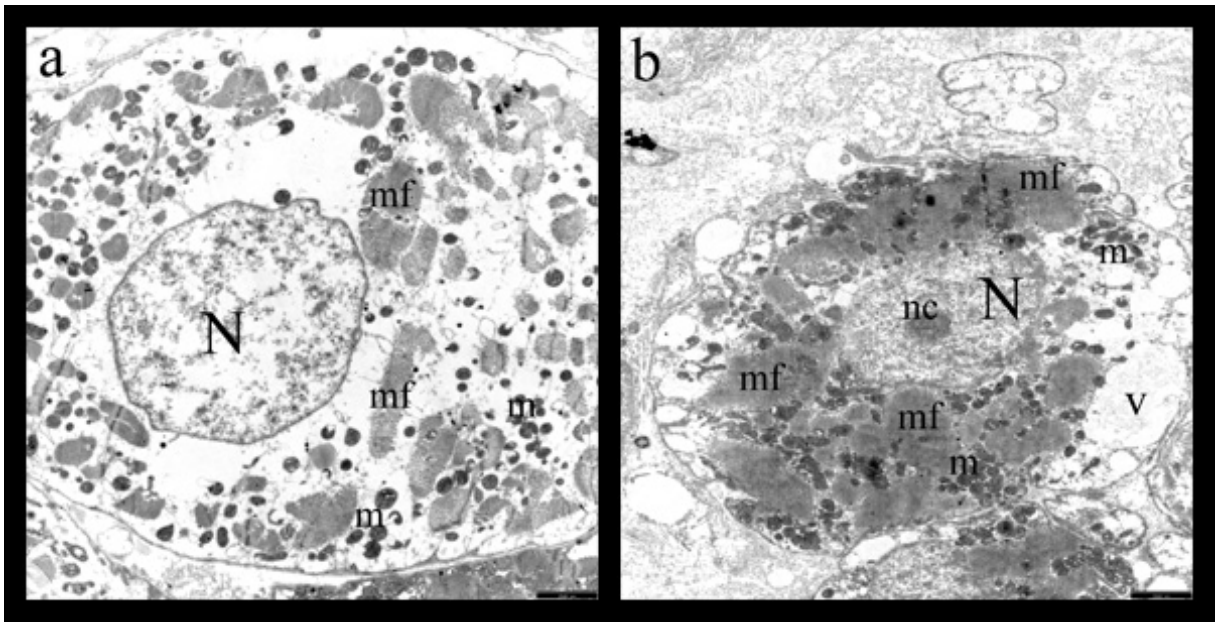
Bu haliyle AF grubunda bazı hücrelerde shrinkage necrosis (büzüşme nekrozu) olarak da adlandırılan apoptosize işaret eden morfolojik değişiklikler (büzüşme nekrozu, nükleer membranın altında kromatin clumping ve vakuolalizasyon) gözlenmiştir.

Bazı AF hücrelerinde çekirdekte kromatolizis ve silinme izlenmiştir (Şekil 27 ve 28). Bazı mikrofilaman demetlerinin periyodik çizgilenmesini kaybettiği ve kompaktlaştığı görülmüştür, yine bu hücrelerde lipofuskin içeren rezidual cisimcikler izlenmiştir. Bunlar hücrenin harabiyet neticesindeki otolysosomal aktivitesinin son ürünleri olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 26: AF ve SR örneklerine ait TEM görüntüleri

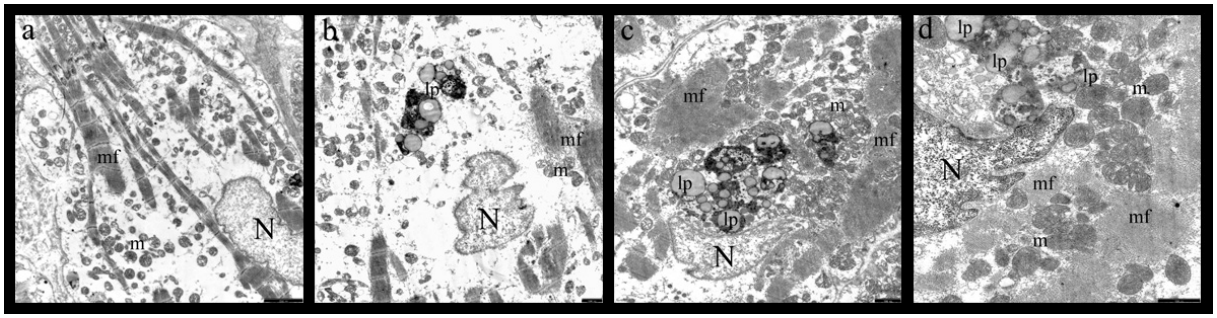
a: Kontrol grubunda tipik eukromatin kas çekirdeği (N) ve belirgin nucleolusu (nc), mitondriyon (m) ve mikrofilamanlar (mf) sağlam olarak izleniyor, b: aynı büyütmede AF grubunda, hücrede büzüşme ve kondenzasyon artışı tipik, nukleus heterochromatin (N)-kondense chromatin materyal zar altında kümelenmeye başlamış, mitokondriyon (m) ve microflamanlar (mf) yoğun ve küme şeklindedir. Aralarında vakuoller (v) bulunmaktadır.



Şekil 27: AF ve SR örneklerine ait TEM görüntüleri

Miyositlerin aynı büyütmede enine kesitlerinde **a:** kontrol grubunda euchromatin nukleus (N) microflamanların (mf) ve mitochondrionların (m) olağan dağılımı izlenirken, **b:** AF

grubunda hücredeki büzüşme ve sitoplazmada yoğunlaşma tipiktir, enine mikrofilaman kesitleri ve mitokondriyonlar sıkı sıkı paketlenmiş gibi görülmektedir. Çekirdekte karyolizis şeklinde kromatin dağılımı gözlenmektedir (nekroza işaret eder).

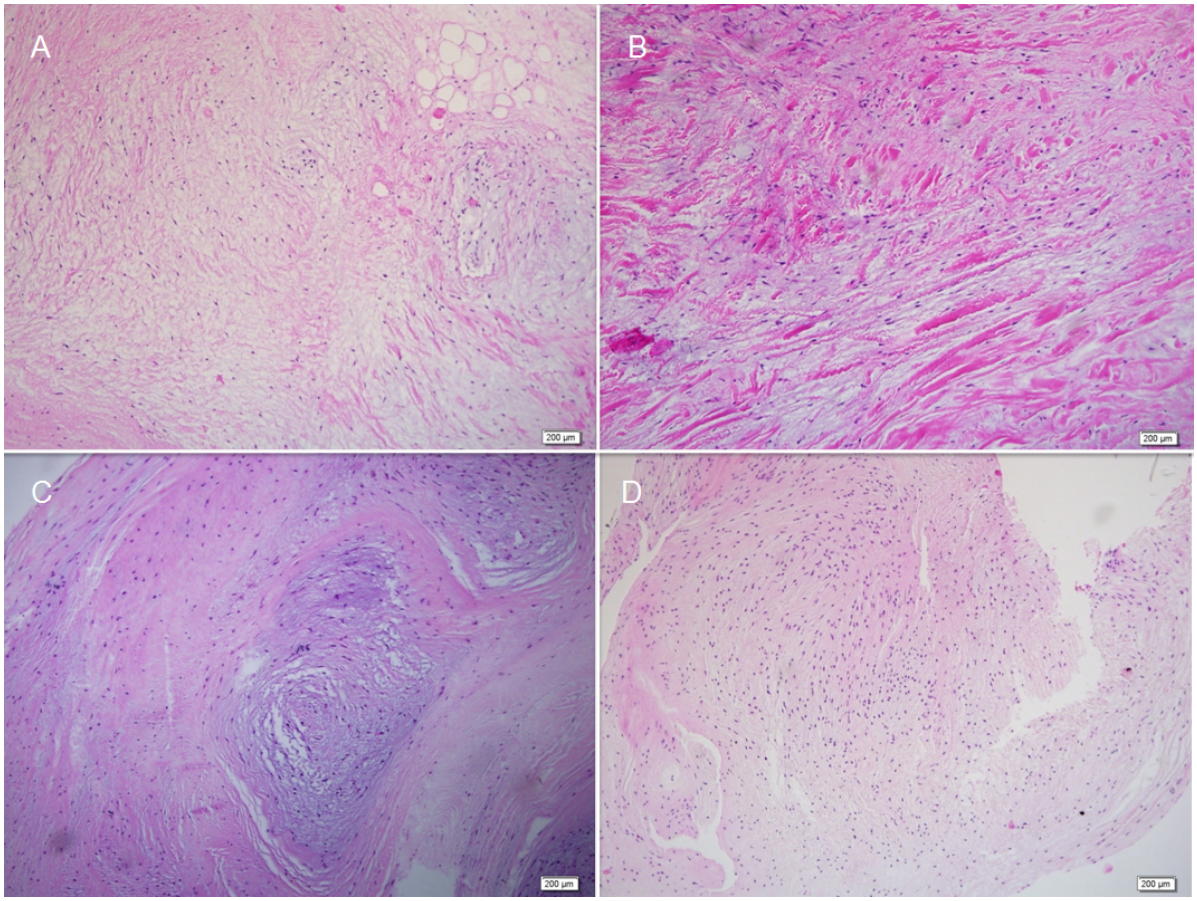


Şekil 28: AF ve SR örneklerine ait TEM görüntüleri

a: Kontrol grubunda normal ökromatin çekirdek (N) ve periyodik sarkomerik çizgilenmesini gösteren mikrofilaman (mf) demetleri izlenirken **b:** AF grubunda sarkomerik çizgilenmesini yitirmiş kompakt mikrofilaman (mf) kesitleri ve lipofuskin (lp) görülmektedir, **c:** AF grubunda çekirdeğe komşu yoğun lipofuskin (lp) artışı, mitokondriyal kristalardaki disorganizasyon (m), yoğunlaşmış enine kesilmiş mikrofilaman demetleri (mf) dikkat çekmektedir, **d:** c figürünün daha büyük büyütmesidir

5.4. Mitral Yetmezlik Etyolojisinin Patolojik Tespiti

Mitral kapak değişimi operasyonlarında alınan tüm örneklerin histopatolojik incelemesinde AF ve SR grubundaki hastalarda kapak yetmezliğinden sorumlu patolojinin dejeneratif etiyoloji olduğu tanımlanmıştır. Bu sayede transkriptomik düzeyde karşılaştırma yapılan grupların homojen olduğu doğrulanmıştır. Dejenaratif etiyolojinin ifadesi Şekil 29'da görülmektedir.



Şekil 29: Mitral kapaklarda hematoksilen eosin boyaması

Mitral kapak replasmanı gerçekleştirilen hastaların mitral kapak örneklerinde patolojik değerlendirme **A:** Normal sinüs ritimli hastaya ait mitral kapak örneği, (HEX40) Kapakta fibroza tabakasından spongioza tabakasına kadar uzanan gevşek kollajenöz stroma, miksoid madde birikimi ve elastik liflerde parçalanma, fragmantasyon, miksomatöz dejenerasyon; **B:** Normal sinüs ritimli hastaya ait mitral kapak örneği, (HEX100) Kapak stromasında gevşek ödemli görünüm, gri-mavi renkte miksoid görünüm, miksomatöz dejenerasyon; **C:** Kalıcı atriyal fibrilasyon ritimli hastaya ait mitral kapak örneği, (HEX100) Kapak stromasında gevşek ödemli görünüm, gri-mavi renkte miksoid görünüm, miksomatöz dejenerasyon; **D:** Kalıcı atriyal fibrilasyon ritimli hastaya ait mitral kapak örneği, (HEX100) Miksomatöz dejenerasyon, kapakta fibrozadan spongioza tabakasına kadar gevşek, ödemli stroma görünümü, miksoid madde birikimi ve elastik liflerde parçalanma.

Çıkartılan mitral kapak doku örneklerinin histopatolojik incelemesinde mitral kapak yetmezliği etiyolojisinin dejeneratif olduğunun doğrulanması çalışmaya alınan örneklerin homojen olması açısından önemli bir kanıt oluşturmaktadır.

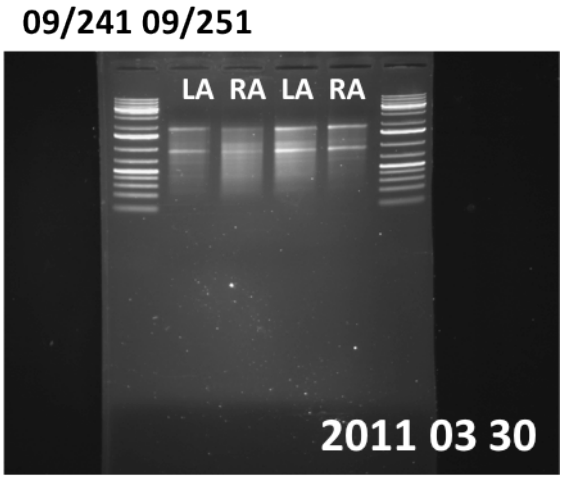
5.5. Mikrodizin Deneylerinin Bulguları

5.5.1. İzole edilen RNA örneklerinin kalite ve miktar bulguları

İzole edilen RNA'ların bütünlüğünün kontrolü için örnekler % 1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve spektrofotometrik olarak konsantrasyonları belirlenmiştir (Şekil 30 ve Tablo 6). Ayrıca izole edilen total RNA örnekleri Agilent Bioanalyzer 2100'de RNA 6000 Pico ile yürütülmüş ve RIN (RNA Integrity Number) değerleri tespit edilmiştir (Tablo 6). Örneklerin mikrodizin çalışmaları için uygun olduğu saptanmıştır. Mikrodizin analizi için yeterli miktar ve kalitede izole edilemeyen RNA örnekleri yeniden izole edilmiştir.

Tablo 6: RNA örneklerine ait konsantrasyon ve RIN değeri aralıkları

RNA örnekleri/ sayısı	Konsantrasyon (ng/µl) min-max	A260/A280 min-max	A260/A230 min-max	RIN min-max
15 AF RA	26.06 – 65.89	1.92 – 2.36	0.05 – 1.47	3.5 – 7.3
15 AF LA	14.64 – 97.23	1.96 – 2.22	0.05 – 1.57	3 – 8.1
15 SR RA	15.63 – 60.45	1.98 – 2.26	0.05 – 1.58	2.8 – 8.4
15 SR LA	20.76 – 61.62	1.92 – 2.18	0.05 – 1.73	4.8 – 8.2



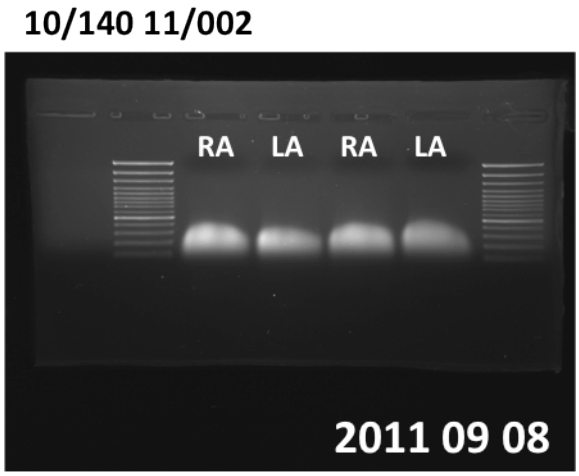
Şekil 30: RNA örneklerinin % 1 agaroz jelde yürütülüp görüntülenmesi

5.2.2. Mikrodizin Analizi için cRNA Sentezlenmesi ve Fragmantasyonu

Total RNA izolasyonundan sonra elde edilen RNA örneklerinin miktar ve kalite açısından mikrodizin analizine uygun olduğu tespit edildikten sonra mikrodizin analizi için deney basamaklarına geçilmiştir. Sentezlenen cRNA miktarının spektrofotometrik ölçümü ve fragmantasyonunun görülebildiği agaroz jel görüntülerinden örnekler aşağıda yer almaktadır (Tablo 7 ve Şekil 31).

Tablo 7: İzole edilen total RNA örneklerinden sentezlenen cRNA örneklerinin spektrofotometrik ölçüm aralıkları

cRNA örnekleri/ sayısı	Konsantrasyon (ng/µl) min-max	A260/A280 min-max	A260/A230 min-max	Fragmantasyon
15 AF RA	336.92 – 1365.6	1.73 - 2.01	0.65 - 2.01	ok
15 AF LA	318.63 – 1263.93	1.87 - 2.08	0.97 - 2.12	ok
15 SR RA	331.88 – 1160.98	1.77 - 2.06	0.68 - 2.01	ok
15 SR LA	319.83 – 1139.51	1.86 - 2.09	0.43 - 2.02	ok



Şekil 31: İzole edilen total RNA'lardan sentezlenen cRNA'ların fragmante edildikten sonraki agaroz jel görüntüleri

5.5.3. Hibridizasyon

Mikrodizin analizinde ıslak laboratuvar çalışmasının sondan önceki basamağı hibridizasyondur. Özetle doku örneklerinden izole edilen total RNA'lardan biyotin işaretli cRNA'lar sentezlendi ve fragmante edildikten sonra insan genomunun 54675 transkriptle temsil edildiği "Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array"ler üzerine hibridize edildi. Son basamak bu arraylerin yılama-boyama-tarama işlemleridir. Tablo 8'de tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen mikrodizinlerin hibridizasyon yüzdeleri gösterilmiştir.

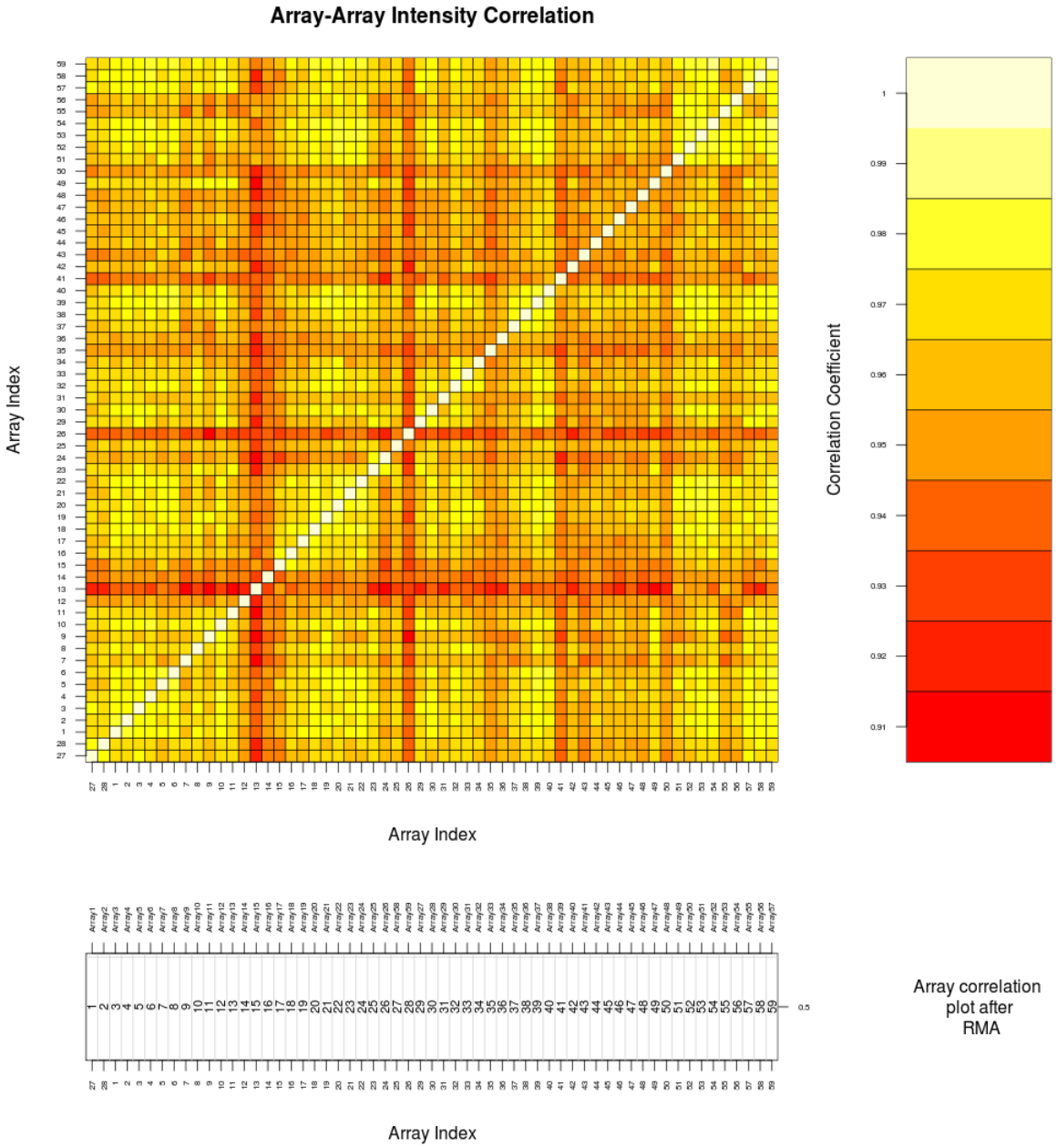
Tablo 8: Mikrodizini tamamlanmış arraylerin hibridizasyon yüzdeleri

Hibridize edilen array sayısı	Hibridizasyon yüzdesi (% P) min-max
15 AF RA	32.4 - 46.4
15 AF LA	31.9 - 44.9
15 SR RA	32.7 - 45.9
15 SR LA	31.4 - 46.6

5.5.4. Biyoinformatik analizler

Mikrodizin analizleri tamamlanmış arraylerin kalite kontrol analizleri www.arrayanalysis.org aracıyla gerçekleştirilmiştir (168). Islak laboratuvar çalışması sonunda elde edilen tüm CEL dosyalarının birlikte analizinin yapılabilirliğini değerlendiren bu analiz ile veriseti içerisindeki tüm arralerin birbirleriyle yüksek oranda korele olduğu tespit edilmiştir.

Arraylerin ön işleme (preprocessing) sonrasında kabul edilebilir korelasyon değeri 0,8 üzerinde olmalıdır. Daha düşük değerde korelasyon gösteren arrayler, birlikte analiz edilemeyeceği için veri setinden çıkarılmalıdır. Yapılan kalite kontrol analizinde ön işleme sonrası tüm arraylerin 0,91 ve üzerinde korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 32).



Şekil 32: Arraylerin ön işleme sonrası korelasyonu

5.5.5. Farklı ifade olan gen setleri

AF ve SR grupları arasında farklı ifade olan ve ifadesi 1,5 kat ve üzerinde değişim gösteren ***213*** gen tespit edilmiştir (Ek 2). Bu genler arasında; kalp kasılmasıyla ilgili olan CACNA1G, CSRP3, GNAO1, KCNJ18 genleri; ekstrasellüler matriks ile ilgili CHL1, COL21A1, COL28A1, COLQ, FGF1, SLC1A3, VIT, COMP, CPLX3 genleri; ANGPTL2, BMP7, NPPB, TNNI1; iyon kanalı kodlayan CACNB2, GJC1, KCNK3, ATP1B4, SNX22 genleri; apoptozisle ilgili PRKAR1A, DNAJA4, BNIP3, FASTKD1, DAPK2, GADD45,

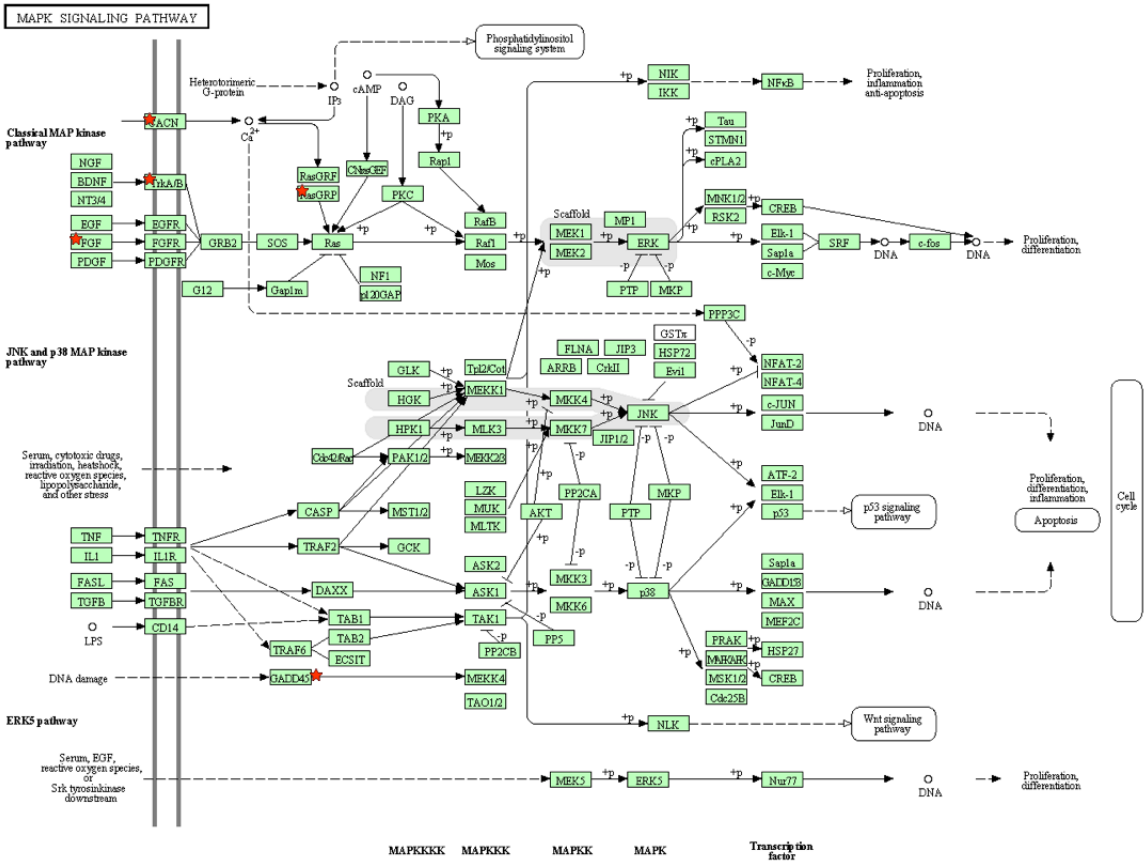
BCL6, KLF10 genleri; anjiyogenezle ilgili NTRK2; AKAP3, AKAP6, ADAM11 gen ifadelerindeki değişim özellikle dikkat çekicidir.

Sağ ve sol atriyum arasında yapılan karşılaştırmada farklı ifade olan gen sayısı ***368*** olarak tespit edilmiştir (Ek 3). Bu genler arasında ADM, BMP5, BMP10, FBN2, HS3ST3A1, NPR3, SMAD6, SMAD7, SMAD9, TNNI3K, FHL2, SLN, GJA5, COL4A5, COL4A6, COL13A1, ADAMTS8, ANGPT1 FOXC1, ve TGF-β sinyal yolağı dikkat çekicidir.

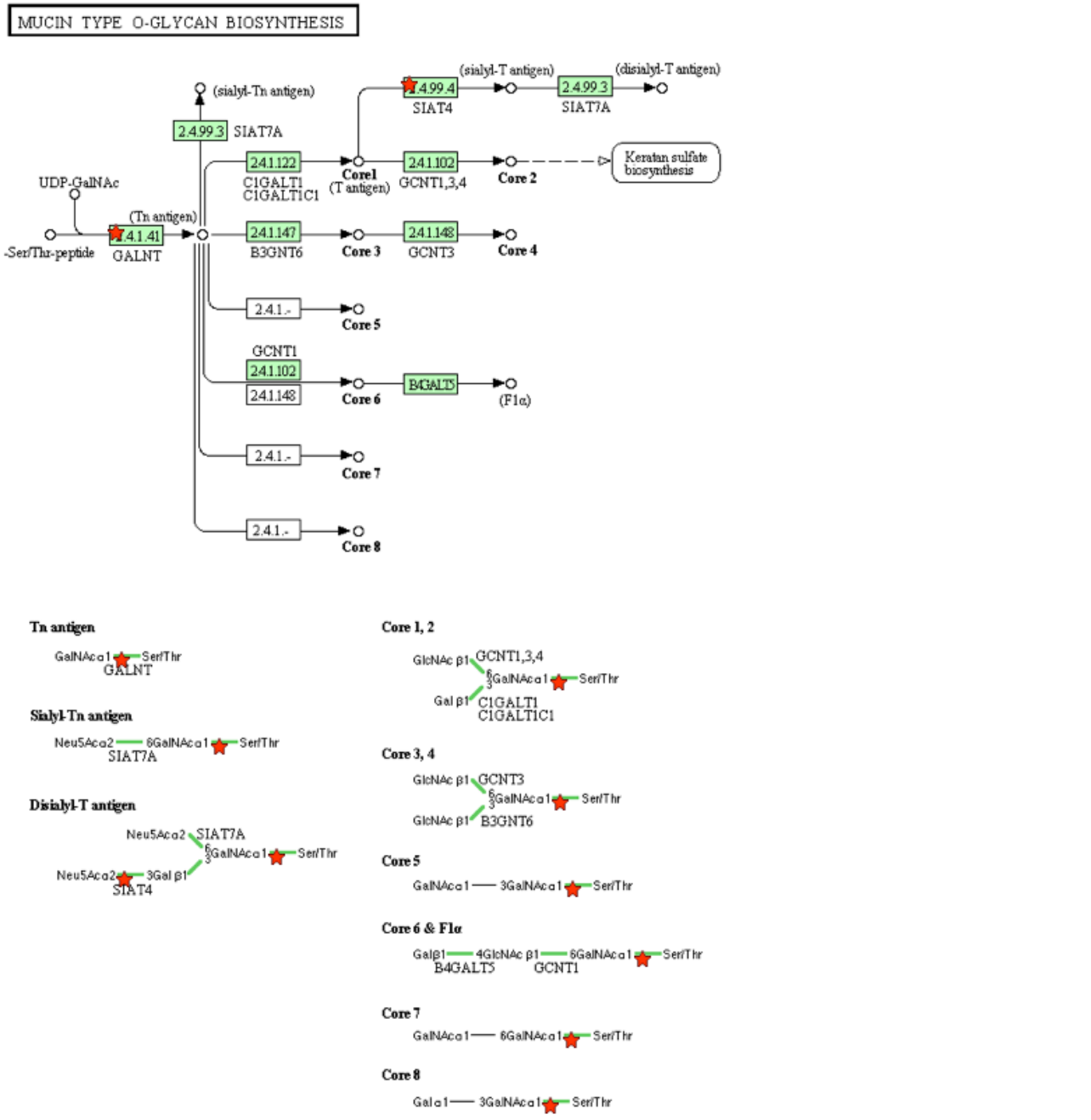
5.5.6. Genlerin anotasyonu, hiyerarşik kümelenmesi ve yolak analizleri

AF grubunda MAPK yolağı üzerinde bulunan 6 genin ifadelerinin artmasıyla bu yolağın, AF sürecinde aktive olan yolaklardan biri olduğu tespit edilmiştir (Şekil 33). İfadesi farklı olan genler yolak üzerinde yıldızla işaretlenmiştir. AF sürecinde etkin olduğu tespit edilen bir diğer yolak O-Glikan biyosentez yolağıdır (Şekil 34). Ayrıca ekstrasellüler matriksle ilişkili genlerin ifadesi AF grubunda yüksek oranda değişmiştir. Bu durum AF sürecinde ekstrasellüler matriks alterasyonları olduğu (Şekil 39), fibrozisin aktifleştiğini göstermektedir. Bunların dışında kardiyak kas kontraksiyonu, apoptozis, iyon ve membran transportuyla ilişkili genler, kalsiyum sinyal yolağı ve hücre-hücre interaksiyonu ile ilgili olan genlerin ifadelerinin anlamlı oranda değiştiği belirlenmiştir.

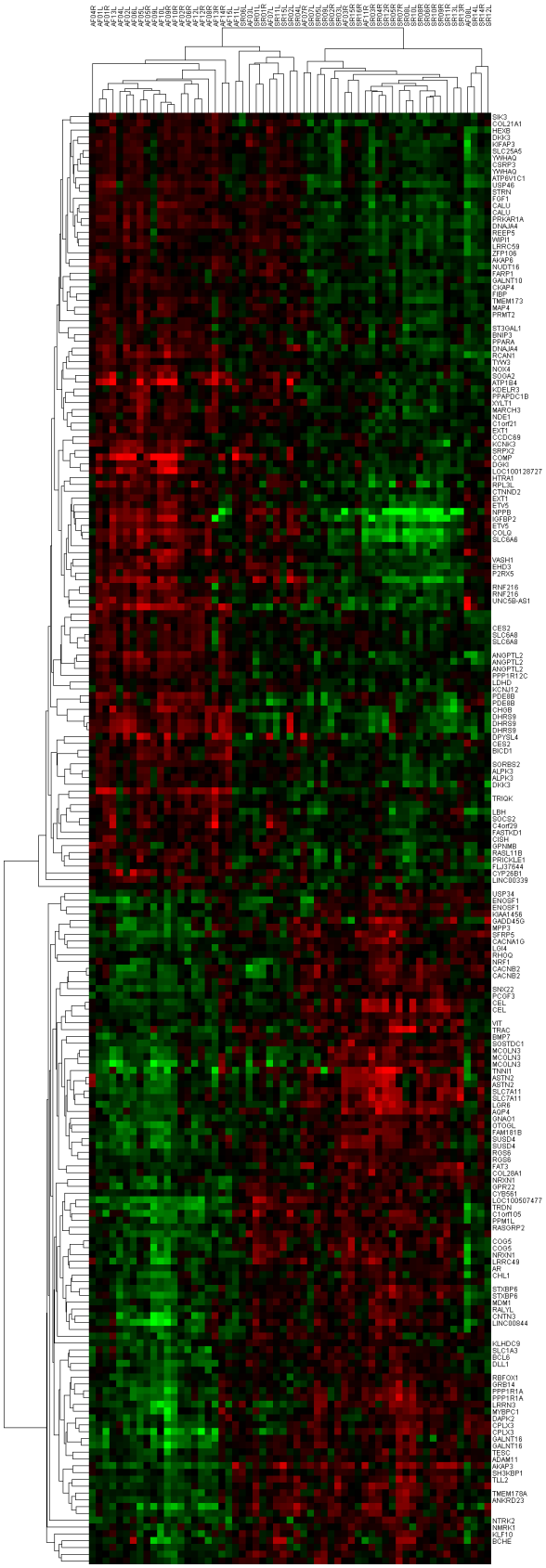
Heatmap üzerindeki dendogram, örneklerin kümelenmesini gösterirken sol tarafındaki dendogram 2 kat değişim gösteren genlerin kümelenmesini göstermektedir (Şekil 35 ve 36).



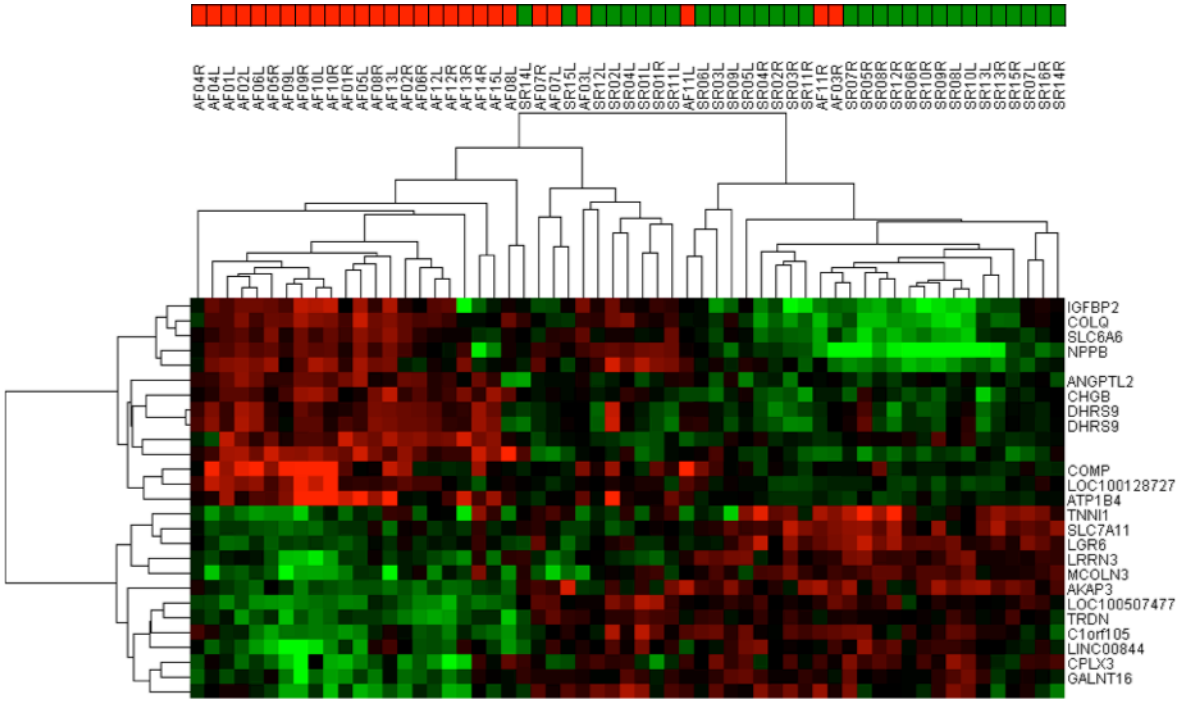
Şekil 33: MAPK yolağı



Şekil 34: Müsin tip O-glikan biyosentez yolağı



Şekil 35: 2 kat ve fazla değişim gösteren genlerle hiyerarşik kümeleme ve heatmap



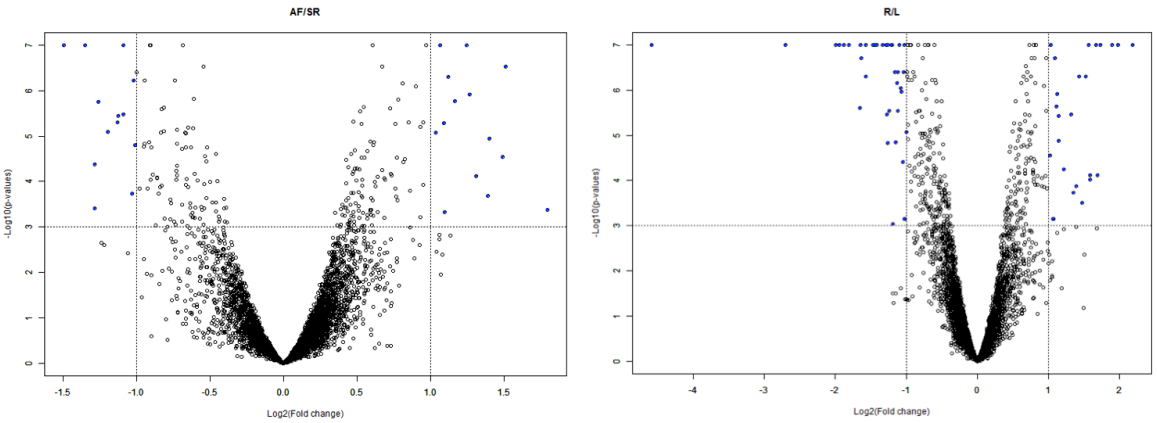
Şekil 36: Hiyerarşik kümeleme ve heatmape yakın bakış

Heatmapin üst tarafında örneklerin dağılımını gösteren dendogram, ilk basamakta 2 kola ayrıldığı ve AF ile SR örnekleri büyük oranda birbirinden ayrıldığı görülmektedir.

Tablo 9: AF/SR arasında 2 kat ve daha fazla değişim gösteren genler

Gen Adı	Sembolü
chromogranin B (secretogranin 1)	CHGB
uncharacterized LOC100507477	LOC100507477
mucolipin 3	MCOLN3
triadin	TRDN
angiopoietin-like 2	ANGPTL2
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	DHRS9
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 16	GALNT16
solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	SLC6A6
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	DHRS9
A kinase (PRKA) anchor protein 3	AKAP3
solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11	SLC7A11
leucine rich repeat neuronal 3	LRRN3
chromosome 1 open reading frame 105	C1orf105
uncharacterized LOC100128727	LOC100128727
long intergenic non-protein coding RNA 844	LINC00844
collagen-like tail subunit (single strand of homotrimer) of asymmetric acetylcholinesterase	COLQ
leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 6	LGR6
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 4 polypeptide	ATP1B4
complexin 3	CPLX3
cartilage oligomeric matrix protein	COMP
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2
troponin I type 1 (skeletal, slow)	TNNI1
natriuretic peptide B	NPPB

Büyük verisetleri içerisinde değişiklikleri kolayca görmeye yarayan, anlamlılık (p değeri) ve kat değişimine göre veriyi grafiklendiren "volcano plot"lar AF/SR ve RA/LA aralarında farklı ifade olduğu belirlenen genlerle çizdirilmiştir. 2 kat ve daha fazla değişim gösteren genler mavi noktalarla belirtilmiştir (Şekil 37)



Şekil 37: Farklı ifade olan genlerin volcano plotları

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

AF'un moleküler temellerinin transkriptom ebadında araştırıldığı bu çalışmada dejeneratif mitral yetmezliği etiyolojisinin eşlik ettiği 15 AF ve 15 sinüs ritimli hastanın sağ ve sol atriyum örnekleri dahil edilmiştir.

Bugüne dek AF'un global moleküler analizine dair farklı çalışmalar yapılmıştır. Ancak bu çalışmalardaki en büyük sorun, heterojen gruplarla yapılan, kompleks hastalıkların araştırıldığı yüksek işlem hacimli çalışmalarda karşılaşılan gürültünün, sonuçlar üzerine gölgeleyici etkisinin olmasıdır. Heterojen bir patoloji olan AF'u, mikrodizin gibi yüksek işlem hacimli bir yöntemle araştırırken etiyoloji ve kontrol grubu açısından homojen örneklerin seçilmesi gerekmektedir. Bu nedenle AF'un moleküler patofizyolojisinin araştırıldığı bu tez çalışmasında hasta ve kontrol grupları son derece homojen tutulmaya çalışılmıştır. Mitral kapak hastalığında romatizmal tutulum ve iskemik kalp hastalıkları da etiyolojik neden olarak karşımıza çıkabilmektedir. Romatizmal mitral kapak hastalığında enflamatuar sürecin patogenezde rol oynaması gen ekspresyon profilleri üzerinde etkili olabilecek bir başka değişkeni oluşturma potansiyeli dolayısıyla çalışma dizaynı sırasında dışlanma kriteri olarak belirlenmiştir. Benzer gerekçeler iskemik etiyolojili mitral kapak hastalıkları için de geçerli olması nedeniyle dışlanma kriteri olarak kabul edilmiştir. İzole dejeneratif mitral yetmezliği olgularının çalışmaya alınması etiyolojik üniformite sağlaması açısından literatürdeki ilk ve tek örneği oluşturmaktadır. Çalışmaya alınan hastaların dejeneratif MY etiyolojisinin patolojik incelemelerle doğrulanması çalışmanın güvenilirliğini artırması anlamında etkin bir metodolojik yöntem özelliğini taşımaktadır.

Çalışmaya alınan hastalar kalıcı (permanent) AF özelliğini taşımaktadır. Heterojen bir patoloji olan AF, tek başına görülebildiği gibi başka patolojilere de eşlik edebilmektedir. AF'un ortaya çıkmasına sebep olan mekanizmalar başlı başına çeşitlilik gösterir. Ayrıca klinikte AF sonlanma durumuna ve süresine göre sınıflandırılmıştır. Çünkü AF süresine göre hem moleküler hem hücresel hem de makro düzeyde değişiklikler farklılık arz etmektedir. AF ile yeniden biçimlenme sırasında farklı zaman dilimleri mevcuttur (47). Saniyelerle dakikalar arasında olan "kısa dönem"de; iyon konsantrasyonu, pompa aktivitesi ve fosforilasyon gibi metabolik değişimler görülmektedir. Saatlerle günler arasında gerçekleşen "orta dönem", gen ekspresyon değişimleri ve kalsiyum downregülasyonu ile karakterizedir. Gen ekspresyon değişimlerinin değerlendirilmesinde AF süresi de önem kazanmaktadır. Bu bağlamda çalışmaya alınan hastaların gen ifade

profillerindeki moleküler değişikliklerin benzer sürede AF'a maruz kalmış ve değişikliklerin büyük çoğunluğunun AF sebebiyle olma potansiyeli açısından kalıcı AF'lu hastalardan seçilmesi, elde edilen sonuçların hastalık ilişkili ifade profili değişikliğine işaret etmesi açısından önem göstermektedir. İnsanlarda AF süresi ile ilgili gen ekspresyon değişimlerinin araştırıldığı bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu açıdan izole kalıcı AF hastalarının değerlendirmeye alındığı bu çalışma tanımlanan açıdan da literatürdeki tek örnek olma niteliğini taşımaktadır.

6.1. RNA İzolasyonu

Moleküler temelli kardiyovasküler araştırmalarda gen ekspresyon profillerinin ortaya konması için hedef genlerde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli metodolojiler kullanılmaktadır. Günümüzde gelişen moleküler biyolojik teknikler sayesinde hastalıklı dokuda mikrodizin yöntemiyle genom ürünlerinin bütünün, diğer bir deyişle transkriptomun tamamının değerlendirilmesi de olasıdır. Ancak, bu metodoloji RNA'nın kalp dokusundan parçalanmadan, bütünlüğünü kaybetmeden izole edilmesini gerektirmektedir ki bu da ciddi teknik zorluklar içermektedir. Uygulanabilir ve tekrar edilebilir protokollerin oluşturulması amacıyla proje kapsamında insan kalp dokusundan total RNA izolasyon metodolojisinin tanımlanması kardiyovasküler moleküler çalışmalar açısından önemli bilimsel kazanımlar sağlamıştır.

Parçalanmamış total RNA izolasyonunda, yöntem optimizasyonunun birçok değişkene bağlı olduğu gözlenmiştir. En iyi kardiyak doku homojenizasyonunun, cerrahi sırasında alınan taze atriyal dokunun mikrodiseksiyon aletleri kullanılarak mümkün olduğunca ince diseksiyonu ve sıvı nitrojen içinde dondurulması ile elde edildiği gözlemlenmiştir. Total RNA izolasyonunda; Trizol yönteminde nanodrop ile ölçülen RNA konsantrasyonu 326.5 ng/ul ile 445.2 ng/ul arasında değişirken agaroz jel elektroforezinde RNA'nın tamamen degrade olduğunu gösteren yayma görüntüsü izlenmiştir. Qiagen yönteminde ise RNA konsantrasyonu 42.4 ng/ul ile 127.2 ng/ul arasında değişmekte ve agaroz jel elektroforezinde parçalanma olmasına rağmen bütünlüğünü kısmen korumuş 18S/28S bantları gözlenebilmektedir. MELT yönteminde RNA konsantrasyonu 17.9 ng/ul ile 87.0 ng/ul arasında ölçülmüş, jelde belirgin 18S/28S bantları gözlenmiştir. Bu yöntemlerle izole edilen RNA örnekleri arasında 18S/28S bantlarında en az degradasyon bahsedilen homojenizasyon yöntemi ve MELT izolasyon yöntemi ile elde edilen RNA örneklerinde

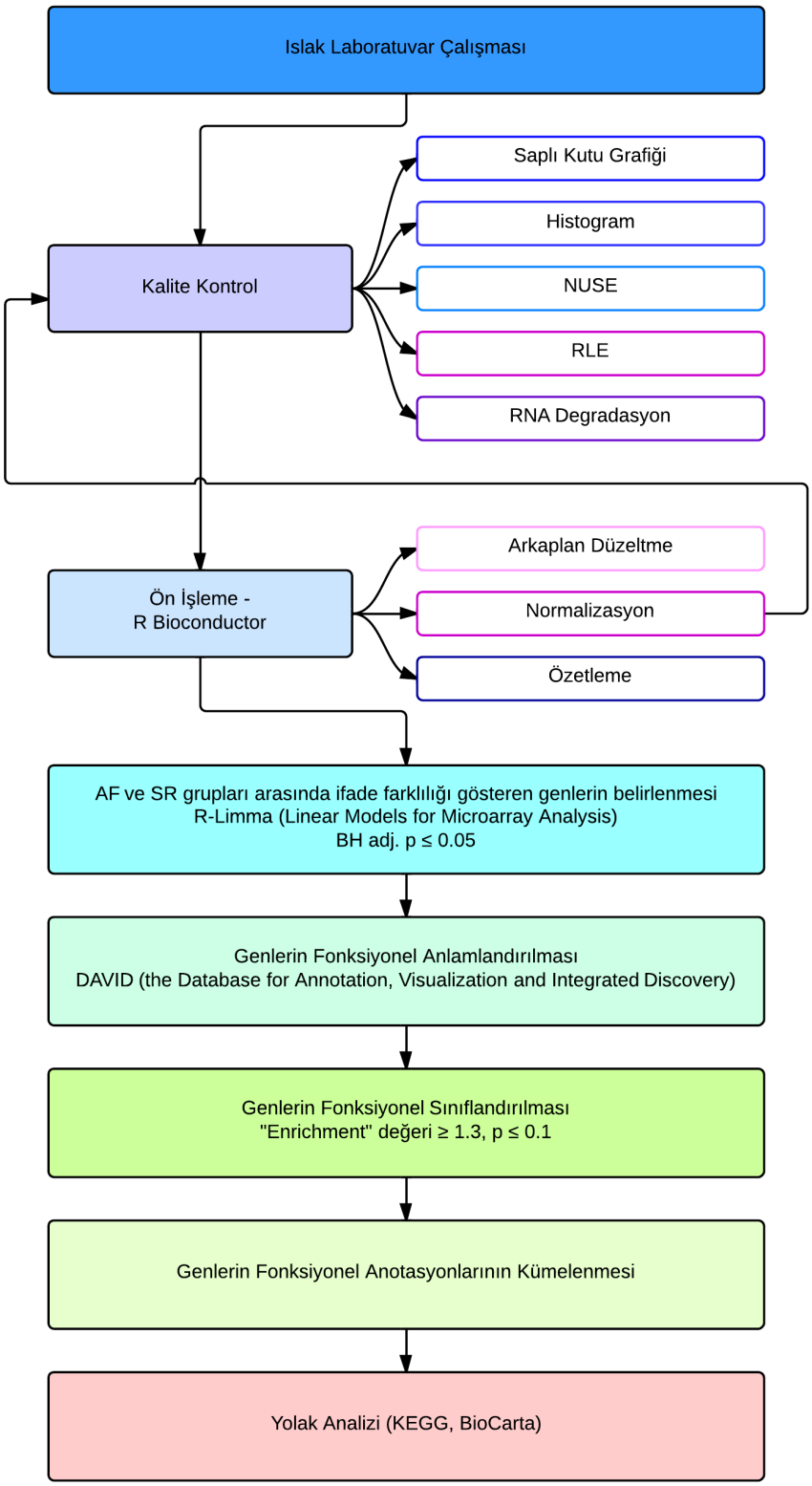
olduğu belirlenmiştir. Bu metodoloji ile elde edilen RNA örneklerinin, Agilent 2100 Bioanalyzer sisteminde elde edilen RIN değerleri 5.70 ile 7.50 arasında değişmektedir.

Kardiyak dokunun transkriptomik analizlerinde parçalanmamış total RNA izolasyonu için kardiyak dokunun homojenizasyonu oldukça kritik bir aşamadır ve bu süreçte son derece kırılgan olan RNA parçalanabilmektedir. Sağ ve sol insan atriyum doku örneklerinde karşılaştırdığımız doku homojenizasyon ve RNA izolasyon yöntemleri arasında intraoperatif mikrodiseksiyon tekniği en başarılı sonucu vermiştir. Tanımlanan bu metodoloji insan atriyal dokusunun genom ebadında transkriptomik araştırmalarında istikrarlı sonuçların alınmasına sağladığı katkılar bakımından önemlidir. Nitekim tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen kalp dokusundan intakt total RNA izolasyon metodolojisi **Uluslararası katılımlı Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 11. Ulusal Kongresi'nde** sunulmuş ve ***"Araştırma Üçüncülük"*** ödülünü kazanmıştır.

6.2. Mikrodizin Bulguları

Mikrodizin teknolojilerin AF araştırmalarında kullanılmaya başlandığı erken dönemlerde hasta karakterizasyonlarının üniform olmadığı çalışmalar planlanmıştır. Bu durum birden fazla patolojik kondisyonun farklı olması durumunda elde edilecek sonuçların hangi kondisyonla ilişkili olduğu konusunda belirsizlikleri beraberinde getirmiştir. Bu tez çalışması kapsamında dejeneratif mitral yetmezliği olan 15'i AF'lu 15'i sinüs ritimli toplam 30 hastanın sol ve sağ atriyum doku örneklerinde (n=60) 54.675 transkriptin temsil edildiği transkriptom boyu mikrodizin analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca elde edilen mikrodizin gen ekspresyon verisi üzerinde farklı ifade düzeyi gösteren genlerin belirlenmesi amacıyla ileri biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Toplam 60 örnekte gerçekleştirilen transkriptom analizi sonrasında AF'lu ve sinüs ritimli doku örneklerinde farklı düzeyde ifade olan 213 gen tespit edilmiştir. Çalışma çerçevesinde kullanılan biyoinformatik analizler ve veri madenciliği algoritması Şekil 38'de özetlenmiştir. DAVID biyoinformatik analiz platformunda gerçekleştirilen fonksiyonel anotasyon ve yolak analizleri AF etiyopatolojisiyle öncelikli olarak ilintilendirilebilen 8 genin kas kasılması, 18 genin ekstrasellüler matriks regülasyonu, 6 genin MAPK sinyal yolağı, 11 genin iyon transportu aktivitesi ile ilişkili olduğu yolak analizlerinde tespit edilmiştir. Tez çalışması bitmiş olmakla beraber çalışmada çıkacak olan makalelerimizin analiz ve hazırlık çalışmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu çalışmalar kapsamında belirlediğimiz

213 gen içinden ilgili yolaklarda yer alan öncelikli hedefleri teyyid etmeye devam edilmektedir.



Şekil 38: Tez çalışması çerçevesinde kullanılan biyoinformatik analizler ve veri madenciliği algoritması

Atriyal fibrilasyonda hücreler arası etkileşim ve iyon transportu ile ilgili gen grupları farklı düzeyde ifade edilmektedir.

AF sürecinin başlarında iyon konsantrasyonlarında değişiklikler olduğu literatürde bildirilmiştir. İyon kanallarını kodlayan genlerin ifadelerinin AF grubunda istatistiki anlamlı düzeyde farklı bulunması literatürdeki bu veriyi desteklemektedir. Çalışmanın verisetinde özellikle potasyum, kalsiyum kanallarındaki transportla ilişkili genlerin ifadelerinde değişiklik olduğu saptanmıştır.

Atriyal fibrilasyonda apoptozis ile ilişkili genler farklı düzeyde ifade edilmektedir.

AF'un moleküler temellerinin araştırıldığı bir çok immünohistokimya temelli, yüksek işlem hacimli, protein temelli, morfolojik çalışmada AF sürecinde apoptozisin etkin olduğu iddia edilmiştir. Kharlap ve arkadaşlarının (154) yaptığı çalışmada AF'nu olan koroner arter hastalığı, mitral kapak hastalığı ve sol atriyal miksoma olgularının sağ atriyum transkriptom profilleri değerlendirilmiştir. AF olgularında sinyal iletimi, gen transkripsiyon regülasyonu, hücre proliferasyonu ve apoptozisten sorumlu genlerin farklı ifade olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da hücre ölümünden sorumlu 14 transkriptin ifade seviyesinin AF grubunda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik araştırmaların sonuçları da bu bulguyu destekler niteliktedir. Bu veriler ayrı bir alt başlıkta tartışılmıştır.

Atriyal fibrilasyonda hücre morfogenezinden sorumlu genlerin ifade düzeyi değişmektedir.

Kalp, embriyolojik gelişimi sırasında çok özelleşmiş çeşitli hücresel farklılaşma süreçlerinden geçerek kasılabilir dört odacıklı haline ulaşmaktadır. Son zamanlardaki morfogenezle ilgili çalışmalarda transkripsiyonel kontrolün embriyonik gelişim sürecinde kardiyak morfogeneziste ve elektrofizyolojik gelişimde önemli görevler üstlendiği tanımlamıştır (169). bunlar arasında hücre morfogenezisinden sorumlu genlerden olan Pitx2 transkripsiyon faktörü kardiyak morfogenezis sırasında sol kalp gelişimi ile ilişkilidir. Pitx2 down-regülasyonu ventriküllerin formasyonu için gerekli bir durumken, atriyumun pulmoner venlerin ve interatriyal semptum morfogenezisinde ise up-regülasyonu önemli görevler almaktadır (170). Pulmoner venlerin ve sol atriyumun morfogenezisinde kritik rol oynayan hücre morfogenezis ile ilgili transkriptler, anatomik olarak AF'nun gelişiminde

önemli anatomik lokalizasyon benzerliği dolayısıyla bu hastalığın patogenezinde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (171). Bizim çalışmamızda da sağ ve sol atriyum farkı gözetmeksizin AF olgularında hücre morfogenezisinden sorumlu 9 gen sinüs ritmi olgularından farklı ifade bulduğu tespit edilmiştir. Literatürde hücre morfogenezinden sorumlu gen ve gen ürünleriyle AF ilişkisi konusunda önemli miktarda çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda çalışma kapsamında elde edilen hücre morfogenezi gen ürünleri-AF ilişkisi konusundaki bilgiler literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

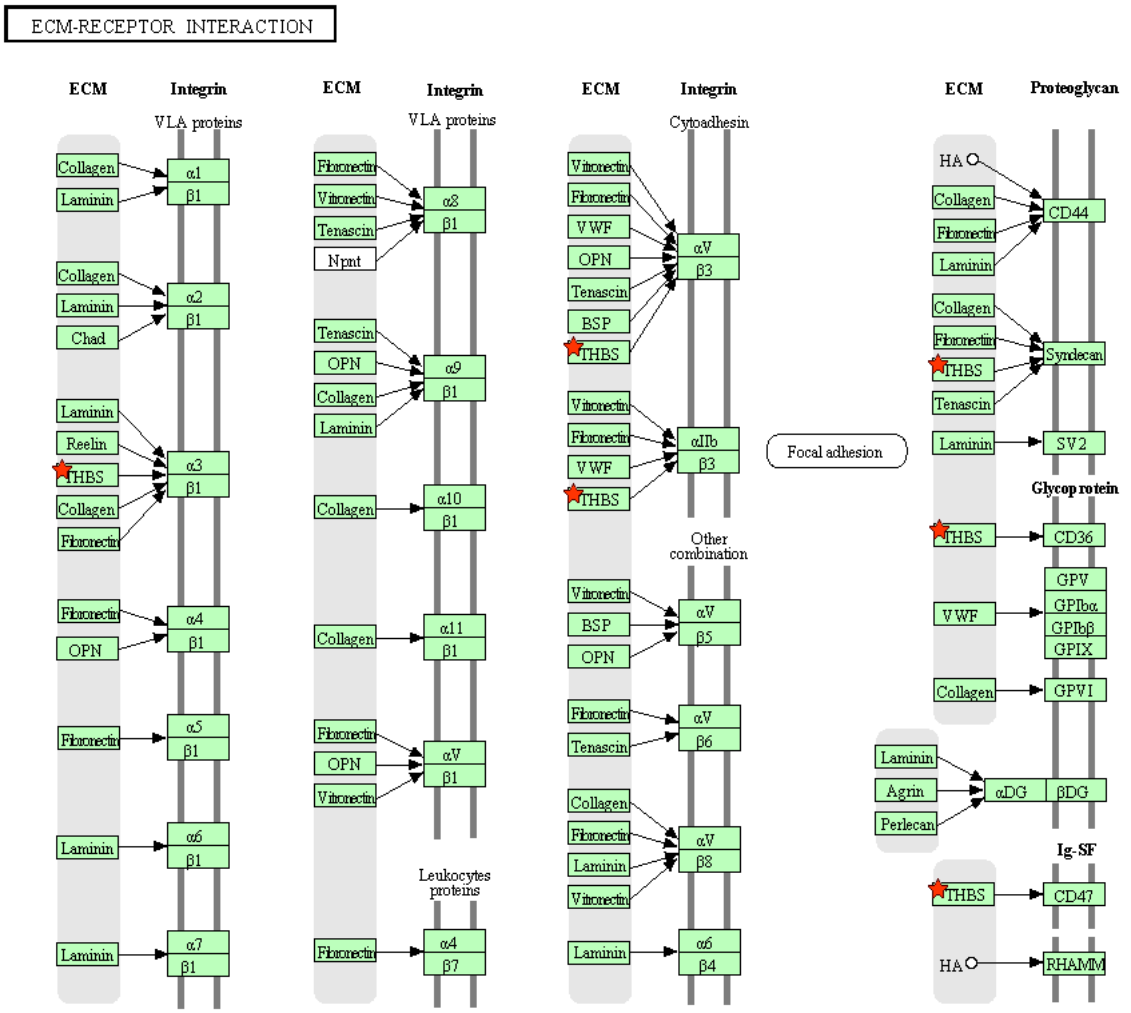
Atriyal fibrilasyon MAPK sinyal yolağını etkilemektedir.

Sol ventrikülün mekanik gerilmeye vermiş olduğu yanıtın mekanizması iyi anlaşılmakla beraber atriyumlar için bu durum sınırlı ölçülerde kalmıştır. Mekanik gerilmenin etkisiyle iyon kanal aktivitelerinde ve otokrin/parakrin mekanizmalarda değişiklikler sonucunda gen ekspresyon profillerinde değişiklikler olmaktadır. Mekanik gerilme sonrasında kardiyomiyositlerde mitogen-activated protein kinaz (MAPK) sinyal yolağında değişiklikler olmaktadır (172). MAPK sinyal yolağı üç alt gruba ayrılmaktadır: extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) yolağı, JNK yolağı ve p38 MAPK yolağı (Şekil 33). Bu üç sinyal yolağı miyosit gerilmesi, endothelin-1, anjiotensin II ve diğer G protein-coupled reseptör agonistleri gibi çeşitli uyarılarla aktive olabilmektedir (173). AF'un yaratmış olduğu mekanik gerilme kuvvetinin bu sinyal yolağında çeşitli değişiklikler yapma potansiyeli mevcuttur. Ancak literatürde bu konuda son derece sınırlı kaynak bulunmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarda MAPK sinyal yolağında bulunan 6 gen AF grubunda farklı ifade bulduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular paralelinde AF patogenezinde MAPK sinyal yolağı üzerinde durulması gereken önemli anahtar/tetik mekanizmalarından birisini oluşturmaktadır.

Atriyal fibrilasyon sürecinde fibrozis etkin bir mekanizmadır ve ekstrasellüler matriks içeriğinde değişiklikler olmaktadır.

AF sürecinde fibrozisin etkin olduğu literatürdeki bir çok çalışmada gösterilmiştir. Atriyal dokuda gerek apoptozis veya diğer hücre ölümü şekilleriyle kaybedilen gerekse kolajen birikimi sebebiyle fibrotik alanların oluşması sonucunda ileti sisteminde aksaklıklar olur. İleti yolundaki fibrotik bir alan, iletinin aksesuar yollar aracılığıyla devam etmesine sebep olmaktadır. Eğer gelen impuls iletilemeyecek kadar geniş bir fibrotik alan oluşmuşsa reentry oluşturacak yeni pacemaker hücrelerin oluşmasını da indükleyebilir. Ekstrasellüler

matriks-reseptör etkileşim yolağında AF ve SR grupları arasında farklı ifade olduğu tespit edilen 6 gen bulunmaktadır. Bu genler kırmızı yıldızlarla işaretlenmiştir (Şekil 39).



Şekil 39: Ekstrasellüler matriks ve reseptör etkileşim yolağı

6.3. Apoptozis Bulguları

Apoptozisin AF'da etiyolojik bir neden olarak araştırıldığı bu çalışmada, kalıcı AF'lu hastaların atriyal doku örneklerinde immünohistokimyasal yöntemlerle, kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada proapoptotik protein ifadelerinde istatistiki olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada, kalıcı AF'u olan hastaların sağ atriyal doku kesitlerinde normal sinüs ritimli hasta kesitlerine göre, immunohistokimyasal yöntemlerle pro-apoptotik Bax protein ekspresyonun artma eğiliminde ve anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunun azalma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Öte yandan atriyal hücrelerin

ultrastrüktürel incelemelerinin yapıldığı elektron mikroskobik incelemelerde büzüşme nekrozu olarak da adlandırılan apoptosize işaret eden morfolojik değişiklikler (büzüşme nekrozu, nükleer membranın altında kromatin clumping ve vakuolalizasyon) tespit edilmiştir. Ayrıca yine bir programlı hücre ölümü tipi olan otafaji ile uyumlu değişiklikler (sitoplazmik lipofuskin birikimi) AF olgularında tespit edilmiştir.

Apoptozis, regüle edilebileceği değişik basamakları olan çok adımlı bir hücre ölümü prosesidir. Özellikle Bcl-2 gen ailesi tarafından pro- veya anti-apoptotik protein ekspresyonlarının çeşitli nedenlerle artması/azalmasına göre apoptozis regüle edilir (174). Bu durum, tam diferansiye olmuş kardiyomiyositlerin geri dönüşümsüz hücre hasarına yanıt olarak, miyokardiyuma daha çok zarar veren nekrozisin yerine apoptozise yönlendirilebilmesi veya kurtarılabilir hücrelerin gereksiz ölümünün engellenmesi açısından önemli bir özelliktir. Apoptozisin uyarımı veya inhibisyonu; kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hücresel hasarların olduğu patolojilerin önlenmesi ve tedavisi için önemli bir hedef olacaktır.

Kardiyovasküler sistemin normal embriyonik gelişimi sırasında apoptozis yoğun olarak meydana gelirken erişkinlerde apoptozis mekanizmaları, erişkin kalpte inaktif halde bulunur (110). Bunun yanında çeşitli kardiyak ve vasküler hastalıklarda apoptozis mekanizmalarında değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Tip-A Aort disseksiyonlu hastaların vasküler düz kas hücrelerinde pro-apoptotik Bak proteini ekspresyonunun ve DNA fragmantasyonunun kontrol örneklerine oranla fazla olduğu çalışma grubumuz tarafınca gösterilmiştir (175). Öte yandan kardiyovasküler hastalılarda AF ile apoptozis arasındaki ilişki irdelenmiştir. Çobanoğlu ve ark.'ları koroner bypass operasyonuna alınan hastalarda sağ atriyal dokudaki apoptozisin postoperatif AF gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir (176). Yine araştırma grubumuzun yapmış olduğu çalışmada apoptozisin terminal belirteci olan DNA fragmantasyonu ile AF arasında pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, kalıcı AF patogenezinde atriyal miyosit apoptozisinin rolü olduğunu düşündürmektedir (177).

Hücre fizyolojisi ve patolojisindeki temel rolü son yıllarda ortaya çıkan apoptozisin moleküler düzeyde anlaşılması tedavi yaklaşımlarına yeni boyutlar getirecektir. Apoptozisin uyarımı ve inhibisyonu, belirli kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde ideal bir yöntem gibi görülmektedir. Ancak klinikte apoptozisten

yararlanabilmek için selektif dokularda bu sürecin nasıl başlatılabileceği ve nasıl sonlandırılabileceğine yönelik yoğun çalışmalara gereksinim vardır. Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlarla AF patogenezinde apoptozisin rolü olma ihtimali yüksektir. Bu bilginin üzerinde yapılacak ileri çalışmalar ile sonuçları açısından önemli olan bu ritim bozukluğunun tedavisinde yeni bakış açıları geliştirme potansiyeli gündeme gelebilecektir.

Sonuç

Bu tez çalışmasında, mikrodizin çalışmalarıyla bilimsel veri açısından önemli bulgular kaydedilmiştir. AF etiyopatogenezinde anahtar/tetik rolü oynayabilecek ve bugüne kadar AF ilişkisi tanımlanmamış yeni moleküler yolaklar tanımlanmıştır. Elde edilen verilerin hücre biyolojisi kapsamında yorumları ve detaylandırmalar devam etmektedir. Elde edilen sonuçlar daha sonra bilimsel arenada tartışılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Schnabel RB, Sullivan LM, Levy D, et al. Development of a risk score for atrial fibrillation (Framingham Heart Study): a community-based cohort study. Lancet. 2009 Feb 28;373(9665):739-45.
2. Lopes RD, White JA, Atar D, et al. Incidence, treatment, and outcomes of atrial fibrillation complicating non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. International journal of cardiology. 2013 Oct 3;168(3):2510-7.
3. Ma JY, Wang Y, Zhao YF, et al. Atrial fibrillation after surgery for esophageal carcinoma: clinical and prognostic significance. World journal of gastroenterology : WJG. 2006 Jan 21;12(3):449-52.
4. Mader SS. Inquiry into Life, 8th edition; 1997.
5. http://anatomyandphysiologyi.com/heart-anatomy-chambers-vessels-valves/.
6. Camm AJ. The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine; 2009.
7. http://www.cardioconsult.com.
8. http://www.planitikos.gr/2012/05/blog-post_07.html.
9. http://www.textbookofcardiology.com.
10. http://www.zuniv.net/physiology/book/chapter11.html.
11. Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, et al. Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. The New England journal of medicine. 1997 Mar 27;336(13):905-11.
12. Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. The American journal of cardiology. 1998 Oct 16;82(8A):2N-9N.
13. Wakili R, Voigt N, Kaab S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. The Journal of clinical investigation. 2011 Aug;121(8):2955-68.
14. Lip GY, Beevers DG. ABC of atrial fibrillation. History, epidemiology, and importance of atrial fibrillation. BMJ. 1995 Nov 18;311(7016):1361-3.
15. Khasnis A, Thakur RK. Atrial fibrillation: a historical perspective. Cardiology clinics. 2009 Feb;27(1):1-12, vii.
16. Flegel KM. From delirium cordis to atrial fibrillation: historical development of a disease concept. Annals of internal medicine. 1995 Jun 1;122(11):867-73.

17. Khasnis A, Thakur RK. Atrial fibrillation: a historical perspective. The Medical clinics of North America. 2008 Jan;92(1):1-15, ix.

18. Schweitzer P, Keller S. A history of atrial fibrillation. Vnitrni lekarstvi. 2002 Dec;48 Suppl 1:24-6.

19. Diker E, Aydogdu S, Ozdemir M, et al. Prevalence and predictors of atrial fibrillation in rheumatic valvular heart disease. The American journal of cardiology. 1996 Jan 1;77(1):96-8.

20. Holm M, Pehrson S, Ingemansson M, et al. Non-invasive assessment of the atrial cycle length during atrial fibrillation in man: introducing, validating and illustrating a new ECG method. Cardiovascular research. 1998 Apr;38(1):69-81.

21. J. MGA. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. American heart journal. 1959;58:59-70.

22. Konings KT, Kirchhof CJ, Smeets JR, Wellens HJ, Penn OC, Allessie MA. High-density mapping of electrically induced atrial fibrillation in humans. Circulation. 1994 Apr;89(4):1665-80.

23. Schuessler RB, Grayson TM, Bromberg BI, Cox JL, Boineau JP. Cholinergically mediated tachyarrhythmias induced by a single extrastimulus in the isolated canine right atrium. Circulation research. 1992 Nov;71(5):1254-67.

24. Nathan H EM. The junction between the left atrium and the pulmonary veins. An anatomic study of human hearts. Circulation. 1966;Sep;34(3):412-22.

25. Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. The New England journal of medicine. 1998 Sep 3;339(10):659-66.

26. Dilaveris PE, Gialafos EJ, Sideris SK, et al. Simple electrocardiographic markers for the prediction of paroxysmal idiopathic atrial fibrillation. American heart journal. 1998 May;135(5 Pt 1):733-8.

27. Li J, Wang L. Catheter ablation of atrial fibrillation originating from superior vena cava. Archives of medical research. 2006 Apr;37(3):415-8.

28. Haissaguerre M, Hocini M, Sanders P, et al. Localized sources maintaining atrial fibrillation organized by prior ablation. Circulation. 2006 Feb 7;113(5):616-25.

29. Chen PS, Chou CC, Tan AY, et al. The mechanisms of atrial fibrillation. Journal of cardiovascular electrophysiology. 2006 Dec;17 Suppl 3:S2-7.

30. Gallagher MM, Camm AJ. Classification of atrial fibrillation. Pacing and clinical electrophysiology : PACE. 1997 Jun;20(6):1603-5.

31. Shemin RJ, Cox JL, Gillinov AM, Blackstone EH, Bridges CR. Guidelines for reporting data and outcomes for the surgical treatment of atrial fibrillation. The Annals of thoracic surgery. 2007 Mar;83(3):1225-30.

32. Tapio H, Jari H, Kimmo M, Juha H. Prevention of atrial fibrillation after cardiac surgery. Scandinavian cardiovascular journal : SCJ. 2007 Apr;41(2):72-8.

33. Ramlawi B, Otu H, Mieno S, et al. Oxidative stress and atrial fibrillation after cardiac surgery: a case-control study. The Annals of thoracic surgery. 2007 Oct;84(4):1166-72; discussion 72-3.

34. Edgerton ZJ, Edgerton JR. History of surgery for atrial fibrillation. Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society. 2009 Dec;6(12 Suppl):S1-4.

35. Scheinman MM, Morady F, Hess DS, Gonzalez R. Catheter-induced ablation of the atrioventricular junction to control refractory supraventricular arrhythmias. JAMA. 1982 Aug 20;248(7):851-5.

36. Cox JL. The first Maze procedure. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 2011 May;141(5):1093-7.

37. Cox JL, Schuessler RB, Boineau JP. The development of the Maze procedure for the treatment of atrial fibrillation. Seminars in thoracic and cardiovascular surgery. 2000 Jan;12(1):2-14.

38. Edgerton ZJ, Edgerton JR. A review of current surgical treatment of patients with atrial fibrillation. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2012 Jul;25(3):218-23.

39. Gaynor SL, Schuessler RB, Bailey MS, et al. Surgical treatment of atrial fibrillation: predictors of late recurrence. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 2005 Jan;129(1):104-11.

40. Sra J, Thomas JM. New techniques for mapping cardiac arrhythmias. Indian heart journal. 2001 Jul-Aug;53(4):423-44.

41. Epstein LM, Mitchell MA, Smith TW, Haines DE. Comparative study of fluoroscopy and intracardiac echocardiographic guidance for the creation of linear atrial lesions. Circulation. 1998 Oct 27;98(17):1796-801.

42. Wittkampf FH, Vonken EJ, Derksen R, et al. Pulmonary vein ostium geometry: analysis by magnetic resonance angiography. Circulation. 2003 Jan 7;107(1):21-3.

43. Wellens HJ. Pulmonary vein ablation in atrial fibrillation: hype or hope? Circulation. 2000 Nov 21;102(21):2562-4.

44. Cabrera JA, Sanchez-Quintana D, Farre J, et al. Ultrasonic characterization of the pulmonary venous wall: echographic and histological correlation. Circulation. 2002 Aug 20;106(8):968-73.

45. Pappone C, Vicedomini G, Manguso F, et al. Robotic magnetic navigation for atrial fibrillation ablation. Journal of the American College of Cardiology. 2006 Apr 4;47(7):1390-400.

46. Pappone C, Santinelli V. Remote ablation of accessory pathways. European heart journal. 2008 Feb;29(3):422.

47. Schotten U, Neuberger HR, Allessie MA. The role of atrial dilatation in the domestication of atrial fibrillation. Progress in biophysics and molecular biology. 2003 May-Jul;82(1-3):151-62.

48. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. Circulation. 1995 Oct 1;92(7):1954-68.

49. Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. Cardiovascular research. 2002 May;54(2):230-46.

50. Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, et al. Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. Circulation. 2001 Feb 6;103(5):684-90.

51. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, et al. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. Circulation. 2001 Feb 6;103(5):769-77.

52. Yu WC, Lee SH, Tai CT, et al. Reversal of atrial electrical remodeling following cardioversion of long-standing atrial fibrillation in man. Cardiovascular research. 1999 May;42(2):470-6.

53. Schotten U, Ausma J, Stellbrink C, et al. Cellular mechanisms of depressed atrial contractility in patients with chronic atrial fibrillation. Circulation. 2001 Feb 6;103(5):691-8.

54. Sanfilippo AJ, Abascal VM, Sheehan M, et al. Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study. Circulation. 1990 Sep;82(3):792-7.

55. Zou R, Kneller J, Leon LJ, Nattel S. Substrate size as a determinant of fibrillatory activity maintenance in a mathematical model of canine atrium. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2005 Sep;289(3):H1002-12.

56. Burstein B, Qi XY, Yeh YH, Calderone A, Nattel S. Atrial cardiomyocyte tachycardia alters cardiac fibroblast function: a novel consideration in atrial remodeling. Cardiovascular research. 2007 Dec 1;76(3):442-52.

57. Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. Cardiovascular research. 2002 May;54(2):361-79.

58. Goudis CA, Kallergis EM, Vardas PE. Extracellular matrix alterations in the atria: insights into the mechanisms and perpetuation of atrial fibrillation. Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology. 2012 May;14(5):623-30.

59. Anyukhovsky EP, Sosunov EA, Chandra P, et al. Age-associated changes in electrophysiologic remodeling: a potential contributor to initiation of atrial fibrillation. Cardiovascular research. 2005 May 1;66(2):353-63.

60. Bailey GW, Braniff BA, Hancock EW, Cohn KE. Relation of left atrial pathology to atrial fibrillation in mitral valvular disease. Annals of internal medicine. 1968 Jul;69(1):13-20.

61. Ohtani K, Yutani C, Nagata S, Koretsune Y, Hori M, Kamada T. High prevalence of atrial fibrosis in patients with dilated cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology. 1995 Apr;25(5):1162-9.

62. Sinno H, Derakhchan K, Libersan D, Merhi Y, Leung TK, Nattel S. Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs. Circulation. 2003 Apr 15;107(14):1930-6.

63. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. Nature. 2002 Jan 10;415(6868):219-26.

64. Polyakova V, Miyagawa S, Szalay Z, Risteli J, Kostin S. Atrial extracellular matrix remodelling in patients with atrial fibrillation. Journal of cellular and molecular medicine. 2008 Jan-Feb;12(1):189-208.

65. Nakano Y, Niida S, Dote K, et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to human atrial remodeling during atrial fibrillation. Journal of the American College of Cardiology. 2004 Mar 3;43(5):818-25.

66. Saygili E, Rana OR, Meyer C, et al. The angiotensin-calcineurin-NFAT pathway mediates stretch-induced up-regulation of matrix metalloproteinases-2/-9 in atrial myocytes. Basic research in cardiology. 2009 Jul;104(4):435-48.

67. Wang W, Zhang HT, Yang XL. Effect of matrix metalloproteinase and their inhibitors on atrial myocardial structural remodeling. J Cardiovasc Med (Hagerstown). 2013 Apr;14(4):265-9.

68. Ehrlich JR, Hohnloser SH, Nattel S. Role of angiotensin system and effects of its inhibition in atrial fibrillation: clinical and experimental evidence. European heart journal. 2006 Mar;27(5):512-8.

69. Boldt A, Wetzel U, Weigl J, et al. Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. Journal of the American College of Cardiology. 2003 Nov 19;42(10):1785-92.

70. Shroff SC, Ryu K, Martovitz NL, Hoit BD, Stambler BS. Selective aldosterone blockade suppresses atrial tachyarrhythmias in heart failure. Journal of cardiovascular electrophysiology. 2006 May;17(5):534-41.

71. Zhao J, Li J, Li W, et al. Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. British journal of pharmacology. 2010 Apr;159(8):1584-94.

72. Riser BL, Cortes P, Heilig C, et al. Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor-beta isoforms in cultured rat mesangial cells. The American journal of pathology. 1996 Jun;148(6):1915-23.

73. MacKenna D, Summerour SR, Villarreal FJ. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. Cardiovascular research. 2000 May;46(2):257-63.

74. Tsai CT, Chiang FT, Tseng CD, et al. Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. Journal of the American College of Cardiology. 2010 Feb 23;55(8):758-70.

75. Goette A, Hoffmanns P, Enayati W, Meltendorf U, Geller JC, Klein HU. Effect of successful electrical cardioversion on serum aldosterone in patients with persistent atrial fibrillation. The American journal of cardiology. 2001 Oct 15;88(8):906-9, A8.

76. Tsai CF, Yang SF, Chu HJ, Ueng KC. Cross-talk between mineralocorticoid receptor/angiotensin II type 1 receptor and mitogen-activated protein kinase pathways underlies aldosterone-induced atrial fibrotic responses in HL-1 cardiomyocytes. International journal of cardiology. 2013 Oct 25;169(1):17-28.

77. Kiryu M, Niwano S, Niwano H, et al. Angiotensin II-mediated up-regulation of connective tissue growth factor promotes atrial tissue fibrosis in the canine atrial fibrillation model. Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology. 2012 Aug;14(8):1206-14.

78. Silver MA, Pick R, Brilla CG, Jalil JE, Janicki JS, Weber KT. Reactive and reparative fibrillar collagen remodelling in the hypertrophied rat left ventricle: two experimental models of myocardial fibrosis. Cardiovascular research. 1990 Sep;24(9):741-7.

79. Thijssen VL, Ausma J, Borgers M. Structural remodelling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival. Cardiovascular research. 2001 Oct;52(1):14-24.

80. Booth LA, Tavallai S, Hamed HA, Cruickshanks N, Dent P. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. Cellular signalling. 2013 Dec 2.

81. Mirkes PE. Cell death in normal and abnormal development. Congenital anomalies. 2008 Mar;48(1):7-17.

82. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.

83. Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. The international journal of biochemistry & cell biology. 2004 Dec;36(12):2405-19.

84. Shi Y. Mechanical aspects of apoptosome assembly. Current opinion in cell biology. 2006 Dec;18(6):677-84.

85. Kulikov AV, Shilov ES, Mufazalov IA, Gogvadze V, Nedospasov SA, Zhivotovsky B. Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2012 Jun;69(11):1787-97.

86. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews Molecular cell biology. 2008 Jan;9(1):47-59.

87. Thorburn A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. Apoptosis : an international journal on programmed cell death. 2008 Jan;13(1):1-9.

88. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. Cell. 2003 Feb 21;112(4):481-90.

89. Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Villunger A. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. Cell death and differentiation. 2006 Aug;13(8):1325-38.

90. Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. Cell death and differentiation. 2012 Jan;19(1):67-74.

91. http://www.biooncology.com/biological-pathways/apoptosis.

92. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity. 1995 Dec;3(6):673-82.

93. den Hollander MW, Gietema JA, de Jong S, et al. Translating TRAIL-receptor targeting agents to the clinic. Cancer letters. 2013 May 28;332(2):194-201.

94. Zuckerman V, Wolyniec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. The Journal of pathology. 2009 Sep;219(1):3-15.

95. Bukowska A, Lendeckel U, Bode-Boger SM, Goette A. Physiologic and pathophysiologic role of calpain: implications for the occurrence of atrial fibrillation. Cardiovascular therapeutics. 2012 Jun;30(3):e115-27.

96. Aime-Sempe C, Folliguet T, Rucker-Martin C, et al. Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. Journal of the American College of Cardiology. 1999 Nov 1;34(5):1577-86.

97. Kim NH, Ahn Y, Oh SK, et al. Altered patterns of gene expression in response to chronic atrial fibrillation. International heart journal. 2005 May;46(3):383-95.

98. Watson T, Shantsila E, Blann A, Lip GY. Circulating progenitor cells in patients with atrial fibrillation and their relation with serum markers of inflammation and angiogenesis. Thrombosis and haemostasis. 2010 Aug;104(2):327-34.

99. Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, Leung TK, Thorin E, Nattel S. Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure:

angiotensin-dependent and -independent pathways. Cardiovascular research. 2003 Nov 1;60(2):315-25.

100. Muller P, Deneke T, Schiedat F, et al. Increased Preoperative Serum Apoptosis Marker Fas Ligand Correlates With Histopathology and New-Onset of Atrial Fibrillation in Patients After Cardiac Surgery. Journal of cardiovascular electrophysiology. 2013 May 23.

101. Houmsse M, Tyler J, Kalbfleisch S. Supraventricular tachycardia causing heart failure. Current opinion in cardiology. 2011 May;26(3):261-9.

102. Jesel L, Abbas M, Toti F, Cohen A, Arentz T, Morel O. Microparticles in atrial fibrillation: a link between cell activation or apoptosis, tissue remodelling and thrombogenicity. International journal of cardiology. 2013 Sep 30;168(2):660-9.

103. Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. Journal of the American College of Cardiology. 2008 Feb 26;51(8):802-9.

104. Du J, Xie J, Zhang Z, et al. TRPM7-mediated Ca2+ signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. Circulation research. 2010 Mar 19;106(5):992-1003.

105. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. Circulation. 1999 Jul 6;100(1):87-95.

106. Han W, Fu S, Wei N, et al. Nitric oxide overproduction derived from inducible nitric oxide synthase increases cardiomyocyte apoptosis in human atrial fibrillation. International journal of cardiology. 2008 Nov 12;130(2):165-73.

107. Trappe K, Thomas D, Bikou O, et al. Suppression of persistent atrial fibrillation by genetic knockdown of caspase 3: a pre-clinical pilot study. European heart journal. 2013 Jan;34(2):147-57.

108. Brink AJ, Torrington M. Progressive familial heart block--two types. South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde. 1977 Jul 9;52(2):53-9.

109. Brugada J, Brugada R, Brugada P. Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease. Circulation. 1998 Feb 10;97(5):457-60.

110. James TN. Apoptosis in cardiac disease. The American journal of medicine. 1999 Dec;107(6):606-20.

111. James TN, Terasaki F, Pavlovich ER, Vikhert AM. Apoptosis and pleomorphic micromitochondriosis in the sinus nodes surgically excised from five patients with the long QT syndrome. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1993 Sep;122(3):309-23.

112. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. Circulation. 1997 Aug 19;96(4):1180-4.

113. Li J, Solus J, Chen Q, et al. Role of inflammation and oxidative stress in atrial fibrillation. Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society. 2010 Apr;7(4):438-44.

114. Marcus GM, Smith LM, Ordovas K, et al. Intracardiac and extracardiac markers of inflammation during atrial fibrillation. Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society. 2010;7(2):149-54.

115. Rudolph V, Andrie RP, Rudolph TK, et al. Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. Nature medicine. 2010 Apr;16(4):470-4.

116. Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Lavoie J, Nattel S. Prednisone prevents atrial fibrillation promotion by atrial tachycardia remodeling in dogs. Cardiovascular research. 2006 Mar 1;69(4):865-75.

117. Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Burstein B, et al. Effects of simvastatin on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with congestive heart failure. Cardiovascular research. 2007 Apr 1;74(1):75-84.

118. Liao CH, Akazawa H, Tamagawa M, et al. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. The Journal of clinical investigation. 2010 Jan;120(1):242-53.

119. Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, et al. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. Circulation. 2001 Jul 10;104(2):174-80.

120. Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF, O'Rourke B. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. The Journal of clinical investigation. 2005 Dec;115(12):3527-35.

121. Purohit A, Rokita AG, Guan X, et al. Oxidized Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation. Circulation. 2013 Oct 15;128(16):1748-57.

122. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. Cardiovascular research. 2001 Sep;51(4):637-46.

123. Yang M, Tan H, Cheng L, et al. Expression of heat shock proteins in myocardium of patients with atrial fibrillation. Cell stress & chaperones. 2007 Summer;12(2):142-50.

124. Brundel BJ, Henning RH, Ke L, van Gelder IC, Crijns HJ, Kampinga HH. Heat shock protein upregulation protects against pacing-induced myolysis in HL-1 atrial myocytes and in human atrial fibrillation. Journal of molecular and cellular cardiology. 2006 Sep;41(3):555-62.

125. Brundel BJ, Shiroshita-Takeshita A, Qi X, et al. Induction of heat shock response protects the heart against atrial fibrillation. Circulation research. 2006 Dec 8;99(12):1394-402.

126. Goudarzi M, Ross MM, Zhou W, et al. Development of a novel proteomic approach for mitochondrial proteomics from cardiac tissue from patients with atrial fibrillation. Journal of proteome research. 2011 Aug 5;10(8):3484-92.

127. Kornej J, Reinhardt C, Kosiuk J, et al. Response of circulating heat shock protein 70 and anti-heat shock protein 70 antibodies to catheter ablation of atrial fibrillation. Journal of translational medicine. 2013;11:49.

128. Mandal K, Torsney E, Poloniecki J, Camm AJ, Xu Q, Jahangiri M. Association of high intracellular, but not serum, heat shock protein 70 with postoperative atrial fibrillation. The Annals of thoracic surgery. 2005 Mar;79(3):865-71; discussion 71.

129. Arnar DO, Thorvaldsson S, Manolio TA, et al. Familial aggregation of atrial fibrillation in Iceland. European heart journal. 2006 Mar;27(6):708-12.

130. Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, et al. Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. Journal of the American College of Cardiology. 2003 Jun 18;41(12):2185-92.

131. Ellinor PT, Yoerger DM, Ruskin JN, MacRae CA. Familial aggregation in lone atrial fibrillation. Human genetics. 2005 Nov;118(2):179-84.

132. Fox CS PH, D'Agostino RB Sr, Lloyd-Jones DM, Vasan RS, Wang TJ, Levy D, Wolf PA, Benjamin EJ. Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. JAMA. 2004 Jun 16;291(23):2851-5.

133. Gollob MH, Seger JJ, Gollob TN, et al. Novel PRKAG2 mutation responsible for the genetic syndrome of ventricular preexcitation and conduction system disease with childhood onset and absence of cardiac hypertrophy. Circulation. 2001 Dec 18;104(25):3030-3.

134. Gruver EJ, Fatkin D, Dodds GA, et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy and atrial fibrillation caused by Arg663His beta-cardiac myosin heavy chain mutation. The American journal of cardiology. 1999 Jun 17;83(12A):13H-8H.

135. Edward S. Orgain LW, Paul D. White. Uncomplicated Auricular Fibrillation And Auricular Flutter: Frequent Occurrence And Good Prognosis In Patients Without Other Evidence Of Cardiac Disease. Arch Intern Med (Chic). 1936;57(3):493-513.

136. Fox CS, Parise H, D'Agostino RB, Sr., et al. Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. JAMA. 2004 Jun 16;291(23):2851-5.

137. Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. Science. 2003 Jan 10;299(5604):251-4.

138. Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. Cell. 2001 Feb 23;104(4):569-80.

139. Otway R, Vandenberg JI, Fatkin D. Atrial fibrillation--a new cardiac channelopathy. Heart, lung & circulation. 2007 Oct;16(5):356-60.

140. Ellinor PT, Shin JT, Moore RK, Yoerger DM, MacRae CA. Locus for atrial fibrillation maps to chromosome 6q14-16. Circulation. 2003 Jun 17;107(23):2880-3.

141. Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, et al. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. The New England journal of medicine. 2006 Jun 22;354(25):2677-88.

142. Xia M, Jin Q, Bendahhou S, et al. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. Biochemical and biophysical research communications. 2005 Jul 15;332(4):1012-9.

143. Yang Y, Xia M, Jin Q, et al. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. American journal of human genetics. 2004 Nov;75(5):899-905.

144. Hodgson-Zingman DM, Karst ML, Zingman LV, et al. Atrial natriuretic peptide frameshift mutation in familial atrial fibrillation. The New England journal of medicine. 2008 Jul 10;359(2):158-65.

145. 145 Van Norstrand DW, Asimaki A, Rubinos C, et al. Connexin43 mutation causes heterogeneous gap junction loss and sudden infant death. Circulation. 2012 Jan 24;125(3):474-81.

146. Wang J, Sun YM, Yang YQ. Mutation spectrum of the GATA4 gene in patients with idiopathic atrial fibrillation. Molecular biology reports. 2012 Aug;39(8):8127-35.

147. Thijssen VL, van der Velden HM, van Ankeren EP, et al. Analysis of altered gene expression during sustained atrial fibrillation in the goat. Cardiovascular research. 2002 May;54(2):427-37.

148. Kim YH, Lim DS, Lee JH, et al. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. Experimental & molecular medicine. 2003 Oct 31;35(5):336-49.

149. Lai LP, Lin JL, Lin CS, et al. Functional genomic study on atrial fibrillation using cDNA microarray and two-dimensional protein electrophoresis techniques and identification of the myosin regulatory light chain isoform reprogramming in atrial fibrillation. Journal of cardiovascular electrophysiology. 2004 Feb;15(2):214-23.

150. Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, et al. Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis. International journal of cardiology. 2005 Jul 10;102(2):233-8.

151. Ellinghaus P, Scheubel RJ, Dobrev D, et al. Comparing the global mRNA expression profile of human atrial and ventricular myocardium with high-density oligonucleotide arrays. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 2005 Jun;129(6):1383-90.

152. Barth AS, Merk S, Arnoldi E, et al. Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature. Circulation research. 2005 May 13;96(9):1022-9.

153. Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, et al. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. Circulation. 2005 Jul 26;112(4):471-81.

154. Kharlap MS, Timofeeva AV, Goryunova LE, et al. Atrial appendage transcriptional profile in patients with atrial fibrillation with structural heart diseases. Annals of the New York Academy of Sciences. 2006 Dec;1091:205-17.

155. Lamirault G, Gaborit N, Le Meur N, et al. Gene expression profile associated with chronic atrial fibrillation and underlying valvular heart disease in man. Journal of molecular and cellular cardiology. 2006 Jan;40(1):173-84.

156. Chen CL, Lin JL, Lai LP, Pan CH, Huang SK, Lin CS. Altered expression of FHL1, CARP, TSC-22 and P311 provide insights into complex transcriptional regulation in pacing-induced atrial fibrillation. Biochimica et biophysica acta. 2007 Mar;1772(3):317-29.

157. Cardin S, Libby E, Pelletier P, et al. Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation. Circulation research. 2007 Feb 16;100(3):425-33.

158. Kharlap MS, Goriunova LE, Timofeeva AV, et al. [Gene expression analysis in myocytes of right atrial appendages in patients with atrial fibrillation using cDNA microarray technique]. Kardiologiia. 2008;48(9):34-42.

159. Mace LC, Yermalitskaya LV, Yi Y, Yang Z, Morgan AM, Murray KT. Transcriptional remodeling of rapidly stimulated HL-1 atrial myocytes exhibits concordance with human atrial fibrillation. Journal of molecular and cellular cardiology. 2009 Oct;47(4):485-92.

160. Maass AH, De Jong AM, Smit MD, et al. Cardiac gene expression profiling - the quest for an atrium-specific biomarker. Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation. 2010 Dec;18(12):610-4.

161. Censi F, Calcagnini G, Bartolini P, Giuliani A. A systems biology strategy on differential gene expression data discloses some biological features of atrial fibrillation. PloS one. 2010;5(10):e13668.

162. Wu X, Wang L, Wang X, Zhang H, Du J. Conserved DNA sequences discovered from atrial fibrillation related genes. International heart journal. 2011;52(5):295-8.

163. 163 Ou F, Rao N, Jiang X, et al. Analysis on differential gene expression data for prediction of new biological features in permanent atrial fibrillation. PloS one. 2013;8(10):e76166.

164. Chilukoti RK, Mostertz J, Bukowska A, et al. Effects of irbesartan on gene expression revealed by transcriptome analysis of left atrial tissue in a porcine model of acute rapid pacing in vivo. International journal of cardiology. 2013 Oct 3;168(3):2100-8.

165. Yeh YH, Kuo CT, Lee YS, et al. Region-specific gene expression profiles in the left atria of patients with valvular atrial fibrillation. Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society. 2013 Mar;10(3):383-91.

166. Tarca AL, Romero R, Draghici S. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. American journal of obstetrics and gynecology. 2006 Aug;195(2):373-88.

167. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature protocols. 2009;4(1):44-57.

168. Eijssen LM, Jaillard M, Adriaens ME, et al. User-friendly solutions for microarray quality control and pre-processing on ArrayAnalysis.org. Nucleic acids research. 2013 Jul;41(Web Server issue):W71-6.

169. Gage PJ, Suh H, Camper SA. Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. Development. 1999 Oct;126(20):4643-51.

170. Franco D, Campione M, Kelly R, et al. Multiple transcriptional domains, with distinct left and right components, in the atrial chambers of the developing heart. Circulation research. 2000 Nov 24;87(11):984-91.

171. Franco D, Chinchilla A, Daimi H, Dominguez JN, Aranega A. Modulation of conductive elements by Pitx2 and their impact on atrial arrhythmogenesis. Cardiovascular research. 2011 Jul 15;91(2):223-31.

172. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. Nature reviews Molecular cell biology. 2006 Aug;7(8):589-600.

173. Kerkela R, Ilves M, Pikkarainen S, et al. Key roles of endothelin-1 and p38 MAPK in the regulation of atrial stretch response. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2011 Jan;300(1):R140-9.

174. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. Nature. 2003 Dec 11;426(6967):671-6.

175. Durdu S, Deniz GC, Balci D, et al. Apoptotic vascular smooth muscle cell depletion via BCL2 family of proteins in human ascending aortic aneurysm and dissection. Cardiovascular therapeutics. 2012 Dec;30(6):308-16.

176. Ak K, Akgun S, Tecimer T, et al. Determination of histopathologic risk factors for postoperative atrial fibrillation in cardiac surgery. The Annals of thoracic surgery. 2005 Jun;79(6):1970-5.

177. Günseli Çubukçuoğlu Deniz SD, Ahmet Rüçhan Akar, Nalan Akyürek,, Ömer Akyürek ÇZ, Ümit Özyurda. Kalıcı fibrilasyon sürecindeki insan sağ atriyal miyositlerinde apoptotik protein ekspresyonları. Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi. 2010.

EKLER

EK1: Hastanın Bilgilendirilmiş Onam (Rıza) Formu Örneği

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

HASTANIN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM (RIZA) BELGESİ

Hastanın Adı Soyadı:.....
Protokol Numarası:.....
Doğum Tarihi:.....
Telefon Numarası:.....
Adresi:.....
Hastalığın Ön Tanısı/Tanısı:
.....
Hastaneye Kabul Tarihi:.....

ACİL DURUMLARDA ONAM ALINACAK YASAL TEMSİLCİSİNİN
Adı-Soyadı:.....
Adresi:.....
Telefon Numarası:.....

KANUNİ YETERLİLİĞİ OLMAYAN HASTALAR İÇİN
Veli / Vasinin Adı-Soyadı:.....
Adresi:.....
Telefon Numarası:.....

YAZILI ONAM (RIZA):

Sayın hastamız lütfen bu formu dikkatlice okuyunuz. Tıbbi durumunuz ve hastalığınızın tedavisi için size önerilen girişim/tedavi hakkında bilgi sahibi olmak en doğal hakkınızdır. Bu açıklamaların amacı sağlığınız ile ilgili konularda sizi bilgilendirmek ve bu sürece sizi daha bilinçli bir biçimde ortak etmektir. Burada belirtilenlerden başka sorularınız varsa bunları cevaplamak görevimizdir. Bizler size yardım için buradayız. Tanısal girişimlerin, tıbbi ve cerrahi tedavilerin yararlarını ve olası risklerini öğrendikten sonra yapılacak işleme rıza göstermek ya da göstermemek kendi kararınıza bağlıdır. Arzu ettiğiniz takdirde sağlığınız ile ilgili tüm bilgi ve dokümanlar size veya uygun göreceğiniz bir yakınınıza verilebilir. Okuma-yazma sorunu yaşıyorsanız ya da size yapılacak işlemlere izin verme sürecine sizin belirleyeceğiniz bir kişinin daha katılmasını istiyorsanız, görüşme tanığı olarak belirlediğiniz kişinin katılmasına izin verebilirsiniz. Yasal ve tıbbi zorunluluk taşıyan durumlar dışında bilgilendirmeyi reddedebilirsiniz. İstediğiniz zaman verdiğiniz izni geri çekme hakkına sahipsiniz. Bu durum sizin bundan sonraki tedavinizi hiçbir şekilde aksatmayacaktır. Ancak, yasal açıdan bu hakkınız "tıbbi yönden bir sakınca bulunmaması" şartına bağlıdır. Bu durum gerçekleştiğinde, Aydınlatılmış Onamı Geri Çekme Tutanağı düzenlenerek bu belgenin arkasına eklenecektir.

Doktorum..... ve ekibi bende..... ön tanısı olması nedeniyle aort/mitral/trikuspid/pulmoner kapak (uygun olmayanı çiziniz) onarım veya replasmanı olmam gerektiğini açıkladı. Uzun süreli kapak hastalığım nedeniyle genişleyen kalp atrium boşluğuna bağlı olarak atrial fibrilasyon denilen ritim bozukluğunun da olabileceği açıklandı. Bu, hasarlı kalp kapağının tamiri veya değiştirilmesi anlamına gelmektedir. Cerrahın ameliyat sırasında yapılacak işlemin detayları ve seçimi hakkında benim iyilik halim için karar verme yetkisi olduğunu anlıyorum. Açık kalp operasyonu sırasında kalbin ve akciğerlerin fonksiyonunu üstlenen Kalp-Akciğer makinasına bağlanması gerekmektedir. Bu işlem sırasında kanül adı verilen tüplerin giriş bölgelerinden çıkarılarak atılan kalp atrium dokusu üzerinde araştırma yapmamız planlanmaktadır.

"KALICI ATRİYAL FİBRİLASYONLU VE SİNÜS RİTİMLİ HASTALARDA APOPTOZİS İLİŞKİLİ GENLERİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZLERİ" adlı çalışma amacıyla çıkartılmış atrium dokunuz, hastalığın nedenini anlamaya yönelik araştırmalar yapmak üzere alınarak bir takım incelemeler yapılacaktır. 30 gönüllü normal sinüs ritmindeki ve 30 atrial fibrilasyon denen ritim bozukluğu gelişmiş hasta üzerinde çalışılması planlanmaktadır. Burada yapılan

incelemeler, ritim bozukluğunun nedeni ve gelişme sürecini anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Araştırmamız, ameliyat sırasında zaten çıkarılmak durumunda olan küçük bir miktar kalp dokusu üzerinde yapılacağından bu işlemin size ve ameliyatınıza ek bir risk getirmesi söz konusu değildir.

HASTA BEYANI: Bu formda tanımlananlar dışında yapılacak her hangi bir ilave girişimin, yalnızca sağlığıma yönelik ciddi zararların önlenmesi ve yaşamımın kurtarılması için uygulanabileceğini anlıyor ve kabul ediyorum. Kurumumuzun bir eğitim hastanesi olması nedeniyle, cerrahi girişimin, öğretimden sorumlu bir hekim (öğretim üyesi, uzman) gözetim ve sorumluluğunda, asistan/araştırma görevlisi doktorlar tarafından da uygulanabileceğini; ama her koşulda girişimi gerçekleştirecek hekimin yeterli deneyimde olacağını anlıyor ve kabul ediyorum. Oluşabilecek komplikasyonlar ve olası riskleri konusunda bilgilendirildim. Bu tanı ve tedavi yöntemlerini reddettiğim zaman sağlığımı tehdit edici başka hangi risklerin oluşabileceği, bu tedavi yerine uygulanabilecek başka bir tıbbi yöntemin bulunup bulunmadığı konusunda bilgilendirildim. Gerektiği takdirde kan transfüzyonuna onay veriyorum. Bazı doku veya örneklerin hastane kaydımın bir parçası olarak tutulabileceğini anlıyorum. Öngörülen cerrahi girişim sırasında tıbbi eğitim amaçlı fotoğraf ve video çekimi yapılabileceğini ve bu dokümanın sadece tıbbi personel tarafından eğitim amaçlı kullanılabileceğini ancak bu dökümanlarda kimliğimin belli olmayacağını anlıyorum. Eğer ameliyat sırasında iğne yada keskin bir cisim ekipten birine batarsa HIV ve diğer kanla geçen hastalıkların test edilebilmesi için benden araştırma amaçlı tekrar kan alınmasını kabul ediyorum. Eğer buna ihtiyaç duyulursa ameliyattan sonra bu konuyla ilgili en kısa zamanda bilgilendirilebileceğimi ve gerekli önerilerin verileceğini anlıyorum. Verilen açıklamaları anladım ve istediğim zaman bir gerekçe göstermeksizin kararımı değiştirebilirim. Bu kararım, normal medikal tedavimi etkilemeyecektir.

BU FORMDA TANIMLANAN ÇALIŞMAYA KATILMAYI KABUL EDİYORUM.

Hastanın Adı Soyadı:.....

Hastanın İmzası:.....

Tarih: .....

HASTADAN SORUMLU HEKİMİN
Adı-Soyadı:.....

Kurum sicil no:.....

İmza: .....

Tarih: .....

GÖRÜŞME TANIĞI:
Adı-Soyadı:.....

Adresi: .....

Tel. No: .....

İmza: .....

EK2: AF ve SR Grupları Arasında Farklı İfade Olan Gen Seti İçinden 35 örnek

Gen Adı	Sembolü
angiopoietin-like 2	ANGPTL2
mucolipin 3	MCOLN3
Triadin	TRDN
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	DNAJA4
protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha	PRKAR1A
A kinase (PRKA) anchor protein 3	AKAP3
catenin (cadherin-associated protein), delta 2	CTNND2
exostosin 1	EXT1
potassium channel, subfamily K, member 3	KCNK3
bone morphogenetic protein 7	BMP7
guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	GNAO1
calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	CACNA1G
collagen-like tail subunit (single strand of homotrimer) of asymmetric acetylcholinesterase	COLQ
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	PPP1R1A
peroxisome proliferator-activated receptor alpha	PPARA
complexin 3	CPLX3
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	BNIP3
striatin, calmodulin binding protein	STRN
ATPase, Na+/K+ transporting, beta 4 polypeptide	ATP1B4
Calumenin	CALU
B-cell CLL/lymphoma 6	BCL6
protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1L	PPM1L
alpha-kinase 3	ALPK3

cartilage oligomeric matrix protein	COMP
FAST kinase domains 1	FASTKD1
neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	NTRK2
A kinase (PRKA) anchor protein 6	AKAP6
collagen, type XXVIII, alpha 1	COL28A1
troponin I type 1 (skeletal, slow)	TNNI1
natriuretic peptide B	NPPB
growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	GADD45G
calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	CACNB2
ADAM metallopeptidase domain 11	ADAM11
collagen, type XXI, alpha 1	COL21A1
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	KCNJ12

EK3: RA ve LA Grupları Arasında Farklı İfade Olan Gen Seti İçinden 35 Örnek

Gen Adı	Sembolü
bone morphogenetic protein 10	BMP10
SMAD family member 6	SMAD6
adrenomedullin	ADM
paired-like homeodomain 2	PITX2
SMAD family member 7	SMAD7
SMAD family member 9	SMAD9
natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)	NPR3
claudin 18	CLDN18
GATA binding protein 5	GATA5
bone morphogenetic protein 5	BMP5
heat shock 70kD protein 12B	HSPA12B
myotilin	MYOT
calpain 3, (p94)	CAPN3
fibroblast growth factor receptor 3	FGFR3
astrotactin 2	ASTN2
sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	SCN3A
troponin T type 1 (skeletal, slow)	TNNT1
collagen, type IV, alpha 6	COL4A6

angiopoietin 1	ANGPT1
gap junction protein, alpha 5, 40kDa	GJA5
collagen, type IV, alpha 5	COL4A5
tubulin polyglutamylase complex subunit 2	TPGS2
transforming growth factor, beta receptor III	TGFBR3
macrophage receptor with collagenous structure	MARCO
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	BNIP3L
EPH receptor A2	EPHA2
claudin 5	CLDN5
lipoprotein lipase	LPL
potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	KCNA5
collagen, type XIII, alpha 1	COL13A1
EH-domain containing 2	EHD2
mucolipin 3	MCOLN3
laminin, beta 3	LAMB3
apolipoprotein E	APOE
EPH receptor A7	EPHA7

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Günseli Çubukçuoğlu Deniz

Doğum Yeri: Antakya - HATAY

Doğum Tarihi: 16.07.1981

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Hatay Osman Ötken Anadolu Lisesi (1992-1999)

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya (1999-2005)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji (2005-2008)

İş Tecrübesi

Kurumu: TUBİTAK 108S375 **Görevi:** Proje Bursiyeri
Yılları: 2009-2013

Yayınlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

1. Zhang D, Wu CT, Qi XY, Meijering RA, Hoogstra-Berends F, Tadevosyan A, **Cubukcuoglu Deniz G**, Durdu S, Akar AR, Sibon OC, Nattel S, Henning RH, Brundel BJ. Activation of Histone Deacetylase-6 (HDAC6) Induces Contractile Dysfunction through Derailment of α-Tubulin Proteostasis in Experimental and Human Atrial Fibrillation. ***Circulation. 2013 Oct 21. [Epub ahead of print]***

2. Durdu S, **Deniz GC**, Balci D, Zaim C, Dogan A, Can A, Akcali KC, Akar AR. Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cell Depletion via BCL2 Family of Proteins in Human Ascending Aortic Aneurysm and Dissection. ***Cardiovasc Ther. 2012 Sep 15. doi: 10.1111/1755-5922.12007. PMID: 22978789 DOI: 10.1111/1755-5922.12007***

3. Durdu S, **Deniz GC**, Dogan A, Zaim C, Karadag A, Dastouri MR, Akar AR. Stem cell mediated cardiovascular repair. ***Can J Physiol Pharmacol. 2012 Mar;90(3):337-51. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22394394***

4. **Cubukcuoglu Deniz G**, Durdu S, Akar AR, Akyurek N, Akyurek O, Zaim C, Ozyurda U. Kalıcı fibrilasyon sürecindeki insan sağ atriyel miyositlerinde apoptotik protein ekspresyonları-Apoptotic protein expressions in human right atrial myocytes with permanent fibrillation. Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi-***Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2010 18: 106-114. ISSN: 1301-5680***

5. Durdu S, **Cubukcuoglu DG**, Akar AR. Otolog kök hücre tedavisi ve cerrahi miyokardiyal revaskularizasyon-Autologous stem cell therapy with surgical myocardial revascularization. ***Anadolu Kardiyol Derg. 2009 Dec;9(6):465-6. ISSN: 1302-8723***

6. Akar AR, Durdu S, **Cubukcuoglu DG**, Aslan A, Akcali KC, Ozyurda U. Failing heart; remodel, replace or repair? ***Anadolu Kardiyol Derg. 2008 Nov;8 Suppl 2:148-57. ISSN: 1302-8723 PMID: 19028646***

7. **Cubukcuoglu Deniz G**, Durdu S, Akar AR, Ozyurda U. Biotechnology and stem cell research: a glance into the future. Anadolu Kardiyoloji Dergisi-The Anatolian Journal of Cardiology 2008 Aug;8(4): 297-302. ISSN: 1302-8723 PMID: 18676307

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

1. Akar AR, Durdu S, **Cubukcuoglu GD**, Karadag A, Ozyurda U. Cytotherapy for Cardiovascular Diseases. ***Journal of Cellular Therapy & Regenerative Medicine 2010 1(1): 27-36 ISSN: 1309-2308***

2. Serkan Durdu, **Günseli Çubukçuoğlu Deniz**, Alp Aslan, A. Rüçhan Akar. Kalp Damar Cerrahisinde Kök Hücre Uygulamaları Kısım V. Yenilikler, Bölüm 3, s: 603-642. ***Ekstrakorporeal Dolaşım ISBN: 978-605-4160-00-6 Eflatun Yayınevi 2008 Ankara Editör:*** *Ufuk Demirkılıç* ***Kitap Bölümü***

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. 23-25 Kasım 2011 Aynur Karadağ, Deniz Balcı, **Günseli Çubukçuoğlu Deniz**, Serkan Durdu, Hilal Özdağ, Asuman Sunguroğlu, Ahmet Rüçhan Akar, Alp Can. In Vitro Fusion of Murine Cardiomyocytes (HL-1) and Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. ***17th International Symposium on Biomedical Science and Technology BIOMED 2011 Ankara Türkiye***

2. 4-8 Mayıs 2011 Aynur Karadağ, Deniz Balcı, **Günseli Çubukçuoğlu Deniz**, Serkan Durdu, Hilal Özdağ, Asuman Sunguroğlu, Ahmet Rüçhan Akar, Alp Can. Spontoneous Fusion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Murine Cardiomyocytes (HL-1) in vitro. ***International Symposium on New Approaches in Cardiovascular disorders: NACD- 2011 Ankara Türkiye***

3. 4-8 Mayıs 2011 **Günseli Çubukçuoğlu Deniz**, Serkan Durdu, Yeşim Doğan Alakoç, Çağın Zaim, Zeynep Özkeserli, Hakan Gürdal, Hilal Özdağ, Ahmet Rüçhan Akar. Comparative Atrial Gene Expression Profiles of Patients with Degenerative Mitral Regurgitation: Atrial Fibrillation Versus Sinus Rhythm ***International Symposium on New Approaches in Cardiovascular disorders: NACD-2011 Ankara Türkiye***

4. 4-8 Mayıs 2011 Serkan Durdu, **Günseli Çubukçuoğlu Deniz**, Çağın Zaim, Arın Doğan, Deniz Balcı, Alp Can, Kamil Can Akçalı, Ahmet Rüçhan Akar.

Involvement of Bcl-2 Family of Proteins in Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis in Patients with Ascending Aortic Aneurysm and Dissection ***International Symposium on New Approaches in Cardiovascular disorders: NACD2011 Ankara Türkiye***

5. 5-9 Mayıs, 2010 Ogan-Cetinkaya F, Egin Y, Uysal S, **Cubukcuoglu Deniz G**, Dogan-Alakoc Y, Durdu S, Ozdag H, Akar AR, Akar N. Evaluation of VKORC1 [G1639A] [C1173T], and prothrombotic gene polymorphisms in warfarin response of Turkish patients (Abstract No: 26). ***BEST POSTER PRESENTATION 5th International Clinical Vascular Biology Congress Bafra, KKTC Journal of Vascular Research ISSN: 1018-1172 IDS No: 609QO 2010; 47, 27.***

6. 21-24 Mayıs, 2009 Akar AR, Akcalı KC, Durdu S, **Çubukçuoğlu Deniz G**, Cingoz B, Darcansoy Işeri O, Kaya B, Özyurda Ü. Involvement of Bcl-2 Family of Proteins In Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis In Patients With Ascending Aortic Aneurysm And Dissection. ***Joint 4th EORTC Pathobiology Group Annual Meeting & 1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress Antalya Türkiye***

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. 3-6 Kasım 2010 Çetinkaya F, Eğin Y, Özkeserli Z, Doğan A, Uysal S, **Çubukçuoğlu Deniz G**, Doğan Alakoç Y, Durdu S, Özdağ H, Akar AR, Akar N. Antikoagülan Kullanım Endikasyonu Olan Hastalarda VKORC1 C1173T ve G-1639A Gen Polimorfizmlerinin Farmakogenetik Etkisinin Araştırılması. ***36. Ulusal Hematoloji Kongresi Antalya Türkiye***

2. 27-31 Ekim 2010 **Çubukçuoğlu Deniz G**, Serkan Durdu S, Özdağ H, Ümit Özyurda Ü, Akar AR. İnsan Atriyal Dokusundan Parçalanmamış Total RNA İzolasyonu: Transkriptomik Analizler İçin Metodolojik Tanimlama. ***SÖZEL BİLDİRİ ÜÇÜNCÜLÜK ÖDÜLÜ Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 11. Ulusal Kongresi Antalya Türkiye***

3. 27-31 Ekim 2010 Çetinkaya F, Eğin Y, **Çubukçuoğlu Deniz G**, Doğan Alakoç Y, Durdu S, Özdağ H, Akar AR, Özyurda Ü, Akar MN. Warfarin Kullanan Türk

Hastaların İlaç Yanıtında VKORC1 (G-1639A), (C1173T) ve Protrombotik Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi. ***Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 11. Ulusal Kongresi Antalya Türkiye***

4. 17-21 Ekim 2008 **Deniz Çubukcuoglu G**, Durdu S, Akar AR, Akyürek N, Akyürek Ö, Uysalel A, Çorapçıoğlu T, Özyurda Ü. Kalıcı atriyal fibrilasyon ve normal sinus ritimli olgularda atriyal hücrelerde apoptozis ve apoptozisi regüle edici proteinlerin karşılaştırılması (S-124). ***Turkish Society of Cardiovascular Surgery Xth Biannual Meeting-Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 10. Ulusal Kongresi Çeşme İzmir Türkiye Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi ISSN: 1301-5680 Vol: 16, Sayı:4***

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

1. **Cubukcuoglu Deniz G**, Durdu S, Akar AR, Akyurek N, Akyurek O, Zaim C, Ozyurda U. Kalıcı fibrilasyon sürecindeki insan sağ atriyel miyositlerinde apoptotik protein ekspresyonları-Apoptotic protein expressions in human right atrial myocytes with permanent fibrillation. Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi-***Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2010 18: 106-114. ISSN: 1301-5680***