ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

HL-1 MODEL HÜCRELERİNDE ATRİYAL FİBRİLASYON PATOGENEZİNDEN SORUMLU MOLEKÜLER YOLAKLARIN ARAŞTIRILMASI

Ali Emre AKPINAR

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Mustafa ŞIRLAK

Ağustos

2020

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.

Ali Emre AKPINAR

ONAY

Prof. Dr. Mustafa ŞIRLAK danışmanlığında Ali Emre AKPINAR tarafından hazırlanan bu çalışma 06/08/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:	Prof. Dr. Mustafa YILMAZ	İmza:
Üye:	Prof. Dr. Mustafa ŞIRLAK	İmza:
Üye:	Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ	İmza:
Üye:	Doç. Dr. Ali Osmay GÜRE	İmza:
Üye:	Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk ENGİN	İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

HL-1 Model Hücrelerinde Atriyal Fibrilasyon Patogenezinden Sorumlu Moleküler Yolakların Araştırılması

Ali Emre AKPINAR

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Mustafa ŞIRLAK

Atriyal fibrilasyon (AF) insidansı ve prevelansı giderek artan ve klinikte en çok rastlanan kardiyak aritmidir. AF sırasında meydana gelen hızlı ve düzensiz stimülasyon sonucunda atriyal yeniden biçimlenme ve kontraktil disfonksiyon meydana gelmektedir. Bu aritminin oluşumunda meydana gelen hücresel değişimlerin aydınlatılabilmesi için bu çalışmada HL-1 fare kardiyomiyosit hücre hattına 24 saat boyunca dışarıdan elektriksel uyarımı sağlayarak AF modeli oluşturulmuştur. Uyarımın 3, 6, 12 ve 24 saat sonunda RNA örmekleri alınarak dışardan uyarım verilmeyen kontrol hücre grubu arasındaki gen ifadesi profil değişimleri mikrodizin analizleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her zaman diliminde ortak en az 2 kat ifade değişimi gösteren 251 gen olduğu tespit edilmiştir. Bu genlerin yer aldığı yolaklar Gene Ontoloji Veri Tabanı kullanılarak tanımlanmış ve genlerin başlıca azalan kardiyak kas kasılması, kalp hızı regülasyonu, hipertrofik kardiyomiyopati, kalsiyum sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı, ve aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati yolaklarında zenginleştiği görülmüştür. İnsanda AF ile ilişkilendirilen iyon kanal yolaklarında yer alan *SLC8A1, CACNA1G, CACNA1H, CASQ2 ve KCNH2* genlerinin ifadelerinin anlamlı şekilde değiştiği bulunmuştur. Ayrıca kas kasılmasında önemli rolü olan *MYH6* ve *ACTN2* genlerinin ifadelerinde artış gözlenmiştir. Mikrodizin verilerinden elde edilen anlamlı değişen 7 gen seçilmiş ve bu 4 genin, eş-zamanlı kantitatif PZR ile mikrodizin verileri doğrulanmıştır. Bu çalışmada oluşturulan HL-1 AF modeli transkripsiyon verileri, insan AF miyositleri ile güçlü bir uyum olduğu göstermiş ve bulunan bazı genlerin hücreler arası sinyal mekanizmasında yer alan öncü proteinlerini kodlayan genler olması bunların tedavi yaklaşımlarında hedef olabileceği düşünülmüştür.

2020, 148 sayfa.

Anahtar kelimeler: Atriyal Fibrilasyon, HL-1 hücre, Atriyal yeniden biçimlenme, Mikrodizin ifade profilleri.

ABSTRACT

PhD Thesis

Investigation of Molecular Pathways Responsible For Atrial Fibrillation in HL-1 Cell Line

Ali Emre AKPINAR

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Mustafa SIRLAK

The incidence and prevalence of atrial fibrillation (AF) is an increasing and most common clinical cardiac arrhythmia. As a result of rapid and irregular stimulation occurring during AF, atrial remodeling and contractile dysfunction occur. In order to elucidate the cellular changes occurring in the formation of this arrhythmia, an AF model was generated by providing external electrical stimulation to the HL-1 mouse cardiomyocyte cell line for 24 hours. Gene expression profile changes between the control cell group without external stimulation and the samples at the end of 3-, 6-, 12- and 24-hour stimulation were compared with microarray analysis following isolation of total RNA. According to the results obtained, it has been determined that there are 251 genes that show minimum 2-fold expression changes common in each time period. Pathways containing these genes have been identified using the Gene Ontology Database. These differentially expressed genes have been found to be enriched primarily in decreasing cardiac muscle contraction, heart rate regulation, hypertrophic cardiomyopathy, calcium signal pathway, MAPK signal pathway, and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy pathways. It was found that the expressions of *SLC8A1, CACNA1G*, *CACNA1H, CASQ2* and *KCNH2* genes in human ion pathways associated with AF changed significantly. In addition, an increase in the expression of *MYH6* and *ACTN2* genes, which have an important role in muscle contraction, has been determined. Seven significantly regulated genes from microarray data were selected and 4 of the genes were confirmed by Real-Time quantitative PCR. The transcription data of the HL-1 AF model created in this study showed a strong compatibility with human AF myocytes and some genes found to be genes encoding the leading proteins in the intercellular signaling mechanism were thought to be targeted in their treatment approaches.

2020, 148 pages.

Keywords: Atrial Fibrillation, HL-1 cell, Atrial Remodeling, Microarray expression profiles.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca destekleriyle hep yanımda olan tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa ŞIRLAK ve Doç. Dr. M. Serkan DURDU'ya

Doktora eğitimim boyunca katkıları ile beni yönlendiren, destek ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım, sabır ve emeğini esirgemeyen Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a

Tez çalışmalarım sürecinde tecrübeleriyle bilimsel katkı sağlayan ve yönlendirmeleriyle destek olan ve Prof. Dr. Hakan GÜRDAL'a

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, tezimin başlangıcından sonuna kadar emeğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Aynur KARADAĞ'a

Dostluklarıyla ve yardımlarıyla yanımda olan Dr. Senem NOYAN ve Dr. Yasemin ÖZTEMUR ISLAKOĞLU' na,

Her türlü destekleriyle yanımda olan değerli çalışma arkadaşlarım, Dr. Günseli ÇUBUKÇUOĞLU DENİZ, Dr. Mohammad Reza DASTOURİ ve kuzenim Doç. Dr. Özkan ÖZDEN'e,

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine ve

Bütün eğitim ve öğretim hayatım boyunca koşulsuz yanımda oldukları için aileme

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ali Emre AKPINAR

Ankara, 2020

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN i

ONAY ii

ÖZET iii

ABSTRACT iv

TEŞEKKÜR v

İÇİNDEKİLER vi

ŞEKİLLER DİZİNİ ix

ÇİZELGELER DİZİNİ xi

1. GİRİŞ 1

2. KURAMSAL TEMELLER 3

2.1. KALP ANATOMİSİ 3

2.2. KARDİYAK FİZYOLOJİ 7

2.2.1. KARDİYAK AKSİYON POTANSİYELLERİ 7

2.3. KARDİYAK ARİTMİ VE İLETİ BOZUKLUKLARI 20

2.3.1. KARDİYAK ARİTMİ OTOMATİSİTESİ 20

2.3.2. ARDDEPOLARİZASYON VE TETİKLENMİŞ AKTİVİTE 21

2.3.3. AKSİYON POTANSİYELİ SÜRESİ VE KALSİYUM İYON DENGESİ 22

2.3.4. KARDİYAK YENİDEN BİÇİMLENME (YAPILANMA) VE ARİTMİ MEKANIZMALARI 23

2.4. ATRİYAL FİBRİLASYON 24

2.4.1. ATRİYAL FİBRİLASYON TANIMI 24

2.4.2. ATRİYAL FİBRİLASYON SINIFLAMASI 26

2.4.3. ATRİYAL FİBRİLASYON EPİDEMİYOLOJİSİ 27

2.4.4. ATRİYAL FİBRİLASYONUN FİZYOPATOLOJİSİ 27

2.4.5. ATRİYAL FIBRİLASYONUN HÜCRESEL VE MOLEKÜLER ELEKTROFİZYOLOJİSİ 33

2.4.6. AF İLE İLİŞKİLİ HÜCRESEL ANOMALİLER 35

2.4.7. ATRİYAL FİBRİLASYON GENETİĞİ 37

2.4.8. HÜCRESEL AF MODELLERI 47

2.4.9. ATRİYAL FİBRİLASYON TEDAVİ YAKLAŞIMLARI 49

3. GEREKÇE VE AMAÇ 52

4. MATERYAL VE YÖNTEM 54

4.1. MATERYAL 54

4.1.1. HÜCRE HATLARI 54

4.1.2. KİTLER 55

4.1.3. KIMYASAL VE SOLÜSYONLAR 55

4.2. YÖNTEM 56

4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ 56

4.2.2. AF MODELİNİN DOĞRULANMASI VE AF SÜRESİNİN BELİRLENMESİNDE GEN İFADE ANALİZLERİ 58

4.2.3. GEN IFADE PROFILLERININ BELIRLENMESI (MIKRODIZIN ANALIZI) 61

4.2.4. BİYOİNFORMATİK VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 66

4.2.5. EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR ILE GEN İFADE PROFİLLERİNİN DOĞRULANMASI 67

5. ARAŞTIRMA BULGULARI 68

5.1 ATRİYAL FİBRİLASYON MODELİ 68

5.2. RNA KANTİTASYONU VE EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR GEN İFADE ANALİZLERİ 72

5.2.1.RNA İZOLASYONU 72

5.2.2. EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR İLE AF MODELİ DOĞRULANMASI ... 73

5.3. MİKRODİZİN ANALİZLERİ 75

5.3.1. MİKRODIZIN ANALİZLERİ 75

5.3.2. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER VE GEN İFADE PROFİLLERİ 76

4.4. RT-PCR İLE GEN İFADE PROFİLLERİNİN DOĞRULANMASI..... 84

6. TARTIŞMA VE SONUÇ 87

6.1. TARTIŞMA 87

6.2. SONUÇ 96

KAYNAKLAR..... 98

ÖZGEÇMİŞ..... 127

YAYINLAR 128

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kalbin iletim sistemi 4

Şekil 2.2. Miyokardın yapısı 6

Şekil 2.3. Elektrokardiyogram görüntüsü. P, Q, R, S, T ve U dalgaları. 9

Şekil 2.4. Kardiyak iyon kanalları ve alt birimleri 14

Şekil.2.5. Ca^{+2} 'un sitoplazma ve sarkoplazmik retikulumda taşınma mekanizmaları 15

Şekil 2.6. Kardiyak pacemaker hücrelerin aksiyon potansiyelleri ve iyon dengeleri 19

Şekil 2.7. AF Elektrokardiyogram görüntüsü. A. Sinüs ritim B. Atriyal fibrilasyon 25

Şekil 4.1. Hücre kültüründe kardiyomiyositlerin kültüre edilmesi ve elektriksel uyarımı . 58

Şekil 5.1. Elektriksel akım uygulanan H9C2 hücrelerinin 6. saat sonrasındaki morfolojik görünümleri 68

Şekil 5. 2. Elektriksel uyarım sonucu HL-1 hücrelerinin mikroskop görüntüleri……...69

Şekil 5.3. HL-1 hücrelerinin elektriksel uyarım zamanına bağlı olarak dakikada yaptıkları atım sayısının değişimi. 69

Şekil 5.4. AF modellemesinde uyarım verilen hücrelerin kardiyogram görüntüleri. 71

Şekil 5.5. RNA görüntüleri. A. %1 lik agaroz jel görüntüsü. B. Agilent Bioanalyser..... 72

Şekil 5.6. Eş-zamanlı PZR analizi sonucu değişen gen ifade profilleri 74

Şekil 5.8. Uyarım zamanlarına göre ifade farklılığı gösteren genlerin VENNY şeması 77

Şekil 5.9. Fenotip ve yolak analizleri akış şeması..... 78

Şekil 5.10. KEGG figüründen alınmış HCM sinyal yolağı. 81

Şekil 5.11. KEGG figüründen alınmış MAPK sinyal yolağı. 82

Şekil 5.12. KEGG figüründen alınmış Kalsiyum sinyal yolağı. 83

Şekil 5.13. KEGG figüründen alınmış İnsulin sinyal yolağı. 84

Şekil 5.14.Yapılan eş zamanlı kantitatif PZR analizi sonucunda *CACNA1G, CACNA1H, MYH6, MEFC2, DAG1, SLC8A1 ve TNNC1* genlerinin ifade seviyeleri. 85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. AF ile ilişkilendirilmiş gen lokusları ve fonksiyonel etkileri. 41

Çizelge 4.1. AF model doğrulaması ve AF süresinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen eş-zamanlı kantitatif PZR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri. 59

Çizelge 4.2. cDNA sentez reaksiyon koşulları..... 60

Çizelge 4.3. PZR reaksiyonu..... 61

Çizelge 4.4. Eş-zamanlı kantitatif PZR reaksiyonu 61

Çizelge 4.5. First Strand cDNA sentezi 62

Çizelge 4.6. Second Strand cDNA sentezi..... 62

Çizelge 4.7. WT cRNA sentezi 63

Çizelge 4.8. 2.döngü tek zincir cDNA karışımı; 64

Çizelge 4.9. Fragmentasyon karışımı..... 65

Çizelge 4.10. Etiketleme karışımı 65

Çizelge 4.11. Gen ifade profillerinin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen eş-zamanlı kantitatif PZR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri..... 67

Çizelge 5.1. RNA miktar ve saflık değerleri..... 73

Çizelge 5.2. Mikrodizin analizinde kullanılan cRNA ve ss-cDNA kantitasyon verileri 75

Çizelge 5.3. AF model uyarım sürelerine bağlı olarak ifadesi değişen gen sayıları kat değişimi 76

Çizelge 5.4. AF modeliyle ilişkilendirilen fenotipler ve gen sayıları. 78

Çizelge 5.5. GO analizi sonucunda belirlenen yolaklar ve gen sayıları..... 79

Çizelge 5.6. Azalan kardiyak kas kasılması yolağında yer alan genler ve kat değişimleri. 80

Çizelge 5.7. HCM yolağında yer alan genler ve kat değişimleri 80

Çizelge 5.8. MAPK sinyal yolağında yer alan genler ve kat değişimleri 82

Çizelge 5.9. İnsülin sinyal yolağında yer alan genler ve kat değişimleri..... 83

SİMGELER DİZİNİ

ACC:	Amerikan Kardiyoloji Koleji
ACH:	Asetilkolin
ADM:	Adrenomedulin
AERP:	Atriyal efektif refrakter periodları
AF:	Atriyal fibrilasyonun
AHA:	Amerikan Kalp Derneği
ANF:	Atriyal natriüretik faktörün
AP:	Aksiyon potansiyeli
AT1:	Anjiyotensin reseptör tip 1
ATP:	Adenozin trifosfat
AV:	Atriyoventriküler
BNP:	Beyin natriüretik peptid
Ca^{+2}	Kalsiyum iyonları
CACNA1G:	Kalsiyum kanalı, T tipi, alfa 1G
CACNA1H:	Kalsiyum kanalı, T tipi, alfa 1H
CaM:	Ca^{+2}/kalmodulin
CaMKII:	Ca^{+2}/Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II
cAMP:	Siklik adenozin trifosfat
CASQ2:	Kalsekuestrin geni
CHF:	Konjestif kalp yetmezliği

CSQ:	Kalsekuestrin
CTGF:	Bağ dokusu büyüme faktörü
CV:	İletim hızı
DAG1:	Distroglikan 1
EACTS:	Avrupa Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Derneği
EAD:	Erken arddepolarizasyonlar
ECM:	Ekstraselüler matriks
EKG:	Elektrokardiyografi
ER:	Endoplazmik retikulum
ERK:	Ektraselüler sinyal regüle protein kinaz
ERP:	Etkili refrakter periyod
ESC:	Avrupa Kardiyoloji Derneği
GAD:	Gecikmiş arddepolarizasyon
HSP:	Heat Shock Protein
I_{Ca}	Kalsiyum iyonları
I_{Na}:	Sodyum iyonları
I_{to}:	Dış akım
I_K	Potasyum iyonları
K^+	Potasyum iyonları
KCNH2:	Voltaj geçişli potasyum kanalı
KPVT:	Katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi

LDB3:	LIM bağlayıcı domain 3
LGE-MRI:	Geç gadolinyumla güçlendirilmiş manyetik görüntüleme
MAPK:	Mitojen-aktive protein kinaz
MB:	Miyoglobin
MEF2C:	Miyosit faktör 2C
MMIF:	Macrophage migration inhibitory factor
MYH6:	Miyozin ağır polipeptit 6
msn:	Milisaniye
mV:	Milivolt
Na^+	Sodyum iyonları
NCX:	Na^+-Ca^{+2} değiştiricisi
NKA:	Na^+/K^+-ATPaz
OSS:	Otonom sinir sistemi
PAR:	Proteaz ile aktive edilen reseptörleri
PDLİM3:	PDZ ve LIM domain 3
PİK3R1:	Fosfotodolinozitol 3-kinaz, düzenleyici alt birim
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR	Eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
PLB:	Fosfolamban
RA:	Sağ atriyum
RAAS:	Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi

RAP:	Hızlı atriyal pacing
RHD:	Romatizmal kalp hastalığı
RSDN:	Renal sempatik denervasyon
RyR:	Riyanodin reseptörleri
SA:	Sinoatriyal
SERCA:	Sarkoendoplazmik kalsiyum
SLC8A1:	Sodyum kalsiyum değiştirici
SR:	Sinüs ritim
SREBF1:	Sterol düzenleyici element bağlayıcı trasnkrisiyon faktörü
Srl:	Sarcalumenin
SV40:	Simiyan virus 40
TNNC1:	Troponin C
TTX:	Tetrodotoksin
VEGF-B:	Vascular endothelial growth factor B
VF:	Ventriküler fıbrilasyonun
VGCC:	Voltaj geçişli kalsiyum kanalları
α:	Alfa
β:	Beta
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
ng	Nanogram

bp	Baz çifti
dk	Dakika
ul	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Dünya genelinde en sık görülen ölüm nedeni olarak kardiyovasküler hastalıklar gösterilmektedir. 2012 yılında dünya genelindeki bulaşıcı olmayan hastalıklardan kaynaklı ölüm oranları arasında ilk sırada %46,2 (17,5 milyon) ile kardiyovasküler hastalıklar yer almaktadır ve bu sayının 2030 yılında 22,2 milyon olacağı tahmin edilmektedir. 2014 yılı Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, meydana gelen ölümlere %40.4 oranında kardiyavasküler hastalıkların neden olduğu rapor edilmiştir (1). Kardiyavasküler sistemde meydana gelen bir dizi fizyolojik ve moleküler değişim, farklı patolojileri de beraberinde getirmektedir. Koroner kalp hastalıkları, kalp yetmezliği, hipertansiyon, kardiyomiyopatiler serebrovasküler hastalıklar ve ritim bozuklukları (kardiyak aritmiler) başlıca kalp damar hastalıkları arasında yer almaktadır. Klinikte en çok görülen aritmi atriyal fibrilasyondur (AF) ve diğer kardiyovasküler hastalıklar gibi, insidans ve prevelansı yaş ve çevresel faktörler ile birlikte giderek artan bir sağlık sorunu olduğu görülmektedir.

Kalbin aksiyon potansiyelinde, birincil uyarım odağı olan sinoatriyal düğüm (SA) dışında birçok farklı ektopik odaktan çıkan uyarımlar sonucunda AF meydana gelmektedir. Normal kalp ritminde (sinüs ritim-SR) birincil odak temeli uyarımın hiyerarşik düzende atriyuma iletilirken, AF de ise farklı odak temelll birden fazla uyarının oluştuğu görülmektedir. AF temelinde, koroner arter hastalığı, hipertansiyon, kalp yetmezliği gibi birçok neden yatmaktadır. Bu nedenlerin yanı sıra, zayıf vücut kitlesi, boy, yaşlılık ve genetik faktörler AF nin geri dönüşümsüz olmasına yol açabilmektedir. AF etki süresine bağlı olarak, Amerikan Kalp Derneği (AHA), Amerikan Kardiyoloji Koleji (ACC) ve Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) tarafından AF, *paroksismal, persistan (inatçı) ve permanent (kalıcı)* olmak üzere üç üç ana başlıkta toplanmaktadır (2).

AF diğer farklı kardiyovasküler hastalıklarla birlikte tetiklenen bir patoloji olsa da, tek başına da mortaliteye neden olmaktadır. AF tedavisinde, normal kalp ritmine geri dönüş, kalp kasılma hızını kontrol altına almak, emboli ve inme riskini önlemek amaçlanmaktadır. Tedavi amacıyla antiartimik ilaçlar kullanımının yanında elektriksel kardiyoversiyon ve cerrahi ablasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Özellikle kalıcı AF hastalarına yönelik uygulanan tedavi amaçlı uygulanan yöntemler her zaman istenilen sonuçları vermemekte ve AF nin geri dönüşünü zorlaştırmaktadır.

Diğer kardiyak aritmiler gibi, AF nin de etijolojisini açıklamaya yönelik fizyolojik yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmış ancak, zamanla karmaşık bir patogeneze sahip olduğu görülmüş ve son yirmi yılda moleküler yaklaşımlar geliştirmeye başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, klinikte yer AF hastalarından alınan doku örnekleri ve farklı organizmalarda oluşturulan AF modelleri ile patolojinin altında yatan mekanizmalar tanımlanması amaçlanmıştır. Yapılan tüm bu araştırmalar sonucunda kardiyak dokuda meydana gelen elektrofizyolojik ve moleküler değişiklikler tanımlanmış olsa da, AF'ye yönelik hedef tedavi geliştirilebilmesi için moleküler mekanizmasının daha detaylı aydınlatılması gerekmektedir.

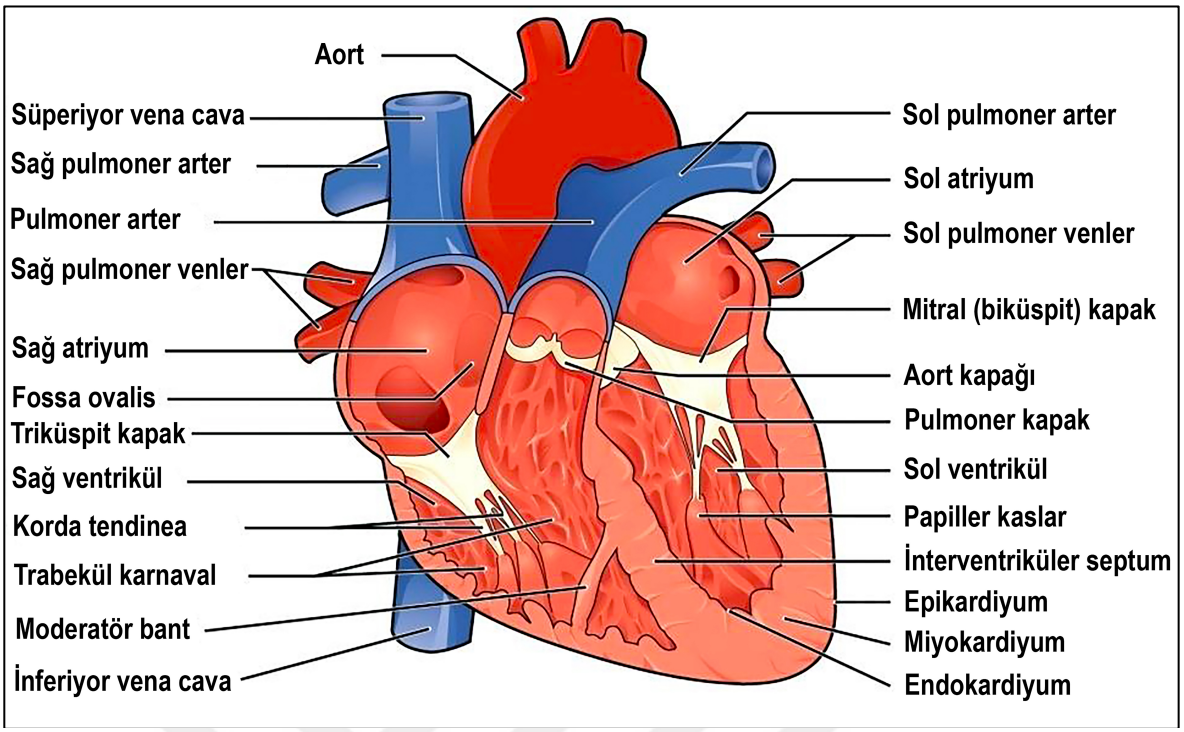
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KALP ANATOMİSİ

Kalp, göğüs kemiğinin hemen arkasında, göğüs kafesinin merkezinde hafif sola doğru yerleşmiştir. Kulakçıkla (atriyum) karıncıkları (ventrikül) birbirlerinden ayıran kapakçıklar bulunmaktadır (3). Mitral kapak sol kulakçık ile sol karıncık arasında, triküspit kapak sağ kulakçık ile sağ karıncık arasında bulunmaktadır. Aortun kapağı ve pulmoner arterin kapağı da bulunmaktadır. Kanın tek yönlü akışı bu kapaklar sayesinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.1.). Atriyoventriküler kapaklardan sağ ventrikül ile sağ atriyum arasında triküspit kapak yer alırken, sol atriyum ile sol ventrikül arasında yer alan kapakçığa mitral kapak adı verilmektedir. Sağ ve sol ventriküller arasında dışa açılan kanallarda yer alan kapakçıklar sırası ile, pulmoner ve aort kapaklarıdır. Bu dört kapağın tümü kanı ters yönde geri aktığında kapanan tek yönlü kapaklardır. Triküspit ve mitral kapaklar aynı zamanda korda tendonu olarak da bilinen özelleşmiş bağ doku lifleriyle ventrikül duvarına bağlıdırlar. Bu nedenle ventriküler kasılma sırasında, bu kapaklar yardımıyla kanın atriyuma geçişi engellenmektedir. Ventriküllerin kasılması sırasında korda tendonu, ventriküllerde bağlı oldukları papiller kasların kasılması sayesinde gerilmiş duruma geçmekte ve ventriküllerin kasılması sırasında kapakların etki altında kaldıkları yüksek kan basıncı karşısında kapalı kalmasına yardımcı olmaktadır.

Kalbin temel işlevi, kanı vücuda dağıtan ve önemli transport sistemi olan kardiyovasküler sistemin pompası olarak görev yapmasıdır. Lenfatik sistemle birlikte kardiyovasküler sistem, hücrelerin çoğuna besin ve oksijen sağlamaktan sorumlu olan dolaşım sistemini oluşturmakta ve kardiyomiyositler olarak bilinen aynı anda kasılma ve gevşetme yapabilen kas lifleri oluşturan binlerce hizalı kas hücresinden oluşmaktadır (4).

Bir insan kalbinin normal fonksiyonunu yapabilmesi için, 80 yıldan daha fazla olmak üzere günde 24 saat, dakikada ortalama 60-70 kez ritmik olarak kasılması gerekmektedir. Yaklaşık 3 milyar civarında kasılan kardiyomiyosit organizasyonunda kalbin kasılmasını hatasız bir şekilde gerçekleşir. Kalpte uyarı belirli bir yapıdan başlatılır ve tüm kalp hücrelerine özelleşmiş bir iletim sistemi yoluyla yayılır. Kalp hücreleri arasındaki iletişim gap-junction olarak adlandırılan özelleşmiş bağlantılar sayesinde gerçekleşmektedir (4)(5).



Şekil 2.1. Kalbin iletim sistemi (6)

Kalp kontraktil hücreler ve iletici hücreler olmak üzere iki tip kas hücresinden oluşmaktadır. Atriyum ve ventrikül dokularının büyük bir kısmını kontraktil hücreler oluştururlar ve kalbin çalışan hücreleridir. Miyokard adı verilen kardiyak dokunun kasılması, kardiyomiyosit adı verilen kas hücrelerinin kasılması ile gerçekleşmektedir. Kalbin kasılmasında rol alan kardiyomiyositler toplam kalp hacminin dörtte üçünü oluşturmaktadır. Bu kas hücreleri silindirik yapıda olup ve uzun kas lifleri oluşturarak birbirlerine uzunlamasına bağlanırlar. Bu lif demeti paralel olarak sıralanarak kardiyak doku tabakasını, kardiyak tabakaların sıralanması ile kalp duvarlarını oluşmaktadır. Bireysel miyositlerin kasılması, kas liflerinin kısalmasını ve bu sayede kalp duvarının kasılmasını sağlamaktadır (7).

Miyokardın mikroskobik yapısına bakıldığında, hücre yapılarının oldukça küçük (≤ 80 μm) ve dallanmış yapıda oldukları görülmektedir. Miyokardda ayrıca interkalar diskler olarak bilinen iskelet kasında bulunmayan özelleşmiş hücreler arası bağlantılar (gap-junction) bulunmaktadır. Diğer kas hücrelerine benzer olarak, kasılma-gevşeme birbiri içine geçen farklı tipteki kas filamentleri ve miyofibrillerin içiçe geçerek kayması ile oluşmaktadır. Bu yapıları meydana getiren ana proteinler aktin ve miyozinlerdir (8).

Kardiyak kas hücreleri, yalnıca kalbe özgüdür ve vücutta bulunan diğer iki kas hücresi türü olan düz ve iskelet kasından kompozisyon ve işlev bakımından farklıdırlar. Her hücre gibi,

kardiyomiyositler de membranla çevrili bir sitoplazmadan oluşur ve hücrenin hemen dışında ekstraselüler matriks bulunmaktadır. Sitoplazma, sitosol ile çevrili organeller, çözünmüş iyonlarla dolu bir sıvı ve çeşitli moleküller ile dolu farklı özel alt yapılardan oluşan hücrenin iç kısmıdır. Kardiyomiyositler diğer hücreler gibi birçok organele sahip olmalarına rağmen, hücresel fonksiyonlarında dikkat çeken üç organel (mitokondri, miyofibriller, sarkoplazmik retikulum) bulunmaktadır.

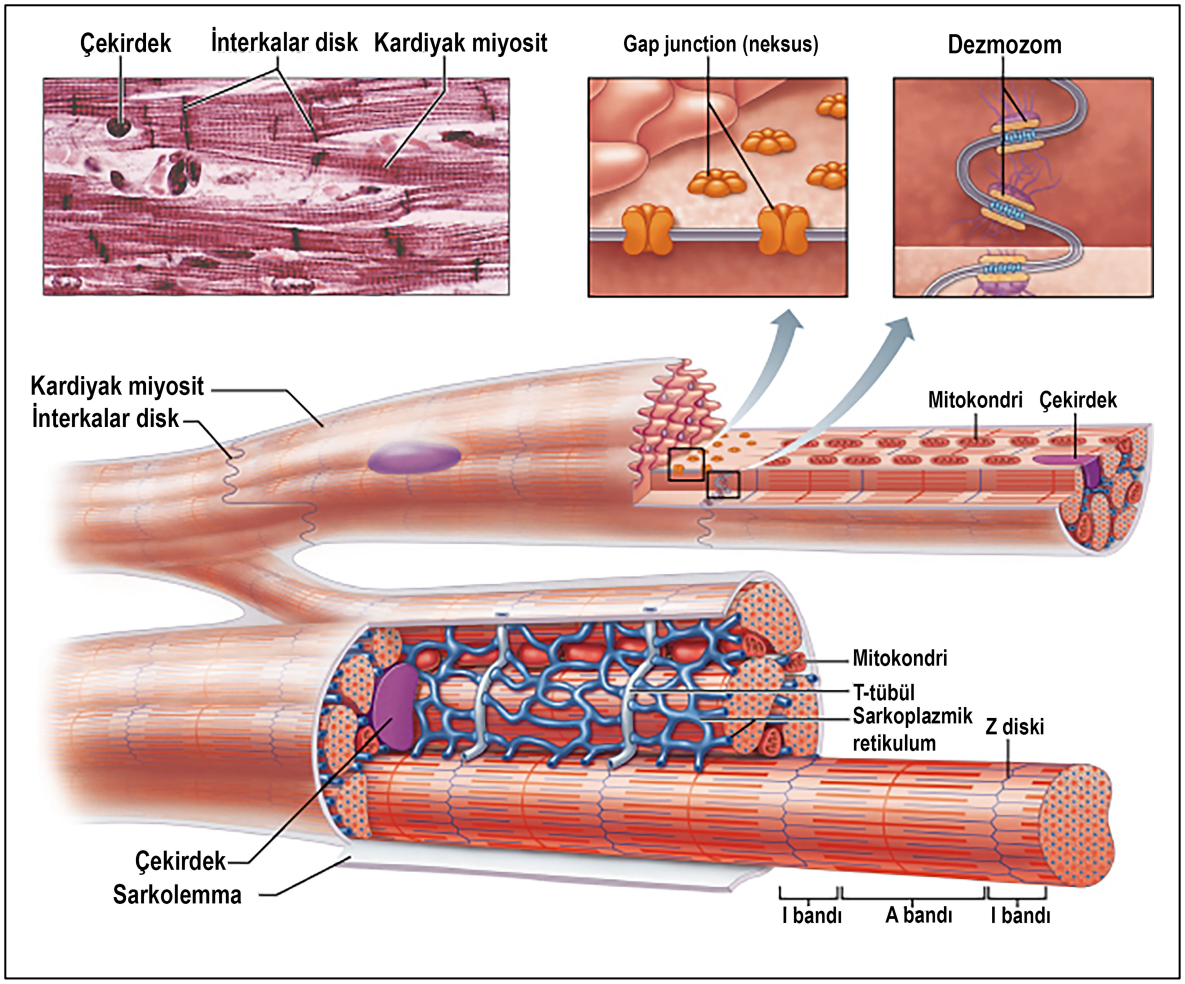
• Mitokondri, genellikle hücrelerin "enerji santrali" olarak adlandırılan ve Adenozin trifosfat (ATP) üretiminde görevli organeldir. ATP, hücrede enerji depolamak ve aktarmak için kullanılan kolayca taşınabilen ve tüketilen küçük enerji paketi olarak düşünülebilecek bir moleküldür. Kardiyomiyositlerin düzenli bir hızda kasılma hareketleri yapmaları gerektiğinden, çok fazla ATP üretmeleri ve sıklıkla diğer hücrelere göre daha fazla sayıda mitokondriye sahip olmaları gerekir.

• Miyofibriller, ince filament benzeri yapıda olan farklı uzun protein türlerinden oluşan yapılardır. Bu yapılar ATP varlığında hücrenin kasılmasını sağlarlar. Sitosoldeki serbest kalsiyum iyonları (I_{Ca}, Ca^{+2}), miyofibrillere bağlanır ve böylece fibrildeki farklı protein yapılarının birbirleri ile iç içe kayarak hücrenin kasılması sağlanır. Bu kayan filament kasılma modeli, myofibrillerin nasıl kasıldığını açıklamaktadır (Şekil 2.2.).

• Sarkoplazmik retikulum, hücre boyunca eşit şekilde yayılmış özel bir kalsiyum deposu olarak görev yapan bir organeldir. Kalbin kasılmasını takiben gevşemesi, I_{Ca} hücre dışına (ekstraselüler) çıkışı ve sarkoplazmik retikuluma geri pompalanmasıyla olur. I_{Ca} uzaklaştırılması sarkolemma tarafından sodyum iyonları (I_{Na}, Na^{+}) I_{Ca} değişimi ile sağlanır. I_{Ca} sarkoplazmik retikulum tarafından geri alınımı ise sarkoendoplazmik kalsiyum (SERCA) mekanizması ile gerçekleşmektedir. SERCA, sitoplazmada içerisindeki yüksek konsantrasyondaki I_{Ca} depolanması için sarkoplazmik retikulum içine geri pompalanmasını sağlanmaktadır. Günümüzde üç SERCA geni karakterize edilmiştir: *SERCA1*, *SERCA2* ve *SERCA3*. *SERCA1* hızlı kasılan iskelet kasında bulunur ve fetal ve neonatal dönemlerde zengindir. *SERCA2*, kardiyomiyositlerde ve yavaş kasılan iskelet kasında yer alırken *SERCA3* epitel ve endotel hücrelerinde yer almaktadır (7).

I_{Ca} taşınmasında SERCA2a'nın etkisinin düzenlenmesi, iki faktör tarafından gerçekleştirilmektedir. Bunlardan ilki, Ca^{+2}/Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II (CaMKII)

ın, SERCA2a üzerindeki 38. pozisyondaki serin'i fosforile ederek ve SERCA2a nın aktivasyonunu sağlayayıp Ca^{+2} geçişlerini artırmasıdır. İkinci faktör ise, fosfolamban proteini ile sağlanmaktadır. Fosfolamban, SERCA2a üzerinde normal şartlarda defosforile yapıdadır. Defosforile fosfolamban, SERCA ve Ca^{+2} arasındaki afiniteyi baskılamaktadır. Fosfolambanın fosforilasyonu β-adrenerjik uyarı ve siklik adenozin trifosfat (cAMP)-bağımlı protein kinazın etkisi ile sağlanır. Bu sayede, SERCA2a üzerindeki inhibisyon kaldırılmakta ve sitoplazmadaki I_{Ca} sarkoplazmik retikuluma pompalanarak sarkoplazmik retikulum I_{Ca} içeriği artması sağlanmaktadır. Bunlara ilaveten, tiroid ve insülin hormonları SERCA2a'nın aktivitesini düzenlerler (8).



Şekil 2.2. Miyokardın yapısı (6)

I_{Ca} geçişlerinin araştırıldığı bir çalışmada, *PLN* fosfolamban gen ifadesi bloke edilen sarkoplazmik retikuluma sahip olan transgenik farelerde, SERCA2a-Ca^{+2} afinitesinde ve dolayısıyla sarkoplazmik retikulum içerisindeki Ca^{+2} konsantrasyonunda artış olduğu

gösterilmiştir. Çalışmada fosfolamban proteininin kalbin kasılmasında düzenleyici bir etki gösterdiği belirtilmiştir (9).

2.2. KARDİYAK FİZYOLOJİ

Vücudun tüm hücrelerinde hücre içi (intraselüler) kısım hücre dışı (ekstraselüler) alana göre negatif yüklüdür ve bu da hücrede membran potansiyeli olarak tanımlanır. İyonları yalnızca özel iyon kanalları yoluyla membran boyunca hareket etmelerinden dolayı farklı iyonlara karşı membran geçirgenliği yüksek düzeyde kontrol altındadır Herhangi bir zamanda açık konumda olan bu iyon kanallarının sayısı, o iyonun membrandan geçirgenliğini belirlemektedir (10).

Kardiyak döngü (kardiyak siklus), atriyuma yayılan ve atriyoventriküler (AV) düğüme ulaşan ve daha sonra Purkinje sistemi olarak bilinen bir dizi sinir lif seti vasıtasıyla onları depolarize eden, üst ana toplardamarın sağ atriyum üst kısmına açıldığı yerin yanında olan sinoatriyal (SA) düğümde üretilen bir impuls ile başlar (pacemaker) ve bu impuls atriyoventriküler düğüme (AV) ulaşıncaya kadar yayılım göstermektedir. Kalbin diğer dokularına kıyasla, AV düğümde iletim hızı belirgin olarak daha yavaştır ve AV düğümdeki bu yavaş iletim sayesinde ventriküle uyarılmadan ve kasılmadan önce kanla dolmak iç yeterli zamanı kazandırmaktadır. Her kardiyak döngü, elektriksel depolarizasyon (kasılmayı tetikleyen sistol) ve bunu takiben mekanik gevşeme ile elektriksel repolarizasyon (diastol) olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Kalp, dinlenme esnasında sistolde diastole göre iki kat daha fazla zaman harcar ve kalp atım hızı arttıkça diastol süresi daha da kısalmaktadır (11).

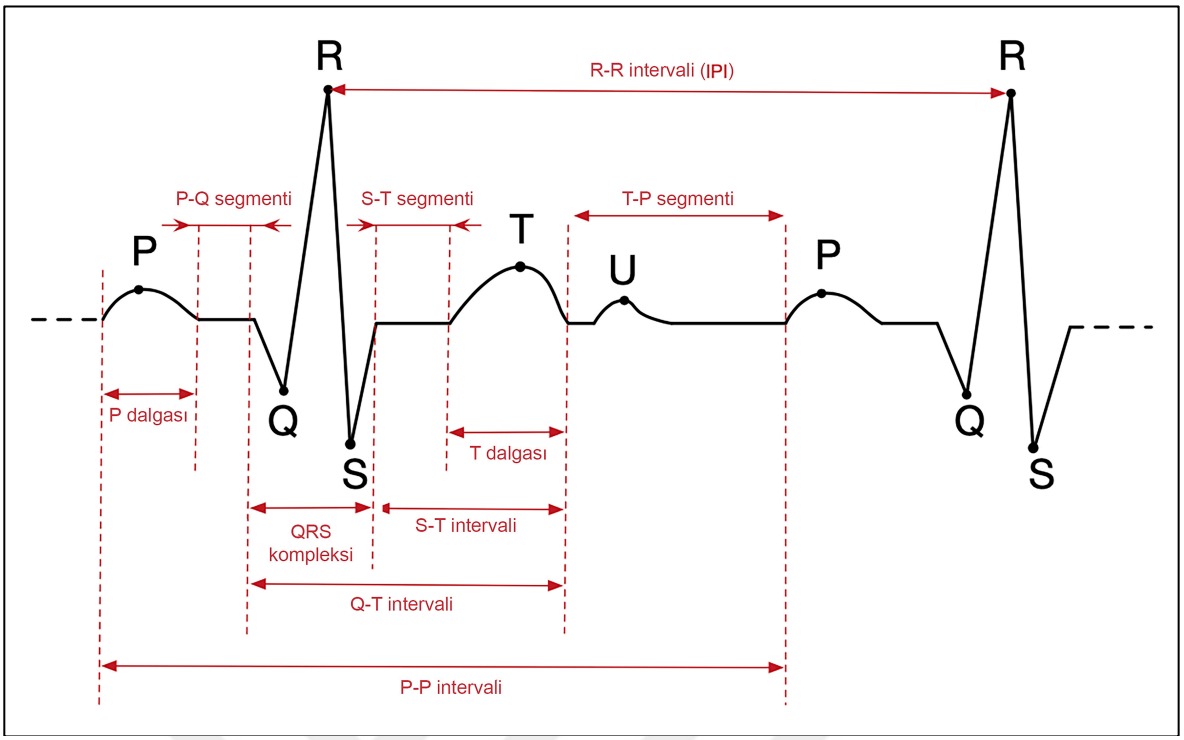
2.2.1. KARDİYAK AKSİYON POTANSİYELLERİ

Kalp hücrelerinin spontan olarak aksiyon potansiyeli oluşturmasına otomatiside adı verilmektedir. SA düğüm hücreleri ile yapılan çalışmalarda otomatisite ile ilgili yapılan SA düğümünden başlayan elektriksel uyarım karmaşık bir yapıya sahip olup, kalp vuruşunun başlamasını sağlamak için birçok faktör birbirleri ile iletişim halindedir. Köpeğe ait sağ atriyumun (RA) aktivasyon haritaları incelendiğinde, SA düğüme ait uyarı başlangıçlarının çok merkezli olduğu ve tahmin edildiği gibi insanlarda ve köpeklerde sempatik uyarının uyarı oluşum yerininbenzer olduğu görülmüştür (12)(13). Atriyum ventrikül ve Purkinje sisteminin her birinde, aksiyon potansiyeli uzun sürelidir ve aksiyon potansiyeli süresi

atriumlarda 150 milisaniye (msn), ventriküllerde 250 msn ve Purkinje liflerinde 300 msn dolaylarındadır. Sinoatriyal (SA) düğüm normalde en yüksek intrinsik hıza sahiptir. Diğer tüm uyarı odakları ikincil veya latent *pacemaker* olarak adlandırılır, çünkü bu odaklar kalbin uyarılmasını başlatma görevini sadece SA düğüm uyarı oluşturamadığı veya oluşan uyarı iletilemediği zaman üstlenirler. Normal otomatisiteye sahip ikincil uyarı odaklarının hızları belirli bir hiyerarşiye göre sıralanmıştır: atriyal uyarı odaklarının intrinsik hızları AV kavşak uyarı odaklarının hızından daha fazladır ve AV kavşak uyarı odaklarının hızı ise ventriküler uyarı odaklarından daha fazladır (14).

Kardiyomiyositlerde ekstraselüler ve intraselüler arasındaki iyon yükü farklılığı membran potansiyeli olarak adlandırılır ve milivolt (mV) olarak ifade edilir. Elektriksel açıdan, kardiyomiyositler dinlenme durumlarında polarize olur, yani hücre içi ve hücreler arası bölge arasındaki transmembran potansiyel (Vm) yaklaşık -80/85 mV'dur. Bu değer SA düğüm hücrelerinde yaklaşık -60 mV iken, atriyum ve ventrikül hücrelerinde -90 mV düzeylerindedir. Atriyum, ventrikül ve Purkinje sistemi dokularının aksiyon potansiyelleri aynı iyonik temellere dayanmaktadır (15).

Kalpte üretilen elektrik dalgalarını vücut yüzeyinde belirli yerlere yerleştirilmiş bir dizi elektrot kullanılarak ölçülmesi yöntemine kardiyak elektriksel aktivite diğer bir deyişle elektrokardiyografi (EKG-ECG) adı verilir. EKG, bir kardiyak döngünün farklı elektriksel fazlarını tanımlayarak, kalp dokusunda üretilen Vm gradyan bölgelerini ve zaman içindeki toplamını gösteren bir yöntemdir. Dalgaların süresi, yükseklikleri ve şekilleri ile dalgalar arasındaki mesafeler, kalbin yapısal veya elektriksel değişimleri hakkında bilgiler verir. Elektrokardiyografi, ana hatlarıyla aritmoloji ve morfoloji olarak ikiye ayırılır. Aritmoloji kalp ritminin tanımlarken, morfoloji ise elektrokardiyografi amplitüd, sinyallerinin dış hatlarının genişlik ve biçimini tanımlamaktadır. Normal sinus ritminde bu sinyallerin sıralaması her zaman sırasıyla PQRST olarak ölçülür. Herbir kardiyak döngü, P dalgası yani atriyal depolarizasyonu ile başlar. ventriküler depolarizasyon QRS kompleksi ile, ventriküler repolarizasyon ise STTU dalga kompleksi (ST segment, T dalgası ve U dalgası) ile temsil edilmektedir. Atriyal repolarizasyon, akut perikardit veya atriyal enfarktüs gibi durumlar dışında genellikle amplitüdünün çok düşük olması sebebiyle tespit edilememektedir (16) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Elektrokardiyogram görüntüsü. P, Q, R, S, T ve U dalgaları (17).

2.2.1.1. İyon Kanalları ve Denge Potansiyelleri

Membran iyon kanalları, kalsiyum (I_{Ca}), sodyum (I_{Na}), potasyum (I_K) ve klor (I_{Cl}) iyonlarının hızlı bir şekilde hücre içi ve hücre dışı geçişini sağlayan hücre membranı içi ile dışı arasında yer alan integral proteinlerdir (4). İntraselüler ve ekstraselüler arasında yaklaşık 10^8 iyonun geçişi bu iyon kanalları sayesinde gerçekleşmektedir. İyon kanallarının açılıp kapanması voltaj-bağımlı, ligand bağımlı ve/veya reseptör-ilişkili olarak gerçekleşmektedir. Genel olarak, kardiyomiyositlerde hücreler arası iyonlara bağlı olarak geçişlere izin veren üç farklı tipte iyon kanalı vardır; sodyum kanalları, potasyum kanalları ve kalsiyum kanallarıdır (18).

Na^+/K^+ veya Na^+/K^+-ATPaz (NKA) pompası, hücre membranında yer alan önemli iyon kanal pompalarından biridir. Bu pompa yardımıyla ATP sayesinde I_{Na} hücre dışına, I_K ise hücre içerisine alınması sağlanır. Bu pompanın her bir akım devrinde 3 I_{Na} karşılık 2 I_K ile yer değişimi sağlanmakta olup böylece, elektrojenik özellik gösteren hücre dışı, hücre içinden daha elektropozitiftir. Hücre membranının, diğer iyonlar için geçirgenliği düşüktür çünkü diğer iyon kanalları dinlenme sırasında genellikle kapalı haldedirler. I_{Na}, ektraselüler maktrikste yüksek konsantrasyonda bulunan I_{Cl} ile denge halindeyken, intraselüler maktikste ise I_K, negatif yüklü proteinler, fosfat ve sülfat iyonlarıyla denge halindedir. Bu iyonlar özelleşmiş iyon kanalları haricinde membran içerisine geçemezler (19).

Sodyum kanalları

Voltaj-geçişli sodyum kanalları yapısal olarak yaklaşık 260 kDa büyüklüğünde alfa(α) ve bir veya iki beta (β) altünitelerinden oluşan protein kompleksinden oluşmaktadır. Günümüze dek 9 α altünitesi (Nav1.1-1.9) tanımlanırken, 4 β altünitenin (β1- β4) foknsiyonel görevi tam olarak belirlenemese de kanal geçişlerinde biyofiziksel aktiviteye yardımcı olduğu düşünülmektedir (20) (Şekil 2.4.). Başlıca sodyum kanal alttiplerinden olan Nav1.5-Nav1.8, tetrodotoksin (TTX) dirençli olmaları sebebiyle bu alt tiplerin, insan ve diğer memeli türlerde TTX zehirlenmesi sonucunda kardiyovasküler disfonksiyonun önlenmesinde normal kalp fonksiyonuna katkıda bulunduğunu gösterilmiştir (21). Nav1 kanallarının vaskülatörün düz kas hücrelerinde ifadelendiği ve sodyum kanalı aktivatörü veratridin molekülünün, birkaç kemirgen kan damarı tipinin kasılmasını indüklendiği bildirilmiştir (22). Sodyum kanalı bloker etkilerinin eksikliğinde fizyolojik koşullar altında vasküler tona katkıda bulunmadıklarını düşündürse de, sempatik sinir geçişleri veratridinin kasılma etkilerine kısmen aracılık etmektedirler ve aynı zamanda düz kas miyositleri üzerinde doğrudan etki edebilmektedirler (23).

Nav1.5

Nav 1.5, kardiyak sodyum kanalı *SCN5A* geni tarafından kodlanmaktadır. Bununla yanı sıra, uyarılabilir ve uyarılamayan diğer dokularda da bir dereceye kadar ifade edilmektedir (24). Nav1.5 aktivasyonu, sinoatriyal (SA) düğüm ve atriyoventriküler (AV) düğüm haricinde, miyokard boyunca aksiyon potansiyeli artışından sorumludur. I_{Na} bu ilk akışı, voltaj-geçişli kalsiyum kanalı aktivasyonu, daha sonra sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum bağımlı kalsiyum salınımı ve son olarak sarkomerlerin kasılması için depolarizasyon tetiklenmesini sağlamaktadır (25). Sodyum kanalları, kasılmadaki rollerine ek olarak da kalp iletiminin temel itici gücüdür. Ventriküllerde, bireysel aksiyon potansiyeli artışlarının toplamı, elektrokardiyogramdaki QRS kompleksinden sorumlu ventriküler depolarizasyon dalgasını oluşturmaktadır. PR intervaline yansıyan atriyal depolarizasyon dalgası, sodyum kanalına bağlı olmakla birlikte, kalsiyum kanalına bağımlı bir bileşene de sahiptir. Bitişik kardiyomiyositler arasındaki iletim, konnexin proteinlerini ve Nav1.5'in yüksek lokal konsantrasyonlarını ifade eden interkalar disk bölgelerindeki gap-junction bağlantılarını içermektedir ve yerel elektriksel akım alanlarının, gap-junction iletişiminden bağımsız

olarak komşu miyositlerde sodyum kanalı aktivasyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (26). İnsan *SCN5A* geninde meydana gelen mutasyonlar kardiyak fonksiyondaki çoklu pertübasyon ile ilişkilendirilmiştir ve bu fonksiyon kaybı (loss of function) mutasyonları, Brugada sendromu vakalarının yaklaşık %20'sinin nedeni olarak gösterilirken, fonksiyon kazanımı (gain of function) mutasyonlarının ise uzun QT sendrom tip 3'e neden olduğu belirlenmiştir (27)(28). Nav 1.5, birçok yaygın antiaritmik tedavinin hedefidir. Vaughan-Williams ilaç sınıflandırılmasına göre, sodyum kanalı blokerleri ventriküler kardiyak aksiyon potansiyellerinin yükselme ve azaltma eğilimlerine göre Sınıf 1 de gruplandırılmaktadır. Sodyum kanal blokerleri ayrıca QRS aralığı ve etkili refrakter periyod (ERP) üzerindeki etkilerine göre alt gruplara ayrılmıştır. Tüm Sınıf 1 antiaritmik ilaçlar depolarize membran potansiyellerinde daha yüksek kanal afinitesine sahipken, açma ve kapama oranlarını önemli ölçüde değiştirmektedir. QRS (Sınıf 1B) üzerinde çok az etkisi olan ERP' yi uzatan bileşiklerin hızlı açma ve kapatma oranları göstermesine karşın, ERP üzerinde büyük etkileri olmayan ve QRS' i uzatan Sınıf 1C bileşiklerinin yavaş kinetiği olduğu belirlenmiştir (29). Sınıf 1C ilaçları artmış kardiyak bloke riski taşıması sebebiyle Nav1.5 inhibisyonu ve QRS uzaması klinik öncesi kardiyak toksikoloji testlerinde sıklıkla incelenen uç noktalardır. Bu nedenle QRS uzaması sağlamak için gerekli Nav1.5 inhibisyonunun derecesi, önemli tartışmalara konu olmaktadır (30).

Nav1.8

Nav1.8, Nav1.5 gibi TTX'e dirençli sodyum kanal ailesinin üyesidir. 2010 yılına kadar Nav1.8'in sadece periferik sinir sisteminde çalıştığı düşünülmesine rağmen, son zamanlarda yapılan genom çalışmalarında Nav1.8'i kodlayan gen olan *SCN10A*' da görülen polimorfizmler PR ve QRS aralıklarının uzaması ile ilişkilendirmiştir (31,32). Daha sonra, fare ve insan kardiyomiyositlerinde ve intrakardiyak nöronlarda Nav 1.8 ekspresyonu gösterilmiştir (33). Kardiyomiyositlerde Nav1.8 in bloke edilmesi geç I_{Na} yavaşlamasıyla aksiyon potansiyel süresini azaltırken, intrakardiyak nöronlardaki Nav1.8 in bloke edilmesi sonucunda aksiyon potansiyel frekansının azalmasına sebep olmaktadır (34,35). Bu gözlemlerin kalp iletimiyle nasıl ilişkili olduğu tam olarak aydınlatılamamıştır. *SCN10A* geninin baskılanmasıyla fare EKG lerinde azalmış PR intervali görülmesine rağmen, Nav 1.8'in farmakolojik inhibisyonunun PR intervalinin uzamasına neden olduğu görülmüş ve böylece bu genin işlevini tam olarak belirleyebilmek daha da karmaşık hale gelmiştir (36).

Yapılan çalışmalarda insanda *SCN10A* geninde belirlenen polimorfizmler kodlanmayan bölgelerinde olduğu belirlense de, yalnızca bir polimorfizm bile *SCN5A* ve/veya *SCN10A* genlerinin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyebileceğini düşündürmektedir (37).

Potasyum Kanalları

Voltaj geçişli potasyum kanallarının birkaç ailesi kardiyomiyositlerde ifadelenir ve birlikte aksiyon potansiyelin repolarizasyondan sorumlu dış akımı sağlamakta görev almaktadırlar. İyon kanal alt tiplerinin farklı repolarizasyon fazlarını aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri belirlemektedir. Repolarizasyon fazı sırasına göre, baskın Kv kanalı gözenek oluşturan alt birimler ve karşılıklı akımlar; Kv4.3 ve Kv1.4 / hızlı ve yavaş geçici dış akım (I_{to}), Kv1.5/ultra hızlı gecikmeli doğrultucu akım (I_{Kur}), Kv11.1 aka hERG/hızlı gecikmeli doğrultucu akımı (I) ve Kv7.1 aka KvLQT1/yavaş gecikmeli doğrultucu akımı (I_{Ks}) olarak adlandırılmaktadır. Gözenek oluşturan alt birime ek olarak, kardiyak miyositler, β-alt birimleri, MinK ve MinK ile ilişkili proteinler, potasyum kanalı etkileşim proteinleri ve potasyum kanalı aksesuar proteinleri dahil olmak üzere çeşitli aksesuar proteinleri ifadelendirmektedir (38) (Şekil 2.4.). Kv kanalının inhibisyonu genellikle depolarize edilmiş aksiyon potansiyeli platosuna ve/veya uzun süreli aksiyon potansiyeli süresine yol açmaktadır (39).

Aritmileri tedavi etmek için potasyum kanal bloke edici ajanların kullanımı, aritmik potansiyelleri nedeniyle genellikle tam olarak başarıya ulaşamamaktadır. Özellikle, uyuşturucuyla ilgili veya kanal mutasyonlarının neden olduğu azalmış Kv11.1/hERG aktivitesinin, "*Torsades de pointes"* olarak bilinen aritmi riskini artırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, en yaygın aritmi formu olan atriyal fibrilasyonu (AF) farmakolojik olarak tedavi etmek için iki strateji geliştirilmiştir; her iki yaklaşım da atriyal Kv kanallarının, atriyal olarak ifade edilen fakat ventriküler miyositlerde ifade edilmeyen Kv1.5 kanallarını hedefleyerek veya atriyum için fonksiyonel seçiciliğe sahip çok kanallı inhibitörler yoluyla seçici olarak bloke edilmesini içermektedir (40).

Kv1.5

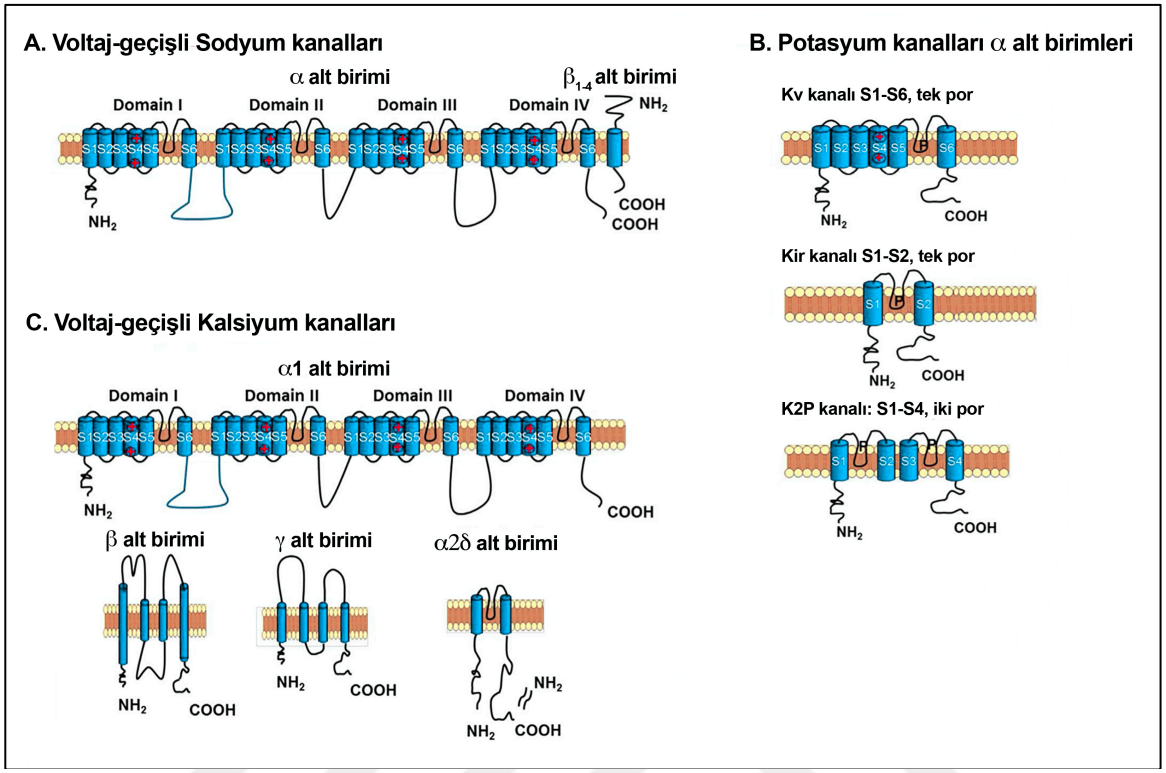
Ultra hızlı gecikmeli doğrultucu akımından (I_{Kur}) sorumlu olan Kv1.5, *KCNA5* geni tarafından ifadelenmektedir. I_{Kur} genellikle sadece atriyal miyositlerde eksprese edilmesi sebebiyle AF ilaç keşfinde umut verici bir hedef olarak görülmektedir (41). Kv1.5 bloke edilmesiyle birkaç ajanın etki mekanizmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir ancak selektif Kv1.5 AF hastalarında bu bloke ajanlar test edilmemiştir (42). Diğer kardiyak iyon kanalları üzerinde Kv1.5 için seçici bir bileşik olan MK-0448, birçok klinik öncesi AF modelinde etkinlik göstermiştir ve sağlıklı gönüllülerde yapılan invaziv bir elektrofizyolojik çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmada MK-0448'in atriyal refrakter periyodunu uzatmadığı gözlenmiş ve bu çalışmaya ek olarak anestezi altındaki köpeklerde yapılan takip çalışmalarında çalışmaya katılanlar gibi genç, sağlıklı deneklerde yüksek vagal tona etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (43).

Hasta bireylerde vagal ton azaltılabilse de, vagal stimülasyon ile ilişkili riskli AF atakları için fazla etkin değildir ve MK-0448'in klinik gelişimi kesilmiştir. Bununla birlikte, sinüs ritim (SR) kontrollerinden ve kalıcı AF hastalarından insan atriyal dokusunda MK-0448 ile yapılan yeni bir çalışmada, MK-0448'in AF hastalarından gelen atriyal dokudaki etkili refrakter periyodunu geciktirdiğini gösterilmiştir. Bu nedenle, sağlıklı gönüllü bireylerde MK-0448 ile yapılan çalışmalarda tam olarak etkili olmayan deneme sonuçları AF popülasyonunda etkinliğin öngörüsü oluşturulamamıştır (44).

<u>Kalsiyum kanalları</u>

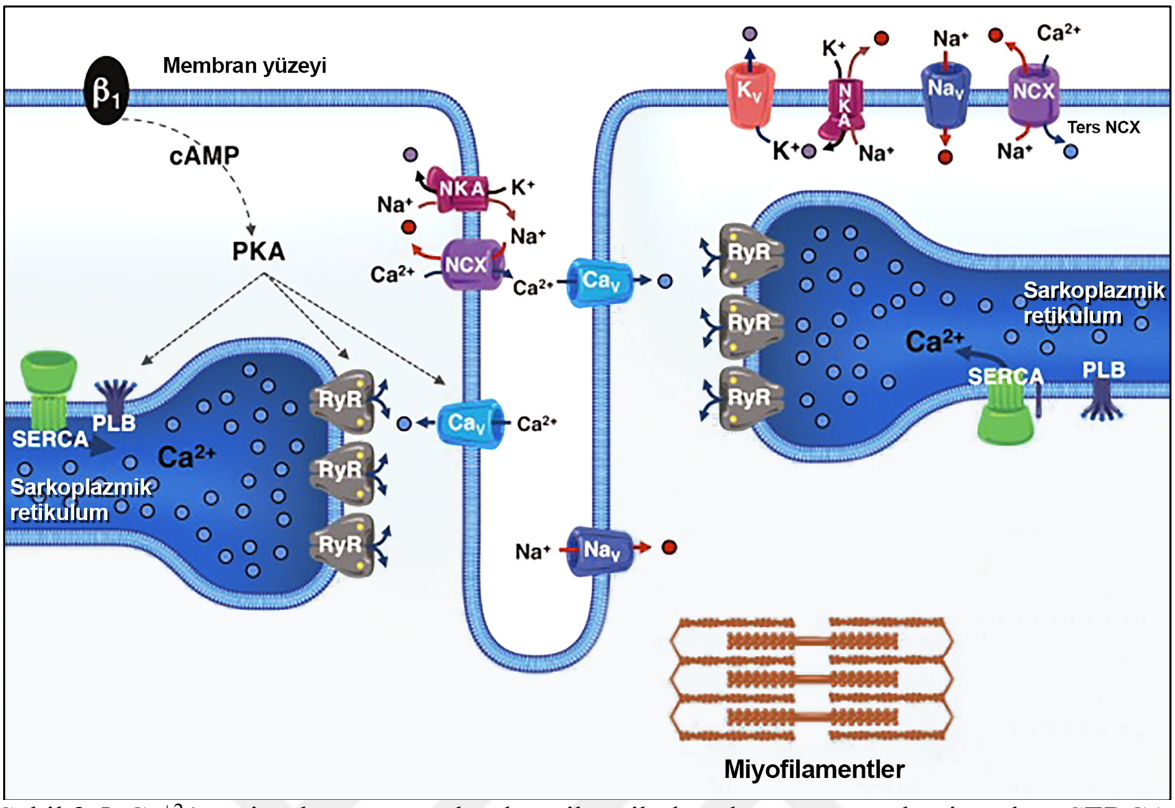
Kardiyovasküler fizyolojinin tüm yönleri için kritik öneme sahip olan bir diğer iyon kanalı ailesi voltaj geçişli kalsiyum kanallarıdır (VGCC). Memeli türlerinde, VGCC'lerin gözenek oluşturucu alt birimlerini kodlayan 10 gen klonlanmıştır (45). Doğal dokularda VGCC'ler, gözenek oluşturan bir alt birim, 4 farklı β alt birimden biri, 4 α2δ alt biriminden biri ve potansiyel olarak 8 γ alt biriminden biri olan bir kompleksden oluşur. β-alt birimleri ve α2δ alt birimlerinin yüzey belleği ifadesi ve kaplamanın gerilim bağımlılığı üzerinde etkileri vardır, buna karşılık γ-alt birimlerinin rolü hakkında çok daha az şey bilinmektedir (Şekil 2.4.). Hücre tipine ve hücre konumuna bağlı olarak, VGCC'ler ayrıca aktivitelerini düzenleyen kalmodulin ve kalsiyum bağlayıcı protein 1 gibi proteinler, vezikül yerleştirme,

nörotransmitter salımı ve hücre içi sinyal molekülleri dahil proteinler de dahil olmak üzere bir dizi protein ile birlikte bir araya gelmektedir (46,47).



Şekil 2.4. Kardiyak iyon kanalları ve alt birimleri (48)

Kas kasılmasını sağlayan miyofibrillerin uyarılabilmesi için gerekli olan I_{Ca}, aksiyon potansiyeli sayensinde gerçekleştirilmektedir. Ventriküler miyositler T-tübül sistemine sahip olmalarıdır ve bu sistem aracılığıyla hücre membranından hücre içerisine doğru elektriksel bir kanal oluşmaktadır. Böylece elektriksel kanal sayesinde oluşan aksiyon potansiyelinin hücre içine yayılması sağlanır. T-tübül sellüler zarı sodyum kanalları, potasyum kanalları, L-tipi kalsiyum kanalları, Na^+-Ca^{+2} değiştiricisi (NCX) ve Na^+-K^+ ATPaz (NKA) gibi taşıyıcı proteinlerin bulunduğu yerdir (49). Bunun sonucu olarak, T-tübül sisteminin elektriksel aktivitesi diğer hücre tiplerinin zar yüzeyinden nispeten farklıdır.



Şekil.2.5. Ca^{+2} 'un sitoplazma ve sarkoplazmik retikulumda taşınma mekanizmaları. SERCA (sarkoendoplazmik Ca^{+2} ATPaz). RyR (riyanodin reseptörü), NCX (Na^{+}- Ca^{+2} değiştiricisi), NKA (Na^{+}-K^{+} ATPaz) ve PLB (fosfolamban inhibitörü) (50)

NCX aktivitesi, membran potansiyeliyle düzenlenir. Hiperpolarize dinlenme esnasında, membran potansiyeli I_{Ca} un sitoplazmadan uzaklaştırılmasını uyarırken, depolarize dinlenim membran potansiyeli I_{Ca} un uzaklaştırılmasının yavaşlamasını sağlar. NCX ile I_{Ca} sitoplazmadan ekstraselüler matrikse taşınması ile intraselüler matrikste I_{Na} konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır. Buna karşılık NKA tarafından I_{Na}'un aktif olarak uzaklaştırılması ile intraselüler Na^{+} konsantrasyonu dengelenmektedir. NCX in aktivasyonu direk olarak ATP hidrolizine bağımlı değildir ancak I_{Na} konsantrasyonu NKA tarafından korunduğu için NCX ve NKA, ATP yardımıyla Ca^{+2} geçişinde fonksiyonel bir birim oluşturmaktadır. NCX miktarındaki artış, diyastolik intraselüler I_{Ca} konsantrasyonunda azalmaya sebep olmaktadır (51). Bu veri, fare ve domuz miyositleri üzerine yapılan bir çalışma ile desteklenmiştir. NCX in bloke edilmesi ile, intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu yükseldiği bildirilmiştir (52). Diastol evresinde, NCX'e bağlı olan intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun düzenlenmesi, sadece NCX miktarına değil aynı zamanda transmembran potansiyele ve intraselüler Na^{+} konsantrasyonuna da bağlıdır (Şekil 2.5.).

Hücreye ekstraselüler ortamdan intraselüler ortama I_{Na} girişi ile hücre membranı hızlı bir şekilde depolarize olmakta (+20mV) ve kardiyak miyositlerin kasılması gerçekleşmektedir. Depolarizasyonu takiben voltaj geçişli potasyum kanalları açılır ve hücre repolarize olur ve gevşeme meydana gelir. Membran depolarizasyonu, voltaja geçişli kalsiyum kanallarının aktif hale geçmesini ve L-tipi kalsiyum kanalları ile I_{Ca}'un intraselüler ortama girişini uyarmaktadır. Uyarılma/kasılma ilişkisinde L-tipi kalsiyum kanalları ile I_{Ca} girişi en büyük etkiye sahiptir. Kalpteki kalsiyum kanalları, iskelet kasındaki kanallardan fonksiyonel olarak farklıdır. Kalpte voltaja duyarlı T-tübül deki kalsiyum kanalları, sarkoplazmik retikulumda I_{Ca} salınımı yapan kanala bağlıdır (53).

Voltaja-geçişli kalsiyum kanalları, elektrofizyolojik özelliklerine göre yüksek ve düşük voltajda aktive olan kalsiyum kanalları olmak üzere iki sınıfa ayrılırken, biyofiziksel özelliklerine göre T-tipi, L-tipi, N-tipi, P/Q-tipi and R-tipi kalsiyum kanal tiplerine sahiptirler. Kardiyak L-tipi kalsiyum kanalları polipeptid yapıda dört alt üniteden oluşmuş heterotetramerik yapıya sahip bir proteindir. Bu alt üniteler, α1, α2, β, γ ve δ olarak adlandırılmışlardır. α1 alt ünitesi kanalın temel yapısını oluşturmakta olup, cAMP'ye bağımlı protein kinazın bağlanacağı fosforilasyon bölgesi ile kanal porlarını içermektedir. Kalsiyum kanallarının diğer alt üniteleri ise α1 alt ünitesinin fonksiyonlarını düzenlemektedir. α2 ve δ alt üniteleri disülfit bağları ile bağlıdır ve aynı genler tarafından kodlanmaktadır (53) (54).

I_{Ca} salınımının düzenlenmesi, Ca^{+2}/kalmodulin'e (CaM) bağımlı proteinkinaz II (CaMKII) proteini tarafından yürütülmektedir. CaMKII, L-tipi kalsiyum kanalları ile riyanodin reseptörlerinin (RyR) fosforilasyonunu gerçekleştirmektedir (55). CaMKII aktivasyonu, L-tipi kalsiyum kanalları aracılığı ile intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun artışı ile gerçekleşmektedir. CaMKII aktivasyonu sonucunda reseptörler aktive olmakta ve bu sayede I_{Ca} sarkoplazmik retikulumdan salınmaktadır (56).

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu yüksek oranda artış gösterdiğinde Ca^{+2}/kalmodulin'nin CaMKII'ye olan afinitesi 700 kat artmaktadır (57). Diastol boyunca hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu, dinlenme değeri olan yaklaşık 100nM a düşer ve CaM birkaç saniye boyunca bağlı halde kalır. Bu nedenle, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyon değerlerinden bağımsız olarak, Ca^{+2} /kalmodulin kompleksi, CaMKII'ye bağlı olduğu sürece kinazın tam olarak aktif

olduğu düşünülmektedir. CaMKII'nin PP1, PP2A ve PP2C gibi protein fosfatazlar tarafından defosforilasyonu sonucunda inaktivasyonu gerçekleşmektedir (58). Kardiyomiyositlerde, KN62 ve KN93 olmak üzere iki tip CaMKII inhibitörü bulunmaktadır. Bu inhibitörler sayesinde CaM'nin CaMKII'ye ait düzenlenme bölgesine bağlanması engellenmektedir (57). CaMKII ve SERCA kalsiyum kanallarının (reseptörler ve α1 alt ünitelerinin) amino ve karboksil gruplarını fosforile ederek, kanalların aktif hale geçmesini sağlamaktadır (59).

Yapılan bir çalışmada, aşırı CaMKII ifadesi bulunduran transgenik fare miyositlerinde hücre içi I_{Ca} girişinin arttığı ve kalsiyum kanallarının inaktivasyonunun yavaşladığı ve KN93 ve KN62 inhibitörleri aracılı CaMKII bloke edildiğinde, I_{Ca} akımının kontrol değerlerine tekrar düşürüldüğü rapor edilmiştir (57).

Hücre zarı üzerindeki L-tipi kalsiyum kanalları ile hücre içine I_{Ca} girişi reseptörlerin aktif hale gelmesin sağlamaktadır. Kardiyomiyositlerin dinlenme fazında Ca^{+2} konsantrasyonu yaklaşık 100 nM iken, sarkoplazmik retikulumdan sitoplazmaya I_{Ca} çıkışı gerçekleşmesiyle, Ca^{+2} konsantrasyonu 600-1000 nM ye kadar yükselebilmektedir. Ca^{+2} un hücre içindeki konsantrasyonunun artması ile kasılmanın ardından, I_{Ca} sitoplazmadan uzaklaştırılarak kardiyomiyositlerin gevşemesi meydana gelir. I_{Ca} uzaklaştırılması, sarkoplazmik retikulumun terminalinde yer alan I_{Na} geri alımı ile sağlanmaktadır. Bir diğer mekanizma ise, NCX değiştiricisi aracılığı ile membrandan I_{Na}'un hücre içine girişi uyarılarak, hücre dışına bir I_{Ca} gönderilmesidir (51).

2.2.1.2. Kardiyak Denge Potansiyelleri

Membran geçirgenliği değiştiği anda hücreler I_{Na} ve I_{Ca} iyonlarına daha geçirgen konuma gelirken, Vm artma eğilimi gösterir ve pozitif yüklenirler ve bunu takiben, membran potasyum iyonlarına (I_K) karşı geçirgen olursa Vm azalma eğilimde olup, negatif yüklenirler. Kardiyomiyositler stimülasyon akımı aldıklarında depolarize olur, yani Vm pozitif voltajlara yükselir, ve depolarizasyon sonrasında polarize, repolarize veya hiperpolarize olmaktadırlar (19).

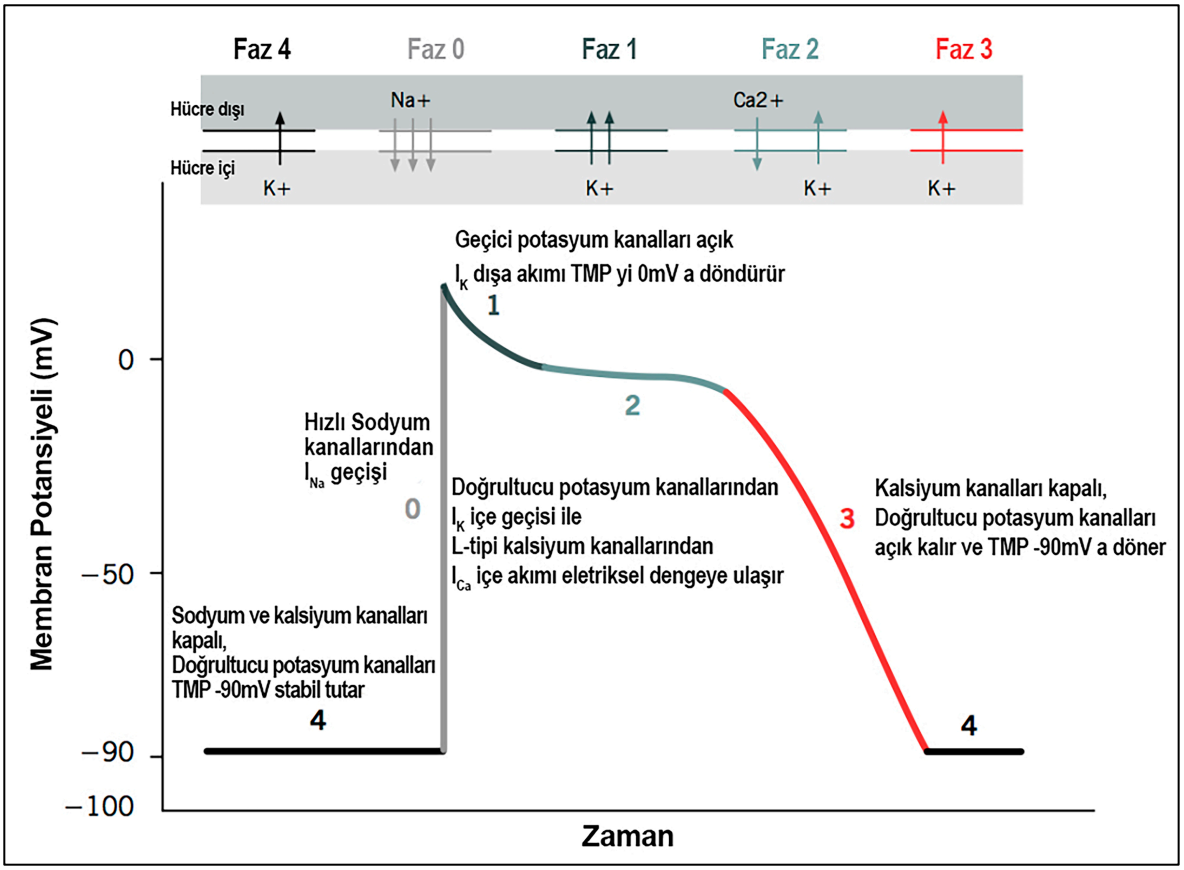
Ventriküler hücreler gibi *pacemaker* olmayan *(non-pacemaker)* hücre aksiyon potansiyeli (AP), vücuttaki diğer aksiyon potansiyellerine özgüdür. Faz 0-4 olmak üzere beş ayrı aşaması bulunmaktadır. AP' nin ortalama dinlenim zar potansiyeli (RMP) değeri belirtildiği

gibi yaklaşık -85 ila -95 mV tur ve "Faz 4" (dinlenme fazı) olarak kabul edilmektedir. Dinlenmeyi takiben, depolarizasyon, -90 mV dinlenme potansiyelinden pozitif bir değere doğru voltaj değişimi olmasıyla başlamaktadır. Repolarizasyon ise, membran potansiyelinin pozitif bir değerden -90 mV dinlenme potansiyeline geri dönmesiyle açıklanmaktadır (60).

Başlangıçta, "Faz 4" dinlenme potansiyeline sahiptir ve L-tipi yavaş kalsiyum kanalları hızlı sodyum kanalları kapalı halde bulunurken, potasyum kanalları pasif olarak açıktır ve evre boyunca I_K hücre dışına çıkmaya başlamasıyla membranın iç yüzeyi daha negatif yüklü konumdadır. Bunu takiben potasyum kanalları kapanır ve "Faz 0" a geçilir. Bu evrede sodyum kanallarının açılmasıyla I_{Na} iyonlarının hücre içine geçişi sağlanmakta ve membran potansiyeli -90 mV dan "eşik değer" (threshold potential) olarak bilinen -70 mV a gelerek ilk depolarizasyon meydana gelmektedir. Komşu hücrelerden gap-junction yoluyla hücreye giren pozitif I_{Na} ve I_{Ca} sayesinde membran potansiyelinin yaklaşık olarak +50 mV a ulaşmasıyla sodyum kanalları çok hızlı şekilde kapanmaktadır. Tepe voltaj değerine ulaşıldığı an "Faz 1" olarak adlandırılır ve potasyum kanalları açılarak I_K hücreden hızlı bir şekilde çıkarılmasıyla birincil repolarizasyon gerçekleşmektedir. Bu evreden sonra "Faz 2" olarak bilinen "plato" evresine geçilir. Bu evrede potasyum kanalları dışa doğru açılırken L-tipi kalsiyum kanalları içe doğru açılmaya başlamaktadır. Bu, hücrede net bir yük dengesi oluşturarak bir plato yaratır ve sonrasında membran potansiyeli -40 mV a gelerek “Faz 3” olarak adlandırılan son repolarizasyon evresine geçilir. Faz 3, Faz 2’nin sonunda, ekstraselüler I_K çıkış ile intraselüler I_{Ca} giriş oranının artması ile başlamaktadır. İçeri giren I_{Na} NKA ile uzaklaştırılırken, benzer olarak giren I_{Ca} NCX pompası ile uzaklaştırılmaktadır. (7). Bu devir, dakikada 60-200 (bpm) kez devam eder. Tüm kardiyomiyositlerin kendiliğinden aktif olmalarına karşın, SA düğümü kalbin başlıca pacemaker yani atım hızını belirleyen bölgedir (60).

SA düğüm pacemaker hücre aksiyon potansiyellerinde, pacemaker olmayan hücre aksiyon potansiyellerinden farklı olarak Faz 1 ve Faz 2 bulunmamakta ve AP’nin depolarizasyon fazında hızlı sodyum kanalları yerine daha yavaş kalsiyum kanalları rol oynamaktadır. Burada hızlı kalsiyum kanalları bulunmamaktadır. "Faz 4" aşaması AP’yi tetikleyen spontan depolarizasyonun olduğu kısımdır. Repolarizasyon sonrasında AP yaklaşık olarak -60 mV’a gelerek yavaş içeri doğrultucu soydum kanalları (I_f) açılır ve membran yavaşça depolarize olmaya başlar. Bu kanallarda oluşan iyon akımlarına ‘funny currents (I_f)’ adı verilmektedir.

Membran potansiyeli değeri -50 mV'a ulaştığında T-tipi kalsiyum kanalları açılır ve intraselüler I_{Ca} geçişleri başlar (I_{CaT}). Membran potansiyeli -40 mV değerine ulaştığı anda L-tipi klasiyum kanalları açılarak daha fazla I_{Ca} (I_{CaL}) intraselüler geçişi sağlanmaktadır. Bu değerden sonra "Faz 0" a geçilir ve bu evre membran potansiyeli +10 mV a gelene devam etmektedir. Membran potansiyeli değerinin maksimum seviyeye gelmesiyle L-tipi kalsiyum kanalları kapanmaya başlar ve potasyum kanallarının açıldığı "Faz 3" olarak adlandırılan repolarizasyon evresine geçilirr. Bu evre ekstraselüler I_K geçişi sayesinde membran potansiyeli yeniden -60mV değerine gelen kadar devam etmekte ve sonrasında yeniden "Faz 4" e geçilmektedir (18) (Şekil 2.6.)



Şekil 2.6. Kardiyak pacemaker hücrelerin aksiyon potansiyelleri ve iyon dengeleri (61)

Sempatik ve Parasempatik Etki

Normal şartlarda SA düğümü aktivasyon hızı kalp atım hızını belirlemektedir. Ancak kalp atım hızı otonom sinir sisteminin (OSS) her iki kolunun aktivasyonu tarafından değiştirilebilir. Sempatik sinirleri ya da kanda sirküle edilen epinefrinden gelen sempatik giriş, atım hızını artırırken, vagus sinirinden gelen parasempatik girşi atım hızını

azaltmaktadır. Norepinefrin ve epinefrein, SA düğümde atım hızını ayarlayan akım potansiyeli boyunca iyon kanallarının açılma ihtimalini artırmak için β-adrenoreseptörlere etki etmektedir. Bu durum normalde daha fazla olan atım hızını ayarlayan potansiyel akım artışı ile sonuçlanır ve SA düğüm -20 mV' a ulaşarak atım hızında artışa neden olan aksiyon potansiyelini daha hızlı biçimde tetiklemektedir. Vagus sinirinden salınan asetilkolinin (ACh) birincil etkisi potasyum kanallarının açık olduğu durumda atım hızını ayarlayan potansiyel akım boyunca açık olma ihtimalini en aza indiren muskarinik ACh reseptörlerine etki ederek atım hızını azaltmaktadır (62).

2.3. KARDİYAK ARİTMİ VE İLETİ BOZUKLUKLARI

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda kalpteki ileti bozuklukları ve bunların neden oldukları kardiyak aritmilerin altında yatan moleküler ve fizyolojik mekanizmaların aydınlatılmasında önemli gelişmeler yaşanmıştır. Elektiriksel fonksiyon bozukluklarının genetik yatkınlık ve moleküler temellerinin anlaşılmaya başlanması olguların daha kolay algılanmasını sağlasa da, kalpte meydana gelen ritim bozukluklarının nedenlerinin ve mekanizmalarının aydınlatılmasında yeterli olmamaktadır.

Aritmik aktiviteler aktif ve pasif olmak üzere iki ana başlıkta değerlendirilmektedir. Aktif aritmiler anormal, artmış uyarı oluşumu ve yeniden giriş olmak üzere iki alt kategoriye ayrılmaktadır. Kalbin normal aktivasyonu sonucunda oluşan uyarıların yayılımı ile refrakter periyodun sonrasında kalbi yeniden uyarması ile oluşmaktadır. Atriyal ve ventriküler aritmilerin mekanizmalarının temelini yeniden giriş dalgaları olduğu çok kanallı haritalama çalışmaları ile belirlenmiştir (63). Atriyal fibrilasyonun (AF) ve ventriküler fibrilasyonun (VF) oluşum mekanizmalarını açıklamak amacıyla, fibrilatuvar ileti dalgaları, eksitasyonun spiral dalgaları ve Faz-2 yeniden giriş geliştirilmiştir (64). Artmış otomatisite ve tetiklenmiş aktivite anormal uyarı oluşumuna neden olmaktadır.

2.3.1. KARDİYAK ARİTMİ OTOMATİSİTESİ

Kalpte taşikardiye neden olan artmış otomatisite ve bradikardiye neden olan azalmış otomatisite anormal otomatisite olarak nitelendirilmektedir. İleti başlangıcı pacemaker ın sinüs düğümünde kayması veya atriyumda diğer ikincil pacemaker ile yer değiştirmesi sonucunda sinüs ritim (SR) hızında değişiklikler meydana gelmektedir. SA düğümde uyarı

iletimininde meydana gelen aksaklık ve artmış vagal aktivitenin aksaması veya bloke olması bradikardinin gelişmesine yol açmaktadır. AV kavşak pacemaker aktivitesinin, SA düğümün aktivite hızından yüksek olduğu durumda AV kavşak ritmi meydana gelmektedir.

Kalpte normal otomatisitenin kalsiyum saati mekanizmasında değişime neden olan genetik mutasyonlar sonucunda Bradikardı hastalığı oluşmaktadır. I_f akımını taşıyan sodyum-potasyum hiperpolarize kanalın bir parçası olan *HCN4* geninde meydana gelen mutasyonlar buna bir örnek olarak gösterilmektedir. *HCN4* mutasyonlarının ailesel bradikardiye neden olduğu belirlenmiştir (65)(66). Elde edilen bulgular SA düğüm otomatisitesinin oluşumunda I_f akımının önemini gösterse de, egzersiz sonucu kalp atımı hızlanması farklı mekanizmalara bağlı olabilmektedir. Bir diğer mekanizma olarak, sempatik uyarı sırasında fosfolamban (PLB) fosforilasyonu ile kalsiyum saatinin aktivitesindeki artış ve I_{Ca} ile RyR2 aktivitesinde artış gösterilmiştir. RyR2 ve kalsekestrindeki (CSQ) mutasyonlar sarkoplazmik retikulumdan I_{Ca} salınımını artırarak katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardiye (KPVT) neden olmaktadır (67)(68).

2.3.2. ARDDEPOLARİZASYON VE TETİKLENMİŞ AKTİVİTE

Aksiyon potansiyelinde transmembran aktivitesiyle oluşan depolarizasyon evresinin kendisi ve kendisinden önceki salınımlarına *arddepolarizasyon* adı verilmektedir. Tetiklenmiş aktivitenin basamakları, erken arddepolarizasyonlar (EAD), geç faz 3 EAD ve gecikmiş arddepolarizasyonları (GAD) şeklinde meydana gelmektedir. Erken *arddepolarizasyon* (EAD), aksiyon potansiyelinin 2. ve 3. fazlarında (veya her ikisinde) repolarizasyonun gecikmesine neden olurken, geç *arddepolarizasyon* (GAD) ise repolarizasyon sonrasında oluşmaktadır. EAD ve GAD dalgaları hücre membranının eşik değere ulaşmasını sağladıklarında spontan aksiyon potansiyeli oluşmaktadır ve buna "tetiklenmiş cevap" adı verilmektedir (69).

EAD ile uyarılan tetiklenmiş aktivite stimülasyon hızına oldukça duyarlıdır ve EAD'lar kalp yetmezliği, ventrikül hipertrofisi gibi farklı nedenlerle hasara uğramış kalp dokularında repolarizasyon süresinin kritik bir noktaya kadar uzaması ile görülmektedir (70). Membran potansiyelinin -30 mV'un üzerindeki değerlerinde salınımlar faz 2 EAD olarak, potansiyelin daha da negatif değerlerinde görülenler ise faz 3 EAD olarak adlandırılmaktadır (71). Belirli antiaritmik ilaçlar ile yavaş stimülasyon hızında EAD aktivitesi uyarılır ancak yüksek

stimülasyon hızında EAD oluşumunun baskınmasına neden olmaktadır (72).

Sodyum kanal akımlarının I_{Na} faz 2 ve 3 sırasında inaktivasyon sonrasında yeniden aktive olduğu süredeki dengesizlik aksiyon potansiyel süresine ve EAD tetiklenmesine neden olmaktadır (73). Benzer şekilde repolarizasyon deposu azaldığı zaman ve sürekli geç I_{Na} akımı olduğu zaman $I_{Ca,L}$ akımının reaktive olması EAD ların gelişimine katkıda bulunabilmektedir (74).

Aksiyon potansiyelinin tamamen repolarize olmasıyla sarkoplazmik retikulumdan spontan olarak salınan I_{Ca} ile transmembran potansiyelinde depolarize salınımlar meydana gelmekte ve GAD ların oluşumuna neden olmaktadır (75). GAD lar membran potansiyeli eşik değere ulaştığında tetiklenmiş aktiven adı verilen spontan aksiyon potansiyeli gelişimine neden olmaktadır ancak bu durum hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. Sarkoplazmik retikulumdan spontan salınan I_{Ca}, normal otomatisiteye önemli ölçüde katkı sağlamasının yanı sıra, aritmojenik bir mekanizma olduğu bilinmektedir (76).

Daha önce de belirtildiği üzere *CSQ2* ve *RyR2* genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu KPVT açığa çıkmaktadır ve bu GAD ile uyarılan aritmilere en iyi örnek olarak gösterilmektedir. İnsanda KPVT'ye neden olan genetik mekanizmalar çok iyi tanımlanmış ve bu sayede transgenik fareler oluşturulmuştur. Yapılan çalışmalarda VT lerin altında yatan nedenin GAD lar olduğu bildirilmiştir (77). Diğer bir çalışmada kalsekestrin mutasyonu taşıyan farelerde sarkoplazmik retikulumdan normalden daha sık ve uzun süren I_{Ca} geçişi olduğu belirlenmiştir (78). Bu çalışmaların sonucunda tetiklenmiş aktivite ve GAD lar KPVT ye neden oluyor ise RyR2'den spontan I_{Ca} salınımının inhibe edilmesi ile kardiyak aritmilerin tedavisinde etkili olabileceği fikri öne çıkmıştır. Elektrofizyolojik ve yapısal yeniden biçimlenmenin neden olduğu kalp yetmezliğinde kalp kası dokusunda heterojen bir yapı oluşmakta ve bu nedenle aritmi meydana gelmektedir ve bu mekanizma Faz-4 I_{NCX} aktivitesinin upregülasyonuna, hücre içi I_{Ca} geçişlerinin kontrolsüz olmasına dayandırılmaktadır (79)(80).

2.3.3. AKSİYON POTANSİYELİ SÜRESİ VE KALSİYUM İYON DENGESİ

Aksiyon potansiyeli süresi ile kendisinden önceki diastol arasındaki ilişkiyi aksiyon potansiyeli süresinin restitüsyonu belirlemektedir ve bu sayede kalp aktivitesinin stabilitesi

sağlanmaktadır. SA nın yeniden pace edilmesi stabilizasyonu etkiler ve aksiyon potansiyeli süresi alternansı uyarması sonucunda fibrilasyon meydana gelir (81). Yeniden iyon giriş dalgalarının stabilizasyonu ve aksiyon potansiyeli süresinin restitüsyonunu ile kalsiyum dinamikleri ve elektriksel aktivasyon birlikteliği doğru orantılıdır (82). I_{Ca}-voltaj eşleşmesi pozitif olduğunda aksiyon potansiyeli süresinin uzamasına, eşleşme negatif olduğunda ise sürenin kısalmasına neden olur. Bu etki I_{NCX} akımındaki artışı oranının $I_{Ca,L}$ akımının azalmasına oranla daha az olmasından kaynaklanmaktadır (83).

2.3.4. KARDİYAK YENİDEN BİÇİMLENME (YAPILANMA) VE ARİTMİ MEKANİZMALARI

Aritmi yapısal olarak normal kalpde görülse de çoğunlukla primer hastalıklı kalpte meydana gelmektedir. Bu nedenle kardiyak yeniden biçimlenme (yapılanma-remodeling) kalp hastalıklarıyla ilişkili olarak hem sinirsel hem de miyokardiyal yeniden yapılanma olarak kardiyak aritmogenezde önemli rol üstlenmektedir (84). İnsanda yapılan çalışmalarda VT ile miyokard skar doku arasında güçlü bir ilişki olduğu belirtilmiştir ve yeniden yapılanma iskemik ve iskemik olmayan kardiyomiyopatide gelişen fibrozis olarak görülmektedir. Anizotropik yeniden giriş aktivitesindeki artış atriyal fibrozisin ilerlemesine ve sonucunda atriyal fibrilasyona (AF) neden olmaktadır (85). Yeniden yapılanma ile birlikte fibroblastlar miyokardiyumda farklı görevler üstlenmektedir. Mikroelektrodlar ile yapılan çalışmalarda kardiyak fibroblast Vm değerlerinin yaklaşık olarak -37 mV oldukları saptanmış, sistol ve diasyolde farklı titreşim dalgaların meydana gelmesinin sonucunda sistol modülasyonunda rol alabileceği düşünülmektedir (86). Fibroblastların kardiyomiyositler ile fonksiyonel birlikteliği ile aralarında oluşan elektronik modülasyon etkisi tetiklenmiş aktivite ve otomatisitenin artışına neden olurken, diasyolde membran potansiyelinin depolarizasyona yönlendirmesiyle sonuçlanmaktadır (87).

Fibrozis gelişiminde rol alan en önemli dönüştürücü büyüme faktörü β1 (*TGF-β1*)'in bölünme, farklılaşma, ektraselüler matriks yapımı ve apoptoz gibi birçok yolakta yer almasının yanında miyofibroblastların aktivasyonunu tetikleme görevini deüstlenmektedir (8-219). Transgenik fareler ile yapılan bir çalışmada *TGF-β1'*in aktif formu eksprese olduğunda ventriküllerden çok atriyumlarda fibrozis artışı ve bu farelerde AF ye giriş eğiliminin olduğu gözlenmiştir (88). Yapılan başka bir çalışmada miyofibroblast ve

kardiyomiyosit etkileşimiyle I_{Ca} salımındaki artış ile birlikte spontan indüklenen AF ye eğilimin arttığı bilgisi desteklenmiş ve transgenik fareler ile yabanıl tip farelerdeki atriyum aksiyon potansiyelleri arasında bir farklılık belirtilmemiştir (89).

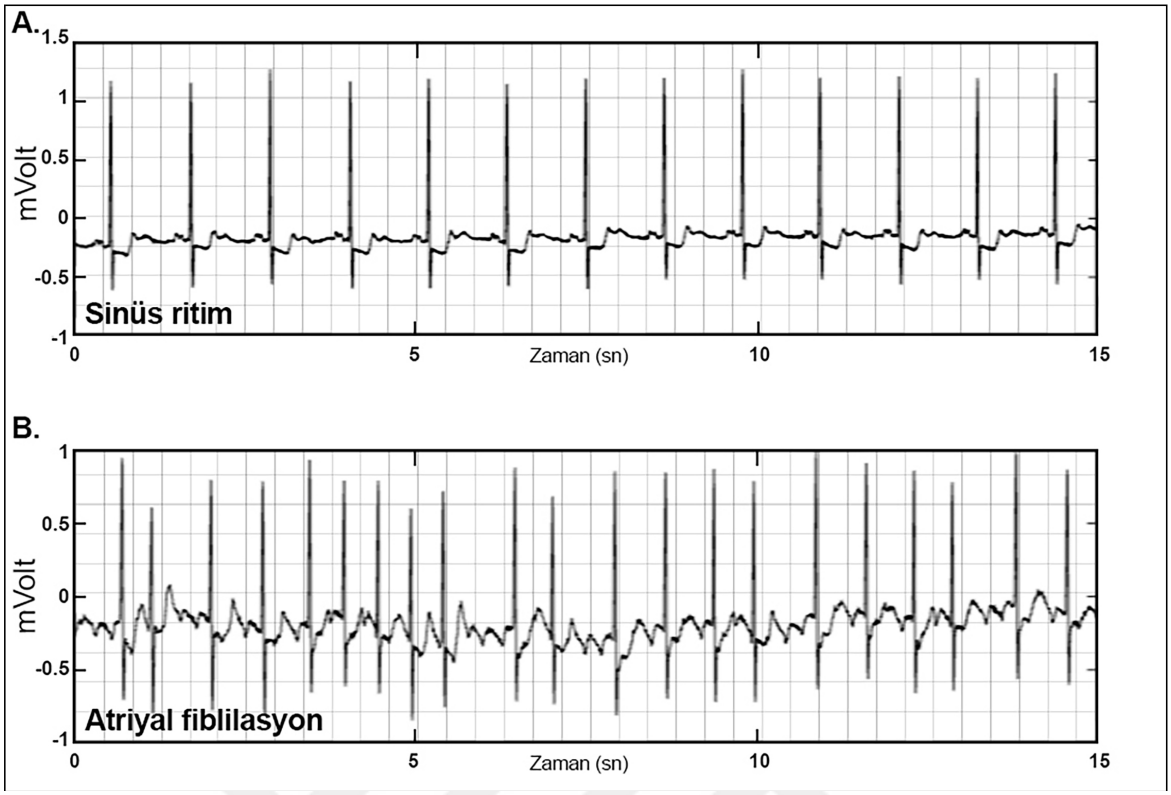
Aritmi gelişimine neden olan bir diğer yeniden yapılanma elektrofizyolojik yeniden biçimlenme olarak adlandırılır. Miyokardiyal enfarktüs ve kalp yetmezliği sonucunda I_{NCX} akımının artmasına ek olarak geç I_{Na} akımındaki artış ve I_{K1} akımındaki azalma ile birlikte GAD artışı meydana gelebilmektedir (90). I_{K1} akımındaki azalması sonucunda *RyR2'*de fonksiyon kaybı meydana gelmekte ve bu da aritmi gelişimine neden olmaktadır (91)

Klinik ve farmasötik alanlardaki büyük çabalara rağmen, antiaritmik tedavilerin etkinliği hem hastalıkları önleme hem de tedavi sonrası için başarılı olmaktan uzaktır, bu nedenle kalp elektrofizyolojisi, aritmi oluşumunda ve korunmasında yer alan mekanizmaların en iyi şekilde aydınlatılmasına yönelik alternatif araştırmaların geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

2.4. ATRİYAL FİBRİLASYON

2.4.1. ATRİYAL FİBRİLASYON TANIMI

Atriyal fibrilasyon (AF), atriyal aktivasyonda oluşan düzensizlikler sonucunda koordine olamayan atriyal kasılmalar ile meydana gelen ve atriyal flutter ve atriyal taşikardi ile birlikte klinikte en sık görülen aritmi olarak bilinmektedir (92). Yüzeysel elektrokardiyogram verilerinde hızlı atriyal fibrilatuar ile birlikte ventriküler yanıtta görülen düzensizlikler sonucunda değişen morfoloji görülmektedir. Sinüs ritimde (SR) görülen P dalgalarının yerine düzensiz amplitüdlü dalgalar ve R-R aralıklarında da düzensizlik ile birlikte düzensiz QRS kompleksi ve düzensiz F dalgaları görülmektedir (2) (Şekil 2.7.)



Şekil 2.7. AF Elektrokardiyogram görüntüsü. A. Sinüs ritim B. Atriyal fibrilasyon (93)

AF ilk olarak, William Harwey tarafından 1628 yılında hayvanların atriyumlarındaki düzensizlik olarak tanımlanmıştır (1-14). Jean Baptiste Sénac tarafından 1783'te ‘rebellious palpitation’ ve mitral darlığı ile bağlantılanmış ve daha sonra aritmi hayvanlarda tanımlanmış olmasına rağmen, atriyal fibrilasyonun üretebileceği çarpıntı nedeni, yirminci yüzyılın başlarına kadar kesin olarak tanımlanmamıştır (94). Kliniğe yüksek nabız şikayetleriyle gelen hastalar için farklı dönemlerde ‘ataxia of the pulse ', 'deliryum kordis' ve 'pulsus irregularis perpetuus' gibi günümüzde AF ile ilişkilendirilen terimler kullanılmıştır (95). Fakat patofizyoloji, James Mackenzie tarafından nabız dalgası şeklini göstermek için icat ettiği ‘clinical polygraph’ kullanarak venöz nabızdaki ‘a’ dalgasının kaybını tanımlayana kadar tam olarak tanımlanmamıştır (96). Willem Einthoven’ın 1906'da atriyal fibrilasyonun tanımlandığı ilk elektrokardiyogramı yayınlamasıyla nabız düzensizliği ile atriyal fibrilasyon arasındaki bağlantı farmakolog Arthur Cushny ve kardiyolog Thomas Lewis tarafından tanımlanmıştır (97). Durumun bu uzun deneyimlere rağmen, halen en iyi nasıl yönetileceği bilinmemekteydi. Örneğin, AF olan bir hastada ideal ventrikül hızı bilinmese de, dinlenme evresinde ventrikül ritmin SR en yüksek dakikada yaklaşık 70 atım (bpm) olduğu ve AF de bunun %25 daha yüksek oranda etkili olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur (98). Bununla birlikte, 85-90 bpm bir oranın korunmasının uzun vadede kalp

için zararlı olduğu ve yaşam süresi ile kalp atış hızı arasında kesinlikle ters bir ilişki olduğu, ortalama payın, yaklaşık 3×10^9 bpm olan tüm memelilerde yaşam boyu yaklaşık 7×10^8 pbm olduğu bildirilmiştir; bu nedenle atriyal fibrilasyonda dakikada 70-85'lik bir dinlenme oranı önerilmiştir (99). Ayrıca egzersiz sırasında ideal ventrikül hızı hakkında belirsizlik bulunmaktaydı, iyi veya kötü sol ventrikül fonksiyonu olan hastalarda farklılığın olduğu ve normal günlük aktiviteler sırasında dakikada 100'ün altında bir oran önerilmiştir (95). Bu verilerin elde edilmesiyle birlikte 1928'de EKG de geliştirilen teknikler sayesinde AF'nin EKG frekans analizleri yapılabilmiş ve atriyal siklus uzunluğu araştırılabilmiştir (100). Uzun dönem içerisinde yapılan tüm çalışmaların sonunda 1982 yılında AF'nin aslında basit bir aritmi olarak tanımlanamayacağı, insidansı yaş ile birlikte çoğalarak, mortalite ve morbiditeyi artıran genel bir sağlık sorunu olduğu anlaşılmıştır (101).

2.4.2. ATRİYAL FİBRİLASYON SINIFLAMASI

Amerikan Kalp Derneği (AHA), Amerikan Kardiyoloji Koleji (ACC) ve Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) tarafından, *paroksismal, persistan (inatçı) ve permanent (kalıcı)* olmak üzere üç klinik AF tipi önerilmiştir (2). 2016 yılında Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) ve Avrupa Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Derneği (EACTS) tarafından yayınlanan AF kılavuzunda diğer AF tiplerine ek olarak *yeni tanı alan* ve *uzun süreli persistan* olmak üzere 5 sınıfa ayrılmıştır (102).

Genel olarak 7 gün ve daha az süren herhangi bir müdahale gerekmeksizin kendiliğinden geçen durum paroksismal AF olarak tanımlanmıştır. Eğer süre 7 günden daha uzun seyretmekte ve ilaç tedavisi ya da elektriksel kardiyoversiyon ile sonlandırabilmekte ise persistan AF olarak adlandırılmaktadır. Uzun süreli persistan AF'de ise, bu süre yaklaşık 1 yıl devam etmektedir. Sonlandırma amaçlı uygulanan tedaviye yanıt alınamıyor ve SR'a geri dönülemediği durumda ise kalıcı yani permanent AF olarak sınıflandırılmaktadır. Aritmi süresine veya AF ile ilişkili semptomların varlığına ve şiddetine bakılmaksızın hastaya ilk kez teşhis konulmuş ise yeni tanı AF olarak sınıflandırılmaktadır(102)

AF, hastalarda çoğunlukla yapısal kalp hastalıkları ile birlikte görülürken, genellikle 60 yaş altındaki erişkinlerde konkominant ve diğer etiyoloji faktörlerin görülmediği AF tipine *lone* AF ismi verilmektedir. Paroksismal AF hastalarının yaklaşık %50'sinde diğer hastalıklara ait bulgular kendini göstermeyebilir ancak, permanent AF hastalarının yaklaşık %80 inde

görülmektedir (103).

2.4.3. ATRİYAL FİBRİLASYON EPİDEMİYOLOJİSİ

Atriyal fibrilasyon tüm Dünya'da insidans ve prevalansı yaş ilerledikçe giderek artan ve önemli derecede morbidite ve mortaliteye neden olan en sık görülen kalıcı kardiyak aritmi olarak bilinmektedir. Avrupa'da yaklaşık 8 milyon kişiyi etkilediği düşünülmekte ve 2060 yılına kadar 2,3 kat artması beklenmektedir (104)(105). Klinik uygulama araştırma veri tabanı verilerine göre İngiltere' de 2060 yılına kadar 1,3 ila 1,8 milyon kişiyi etkileyeceğini düşünülmektedir (106). ABD'de, şu anda yaklaşık 3-5 milyon insan AF'den etkilendiği ve 2050 yılına kadar bu rakamın 8 milyondan fazla olması öngörülmektedir (107). Avustralya, Avrupa ve ABD'de şu andaki tahmini yaygınlığı yaklaşık %1 ile %4 oranında görülmektedir (108)(104). AF'nin en yüksek prevalansa sahip olduğu ülke %5,4 lük oranla Avustralya kıtasıdır ve %0,49-%1,9 oranla en düşük Asya ülkelerinde görülmektedir (109).

Çin, Japonya, Güney Kore, Hindistan ve Malezya'nın yer aldığı 5 Asya ülkesi ile içlerinde Türkiye'nin de yer aldığı, Bahreyn, Katar, Kuveyt, Suudi Arabistan, Umman, Birleşik Arap Emirlikleri ve Yemen de olmak üzere 8 Orta Doğu ülkesinde AF epidemiyolojisi üzerine yapılan 58 çalışmaya göre AF'nin yıllık insidansının %0.538 olduğu tespit edilmiştir (110)(111).

Türkiye'deki tüm sağlık sigortası fonları için talepleri işleyen MEDULA sistemi ICD-10 kod I48 verilerine göre 2007-2014 yılları arasında non-valvular AF tanısı alan 18 yaş üstü 476,731 hasta kayıt edilmiştir. 18 yaş üstü %44.2'si erkek, %55.8'inin kadın olduğu 50.364.653 kişi içinde AF nin prevalansının %0,75 olduğu gözlenmiştir. Prevalansın 19-34 yaşları araasında % 0,08, 35-64 yaşları arasında % 0,58, 65-74 yaşları arasında % 3,26 ve 75 yaş üstünde ise % 4,55 olarak arttığı tespit edilmiştir (112).

2.4.4. ATRİYAL FİBRİLASYONUN FİZYOPATOLOJİSİ

AF ye neden olan birçok risk faktörü bulunmaktadır. AF ile ilişkili az veya geri dönülmez risk faktörleri arasında yaşlılık, zayıf vücut kitlesi, boy ve ailesel AF öyküsü bulunurken, potansiyel geri dönülebilir AF risk faktörleri arasında kapak kalp hastalığı, hipertansiyon, koroner arter hastalığı, kardiyomiyopati, kalp yetmezliği, diyabetes mellitus, obezite, uyku apnesi, hipertiroidizm, aşırı alkol, ilaçlar ve aşırı egzersiz yer almaktadır. Bu koşullar, AF'ye

yatkınlığı arttıran hücresel değişikliklerle birlikte atriyum dokusunda duvar stresi, basıncı ve boyutunda kademeli değişikliklere yol açabilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda genetik, genetik olmayan, çevresel ve / veya diğer stres mekanizmaları gibi diğer koşulların da AF'yi tetiklediği düşündürmektedir (102).

En çok görülen tetikleme mekanizması pulmoner venlerden kaynaklı hızlı ve spontan aktivitedir. Pulmoner ven ektopisi çoğu zaman kendiliğinden sonlanırancak başlamış olması ile devamında AF'nin sürmesi çoklu dalga yeniden giriş mekanizması ile olmaktadır. Paroksismal AF hastalarının pulmuner ven kaslarında belirlenen azalmış refrakter dönem ve bu nedenle iletide meydana gelen gecikme sebebiyle, hızlı tetikleme yapan ektopik odağın birçok paroksismal AF için temel mekanizma olduğu gösterilmiştir. Çalışılan hayvan modellemelerinde pulmoner ven odakları hızlı atriyal atım ve katekolamin uyarısına cevap olarak tetiklenmiş aktivite meydana getirmektedir (113).

2.4.4.1. Atriyal Fibrozis

Atriyal fibrozis; AF gelişimine katkıda bulunmasının yanında, hipertansiyon, kalp yetmezliği ve obezite gibi risk faktörleri nedeniyle ayriyal yeniden biçimlenmede yaygın bir özelliktir (114)(115).

Ayrıca epikardiyal tabakada artmış endomisyal fibrozis gösteren deneysel bir çalışmanın sonuçlarına göre AF'nin kendisi de fibrozisi da teşvik edebilmektedir (116). Atriyal fibrozis ile birlikte yüksek kollajen sentezi sonucunda ekstraselüler matriks interaksiyonlarında değişiklikler meydana gelmektedir (117). Kalp atışı, kapak kalp hastalığı, hipertansiyon, obstrüktif uyku apnesi, ilerleyen yaş ve 'lone' AF olan insanlarda artmış atriyal fibrozisin doğrudan histolojik kanıtı ve elektroanatomik haritalamadan kaynaklanan atriyal voltajın neden olduğu bildirilmiştir (118). Altta yatan risk faktörleri veya AF'nin kendisi nedeniyle pro-fibrotik süreçte renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS), pro-enflamatuar sitokinler, oksidatif stres, transforme edici büyüme faktörü-β1 (TGF-β1), bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi, kalsiyum bağımlı proteazlar/fosfatazlar, hücre dışı matriks düzenleyici proteinler, hipoksiye bağlı faktör-1α ve endotelin-1 sistemi gibi çok sayıda sinyal yolağı söz konusudur, ancak bu karmaşık yolaklar tam olarak aydınlatılabilmiş değildir (119). Anjiyotensin reseptör tip 1 (AT1), ektraselüler sinyal regüle protein kinaz (ERK) ve mitojen-aktive protein kinaz (MAPK)

aktiviteleri atriyal fibrozisi ve AF yeniden biçimlenme sürecini tetiklemektedir (120).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, geç gadolinyumla güçlendirilmiş manyetik rezonans görüntüleme (LGE-MRI) kullanılarak atriyal fibrozisin derecesi tanımlanabilmiştir, ancak LGE-MRI'nın değişken görüntü ve analitik algoritmalar ile sınırlı bir görüntüleme tekniği olması sebebiyle kesin bir veri elde edilmesinde zorluklar yaşanmaktadır (121). Daccarett ve ark., LGE-MRI tarafından saptanan atriyal fibrozisin derecesinin AF kalıcılığı ve daha fazla AF risk faktörü varlığı ile daha yüksek olduğunu göstermiştir (122). Kan havuzuna normalize edilmiş LGE-MRI yoğunluğu ile tanımlanan sol bipolar atriyal skarın sol atriyal voltaj ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür (123). Bununla birlikte, kateter ablasyon prosedürleri uygulanan hastalarda LGE-MRI ile tanımlanan atriyal fibrozis AF tekrarı ile bağımsız olarak ilişkilendirilmiştir (124).

2.4.4.2. Epikardiyal Yağ Dokusu

Epikardiyumda yer lokal yağ depolarının AF substratının geliştirilmesinde önemli rol oynadığını gösteren yeni veriler bildirilmiştir (125). Yapılan klinik çalışmalarda, epikardiyal yağ ile AF arasında bir ilişki olduğunu doğrulamıştır. Epikardiyal ve perikardiyal yağ terimi birbirinin yerine kullanılabilmektedir ancak çoğu çalışmada perikardiyal kese içerisinde yer alan yağ dokusu ilgili bilgiler rapor edilmiştir (126).

Obezitenin gelişmesinin, adipoz doku fibrozu ve TGF-β süper ailesi dahil olmak üzere sayısız adipo-sitokin üretimi ile sonuçlanan genişleyen yağ dokusunun hipoksisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu adipokinlerin parakrin etkisi, epikardiyal yağ doku ile bitişik atriyal kas sistemi ve ortak vasküler sistem arasında fasiyal bariyerlerin olmamasıyla kolaylaştırılmaktadır (127). Venteclef ve ark., sıçan kültür modelinde insan epikardiyal yağından türetilen sekretomu inkübe ederek epikardiyal yağın atriyal fibrozu indüklemedeki parakrin etkilerini göstermiştir (128). Bu çalışmaya ek olarak, epikardiyal yağ dokunun hem büyük hayvan hem de insan atriyum örneklerinde altta yatan miyokardın içine sızdığı gösterilmiştir (129). Yağ infiltrasyonunun miyositleri ayırması ve mikrofibroza benzer bir şekilde iletim anormalliklerine neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle, artmış epikardiyal yağ dokusundaki artış, atriyal fibroz ve değiştirilmiş üç boyutlu atriyal yapının kombinasyonu, yeniden giriş, elektriksel ayrışma ve dalga kırılmasını sürdürebilen iletim anizotropi olası artışına neden olması sebebiyle pro fibrilatör olarak nitelendirilmektedir.

İnvaziv olmayan atriyal epikardiyal yağ ölçümü son zamanlarda LGE-MRI kullanılarak da doğrulanmıştır(130). Bu, epikardiyal yağ dokunun atriyal yeniden biçimlenme üzerindeki etkisi ve kilo kaybının veya diğer tıbbi tedavilerin epikardiyal atriyal yağ yükünü ve bunun atriyal substrat üzerindeki sonuçlarını tersine çevirip çeviremeyeceği konusunda daha fazla çalışmayı kolaylaştıracak temel oluşturmuştur. Epikardiyal yağ doku biyolojisinin daha iyi anlaşılması, adipo-sitokinleri hedefleyen terapötiklere yönelik yeni stratejilere yönelmeyi sağlayacaktır.

2.4.4.3. Otonomik Atriyal Yeniden Biçimlenme

Otonom sinir sistemi, AF substratının yanı sıra başlatılması ve sürekliliği ile karmaşık bir şekilde ilişkilidir (131). Atriyumlar, hem parasempatik hem de sempatik bileşenleri, iç ve dış gangliyonların karmaşık nöral gangliyonlu pleksi (GP) ağı ve aynı zamanda kalp içindeki mekanik / kemo-reseptörler ile sinir sistemi ağına bağlanmaktadır (132). Yapılan deneysel çalışmalarda AF'yi indüklemek için hem β-adrenerjik hem de kolinerjik stimülasyonlar kullanılmıştır. Benzer şekilde, hem insan hem de hayvan çalışmalarında AF başlangıcında sempatovagal dengede değişiklikler kaydedilmiştir (133). Ayrıca, çeşitli deneysel modellerde otonom atriyal yeniden biçimlenme gösterilmiştir. Kısacası, hızlı AF oranlarının atriyal sempatik innervasyonda heterojen bir artışa yol açtığı belirlenmiştir (134). Kalp yetmezliği modelinde posterior sol atriyumda ve AF onarımına katkıda bulunan pulmoner venlerde artmış sempatik / parasempatik lifler ve kardiyak gangliyonlar görülmüştür (135). Negatif trakeal basıncı ile obstrüktif uyku apnesi olan hayvan modelleme çalışmalarında vagal aktivasyonunda görülen artış, atriyal refrakteritenin kısalmasına ve AF artışına katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (136). Bu otonomik değişikliklerin AF'yi teşvik edebileceği ve sürdürebileceği mekanizmalar açıklanmış olsa da, artmış otomatisite, EAD-GAD ve bölgesel heterojen refrakterlik kısaltması gibi mekanizmalar karmaşıklığını korumaktadır.

Deneysel çalışmalarda, çeşitli otonom sinir sistemi mekanizmalarına yönelik modülasyon yöntemlerinin atriyal yeniden biçimlenmeyi iyileştirdiği gösterilmiştir. AF modellerinde GP ablasyonu, farmakolojik otonomik baskılama, yüksek torasik epidural anestezi ile sempatik etkiyi bloke etmek ve düşük seviyeli vagosempatik sinir stimülasyonu atriyal refrakterliğin kısalmasını önleyebileceği ve AF'yi azalttığı belirlenmiştir (137). Bununla birlikte, aynı etkiler renal sempatik denervasyon (RSDN) ile AF sırasında ventriküler hızın yavaşlatılmasını takiben AF süresinin azalması dışında görülmemiştir. AF li keçi modelleme

çalışmasında daha yeni yüksek yoğunluklu haritalama yöntemiyle azalmış atriyal sempatik sinir oluşumu ve RSDN'yi takiben azalmış fibroz ile birlikte azalmış AF karmaşıklığı görülmüştür (138). Bir obstrüktif uyku apnesi modelinde, hem negatif trakeal basınca bağlı atriyal refrakterite kısalması hem de yüksek kan basıncının RSDN tarafından inhibe edildiği tespit edilmiştir (139). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada RSDN, dirençli hipertansiyonu ve semptomatik AF hastalarında kombine pulmoner ven izolasyonu ve RSDN'den pulmoner ven izolasyonu ile başarılı sonuç gösteren küçük bir randomize çalışma ile insanlarda umut verici sonuçlar göstermiştir. Bu çalışmada, her iki müdahale uygulanan hastalarda 12 aylık takipte kan basıncı profili anlamlı olarak düşük ve AF tekrarının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak ilave RSDN'nin şiddetli ilaca dirençli hipertansiyon ve persistan AF hastalarda olumlu etkisi görülmüştür (140). Öte yandan, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin baskılanması ve atriyal fibroz, inflamasyon, apoptoz ve hücre-hücre birleşme ifadesinde gelişmiş yapısal özellikler dahil olmak üzere RSDN'nin doğrudan yeniden biçimlenme etkileri gösterilmiştir (141). Diğer potansiyel otonom atriyal modülasyon stratejisi, artmış parasempatik tona ikincil olabilen persistan AF hastalarında kalp hızı kontrolünü geliştirdiği gösterilen egzersiz eğitimini içermektedir. AF sırasında periferik sempatik aktivitenin azalması ve gelişmiş ventriküler hız kontrolü ile sonuçlanması amacıyla implante edilebilir cihazlar yoluyla baroreseptör stimülasyonu mümkündür (142). Bununla birlikte, baroreseptör stimülasyonu, azalmış atriyal refrakterlik nedeniyle AF'yi teşvik edebilen artmış vagal aktivasyon ile de sonuçlanabilir. Bu modalitenin, atriyal refrakterliğin kısalmasını en aza indirmek için daha düşük yoğunlukta kronik baroreseptör stimülasyonu ile klinik olarak yararlı olup olamayacağı gösterilmiştir. Ayrıca, obezitede kilo kaybının, kısmen parasempatik aktivitenin arttırılmasıyla birlikte uygun otonomik kalp modülasyonu ile ilişkili olabilecek AF yükünü azalttığı gösterilmiştir (143).

2.4.4.4. Aşırı Kan Pıhtılaşması ve Atriyal Yeniden Biçimlenme

AF'nin kan pıhtılaşmasının aktivasyonuna neden olduğu gözlemi uzun yıllar önce yapılmış olsa da, aktif kan pıhtılaşmasının AF'nin kendisi üzerindeki etkisi hakkında çok daha az şey bilinmektedir. Proteaz ile aktive edilen reseptörlerin (PAR) 1990'ların başlarında keşfedilmesi ve çoklu doğal pıhtılaşma proteazlarının ana doğal ligandları olarak tanımlanması, pıhtılaşma kaskadının hemostatik olmayan fonksiyonları üzerine yoğun araştırmaları tetiklemiştir (144). Proteaz ile aktive edilen reseptörler (PAR-1 - PAR-4),

çeşitli hücre tiplerinde ve düşük akım sinyallemede farklı ekspresyon seviyelerine sahip yedi membranlı G-protein-bağlı reseptörlere aittir. PAR-1 ve PAR-2, miyositler, düz kas ve endotelyal hücrelerdeki ifadelerle kalpteki en önemli izoformlardır ve PAR-2'in, fibroblastlarda eksprese edildiği bilinmektedir. Miyositlerde, PAR-1 aktivasyonu hücresel hipertrofi ve AF'li hastaların atriyal dokusunda ve plazmasında yükselen atriyal natriüretik faktörün (ANF) ekspresyonuyla sonuçlanırken PAR-2 aktivasyonu MAP-kinaz aktivasyonuna ve hücresel hipertrofiye yol açmaktadır (145). PAR'ların atriyal yapısal yeniden modelleme üzerindeki rolü hakkında daha fazla bilgi, hücresel ve hayvan deneylerinden elde edilmiştir. İzole sıçan kardiyak fibroblastlarında trombin, pro-fibrotik ERK sinyal molekülleri ve TGF-β1 ile pro-enflamatuar faktör monosit protein-1'in ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Trombin ayrıca ^{3}H-prolin eklemesini artırmış bunun sonucunda fibroblastlar tarafından arttırılmış kolajen sentezinin nedeni olduğu düşünülmüştür. Tüm bu etkiler antikoagülan dabigatran kullanılarak trombin inhibisyonu ile zayıflatılmıştır. Bu sonuçlar ile AF için substratın geliştirilmesinde aktive edilmiş ardışık pıhtılaşma ile PAR aktivasyonunun rolü kuvvetle desteklenmiştir (146). Benzer şekilde yapılan bir diğer çalışmada, hiper pıhtılaşma, kalsiyum kullanımını değiştirerek AF başlangıcına ve ilerlemesine de katkıda bulunmuştur. İzole edilen tavşan pulmoner ven kollarında trombine bağlı arddepolarizasyonlar ve tetikleme, dabigatran tarafından inhibe edilmiştir (147).

İskemi, interstisyel pıhtılaşma sisteminin aktivasyonunda önemli bir rol oynayabilmektedir. İskemik enfarktüs sınır bölgelerinde Erlich ve ark. interstisyel fibrin birikimi ile sonuçlanan miyosit yüzeyi üzerinde doku faktörünün yukarı regülasyonunu göstermiş ve ilginç bir şekilde, hirudin tarafından trombin inhibisyonu enfarktüs boyutunu azaltabileceğini bildirmişlerdir (148). Önemli olarak, akut AF sırasında atriyal arz-talep uyumsuzluğu ve iskemi için artmış atriyal laktat üretimi ile ilgili deneysel kanıtlar bulunmaktadır. Ayrıca, yüksek enerjili fosfat konsantrasyonları kısa AF süresinden sonra azalmakta ve AF' nin iskemi belirteçlerinin yukarı regülasyonunu sağlamaktadır (149). Birlikte ele alındığında, interstisyel boşlukta önemli bir pıhtılaşma faktörü aktivitesi vardır ve AF sırasında iskemi, AF için substrat üretmek amacıyla fibroblast aktivasyonuna, hücresel hipertrofiye ve atriyal fizrosize yol açan koagülasyon sistemini aktive edebilmektedir. Bu nedenle antikoagülasyon tedavisi, tromboembolik komplikasyonları önlemenin yanı sıra, AF yükünü azaltmak için atriyal elektriksel ve yapısal koruyucu etkiler de sağlamaktadır (150).

2.4.5. ATRİYAL FİBRİLASYONUN HÜCRESEL VE MOLEKÜLER ELEKTROFİZYOLOJİSİ

Herhangi bir kardiyak aritminin patofizyolojisinin önemli bir bileşeni, içinde meydana geldiği hücresel ortamdır. Tüm aritmilerin ve özellikle AF nin tedavisinde her ne kadar farmakolojik tedaviler geçici olarak kullanılabilir olsa da tümüyle tedavi ve terapötik yaklaşımları iyileştirmek için aritminin hücresel mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.

İyon pompaları, kanallar ve değiştiriciler dahil olmak üzere iyon taşıma işlemlerindeki değişiklikler, AF gibi aritmilerin oluşumunu yöneten aksiyon potansiyel özelliklerindeki değişikliklerin merkezinde yer almaktadır. Aksiyon potansiyeli süresi (APS) refrakter periyodu belirler ve bu nedenle tekrar girme olasılığının önemli bir belirleyicisidir. Maksimum I_{Na} faz 0 yukarı vuruş hızını, iletim hızını (CV) belirler ve tekrar girme olasılığına ters olarak düzenler. Gecikmiş ve erken sonra polarizasyonlar kendi içlerinde taşiaritmiler oluşturabilen ve reentran aritmiyi tetikleyebilen anormal aktivite üretmektedir. Kardiyak uyarılabilirlik ile ilgili birçok iyon kanalının moleküler yapısının tanımlanması ve bunların doğal iyonik akımlarla fonksiyonel korelasyonu, AF gibi patofizyolojik durumların etkilerini, genlerden iyonik akımlara farklı seviyelerde incelemeyi mümkün kılmıştır. Bir iyon kanalının ekspresyonunun altında yatan farklı adımlar tanımlanmıştır. Kv4.3 (geçici dış akımın gözenek oluşturucu (α) alt birimi, I_{to}), KvLQT1 (yavaş gecikmeli doğrultucu I_{Ks} nin α-alt birimi) ve HERG (hızlı gecikmeli doğrultucu I_{Kr}'nin a alt birimi) dahil olmak üzere birkaç iyon kanalı için farklı mRNA splice varyantları tarif edilmiştir (151)(152). Tekli bazlar, mRNA olgunlaşması sırasında RNA düzenleme enzimleri ile değiştirilebilir ve protein ekspresyon hızını kontrol etmek RNA için stabil olmayabilmektedir. Bu işlemin son mRNA ürünü, çekirdekten endoplazmik retikuluma (ER) aktarılır, burada göreceli olarak sabit oranda poliribozom içinde proteine çevrilmektedir. Oluşan proteinin post-translasyonel modifikasyonları ER ve Golgi kompleksinde olabildiği gibi, proteinin hücre zarına sokulması sırasında gerçekleşebilmektedir. Bu modifikasyonlar hakkındaki edinilen bilgiler son birkaç yılda önemli ölçüde artmış olsa da, iyon kanalı ekspresyonunun kontrolü için çeşitli potansiyel mekanizmaların, fizyolojik koşullar altında bile rolü tam olarak anlaşılmamıştır. İyon kanallarının gözenek oluşturucu α-alt birimleri işlendikten ve membrana göçleri sonucunda kanalın biyofiziksel veya farmakolojik özelliklerini önemli

ölçüde değiştirebilen veya şaperon ve doğrudan membran göçü olarak işlev görebilen yardımcı alt birimlerle bir araya gelebildikleri öngörülmektedir (153). AF ve diğer aritmiler, transkripsiyon aşamasından, fonksiyonel agonist regülasyonuna kadar iyon kanalı ekspresyonunu ve fonksiyonunu yöneten birçok adımdan herhangi biri ile etkileşime girerek ve / veya bunları değiştirerek kanal fonksiyonunun modülasyonuna neden olmaktadır.

Yue ve ark. kanal α-altbirimlerinin transkripsiyonel ifadelerindeki azalma, hızlı atriyal pacing (RAP)'de azalmış olan $I_{Ca,L}$ ve I_{to}'nun mevcut yoğunluklarına önemli bir katkıda bulunduğuna dair kanıt sağlayan ilk kişilerdir (154), bu bulgular daha sonra insan AF de de doğrulanmıştır (155)(156). İki grup AF'li mRNA'nın değişmediği bildirilmiş ancak hastalarda azalmış Kv1.5 protein ekspresyonu bildirmişlerdir. Farklılıkların nedenleri olarak post-transkripsiyonel modifikasyonların olduğu dülşünülmektedir. I_K gibi bazı akımlar için mRNA veya protein ekspresyonu hakkında yeterli veri mevcut değildir ve diğer kanallar için insan AF'den gelen veriler iyon kanalı mRNA ve protein ekspresyonunda bir değişiklik olduğunu gösterirken, patch clamp sınırlamaları nedeniyle fonksiyonel veriler eksiksiz bilinmemektedir (157). Elektriksel yeniden şekillenmenin temellerini daha iyi anlamak için, *in vivo* modellemeler ile hücresel elektrofizyoloji, moleküler biyoloji, protein biyokimyası ve morfoloji yöntemlerini birleştirmek oldukça önemlidir.

AF'nin hücresel ve moleküler temeli, son birkaç yıldır büyük ilgi gören bir alan olmuştur ve sonuçlar, aritmi patofizyolojisi hakkındaki anlayışı önemli ölçüde geliştirmiştir. Atriyal taşikardi yeniden modellemenin iyon akımları ve kanalları üzerindeki etkileri çeşitli hayvan modellerinde ve insan dokularında araştırılmıştır. Hayvan modellerinden elde edilen veriler, ilgili spesifik izolasyon yöntemleri ile yapılması sebebiyle oldukça önemlidir. İyon kanallarının ve impuls yayılımını ve repolarizasyonunu kontrol eden pompaların ekspresyonu önemli türler arası varyasyon gösterir ve benzer fenotipler gösteren akımlar bile biyofiziksel özellikler ve moleküler bazda farklılık gösterebilmektedir (158). AF ile ilgili yapılan deneysel modeller hastalığın klinik formlarının karmaşık patofizyolojisi nedeniyle her zaman aynı ölçüde tekrarlanabilir olmasa da, çoğu iyi seçilmiş modellerde gözlenen fizyolojik değişimlerin birçoğunun insanda gözlenen değişimlerde de karşılık bulmaktadır.

Kalp ameliyatı geçiren hastalardan veya eksplante edilmiş kalplerden elde edilen preparatlarda yapılan çalışmalar belirtilen nedenler ile çok önemlidir. İnsan

preparatlarındaki bulgular, her zaman eşlik eden kalp ve ekstrakardiyak hastalıklar, ventriküler fonksiyondaki anormallikler, ilaçlarda değişkenlik ve değişken yaş gibi kontrol edilemeyen koşulların bir kombinasyonunu temsil etmeleri ile sınırlı kalmaktadır. Ek olarak, elde edilen bazı preparatlarda patch clamp deneyleri için hücre izolasyon prosedürünün sınırlamaları ve geniş fibrozis gibi teknik düşünceler sonuçları etkileyebilmektedir. Optimal hücre izolasyonu, koroner arter perfüzyonuna tabi tutulan taze dokulardan elde edilir. İnsan doku örnekleri genellikle küçüktür ve ve doku eksizyonu zamanından hücre izolasyonuna kadar önemli zaman kayıpları meydana gelebilmektedir (153). Değişken şartlar sebebiyle canlılardan elde edilen dokular ile yapılan çalışmaların yanı sıra, farklı hücresel modelleme yöntemleri oluşturarak moleküler ve elektrofizyolojik değişimlerin gözlenmesi farklı bir bakış açısı olarak ön plana çıkmaktadır.

2.4.6. AF İLE İLİŞKİLİ HÜCRESEL ANOMALİLER

2.4.6.1. Konjestif kalp yetmezliği

Konjestif kalp yetmezliği (CHF) ve mitral kapak hastalığı gibi kronik atriyal hacimsel artış ve aşırı basınç yüklenmesini içeren durumlar, AF'nin en yaygın klinik nedenleri arasındadır. AF ile ilişkili iki kronik atriyal genişleme modelinde Boyden ve ark. aksiyon potansiyeli morfolojisinde sadece küçük değişiklikler olduğunu belirtmiştir (159). Langendorff-perfüze edilmiş tavşan kalplerinde atriyal basınçta akut artış atriyal refrakterlikte belirgin bir kısalmaya ve AF'ye karşı artan bir duyarlılığa neden olmuştur (160). Köpeklerde yapılan başka bir çalışmada elde edilen sonuçlar değişkenlik göstermiştir. Yapılan iki çalışma, atriyal basınç ve gerilmede akut bir artışın atriyal efektif refrakter periodları (AERP) ve tekli faz aksiyon potansiyel süresini uzattığını, bir diğeri de AERP' nin kısaldığını bildirmiştir (161)(162). Akut dilatasyonun insanlardaki etkileri hakkındaki verilerde de tutarsızlık gözlenen çalışmalar bulunmaktadır (153). Dilate atriyumda norepinefrin, anormal otomatisiteye ve GAD’a bağlı olarak tetiklenmiş aktiviteye neden olmuştur. Sağ atriyumda repolarizasyon değişmemiş ve en genişlemiş sol atriyumda sadece orta derecede olmuştur. Köpeklerde pacing ile indüklenen kalp yetmezliği ile ilgili son çalışmalar, CHF ile AF'ye karşı artan duyarlılık arasında açıkça bir ilişki olduğu belirtilmiştir (163). Taşikardi yeniden şekillenmesinin aksine, CHF, AERP, AERP heterojenliği veya genel iletim hızını değiştirmemiştir. Bununla birlikte, yavaş iletimin ayrı bölgeleri nedeniyle, potansiyel olarak mikro-giriş koşulları yaratan iletimin heterojenitesinde güçlü bir artış gözlenmiştir. CHF

hücresel düzeyde, $I_{Ca,L}$, I_{to} ve I_{Ks} yoğunluklarının azalmasına neden olurken, ve NCX akımını ve protein ekspresyonunu artmasına neden olmuştur. İç ve dış akımlardaki dengeli değişiklikler CHF'deki nispeten düşük APS değişimlerini açıklayabilirken, artan NCX, depolarizasyona bağlı ektopik aktiviteden sonraki gecikmeyi destekleyebilmektedir. Tavşanlarda pacing kaynaklı kalp yetmezliğinde kontrol grubuna göre $I_{Ca,L}$'da bir azalma olduğunu görülürken. $I_{Ca,T}$ 'da daha fazla gözlenmiştir (164).

İnsan atriyal miyositlerinde CHF ve atriyal dilatasyonun etkileri de araştırılmıştır ancak, elde edilen veriler çelişkilidir. Yapılan iki farklı çalışmada Le Grand ve ark. ve Ouadid ve ark. tarafından yayınlanan raporlarda $I_{Ca,L}$ da azalma olduğu bildirilirken, (165,166), diğer bir grup herhangi bir değişiklik gözlenmediğini rapor etmiştir (167). Bir diğer çelişkili veri ise, dilate ve hastalıklı atriyumda I_{to} da azalma görülürken (166), daha yakın tarihli bir çalışmada CHF atriyumunda I_{to} yoğunluğunda bir artış gözlenmiş olmasıdır (168). Çelişkili sonuçlar, hasta popülasyonlarının değişen klinik özelliklerinden kaynaklanabilmektedir. Le Grand ve ark.'nın çalışmasında, atriyal dilatasyonu olan hastaların dikkate değer bir yüzdesinde AF görüldüğü ve bunun sonucunda $I_{Ca,L}$ ve I_{to}'daki azalmaya kesinlikle katkıda bulunduğu bu nedenle I_K yoğunluklarının etkilenmiş olabileceği düşünülmüştür. Öte yandan, karşıt sonuçların bazıları şu anda çözülememiştir. Bu veriler, insan dokusundaki çalışmaların sınırlamalarını göstermektedir ve insan deneylerinden elde edilen verilerin hayvan modellerinden elde edilen verilerle birlikte değerlendirilip, ilişkilendirilebilme gerekliliğini vurgulamaktadır.

2.4.6.2. Hipertiroidi

Hipertiroidizm, artmış AF insidansı ile ilişkili yaygın bir klinik durumdur ve olası mekanizma, atriyal repolarizasyonun hızlanması olarak açıklanmaktadır. Atriyal hücresel etki potansiyelleri kısalan hipertiroidi kobaylarda I_{Kr} ve I_{K1} in değişmediği, I_{Ks} ve $I_{Ca,L}$ ise arttığı saptanmıştır. KvLQT1'in ekspresyonu ve L-tipi kalsiyum kanallarının α alt birimi ekspresyonunun hipertiroidizmden etkilenmediği rapor edilmiştir. Tiroid potansiyel mekanizmasıadrenerjik sinir sistemi üzerine etki etmektedir. Hipertiroidizm, atriyal β1 ve β2-adrenerjik reseptörlerin ekspresyon seviyelerini artış yönünde düzenlemektedir ve hem I_{Ks}'ler hem de $I_{Ca,L}$, β-adrenerjik aktivasyonla önemli ölçüde artmaktadır . Gizli hipertiroidisi olan hastalarda $I_{Ca,L}$ tek kanal aktivitesinin α_{1c}-alt birimi ile ekspresyon seviyesinin arttığı bulunmuştur (169).

2.4.6.3. Göğüs Cerrahisi

Göğüs cerrahisi AF riskini önemli ölçüde artırmaktadır. AF yatkınlık faktörleri hücresel düzeyde tanımlanmıştır. Van Wagoner ve ark. kardiyak cerrahi sırasında SR olan ancak daha sonra AF gelişen hastaların SR de kalanlardan daha yüksek bir atriyal $I_{Ca,L}$'ye sahip olduğunu bildirmişlerdir (170). Postoperatif AF gelişen hastalarda Cx40 ekpresyonunda artış görülmüştür. Daha yüksek bir Cx40 ekspresyonu, iletim özelliklerinin heterojenitesindeki artışlarla ilişkili olabileceği ve bu nedenle AF oluşumunu destekleyen bir substrat yarattığı düşünülmektedir (171).

AF ile ilişkili koşullarda elektriksel yeniden biçimlenme ile ilgili mevcut verilerden, AF'ye neden olan farklı olguların farklı iyonik yeniden biçimlenmeye neden olduğu açık olarak kanıtlanmıştır. Dolayısıyla, AF' ye neden olan iyon kanalı anormalliklerinin tek bir patolojik profili yoktur, bunun yerine, AF oluşumunu yöneten iyonik mekanizmalar klinik bağlama göre değişiklik göstermektedir. İyonik mekanizmaların her klinik AF formundaki rolü hakkında daha fazla bilgi edinilmesiyle, antiaritmik ilaç tedavisinin spesifik iyonik substratlarına yönelik optimize edilerek uygulanması fikri daha etkin bir tedavi süreci için olası görünmektedir.

2.4.7. ATRİYAL FİBRİLASYON GENETİĞİ

AF'ye genetik katkının araştırılmasının önemi, yalnız (tek başına-lone) AF vakalarının yüksek yüzdesinden ve cinsiyete ve bazı etnik gruplar arasındaki yaygınlık farklılıklarından kaynaklanmaktadır. AF'nin kalıtsal bileşenini anlaşılması ile, daha sonra AF gelişme riski yüksek olan kişilerin erken tanımlanmasının kolaylaşacağı düşünülmektedir. Uzun süre boyunca, özellikle fare AF modelleri ve diğer AF hayvan modellerinin sınırlı sonuçları, kalıtsal AF' nin araştırılmasını zorlaştırmıştır. Bununla birlikte, moleküler genetikte ortaya çıkan ilerlemelerin ardından birçok çalışma, AF ile ilgili yaygın ve nadir genetik varyasyonlar tanımlamıştır.

2.4.7.1. Kalıtımsal ve Ailesel AF

Son yirmi yılda, birçok araştırmacı bağlantı analizi, aday gen analizi ve tüm genom yeni nesil dizileme gibi farklı çalışma türlerini kullanarak AF'nin genetik tabanını açıklamaya çalışmıştır. 1997'de Brugada ve arkadaşları, bağlantı analizi yaklaşımını kullanarak AF ile

ilgili ilk genetik lokusu (10q22-q24) bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada üç nesli kapsayan, AF vakası sonucu ölen bireylerin bulunduğu, 10'unda AF bulunan 26 canlı üyeden oluşan bir aileye ek olarak ve AF vakalarının görüldüğü iki küçük ailenin dahil edildiği bireyler ile mikrosatellit markerlar kullanılarak genetik haritalama ve bağlantı analizleri gerçekleştirilmiştir. Kullanılan her bir markerın aile bireyleri arasında haplotip ve rekombinasyon bulguları ile aileler arası allel frekanslarından elde ettikleri bulgulara göre, AF' nin aile içi segregasyonunda otozomal dominant bir kalıtım gösterdiği belirlenmiş ve lokusta yer alan aday genlerin 10q23–q26 üzerinde yer alan β-adrenerjik reseptör (*ADRB1*) ve α-adrenerjik reseptör (*ADRA2*) için genler, adrenerjik reseptörlerle etkileşime giren G-protein ile birleşmiş reseptör kinaz (*GPRK5*) genlerinin olabileceği önermişlerdir (172). Birkaç yıl sonra, benzer çalışmalar AF ile ilgili daha fazla genetik lokus, yani 6q14-16, 5p13, 10p11-q21, 20q12-13 ve 5p15 bildirilmiştir (173)(174).

2003 yılında Chen ve ark. otozomal dominant AF bireylerinin yer aldığı Çinli bir ailede ailede, voltaj-geçişli potasyum kanalında ilk fonksiyon kazanım mutasyonunu (*KCNQ1*) tanımlamışlardır. Bununla birlikte, ailesel AF öyküsünün yer aldığı bağlantı analizlerinin tümünde, allel frekanslarından yola çıkarak farklı kromozomlar üzerinde bulunan lokuslarda yer alan genlerin AF aday genler olarak belirlenmesi ve bu aday gen analizinin maliyeti ve fazla zaman alıyor olması nedeniyle az sayıda taranmış genle sınırlı kalmıştır. Ayrıca, bu varyantların nedensellik etkisi teorisi, potasyum kanalı genlerinde 30'dan fazla farklı tip keşfedildiği için tam olarak açıklanamamıştır (175). Bildirilen genlerin çoğu fonksiyon mutasyonlarının kazanımı olmasına rağmen, fonksiyon mutasyon kaybı da rapor edilmiştir. Fonksiyon mutasyonlarının kazanımı, etkili refrakter sürenin kısalmasına ve böylece AF kırılganlığının artmasına neden olmaktadır. *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNE*, *KCNE5*, *KCNQ1* ve *KCNJ2* genlerinde fonksiyon mutasyonlarının diğer kazanımları da tanımlanmıştır (176). *KCNE1* ve *KCNQ1* mutasyonları, repolarizasyonu hızlandıran ve dolayısıyla refrakter periyodu kısaltan bir fonksiyon etkisi kazanımı ile I_{Ks} potasyum kanallarını etkiler. *KCNA5* geninin foksiyon kayıp mutasyonları I_{Kur} potasyum kanallarını etkilemektedir (177)(178). Bu mutasyon, etkili refrakter periyodun uzamasını ve gecikmeli repolarizasyon içeren AF için alternatif bir mekanizma getirmiştir.

Potasyum kanallarının yanısıra, 2005 yılında Olson ve ark., *SCN5A* geni mutasyonunu AF ile ilişkilendiren ilk araştırıcılar olmuşlardır. Bildirilen bu mutasyonlar, Nav1.5 sodyum

kanalında α-alt biriminde gözlenmiştir. Dört farklı düzenleyici β-alt birimi (*SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* ve *SCN4B*) kodlayan genleri içeren α-alt birim gen mutasyonlarının tümü AF ile ilişkilendirilmiştir (179). Bu mutasyonların altında yatan mekanizmaları ortaya çıkarmak, bildirilen karışık fenotipler, fonksiyon mutasyonlarının hem kaybı hem de kazanımının bu farklı fenotiplere nasıl etki edebileceği ve saf AF fenotipine sahip bir hayvan modelinin eksikliği gibi birçok zorluğa sahiptir. *SCN10A* genindeki mutasyonlar da AF ile ilişkilidir ve geç sodyum akımlarından sorumlu olduğu düşünülen ve *SCN5A* ekspresyon seviyesi ile modüle edilebilen Nav1.8 sodyum kanallarını kodlamaktadır (180).

Artan diyastolik I_{Ca} kaçağı, AF'nin patofizyolojik yolaklarından biridir. RyR'nın PKA (protein kinaz A) veya CAMKII bölgelerinde fosforilasyonu, RyR açılma olasılığının artmasına ve sarkoplazmik retikulumdan artan I_{Ca} sızıntısına yol açmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, AF hastalarının daha az miRNA-106b-25 kümesine sahip olduğunu ve bunun sonucunda RyR ekspresyonunda ve I_{Ca} sızıntısında artış olduğunu göstermiştir (181).

Gollob ve ark. AF ile ilişkili *GJA5* genindeki ilk üç somatik mutasyonu tarif etmiştir; Gollob ve ark. AF ile ilişkili konneksin 40 gap-juction ifadesinden sorumlu gen olan *GJA5* genindeki ilk üç somatik mutasyonu tanımlamış ve bu mutasyonların hücreler arası bağlantının bozulmasından sorumlu olduğunu açıklamışlardır. Yapılan bu çalışmada, daha öncesinde *GJA5* knock-out farelerde, atriyal yeniden giriş (re-entry) aritmilere karşı daha fazla hassasiyet görüldüğü bildirilmesi sebebiyle, 15 AF hastasının kardiyak doku ve lenfosit örnekleri alınarak mutasyon taraması yapılmıştır. Elde edilen bulgularda 4 hastada, 4 yeni heterozigot missens mutasyonu tespit edilirken, 3 hastada mutasyonların, kardiyak doku örneklerinde bulunduğu, ancak lenfositlerde bulunmadığı, diğer hastada ise hem kardiyak dokuda hem de lenfositlerde mutasyon saptanması sebebiyle bu mutasyonun germ-line orijinli olduğu belirtilmiştir.(182). Bu bozulmaya atriyal spesifik konneksin 40'ın tükenmesi neden olmaktadır. Ayrıca Christophersen ve ark. aynı gen içinde bir germ hattı mutasyonu tarif etmiştir. Atriyal natriüretik peptidi (ANP) kodlayan gendeki mutasyonların AF ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. ANP proteinindeki bu mutasyonun aksiyon potansiyelini kısaltacağına inanılmaktadır (183). 2008 yılında, *NUP155* geninde nükleer zarfın nükleoporinini kodlayan bir mutasyon tanımlanmıştır ve bu mutasyon nükleer zarf geçirgenliğinde değişikliğe yol açmaktadır. *NKX2-5*, *PITX2*, *ZFHX3*, *GATA4*, *GATA5* ve

GATA6 genleri gibi transkripsiyon faktör genlerinde meydana gelen mutasyonun AF ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. *GATA* ve *PITX2* genleri, AF'nin başlangıcında yer alan pulmoner venöz miyokardın gelişimini etkilemektedir. Birçok çalışma, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü, anjiyotensin gen promotoru ve anjiyotensinojeni kodlayan RAAS sistem genlerinin polimorfizmi ile AF riskinin arttığını bildirmiştir (184)(185). AF' nin kalıtımı ile ilişkilendirilmiş genler ve yer aldıkları lokuslar Çizelge 2.1 de listelenmiştir.

Çizelge 2.1. AF ile ilişkilendirilmiş gen lokusları ve fonksiyonel etkileri. ((*) +: Fonksiyon kazanım, - : Fonksiyon kaybı, O.D: Otozomal dominant, S.M.: Somatik mutasyon, G.M. : Germ-line mutasyon) (176)

Gen	**Lokus**	**Kalıtım**	**Fonksiyonel**
KCNQ1	11p15.5	O.D.	+
KCNE1	21q22.1	O.D.	+
KCNE2	21q22.1	O.D.	+
KCNE3	11q13.4	O.D.	+
KCNE5	Xq23	X'e bağlı	+
KCNJ2	17q23.1	O.D.	+
KCNJ5	11q24.3	O.D.	+
KCNJ8	12p12.1	O.D.	+
KCNH2	7q36.1	O.D.	+/-
KCNA5	12p13.32	O.D.	+/-
KCND3	1p13.2	O.D.	+
HCN4	15q24.1	O.D.	-
MYH6	14q11.2	O.D.	-
ABCC9	12p12.1	O.D.	-
RYR2	1q43	O.D.	+
CACNB2	10p12	O.D.	-
CACNA2D4	12p13.33	O.D.	-
CAV1	7q31.2	O.D.	-
SCN1B	19q13.11	O.D.	+/-
SCN2B	11q23.3	O.D.	-
SCN3B	11q24.1	O.D.	-
SCN4B	11q23.3	O.D.	-
SCN5A	3p22.2	O.D.	+/-
SCN10A	3p22.2	O.D.	+/-
GATA4	8p23.1	O.D.	-
GATA5	20q13.33	O.D.	-
GATA6	18q11.2	O.D.	-
GJA1	6q22.31	S.M. /G.M	-
GJA5	1q21.2	O.D.	-
ZFHX3	16q22.2-q22.3	O.D.	-
GREM2	1q43	O.D.	+
JPH2	20q13.12	O.D.	-
LMNA	1q22	O.D.	
NUP155	5p13.2	O.D.	-
SYNE2	14q23.2	O.D.	
NKX2-5	5q34	O.D.	-
NKX2-6	8p21.2	O.D.	-
NPPA	1p36.22	O.D.	-
PITX2c	4q25	O.D.	-

2.4.7.2. Genom Boyu Asosiyasyon Çalışmaları

AF ile ilgili ilk genom boyu asosiyasyon çalışması (GWAS) 2007'de yayınlanmıştır. Yanlış pozitifleri en aza indirmek için $<5 \times 10^{-8}$'lik bir p-değeri kullanılarak, etkilenen ve etkilenmeyen örnekler arasında varyant frekansları karşılaştırılmıştır. İlk olarak belirlenen lokus kromozom 4q25 de belirlenmiştir (186). Ancak, bu lokus kodlamayan bir alanda yer almaktadır ve çalışmalar en yakın geni (*PITX2*) düzenlemedeki rolünü ortaya koymuştur. Bu gen, pulmoner ven miyokardında (sol-sağ asimetri) kardiyak gelişim ve sinüs düğümü gelişiminin baskılanması için gerekli olan bir gendir. PITX2 knock-out fare modeli, sodyum ve potasyum kanalları ekspresyonlarıda bir azalma göstermiş ve atriyoventriküler düğümde bir iletimin bloklanmasına neden olmuştur (187). Herraiz-Martínez ve ark. son zamanlarda chr4q25 risk varyantlarının hücre içi kalsiyum homoeostazını değiştirip değiştirmediğini araştırdıkları bir çalışmada, hastalarda artmış SERCA2a ekspresyonu, sarkoplazmik retikulum kalsiyum yükü ve RyR2 fosforilasyonunu göstermişlerdir. Bu değişikliklerin aşırı kalsiyum salınımına ve AF için daha yüksek bir riske yol açtığı düşünülmüştür (188).

2009 yılında, Avrupa kökenli bir kohortta 16q22 kromozomu üzerinde yeni bir lokus tanımlanmıştır. Bu lokusa en yakın tekli nükleotid polimorfizmi (SNP), zinc finger (çinko parmak) homeobox 3'e (ZFHX3) intronda tespit edilmiştir. Bu motif bağlama faktörü, *PITX2* geni ile etkileşime giren hipofiz-spesifik pozitif transkripsiyon faktörü 1'in (*POU1F1*) düzenlenmesi için gereklidir (189). Ellinor ve ark. 1q21 kromozomu üzerinde yeni bir lokusu tanımlamışlar ve SNP, voltaj bağımsız kalsiyum ile aktifleştirilmiş potasyum kanalı proteinini kodlayan *KCNN3* geninin yakınında olduğunu rapor etmişlerdir. Bu SK3 kanalları, kardiyak etki potansiyelinin repolarizasyon fazı için gerekli kanallardır (190). Bu SK3 kanalları ayrıca iç mitokondriyal membranda bulunur ve bu kanalların agonistler kullanılarak açılması, I_{Ca} aşırı yüklenmesiyle oksidatif stres kaynaklı yaralanmaya karşı koruyucu bir etkiye sahiptir (191).

Kromozom 15q24 ayrıca AF ve sinüs düğümü işlev bozukluğu ile ilgili bir lokus içermektedir. Bu SNP'ye en yakın gen, sol atriyumdaki sinoatriyal düğümün “funny” akımını düzenleyen kanal proteinlerini kodlayan *HCN4* genidir (192). Son zamanlarda yapılan diğer çalışmalarda, Japon popülasyonunda kromozom 12q24 üzerinde iki SNP tanımlanmışıtır. İlk SNP, *NEURL* geninin yakınında bulunmaktadır. Zebra balığında bu genin baskılanması, aksiyon potansiyel uzamasına yol açmıştır. AF'ye yol açan mekanizması

henüz net olarak tanımlanamamış olsa da bir diğer SNP CUX2 geninin intronunda tanımlanmıştır (193).

SYNE2'deki kromozom 14q23 üzerindeki bir AF SNP'si, nükleer dış zar ve sarkomerin bir parçası olan nesprin-2'yi kodlamaktadır (194). Başka bir iyon olmayan kanal geni, kromozom 7q31 üzerinde AF ile ilgili SNP tanımlanmış, bu lokus, etki potansiyelinin repolarizasyon fazında rolü olan ve ayrıca TGF-β1 ve fibrozisi düzenleyerek yapısal bir role sahip olan *CAVI* (caveolin-1) geninin intron bölgesinde yer almaktadır (195).

Son zamanlarda, birçok çalışmada AF patogenezinde sitoskeletal proteinlerin rolü araştırılmıştır. İki kohort adası *MYH6* ve *MYL4* genlerinde iki yeni SNP rapor edilmiştir *MYH6*, alfa miyozin ağır zincir alt birimini kodlamaktadır. Bu alt birimdeki mutasyonların kardiyak kontraktiliteyi ve kas liflerinin bütünlüğünü etkilediği bildirilmiştir (196)(197). *MYL4*, atriyal hafif zincir olarak bilinen temel miyozin hafif zincir alt birimini kodlamaktadır. *İn vitro* mutant MYL4 zebra balığı üzerinde yapılan deneylerde kardiyak kasılma kaybı ve sarkomer yapısının yokluğu ortaya çıkmıştır (198). Başka bir çalışma *PLEC* genindeki bir missense varyantını keşfederek AF'de miyokardiyal yapının rolünü desteklediği bildirilmiştir (199). Bu gen, kalp kası bütünlüğünü korumada rol oynayan bir çapraz bağlayıcı proteini (plektin) kodlamaktadır. Bu çalışmalar, AF'nin patogenezinde sitoskeletal proteinlerin güçlü bir rol oynadığını düşündürmektedir. Yakın zamanda yapılan büyük bir GWAS meta-analizi, AF'nin 18 yapısal gendeki varyantlarla ve ayrıca *ARNT2* ve *EPHA3* gibi kardiyak fetal gelişimsel rolü olan 13 gendeki varyantlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (200). Bu, fetal gelişim sırasında veya yetişkin yaşamı sırasında kardiyak yapısal yeniden biçimlenme yoluyla atriyal kardiyomiyopatinin bir sonucu olarak AF'nin patofizyolojisini açıklayabilmektedir.

Bir başka büyük GWAS çalışması, 93.000 AF vakası ve 1 milyondan fazla referans arasında 134 AF ile ilişkili lokus tespit etmiştir. Bu çalışma *TBX3*, *TBX5* ve *NKX2-5* genlerinin kardiyak iletim sisteminin gelişimini düzenleyen transkripsiyonel faktörleri kodladığını göstermiştir. Bu çalışma ayrıca AF ve diğer atriyal aritmiler ile kardiyak morfoloji ve fonksiyondan sorumlu genlerin pleiotropisi arasındaki örtüşmeyi vurgulamaktadır (201). Nielsen ve ark., AF ve kalp gelişimi arasındaki ilişkiyi göstermiş ve AF varyantlarının, stres

ve yeniden biçimlenmeye yanıt olarak yetişkinlik döneminde gelişen kalp dokusunda fetal genleri veya yolakları yeniden aktifleştirmede rol oynadığını öne sürmüşlerdir (200).

GWAS çalışmaları ile elde edilen önemli verilere rağmen, AF'nin kalıtsal aktarımını araştırmak için bu yaklaşımın bazı sınırlamaları vardır. Çok sayıda tespit edilen lokus, eksik kalıtımın sadece küçük bir kısmını açıklamıştır. Bu gerçek, GWAS çalışmalarının sonuçlarının klinik kullanımını sınırlamakta ve gen-gen ve gen-çevre etkileşimlerini araştıran çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Diğer bir zorluk, keşfedilen SNP'lerin büyük bir bölümünün genomun kodlamayan bölgelerinde olmasıdır ve bu nedenle, hassas haritalama, fonksiyonel analizler ve evrimsel genetik gibi teknikler kullanarak kesin nedenselliği açıklayabilmek için daha çok çalışma yapılması gerekliliğini göstermiştir.

2.4.7.3. Atriyal Fibrilasyon ve Gen İfade Değişimleri

AF moleküler mekanizmalarına yönelik birçok moleküler çalışma yapılmış ve patolojisinin aydınlatılması amacıyla birçok gen bölgesi odak alınmış ve araştırılmıştır. Bu gen grupları arasında en çok odaklanılan Heat Shock Protein (HSP) ailesinin kalpte koruyucu etkilerinin olduğu ve post translasyonel modifikasyonlarda stres-indüklenmiş şaperonlar olarak görev aldıkları belirlenmiştir (202). Yang ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada, 8 paroksismal AF ve 9 persistan AF hastası, *Hsp27*, *Hsp60*, *Hsp70* ve *Hsc70* (heat-shock) düzeylerinin kardiyak ekspresyonu için 7 SR hastasıyla karşılaştırılmıştır. Çalışma grubu küçük ve çeşitli altta yatan kalp hastalığına sahip AF hastalarını içermesine rağmen, yazarlar persistan/permanent AF ve SR hastalarına kıyasla, paroksismal AF hastalarının atriyal dokusunda *Hsc70* ve özellikle *Hsp27*'nin ekspresyon değerlerinin yüksek olduğu bildirmişlerdir (203). 17 PAF, 14 persistan/permanent AF ve 13 SR hastası üzerine yapılan bir çalışmada, paroksismal AF hastalarında *Hsp27* yükselmeleri ve daha az oranda *Hsp70* seviyeleri bulunmuştur (204). Yapılan her iki çalışmada da, Hsp ifadesi ve AF duyarlılığına ilişkin olarak sadece *Hsp70* (*HspA1A*) ifadesi üzerinde çalışmalar yapmışlar ve sürekli olarak daha yüksek atriyal *HspA1A* ekspresyon düzeyine sahip hastaların postoperatif AF insidansının daha düşük olduğunu göstermişlerdir (205)(206).

Atriyal natriüretik peptid (ANP, NPPA) ve beyin natriüretik peptid (BNP, NPPB) insan ve sıçan modellerinde inme ve miyokard enfarktüsü gibi çeşitli hastalıklar için genetik faktörler olarak belirlenmiştir. Natriüretik peptitler, öncelikle kalpten salgılanan polipeptid

hormonları olarak, elektrolitler, su ve yağ dengesinde ve kardiyovasküler, böbrek ve sinirsel etkiler yoluyla kardiyak hemodinamiğin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Buna ek olarak, gelişme ve hastalıklar sırasında natriüretik peptidlerin ekspresyonu, düzenlenmesi ve terapötik uygulamaları gösterilmiştir (207)(208). Üstelik, *NPPA* ve *NPPB* genlerindeki polimorfizmlerin (BNP, NPPB), inme, kan basıncı ve hipertansiyon gibi vasküler hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (209). Yapılan bir çalışmada, total inmeli hastalarda I_{Na} ve I_K düzeylerinin normal kontrollere göre düşük olduğu görülmüştür. NPPA'nın vücuttaki I_{Na} ve I_K homeostatik kontrolüne dahil olduğu bilinmektedir ve HIF-1 sinyal yolağında yer almaktadır (210). Keçilerde yapılan AF modellemesi çalışmasında bu sinyal yolağında yer alan *HIF1A* (hipoksi indükleme faktör) gen ifadesinin AF model grubunda artış gösterdiği tespit edilmiştir (211). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda *NPPA* geni, daha yüksek potasyum alımı, inme, koroner kalp hastalığı ve toplam kardiyovasküler hastalık riskleri ile ilişkili bulunmuştur ve daha düşük potasyum konsantrasyonunun vasküler hastalıklarla daha fazla ilişkili olabileceğini düşünülmektedir (212).

Yapılan bir çalışmada, MAPKs / TGF-β1 / TRAF6 sinyal yolağının AngII tarafından indüklenen fare atriyal fibroblast proliferasyonunda rol aldığını ve atriyal yeniden biçimlenmeye katıldığını göstermiştir. Fakat TRAF6'nın insan atriyal yapısal yeniden biçimlenme üzerindeki etkisi tam olarak açık değildir. Romatizmal kalp hastalığı (RHD) olan hastalarda TRAF6 ve ilişkili sinyal yollarının ekspresyonunu daha da aydınlatmayı ve sinyal yolakları ile atriyal fibrozis arasındaki ilişkiyi ve kalp cerrahisi sonrası atriyal yapısal yeniden biçimlenme çalışmaları temelinde AF'de oynadıkları rolün araştırılması amaçlanmıştır (213). Çalışmalar MAPK'ların aktivasyonunun atriyal yapısal yeniden modellemede önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. AngII'nin önemli bir downstream sinyal molekülü olan MAPK'ler, atriyal fibrozun altında yatan ana mekanizma olarak kabul edilen AngII tarafından indüklenen TGF-β1 ekspresyonunun yukarı regülasyon sürecine katıldığı bildirilmiştir (214)(215). AngII'nin MAPK'ler aktivasyonunu iyileştirebileceğini, TGF-β1 ve CTGF' nin yüksek ekspresyonunu düzene sokabildiğini ve hücre proliferasyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmada SR hastalarla karşılaştırıldığında, atriyal dokuda MAPK'lerin aktivasyon derecesinin önemli ölçüde postoperatif AF gelişen hastalarda artmış olduğu tespit edilmiştir (216).

AF moleküler mekanizmasının tam olarak aydınlatılabilmesi için gen ifade seviyesinde çalışan tekli gen veya gen gruplarının yanı sıra son yirmi yıl içerisinde insan ve birçok hayvan modellemeleri kullanılarak mikrodizin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Mikrodizin yöntemi çip adı verilen membran üzerinde mikro alanlara yerleştirilmiş tek zincir DNA fragmentleri ile hedeflenen nükleik asit zincilerinin hibridizasyonuna dayanan bir tekniktir. Kim ve ark., AF hastalarından cerrahi sırasında alınan sağ atriyal doku örnekleri ile CABG (koroner bypass) operasyonu yapılan hasta grubunu cDNA mikrodizin yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada CABG hastaları kontrol grubu olarak alınmış ve yapılan karşılaştırma sonucunda incelenen 1125 gen arasından 55 genin ifadesinde anlamlı değişim gözlenmiştir. Bu genlerin AF patogenezinde rol oynayan oksidatif stresten kaynaklandığı yorumuna varılmıştır (217).

Ohki ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada cerrahi sırasında 7 AF hastası ve ve 10 SR sağ atriyum doku örnekleri HGU95A arrayleri kullanılarak karşılaştırılmış ve AF spesifik 33 gen, SR spesifik 63 gende anlamlı düzeyde ifade değişimleri olduğu rapor edilmiştir. AF ye karşı oluşan enflamatuvar cevabın bir düzenleyicisi olan *NF-IL6-β* (nuclear factor-interleukin 6-β), *MMIF* (macrophage migration inhibitory factor), hücre gelişiminde rol oynaya genlerden *VEGF-B* (vascular endothelial growth factor B), sinyal genlerinden *RhoC* geni normal SR hastalarına oranla AF hastalarında anlamlı ifade değişimleri gözlenmiştir (218). Yine benzer bir çalışmada biryıldan fazla süredir AF'de kalan 11 persistant AF hasta grubu ile 7 SR grubu karşılaştırılmış ve kardiyak iyon kanalları ve transport genlerinin ifadelerinde farklılıkların anlamlı olduğu ifade edilmiştir (219). Yine benzer bir çalışmada AF gruplarında 39 farklı gen ifadesinde anlamlı değişikler rapor edilmiş ve bu gen gruplarının, hücre proliferasyonu, sinyal iletimi ve apoptozis yolaklarında yer alan genler olduğu belirtilmiştir (220). Kalp cerrahisi sırasında AF hastaları ve kontrol grubu olarak seçilen hastalardan alınan doku örnekleri ile yapılan pekçok transkriptom çalışması yapılmış olmasına rağmen bu çalışmaların kısıtlayıcı özellikleri bulunmaktadır. Hastaların başka patogenezlerinin olup olmadığı, AF sürelerinin tam olarak tespit edilememesi ve kullanılan ilaçlar sebebiyle sonuçların benzer destekleyici ve tekrarlanabilir olmasına engel olmaktadır. Bu nedenle hem tekrarlanabilir hem de daha homojen örnekleme amacıyla farklı hayvan ve hücre modelleme çalışmaları yapılıp insan AF patogeneziyle ilişkilendirilmesine yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır.

AF süresinin gen ifadelenmesinde oldukça önemi bulunmaktadır. Bu önemin göz önüne alınarak yapılan bir çalışmada, atriyal taşikardi ve ventriküler taşikardi olmak üzere 2 farklı köpek modellemesi gerçekleştirilmiştir. Bu iki modelde 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta süreleri seçilmiş ve mikrodizin karşılaştırmaları yapılmıştır. Elde edilen en önemli sonuçlar ventriküler taşikardi grubunda hücre dışı ilişkili genlerin, atriyal taşikardi grubunda ise iyonik yeniden biçimlenme ile ilişkili genlerin anlamlı ifade değişimleri gözlenmiştir. Yine bu çalışmada herbir genin süre bakımından da farklı ifade profilleri çıkarılmıştır (221).

2.4.7.4. Fare AF Modelleri

Son yıllarda, fare modelleri AF'nin altında yatan genetik ve elektrofizyolojik mekanizmanın kodunu çözmeye çalışan birçok çalışma grubunun dikkatini çekmiştir. Murin modelleri, insan ve fareler arasındaki gelişim ve sinyal yollarının korunması, genetik manipülasyon kolaylığı ve hızlı olgunlaşma nedeniyle iyi bir aday olarak kabul edilmiştir. KCNE1 ve SK2 kanalları için gen knock-out modelleri gibi potasyum kanalları mutasyon modelleri incelenmiştir (222). Ayrıca, sodyum kanalı genleri transgenik modeller için bir hedef olarak görülmüştür. ΔKPQ-SCN5A fare modelleri atriyal aritmiye daha fazla yatkınlık göstermiştir (223). SCN3B alt birim knock-out modelleri de iletim bozuklukları gösterilmiştir (224).

Murin modellerinin değerine rağmen, birkaç sınırlamaları bulunmaktadır. Bu modellerin ana sınırlamalarından biri AF'nin her zaman fizyolojik olmayan şekilde indüklenmesidir. Fareler ve insanlar arasındaki sinyal yollarında benzerlik olmasına rağmen çevresel faktörler, diyet ve toksik maddelerin kötüye kullanımı gibi klinik AF'de yer alan diğer faktörler sebebiyle belirli sınırlamalar getirmektedir.

2.4.8. HÜCRESEL AF MODELLERİ

HL-1 hücreleri, AT-1 transjenik farenin simiyan virus 40 (SV40) T-antijeni eksprese eden atriyal kardiyomiyosit hücre soyundan türetilmiştir. Seri olarak pasajlanabilirken kendiliğinden kasılma yetilerini korurlar. Aynı zamanda kardiyak morfoloji, biyokimyasal ve elektrofizyolojik özelliklerini korumuşlardır. Embriyonik atrial kalp kası hücrelerinin tipik ultrastrüktürel özellikleri kültüre edilen HL-1 hücrelerinde bulunmaktadır (225). HL-1 hücreleri kasılma için gerekli olan yüksek derecede organize olmuş sakromerleri ve intrasellüler atriyal natriüretik faktör (ANF) içermektedirler (226). HL-1 hücreleri de

kardiyomiyositlerde hücresel sinyal yolları ve reseptör çalışmaları için yararlı olmuştur. Ayrıca β-adrenerjik reseptörlere ek olarak, çok sayıda hücre içi sinyal olaylarını düzenleyen α-adrenerjik reseptörleri de ifade etmektedir (227).

HL-1'lerin gen analiz çalışmalarında α-kardiak miyozin heavy chain, α-kardiak aktin, ve konneksin-43 gen ekspresyonlarının erişkin kardiyomiyosit gen ekspresyon profiline benzer bir profile sahip olduğu gösterilmiştir. HL-1 hücrelerinin immünohistokimyasal boyamaları, kardiyak özel belirteçleri olan desmin sarkomerik miyozin ve atrial natriüretik faktörü, kültüre edilen atriyal kardiyomiyositlere benzer olduğunu göstermiştir. Farmakolojik çalışmalar HL-1 hücrelerinin hücre içi sinyal proteinlerinin ekspresyonunu gösteren inotropik ve kronotropik agonistlere cevap verdiğini göstermiştir. HL-1 hücreleri kendiliğinden depolarize olmaktadır ve kardiyak aksiyon potansiyelinin oluşması için gerekli olan iyon kanallarını eksprese etmektedir (225).

HL-1 hücreleri son 10 yıl içinde, hücresel ve moleküler seviyede kalp biyolojisi ile ilgili önemli sorulara cevap bulmak için tasarlanan model sistemlerde kullanılmaktadır. HL-1 hücreleri sinyalizasyon, elektriksel aktivite, metabolik ve transkripsiyonel düzenleme ile ilgili olarak, normal kardiyomiyositlerin fonksiyonel çalışmaları için kullanılırken, aynı zamanda, hipoksi, hiperglisemi-hiperinsülinemi, apoptoz ve iskemi-reperfüzyon gibi patolojik durumları ele almak için de kullanılmıştır. Birçok model *in vitro* kardiyak kas yapısını ve işlevini incelemek için kullanılmasına rağmen, uygun hücre kültürü sistemlerinin geliştirilmesinin zor olduğu gösterilmiştir. HL-1 hücreleri bölünme yeteneği olan kendiliğinden kontraksiyon yapabilen, farklılaşmış erişkin kardiyak fenotip sergileyen tek hücre tipidir (225,227).

Brundel ve ark tarafından yapılan çalışmada HL-1 hücreleri üzerinde yapılan AF modellemesi gerçekleştirilmiştir. Hücrelere 24 saat boyunca 5Hz, 1.5V/cm elektriksel uyarım verilerek AF model hücreleri ile uyarım verilemeyen hücreler arasında membran L-type Ca^{+2} kanal α1C alt ünite seviyeleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre potasyum kanal alt üniteleri olan Kv4.3 ile Kv1.5 seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlenmezken uyarımın 12. saatinde L-type Ca^{+2} kanal seviyesinde yaklaşık %35 oranında azalma görülürken 24. saat sonucunda bu seviyenin %25 oranına düştüğü tespit edilmiştir (30). Yine bu grup tarafında yapılan bir diğer çalışmada HL-1 AF modellemesinde heat-

shock protein ailesinden *HSP27* geninde sinus ritme oranla ifadesinde artış rapor edilmiştir (228).

2.4.9. ATRİYAL FİBRİLASYON TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Klinik uygulamada, AF dahil olmak üzere kardiyak aritmi teşhisi konan hastaları yönetmek için farmakolojik ve farmakolojik olmayan iki tip tedavi kullanılmaktadır. Çoğu aritmi tedavisinde sıklıkla her iki türü de birleştirilmektedir.

2.4.9.1. Antiaritmik İlaçlar ile Tedavi

Bu tip ilaçlar arasında; aritminin başlangıcını önleyici, sinüs ritim korumayı ve kalp frekansını kontrol edici, kanı antikoagüle edici veya kimyasal bir kardiyoversiyon gerçekleştirmeyi amaçlayan çok çeşitli farmakolojik ilaçlar yer almaktadır. Antiaritmik ilaçların özellikleri öncelikle etkiledikleri reseptöre bağlıdır ve en etkili yaygın etkilerine dayanarak Vaughan-Williams sınıflandırmasına göre farklı kategorilere ayrılmaktadırlar (229). Bu nedenle, kullanılan ilaçlar, aritminin tipine bağlı olarak beş ana sınıfta yer almaktadır.

Sınıf I: Voltaja bağlı sodyum kanallarını bloke eden antiaritmik ilaçlar olarak bilinir. I_{Na}'yı inhibe ederek iletim hızını ve kardiyak uyarılabilirliği azaltmada görev almaktadır. Membran stabilize edici ajanlar olarak da bilinen bu sınıftaki ilaçların, birliktelik / ayrılma kinetiğine bağlı olarak üç alt sınıfı bulunmaktadır.

- Sınıf IA: Ara birliktelik / disosiyasyonlu etkili sınıf I ilaçlar olarak bilinmektedir. APS'yi uzatarak, kalp iletkenliğini azaltır ve etkili refrakter periyodu artırmayı sağlamaktadır. Ventriküler ve supraventriküler taşikardi, erken ventrikül atımları ve ventriküler fibrilasyon tedavisinde yarar sağlamaktadır. Örnekler: kinidin ve disopiramid.

-Sınıf IB: Hızlı ilişki / ayrılma etkili sınıf I ilaçlar olarak bilinmektedir. APS'yi kısaltır ve refrakterliği azaltmayı sağlamaktadır. Sıklıkla ventriküler fibrilasyonu önlemek ve hem ventriküler taşikardi hem de erken ventriküler ritimleri tedavi etmek için kullanılmaktadır. Örnekler: lidokain ve ranolazin.

- Sınıf IC: Yavaş ilişki / ayrışma etkili sınıf I ilaçlar olarak bilinmektedir. Kardiyak kontraktiliteyi azaltır, ancak APS üzerindeki etkileri göz ardı edilmektedir. Sodyum bloke

etme dereceleri açısından üç alt sınıfın en önemli sınıfıdır. Ventriküler taşikardi, ventriküler fibrilasyon ve atriyal fibrilasyonu tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Örnekler: flekainid ve propafenon.

Sınıf II: β-blokerler olarak da bilinen bu grup ilaçlar, kalp üzerindeki sempatik aktiviteyi bloke etmek amaçlı kullanılır. Atriyoventriküler düğüm yoluyla elektrik iletimini azalttıkları için supraventriküler taşikardinin tedavisinde faydalıdır. Örnekler: propanolol ve pronethalol.

Sınıf III: Potasyum kanallarını bloke eden ve bu nedenle APS ve refrakter periyodu uzatan antiaritmik ilaçlar bu sınıfta yer almaktadır. Ayrıca, iletim hızı üzerinde etkileri olmadığından, tekrarlayan aritmileri önlemede etkili ilaçlardır. Örnekler: sotalol, amiodaron

Sınıf IV: Kalsiyum kanallarını etkileyen antiaritmik ilaçlar bu sınıfa dahildir. Atriyoventriküler düğüm yoluyla elektrik iletimini azaltır, AP'nin "plato" fazını kısaltarak, kardiyak kasılmayı azaltmaktadır. Örnekler: verapamil ve diltiazem.

Sınıf V: Farklı mekanizmalarda etken olan diğer antiaritmik ilaçlar bu sınıf altında yer almaktadır. Örnekler: adenosin ve digoksin (230).

Vaughan-Williams sınıflandırmasının önemli bir sınırlaması bulunmaktadır. Birçok antiaritmik ilacın sahip olduğu birincil mekanizmalarının çoklu kanal etkileri olması sebebiyle bu ilaçlar birden fazla sınıfa dahil olmaktadır., amiodaron bunun için iyi bir örnektir, bu ilac ilk dört sınıfın tümü ile tutarlı etkileri bulunmaktadır.

Antiaritmik ilaçlarla AF tedavisi ile ilgili olarak, önceki çalışmalar belirli ilaçların kullanım endikasyonlarını ve kontrendikasyonlarını tanımlamıştır. Örneğin β-blokerler veya verapamil, miyokard enfarktüsü veya solunum yolu hastalıklarının neden olduğu AF'yi dolaylı olarak durdurmak için yararlı olabilir, ancak kullanımlarından türetilebilen negatif inotropik yan etkiler ihmal edilmemektedir. Genel olarak, sınıf IC ve daha az ölçüde sınıf IA ilaçlar AF hastalarında sinüs ritmin iyileşmesinde etkilidir, ancak bunların potasyum kanalları üzerindeki etkileri dikkate alınmalıdır (231). Amiodaron, nispeten düşük dozlarda bile ve diğer ilaçlardan daha az yan etkisi ile etkilidir ve AF tedavisi için sık kullanılan bir ilaçtır. Sinüs ritmin geri kazanılması mümkün değilse, alternatif bir yaklaşım ise digoksin (Na, K pompasını etkileyen), β-blokerler, verapamil veya diltiazem gibi SınıfV antiaritmik

ilaçlar kullanılarak ventriküler ritmi optimize etmektir (232).

Bazı iyon kanallarına yönelik nispeten zayıf bloke edici ajan olmaları amacıyla birkaç bileşik geliştirilmeye başlanmıştır. Bunlardan intravenöz vernakalant formülasyonları, AVE0118 ve AZD7009, AF'nin SR'e akut dönüşümü için klinik tedavilere dahil olmuştur (ritim kontrolü). Her üç bileşik de depolarize edilmiş potansiyellerde Kv1.5, Kv4.3, Kir3.1/4'ünü ve Nav1.5'i bloke etmektedir. Buna ek olarak, vernakalant hERG' yi, AZD7009 ise hERG ve KvLQT1'i bloke etmektedir. Her üç bileşik de klinik öncesi AF modellerinde etkilidir ve nispeten proaritmik risk içermemektedir (233). AVE0118 ve AZD7009'un geliştirilmesi durdurulmuş olsa da, vernakalant (BrinavessTM) birçok ülkede klinik kullanımı için onay alınmıştır. Vernakalant, uzun süredir AF olan hastalarda önleyici olarak kullanılsa da etki potansiyelinin yetersizliği sorgulanmaktadır (232). Nav1.5'in voltaj bağımlı bloke edilmesi sonucu depolarize membran potansiyelleri nedeniyle taşikardi dönemlerinde atriyumda daha etkilidir. Atriyal refrakter periyodu artırmakta ve ventriküler Kv kanallarının bloke edilmesi ile ilişkili pro-aritmik etkiye karşı korumaktadır. Sonuç olarak, özellikle atriyal miyositlerde eksprese olmayan (Kv1.5, Kir3.1 / 4) veya daha az belirgin (Kv4.3) ventriküler miyositlerde bloke edilen potasyum kombine bloke edilmesi ve Nav1.5'in bloke edilmesi fonksiyonel atriyal seçicilik sağlamaktadır (234).

2.4.9.2. Farmakolojik Olmayan Tedaviler

Antiaritmik ilaç etkisi genellikle kendi başına yetersizdir ve aritmiyi düzeltmek için genellikle diğer farmakolojik olmayan tedavilerin uygulanmasını gerektirmektedir. Ayrıca, bir aritmi ciddi olduğunda, elektrik şoku tedavisi (defibrilasyon veya kardiyoversiyon) uygulamak veya kısa süreli kalp pili implante etmek gibi sinüs ritmin düzenleyen acil tedavi gerekebilmektedir (235). Anormal kalp ritimlerini önlemek veya tedavi etmek için diğer tedaviler şunları içermektedir; kalp ritim sorunlarına neden olabilecek kalp bölgelerini yok etmek veya elektriksel olarak izole etmek için kullanılan kardiyak doku ablasyonu, ani kardiyak ölüm riski yüksek olan hastalarda kalp defibrilatörünün implantasyonu ve kalbin düzensiz (çok yavaş veya çok hızlı) attığını algılayan kalp pili implantasyonunun ardından kalbin doğru hızda atmasını sağlayan bir sinyal göndermektedir (236). Farmakolojik tedavilerin aksine, bu tedavilerin çoğu hassas kardiyovasküler cerrahi girişimler gerektirir, bu durum hastalar için yüksek risk içermektedir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Atriyal fibrilasyon (AF) giderek artan ve önemli derecede morbidite ve mortaliteye neden olan, en sık görülen kardiyak aritmi türüdür. Dünya'da gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde artan nüfus ile sanayileşmeye paralel olarak AF' den etkilenen insanlarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda AF' nin genetik özellikleri tanımlanmış, heterojen bir patogeneze ve kompleks bir elektrofizyolojiye sahip olduğu belirtilmiştir. Bunun sonucunda, bu hastalığın biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar artarak hız kazanmıştır.

AF ve diğer kardiyak aritmilerin patofizyolojisinin önemli bir bileşeni, içinde meydana geldiği kardiyak doku ve kardiyak hücresel ortamıdır. AF hastalarının tedavisine yönelik her ne kadar farmakolojik ve famakolojik olmayan tedaviler kullanılabilir olsa da, bu tedavi yöntemlerinin geçici etkileri ve her zaman hastalığın tümüyle yok edilmesinde başarılı olamayabilmektedir. Bu nedenle tedavi ve terapötik yaklaşımları iyileştirmek için bu patogenezin hücresel mekanizmaların moleküler açıdan da aydınlatılması gerekmektedir.

Yapılan moleküler çalışmalarda insan AF hastaları ve oluşturulan AF hayvan modellerinden her ne kadar gen ifadesi düzeyinde biyokimyasal süreçlerin aydınlatılmasına yönelik mikrodizin çalışmalarında önemli veriler elde edilmiş ve farklı yolaklar tanımlanmış olsa da, her zaman birbirleriyle örtüşmeyen ve geriye dönük tekrar edilemeyen çalışmalar olması sebebiyle sınırlı kalabilmektedir. Bu sınırlamalara ek olarak, çalışmada kullanılan kontrol ve hasta örneklerinin homojen olmaması veya örneklem sayısının sınırlı kalmasının yanı sıra, hastalarda AF ile birlikte seyreden başka komplikasyonların yer alması elde edilen verilerin yalnızca aydınlatılmak istenen patogeneze yönelik yorumlanması konusunda yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin ayrı ayrı yorumlanmasında zorluklar yaşanmakta ve hasta spesifik tedavilerin geliştirilmesinde hedef bir strateji geliştirilmesine öncü olamamaktadır.

AF' nin karmaşık fizyolojik etkilerinin aydınlatılabilmesi için AF' nin süresinin AF gen ifade profili çok önemli ve bilgi verici potansiyele sahiptir. AF başladığı andan itibaren etki süresine ve enflamasyon süresine bağlı olarak gen ifade profilleri farklılık gösterebilmektedir. Çalışılan insan ve hayvan modellerinde örneklem yalnızca bir kere yapılabildiğinden bu anlamda AF sürecinin her aşamasının takip edilebilmesi mümkün

olmamaktadır. Bu nedenle AF süresinin kontrollü bir şekilde takip edilebilmesi ve farklı zaman aralıklarıyla sonuçlar elde edilmesi, hücresel etki mekanizmasının anlaşılmasında büyük önem taşımaktadır.

Yapılan bu tez çalışmasında "HL-1 hücre hattına dışarıdan elektriksel uyarım verilerek, AF modeli oluşturulabilir ve bu modelde AF transkriptom verisi elde edilebilir" hipotezinden yola çıkarak, AF'ye özel gelecekteki terapötik hedef ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır. Bu temel amaç doğrultusunda, transgenik farelerden elde edilen HL-1 hücreleri kullanılmıştır. HL-1 hücrelerinin seri olarak pasajlanabilen ve kendiliğinden kasılma özelliğinde olan atriyal kardiyomiyosit olmaları büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu hücre hattında kontrollü bir AF modeli oluşturmak ve bu modelde farklı zaman aralıklarında meydana gelen tekli ya da çoklu gen ifade profillerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu sayede, hücresel bir AF modelinde, çalışmada kullanılan örneklerin tümüyle homojen, tekrar edilebilen ve sürecin tümünde meydana gelen değişimleri diğer farklı komplikasyondan bağımsız olarak aritmi spesifik sonuçlar elde ederek, gelişmiş organizmalardan elde edilen AF gen ifade profilleriyle karşılaştırılmasının mümkün olduğu düşünülmüştür.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. HÜCRE HATLARI

Ön deneme çalışmalarında H9C2 fare kardiyomiyosit hücre hattı çalışmaları için Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biowest, L0102) besiyeri kullanılmıştır.

Hücresel AF modeli çalışmalarında fare HL-1 hücre hattı kullanılmıştır (HL-1 Cardiac Muscle Cell Line) (Sigma-Aldrich, SCC065).

HL-1 hücre kültürü çalışmaları için, Claycomb Medium (Sigma-Aldrich, 51800C) besiyeri kullanılmıştır.

Claycomb Medium içerisine ek olarak;

- Fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, F7524)
- Penisilin/streptomisin (10^4 U/ml P and 10^4 µg/ml S) (Sigma-Aldrich, P4333)
- L-glutamin (200mM) (Sigma-Aldrich, G7513)
- Norepinefrin (Sigma-Aldrich, A0937) eklenmiştir.
- Hücrelerin yıkanma aşaması için;
- PBS (Sigma-Aldrich, P3813) kullanılmıştır.
- Hücrelerin plakalardan kaldırılması için;
- Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, T3924) kullanılmıştır.

Hücrelerin flask/plaka yüzeyine yapışmalarını sağlamak için;

- Jelatin (Sigma-Aldrich, G9391)
- Fibronektin (Roche,10838039001) kullanılmıştır.

Hücrelerin dondurulması aşamasında;

- Dimetil Sülfoksit-DMSO (Sigma-Aldrich, D2650)
- Fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, F7524) kullanılmıştır.

4.1.2. KİTLER

Hücrelerden izole edilen total RNA sonrasında;

cDNA sentezi için First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, 11483188001) kullanılmıştır.

PZR optimizasyon aşamasında GoTaq Master Mixes (Promega, m7122) kullanılmıştır.

Hücre hattında oluşturulan AF modelinin doğrulanması ve AF süresinin belirlenmesi için eş-zamanlı kantitatif PZR (qRT-PCR) analizi LightCycler® 480 SYBR Green I master (Roche, 04707516001) ile gerçekleştirilmiştir.

Transkriptom profilleri, Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST array ve Whole Transcriptome Reagent Kit (Affymetrix, P/N 902280) ve Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix, P/N 900720) kullanılarak elde edilmiştir.

Transkriptom analizlerinin doğrulanması amacıyla eş-zamanlı kantitatif PZR işlemi (LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, 04707516001) gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. KIMYASAL VE SOLÜSYONLAR

- Trizol (Invitrogen, 15596026)
- Kloroform (Sigma, C2432)
- Etil alkol (Merck, 1.00983.2511)
- İzopropil alkol (Sigma, I9516)
- Nükleaz-free ddH_2O - Molecular Biology Grade water (Hyclone, 01-869-1A)
- 5X TBE - 54 g Tris Baz (Amresco, 0826-), 27.5 g Borik asit (Amresco, 0588), 20 ml 0.5 M EDTA (Sigma, E9884)
- Agaroz (Applichem, A8963)
- Red Safe (RedSafe,21141
- 6X gel loading dye (New England Biolabs, B7021S)

4.2. YÖNTEM

HL-1 hücre hatlarında in vitro AF modeli oluşturulması ve oluşturulan modelde AF patogenezinde yer alan gen ifade profilleri ve etki mekanizmalarını araştırmak amacıyla sırasıyla aşağıda söz edilen yöntemler kullanılarak çalışmanın deneyleri tamamlanmıştır.

4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Plaka/Flaskların Jelatin-Fibronektin ile Kaplanması

HL-1 hücrelerinin kültüre ekilmeden önce yetiştirilecekleri flask/plakaların jelatin ve fibronektin ile kaplanması gerekmektedir. Bu sayede yüzeye tutunmaları sağlanmıştır. %0.02 konsantrasyonunda 500 ml jelatin çözeltisi hazırlanıp ve otoklavlanmıştır. 1ml Fibronektin (1mg/ml) alınıp hazırlanan 199 ml jelatin çözeltisine eklenmiş ve falkon tüplere 6ml olacak şekilde alikotlanmıştır. Kültüre başlamadan önce flaskların içerisine jelatin-fibronektin karışımı eklenmiş, (T25 flask için 1 ml, T75 flask için 6 ml, 6-well plate (6-kuyulu plaka) için 2ml) ve 37°C inkübatörde 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonrasında jelatin-fibronektin uzaklaştırılarak flasklar kurumaya bırakılmıştır.

Fare Kaynaklı Hücre Hattının (HL-1) Kültürü ve Pasajlanması

Çalışmada, fare atriyum dokusu kökenli bir hücre serisi olan HL-1 "beating" hücreleri kullanılmıştır**.** HL-1 hücreleri için özel üretilen Claycomb ortamı içerisine 2 mM L-glutamin, 0.1 mM norepinefrin, %10 FBS (fetal sığır serumu), 100 U/ml penisilin ve 100 µM streptomisin eklenerek hücrelerin içerisinde yaşayacağı ve çoğalacağı ortam hazırlanmıştır. Hücreler bu ortam içerisinde, %5 CO_2'in bulunduğu, %95 oranında neme sahip olan 37^{o}C'deki inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin sağlıklı yaşayabilmesi ve çoğalabilmeleri için bu ortam inverted mikroskopta kontrol edilerek, her iki günde bir düzenli olarak değiştirilmiştir.

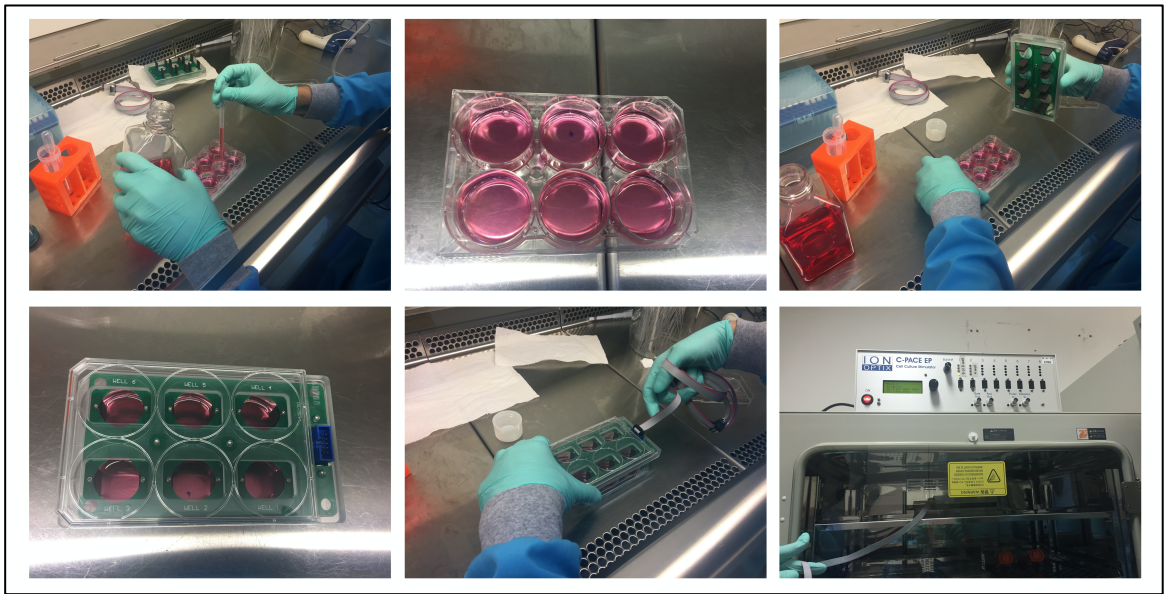
Hücreler %90 üzeri konfluent durumuna geldikten sonra Claycomb ortamı uzaklaştırılarak, flasklar Mg^{2+}, Ca^{2+} 'lu PBS ile yıkanmış ve %0.05 tripsin/EDTA (T-75 için 3 ml, T-25 için 1.5 ml, 6-kuyulu plaka için 0.5ml) ile 37^{o}C CO_2inkübatörde inkübe edilerek hücreler tutundukları yüzeyden kaldırılmıştır. Hücreler 15 ml falcon tüplere alınmış ve 500xg de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatan uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 4 ml Claycomb besiyeri içerisinde yavaşça çözüp yeni flasklara ekim yapılarak hücre idamesi sağlanmıştır.

Elde edilen hücrelerin bir kısmı dondurulmuş bir kısmı ise elektriksel uyarım denemelerinde kullanılmak üzere 6-kuyulu plakalara ekilmiştir.

Hücrelerin dondurulması aşaması için santrifüjden çıkan hücre pelleti 1.5 ml dondurma ortamı (%95 FBS ve %5 DMSO) içinde yavaşça tekrar süspansiyon haline getirilerek kriyoviyal tüp içerisine alınmıştır. Oda sıcaklığında izopropanol içeren bir Nalgene Mr. Frosty™ freezing container içerisine yerleştirilen kriyoviyal tüpler –80°c de 6-12 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankı içerisine yerleştirilmiştir.

İn-vitro Kültür Ortamında Hücrelerin Elektriksel Uyarımı-Atrial Fibrilasyon Modeli

HL-1 kardiyomiyosit hücreler ile yapılması planlanan elektriksel uyarım deneyi öncesinde uyarım sonucunda hücreler üzerindeki fiziksel etkiyi görmek amacıyla H9C2 hücreleri DMEM besiyer içerişine %10 FBS ve %1 antibiyotik (100 U/ml penisilin ve 100 µM streptomisin) eklenerek hücrelerin içerisinde yaşayacağı ve çoğalacağı ortam hazırlanmıştır. Hücreler bu ortam içerisinde, %5 CO_2'in bulunduğu, %95 oranında neme sahip olan 37^oC'deki inkübatörde kültüre edilmiştir. IonOptix C-Pace EP Cell Culture Stimulator 100 pacer sistemi ile 6-kuyulu plaklara entegre olan karbon elektrot IonOptix The C-Dish™ kullanılarak, kuyu başına 1.5V/cm^3 olacak 4 sn boyunca 5 Hz (P1 dalga) ve 1 sn boyunca 1 Hz (P2 dalga) olacak şekilde hücrelere 6 saat boyunca akım verilmiş ve hücre görüntüleri kayıt edilmiştir (228). Aynı sistem ve koşullarda 6-kuyulu plakalara kuyu başına $1x10^6$ olacak şekilde ekilen HL-1 hücrelerine 24 saat boyunca uyarım gerçekleştirilmiş ve uyarımın her saatinde hücrelerin inverted mikroskop video görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. Hücre kültüründe kardiyomiyositlerin kültüre edilmesi ve elektriksel uyarımı (IonOptix C-Pace EP Cell Culture Stimulator 100- IonOptix The C-Dish™)

HL-1 hücre modelinin doğrulanması amacıyla hücrelere verilen elektriksel uyarım sonucu oluşturulan AF modellemesinin IonOptix Myocyte Calcium Photometry and Contractility Systems kullanılarak IonOptix IonWizard 7.3 yazılımı ile elektrokardiyogram görüntüleri elde edilmiştir.

4.2.2. AF MODELİNİN DOĞRULANMASI VE AF SÜRESİNİN BELİRLENMESİNDE GEN İFADE ANALİZLERİ

HL-1 atriyum hücrelerine uygulanan elektrik akımı sonrasında atriyal fibrilasyon modelinin oluşturulup oluşturulamadığı gözlemlemek amacıyla elektrokardiyogram analizlerinin yanı sıra literatürde atriyal fibrilasyonda ifade profillerinin değiştiği rapor edilen *HSPA1A* (228)(204), *TGF-βI* (215)(214), *NPPA* (207,210), ve *MAP2K3* (214)(216), genleri seçilmiştir. Herbir gen bölgesi için "Primer3" programı kullanılarak primerler tasarlanmış ve kullanılan primer dizileri Çizelge 4.1. de gösterilmiştir. Seçilen primerlerlerle eş-zamanlı kantitatif PZR (qRT-PCR) analizi yöntemiyle seçilen 4 farklı uyarım süresine (3.,6.,12.ve 24. saat) göre ifade profilleri ile uyarılmayan kontrol grubu örneklerinin ifade profilleri incelenmiştir. Bu genlerin ifade analizleri için kardiyak dokularda ifadesinin değişmediği bilinen *HPRT* geni referans (house-keeping) gen olarak kullanılmıştır (237).

Çizelge 4.1. AF model doğrulaması ve AF süresinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen eş-zamanlı kantitatif PZR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri.

Primer Adı	**Dizi (5'-3')**	**Ürün Uzunluğu (bp)**
MAP2K3_F MAP2K3_R	ACAACTCTCCAGGTGTGACCA AAACAGCAATAGGTTCCTGCCC	142
TGFB1_F TGFB1_R	TGGAGCTGGTGAAACGGAAG ACTGGCGAGCCTTAGTTTGG	71
HSPA1A_F HSPA1A_R	CAGCGAGGCTGACAAGAAGAA CCCGCTTGTGCACGAACT	104
NPPA_F NPPA_R	CCCTCGGAGCCTACGAAGA GGTACCGGAAGCTGTTGCA	92
HPRT_F HPRT_R	GTTGGGCTTACCTCACTGCT TAATCACGACGCTGGGACC	125

RNA Eldesi ve Kantitasyonu

RNA izolasyonu yapılacak olan hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, %0.05 tripsin/EDTA ile 6-kuyulu plakalardan kaldırılmış ve hücreler 1 ml trizol içerisine alınmıştır. Her 1 ml trizol ve örnek karışımı üzerine 1/5 oranında (200 µl) kloroform eklenen tüpler çalkalanıp ve 1-2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 15.000 rpm +4ºC'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst faz (total RNA içerisinde olduğu berrak kısım) yeni tüpe alınarak başlangıç trizol miktarının (1 ml) yarısı oranında (500 µl) izopropanol eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Tüpler oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra 15.000 rpm +4ºC'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatan uzaklaştırıldıktan sonra başlangıç trizol miktarı ile aynı oranda (1 ml) %70 etil alkol eklenerek 10.000 rpm +4ºC'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonrasında süpernatan uzaklaştırılmış ve aynı oranda %70 etil alkol eklenerek yeniden 10.000 rpm +4ºC'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Etil alkolü ortamdan tamamen uzaklaştırmak amacıyla pelet oda sıcaklığında bekletilmiş ve 20 µl nükleaz free su içerisinde çözülerek RNA elde edilmiş ve -80^{0}C 'de ilgili kutuya kaldırılmıştır.

RNA kantifikasyonu için 2 µl su ile sulandırılmış RNA kullanılmış ve Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) kullanılarak RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi sağlanmıştır. RNA örnekleri için A_{260}/A_{280} oranlarının 1.8-2 arasında olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca bir kısım RNA örneği %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Hassas terazide (Shimadzu BX320H) tartılan 1g agaroz 1x TBE ile 100 ml'ye tamamlanmış mikrodalga fırında çözülmesi sağlanan jel biraz soğutulduktan sonra 5 µl red safe eklenerek

jel tablasına dökülmüş ve polimerize olması için 20-30 dakika bekletilmiştir. %1'lik agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilmiş 1 µl RNA, 2 µl 6x Loading Dye ve 3 µl su ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Örnekler 100V 30 dakika yürütülerek, UV görüntüleme sistemi (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) kullanılarak görüntülenmiş ve termal yazıcı (SonyUP-D895) ile görüntüleri alınmıştır. Ayrıca örnekler 2100 Bioanalyser Instrument (Agilent, G2939BA) kullanılarak görüntülenmiştir

cDNA Sentezi ve Eş-Zamanlı Kantitatif PZR

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA eldesi için First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Reaksiyon için Çizelge 4.2. de yer alan reaktifler ve miktarları kullanılarak 11,8 µl master mix hazırlanmış ve her bir örnek için, RNA miktarı 1000 ng olacak şekilde uygun hacim hesaplanmış ve su ile toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 4.2. cDNA sentez reaksiyon koşulları

Reaktif	**Hacim (µl)**
10X Reaction Buffer	2
$MgCl_2$	4
dNTP Mix	2
Oligo-p $(dT)_{15}$ Primer	2
RNase Inhibitor	1
AMV Reverse Transcriptase	0.8
H_2O	-
RNA Örneği (1000 ng)	-
Toplam	**20**

Her bir RNA örneği için hazırlanan reaksiyon karışımları Thermal Cycler cihazına alınmış ve RT-PZR (reverse transkripsiyon PCR) süresi sonunda -20°C dondurucuya kaldırılmıştır. Örnekler 10 dakika 25°C, 60 dakika 42°C, 5 dakika 99°C ve son olarak 5 dakika 4°C de inkübe edilmiştir.

cDNA sentezinden sonra primerlerin optimizasyonu için PZR analizleri gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonları için kullanılan reaktifler ve oranları Çizelge 4.3. de verilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri %2 lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiş ve daha sonrasında eş-zamanlı kantitatif PZR analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3. PZR reaksiyonu

Reaktif	**Hacim (µl)**
10xTaq Buffer	12,5
dNTPs	1
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
cDNA (50ng/µl)	1
H_2O, PCR-grade	3,5
Toplam	**20**

Eş-zamanlı kantitatif PZR analizleri için LightCycler® 480 SYBR Green I Master kullanılmıştır. Çizelge 4.4. de yer alan reaktif ve oranları hazırlanmış ve reaksiyonlar Light Cycler 480 (Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham veriler ΔΔCt metodu kullanılarak analiz edilmiştir.

Çizelge 4.4. Eş-zamanlı kantitatif PZR reaksiyonu

Reaktif	**Hacim (µl)**
2x SYBR Green Mix	10
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
cDNA (10ng/µl)	2
H_2O, PCR-grade	6
Toplam	**20**

4.2.3. GEN İFADE PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ (MİKRODİZİN ANALİZİ)

HL-1 hücrelerine farklı saat aralıkları boyunca elektriksel uyarım verilerek oluşturulan AF modellemesi RNA örnekleri ile Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST array ve Whole Transcriptome Reagent Kit ve Hybridization, Wash and Stain Kit kullanılarak mikrodizin analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler aşağıda yer alan kitin standart protokolleri uyarınca aralıksız devam edilmesi gereken basamaklar izlenerek tamamlanmıştır.

Birinci Zincir cDNA sentezi

Bu ters transkripsiyon basamağında, total RNA'ya uygun primerler ile T7 promoter dizisi eklenerek, 5' ucunda T7 promoter dizisini içeren tek sarmallı cDNA elde edilmiştir. Bu işlemi gerçekleştirmek için kit içindeki bileşenler kullanılmıştır. Her örneğin konsantrasyonu 250 ng/µl olacak şekilde RNazsız su ile sulandırılıp Çizelge 4.5. te belirtilen reaksiyon karışım hazırlamıştır.

Çizelge 4.5. First Strand cDNA sentezi

Reaktif	**Miktar (µl)**
First-Strand Buffer	4
First-Strand Enzim	1
Diluted Poly-A RNA Controls (4. Dilüsyon)	2
Total RNA	3
Toplam	**10**

Belirtilen karışım tüplere dağıtılıp kısa santrifüj işleminden sonra öncelikle 25ºC'de 60 dakika ardından 42ºC'de 60 dakika son olarak 4 ºC 'de 2 dakika termal cycler da inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından tüpler buz üzerine alınıp santrifüj edilmiş ve bir sonraki adıma geçilmiştir.

İkinci Zincir cDNA sentezi

Bu basamakta, tek iplikli cDNA, *in vitro* transkripsiyon için bir şablon olarak hareket eden çift iplikli cDNA'ya dönüştürülmüştür. Reaksiyonun gerçekleştirilmesi amacıyla, RNA'yı aynı anda indirgemek ve ikinci iplik cDNA'yı sentezlemek için DNA polimeraz ve RNaz H kullanılmıştır. Çizelge 4.6. da yer alan reaksiyon karışımı hazırlanmış ve sonrasında first-strand cDNA karışımı üzerine eklenmiştir. Vorteks ve kısa santrifüj yapıldıktan sonra öncelikle 16ºC'de 60 dakika, ardından 65ºC'de 10 dakika ve son olarak 4 ºC 'de 2 dakika termal cycler da inkübe edilmiştir.

Çizelge 4.6. Second Strand cDNA sentezi

Reaktif	**Miktar (µl)**
Second-Strand Buffer	18
Second-Strand Enzim	2
Toplam	**20**

İnkübasyonun ardından bir sonraki basamak cRNA by *in vitro* transkripsiyon ile cRNA sentezine aşamasına geçilmiştir.

In Vitro cRNA Sentezi

Bu aşamada, antisens RNA (eşlenik RNA veya cRNA), T7 RNA polimeraz enzimi kullanılarak ikinci iplikli cDNA şablonunun *in vitro* transkripsiyonu (WT) ile amplifiye

edilmiştir. Bu RNA hazırlama yöntemi, Eberwine veya RT-WT yöntemi olarak bilinen orijinal T7 *in vitro* transkripsiyon teknolojisine dayanmaktadır.

Oda sıcaklığında Çizelge 4.7. de yer alan WT karışımı hazırlanmış ve her bir örnek üzerine 30 µl eklenmiştir. 40ºC'de 16 saat ardından 4 ºC 'de 2 dakika termal cycler da inkübe edilmiştir.

Çizelge 4.7. WT cRNA sentezi

Reaktif	**Miktar (µl)**
WT Buffer	24
WT Enzim	6
Toplam	**30**

cRNA Pürifikasyonu

Bu aşamada, 2-döngülü tek-sarmal cDNA sentezine cRNA'yı hazırlamak için enzimler, tuzlar, inorganik fosfatlar ve birleştirilmemiş nükleotidlerden arındırılmıştır. Bu işleme yer alan tüm basamaklar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve pürifikasyon işlemi manyetik boncuklar yardımıyla yapılmıştır. Örnekler ile 100 µl manyetik boncukkarıştırılmış ve 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edimiştir. Ardından tüpler "magnetic stand" üzerine yerleştirilmiş ve 5 dk. beklendikten sonra süpernatan uzaklaştırılmıştır. Örneklerin üzerine 200 µl %80 etil alkol eklenerek 30 saniye bekletildikten sonra süpernatan uzaklaştırılmış ve önceki basamak iki kez daha tekrarlanmıştır. Son olarak tüplerdeki süpernatan uzaklaştırılıp etil alkolün tamamen uzaklaşması için 5 dk. bekletilmiştir. Örnekler üzerine 37 µl RNazsız su eklenerek "magnetic stand" e yerleştirilerek 5 dk beklenmiştir. Ardından süpernatan temiz 0.2 ml PCR tüplerine alınmış ve miktar tayini için nanodrop'da ölçülmüştür. Beklenen konsantrasyon en az 625 ng/µl'dir.

2.Döngü Tek Zincir cDNA Sentezi

Bu aşamada, sense iplik cDNA, 2.döngü primerler kullanılarak cRNA'nın ters transkripsiyonu ile sentezlenmiştir. Sense iplik cDNA dizisi dTTP'ye göre sabit bir oranda dUTP içermektedir. Bu işlem için 15 ug cRNA kullanılmıştır. Öncelikle 24 µl cRNA ile 4 µl 2.döngü primer karıştırılmış ve 70ºC'de 5 dakika ardından 25ºC'de 5 dakika son olarak 4

ºC ‘de 2 dakika termal cycler da inkübe edilmiştir. Çizelge 4.8. de yer alan reaksiyon karışımı hazırlanmış ve üzerine cRNA-primer karışımı eklenmiştir.

Çizelge 4.8. 2.döngü tek zincir cDNA karışımı;

Reaktif	**Miktar (µl)**
2nd-Cycle ss-cDNA Buffer	8
2nd-Cycle ss-cDNA Enzyme	4
Toplam	**12**

Örnekler 25ºC’de 10 dakika ardından 42ºC’de 90 dakika, 70 ºC 10 dakika son olarak 4ºC‘de 2 dakika termal cycler da inkübe edilmiştir.

RNase H ile RNA Hidrolizi

Bu aşamada, RNase H ile tek iplikli cDNA bırakarak cRNA şablonu hidrolize edilmiştir. 2.döngü ss-cDNA örnekleri üzerine 4 µl Rnase H eklenmiş ve 37ºC’de 45 dakika ardından 95ºC’de 5 dakika son olarak 4 ºC ‘de 2 dakika termal cycler da inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 11 µl RNazsız su eklenip 2.döngü tek zincir cDNA (2nd-Cycle Single-Stranded cDNA) pürifikasyonu basamağına geçilmiştir.

2.Döngü Tek Zincir cDNA Pürifikasyonu

Hidrolizden sonra, 2-döngülü tek-iplikli cDNA enzimleri, tuzları ve dNTP'leri uzaklaştırmak için saflaştırılmıştır. Bu işlem oda sıcaklığında manyetik boncuk yardımıyla yapılmıştır. Örnekler üzerine 100 µl manyetik boncuk ve 150 µl %100 etil alkol eklenerek karıştırılmış ve 20 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından tüpler “magnetic stand” üzerine yerleştirilmiş ve 5 dk. bekletilmiştir. Süpernatan uzaklaştırılmış ve üzerine 200 µl %80 etil alkol eklenerek 30 saniye beklemeye bırakılmıştır. Süpernatan uzaklaştırılmış ve önceki basamak iki kez daha tekrar edilmiştir. Son olarak tüplerdeki süpernatan ve etil alkolün tamamen uzaklaşması için 5 dk. beklenmiştir. Örnekler üzerine 30 µl RNazsız su eklenerek “magnetic stand” e yerleştirilmiş ve yine 5 dk bekletilmiştir. Ardından süpernatan temiz 0.2 ml PCR tüplerine alınımış ve miktar tayini için nanodrop’da ölçülmüştür. Beklenen konsantrasyon en az 176 ng/uL’dir.

Fragmentasyon ve İşaretlenmiş (Labeled) Tek Zincir cDNA

Saflaştırılmış sense iplikli cDNA, doğal olmayan dUTP kalıntılarında urasil-DNA glikozilaz (UDG) ve apurinik/apyrimidinik endonükleaz 1 (APE 1) ile parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Parçalanmış cDNA, biyotine kovalent olarak bağlı Affymetrix tescilli DNA işaretleme reaktifi kullanılarak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ile etiketlenmiştir. Fragmentasyon ve etiketleme işlemi için 5.5 µg tek zincir cDNA kullanılmıştır. Çizelge 4.9. da yer alan reaksiyon karışımı hazırlanmış ve 176 ng/µl olacak şekilde seyreltilen cDNA üzerine eklenmiştir. Örnekler 37ºC'de 60 dakika ardından 93ºC'de 2 dakika son olarak 4 ºC 'de 2 dakika termal cycler da inkübe edilmiştir.

Çizelge 4.9. Fragmentasyon karışımı

Reaktif	**Miktar (µl)**
Nuclease-free Water	10
10X cDNA Fragmentation Buffer	4.8
UDG, 10 U/µL	1
APE 1, 1,000 U/µL	1
Toplam	**16.8**

Fragmente edilen örnekler buz üzerine alınmış ve Çizelge 4.10.da yer alan etiketleme (labeling) reaksiyonu karışımı eklenmiştir. 37ºC'de 60 dakika ardından 70ºC'de 10 dakika son olarak 4 ºC 'de 2 dakika termal cycler da inkübe edilmiştir.

Çizelge 4.10. Etiketleme karışımı

Reaktif	**Miktar (µl)**
5X TdT Buffer	12
DNA Labeling Reagent, 5 mM	1
TdT, 30 U/µL	2
Toplam	**15**

Bu aşamadan sonra hibridizasyon, yıkama-boyama ve tarama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için Hybridization, Wash and Scan kiti kullanılmıştır. Örnekler ile 100 format için uygun hibridizasyon koktaili hazırlanmış ve 99ºC'de 5 dakika son olarak 45 ºC 'de 5 dakika inkübe edildikten sonra ve Mouse Gene 2.0 ST array'e yüklenmiştir. Her örnek 45ºC'de 16

saat 60 rpm hibridizasyon fırını içinde bekletilmiştir. Bu işlemin ardından Affymetrix Fluidics Station 450'de uygun yıkama ve boyama protokolü (FS450_0002) ile yıkanmış ve Affymetrix Scanner 7G kullanılarak taratılmıştır.

4.2.4. BİYOİNFORMATİK VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Hibridize edilen affymetrix genechip® mouse gene 2.0 st arrayleri AGCC launcher programı yardımıyla fludics station 450'de yıkanmış ve sonrasında affymetrix genechip scanner 3000'de taranıp ham veri olan .arr uzantılı dosyalar elde edilmiştir. AGCC viewer yazılımı yardımıyla .cel dosyaları oluşturulmuş ve ham veriye ait kontroller yapılmıştır. Ham ifade düzeyi değerlerini taşıyan .cel dosyalarının ön-işleme ve normalizasyon işlemleri Affymetrix® firması tarafından sağlanan Affymetrix® Expression Console (v1.4.0) programı ile normalizasyon sonrası işlemler (istatistiksel analizler) ise BRB-ArrayTools (v4.3.2) programı ile yapılmıştır.

Mikrodizin miRNA ifade verisi RMA (Robust Multiarray Average) (238) metodu kullanılarak Affymetrix® Expression Console (v1.4.0) programında normalize edilmiştir. Normalizasyon teknik farklardan dolayı ortaya çıkabilecek farklılıkları (spesifik olmayan bağlanma, yıkama ve boyama aşamasından kaynaklanabilecek farklılıklar, arka plan gürültüsü gibi) eleyerek biyolojik veri üzerindeki gerçek farkların ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır. RMA normalizasyon yöntemi, arka plan düzeltmesi (background correction), quantile normalizasyon ve verinin logaritma 2 tabanına dönüştürülmesini içeren bir pakettir.

Ham verinin analizi sonucunda ifade profili en çok değişen gen listeleri belirlenmiş ve bu genlerin zenginleştiği sinyal iletim sistemlerini araştırmak için WebGestalt (WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit) (http://www.webgestalt.org/) (239) aracılığıyla yolak zenginleştirme analizleri yapılmıştır. Ayrıca farklılık gösteren listelerdeki genlerin fenotip analizi ve GO fonksiyon analizleri de gerçekleştirilmiştir.

Araştırmadaki deneyler en az iki biyolojik tekrar kulanılarak yapılmıştır. Student's t-test kullanılarak istatistiksel olarak anlamlı olduğu düşünülen farklılıklar analiz edilmiş ve anlamlılık derecesi $p<0,05$ olarak alınmıştır.

4.2.5. EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR ILE GEN İFADE PROFİLLERİNİN DOĞRULANMASI

Transkipsiyon ve biyoinformatik analizler sonucunda HL-1 AF modelleri ve kontrol gurubu arasında ifade farklılığı gösteren ve moleküler belirteç özelliğine sahip olduğu bilinen *CACNA1G, CACNA1H, MYH6, MEFC2, DAG1, SLC8A1* ve *TNNC1* genlerinin ifade seviyelerini hassas bir şekilde doğrulayabilmek için bu genler bölgelerine yönelik primerler tasarlanmıştır ve primer dizi listeleri Çizelge 4.11. de belirtilmiştir. Belirlenen primerler kullanılarak Çizelge 4.4. de belirtilen koşullarda eş-zamanlı kantitatif PZR analizi yöntemiyle seçilen 4 farklı uyarım süresine göre ifade profilleri ile kontrol grubu örneklerinin ifade profilleri incelenmiştir. Bu genlerin ifade analizleri için *HPRT* geni house-keeping gen olarak kullanılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen Ct verilerinin analizleri ΔΔCt metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

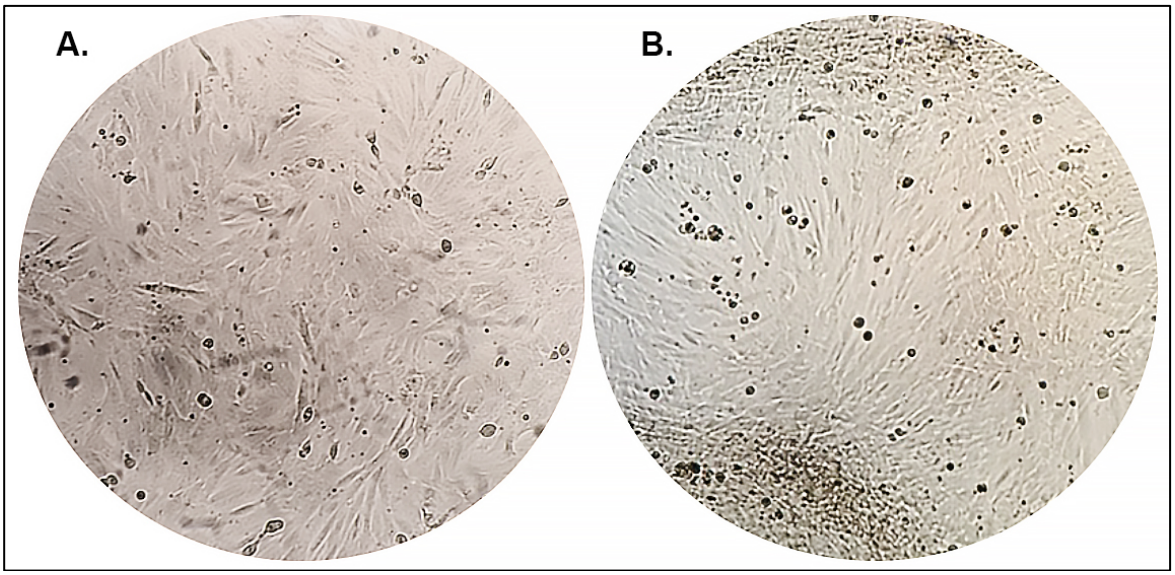
Çizelge 4.11. Eş-zamanlı kantitatif PZR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri.

Primer Adı	**Dizi (5'-3')**	**Ürün uzunluğu (bp)**
CACNA1H_F	ACCTACACAGGTCCCATCAG	111
CACNA1H_R	CAGAGTATCCGTGAGAGGCT	
CACNA1G_F	ATTTTTGAGGCGAAAGCGTC	147
CACNA1G_R	GTTCTCGCTTTCCGTTGAAG	
SLC8A1_F	CAGAAATAGGAGCCATCTTCG	127
SLC8A1_R	AGACTGAAAAGGCAAACACAC	
DAG1_F	GCGCTGAAGGCTAGTCGG	173
DAG1_R	AGTGCCAGGCAGTGTTGAAA	
MEF2C_F	CAGAGGGATCACGCATCTCA	202
MEF2C_R	GGAAGTTGTTCCCGTCAGCA	
MYH6_F	AGCTACAGTTGAAGGTGAAGGC	204
MYH6_R	GTTATTCCTCGTCGTGCATCTT	
KCNH2_F	CAGAACACCTTCCTCGACACC	104
KCNH2_R	TTGCAGTAGATGACAGCGCA	
TNNC1_F	TGAAGGACGACAGCAAAGGG	188
TNNC1_R	TCGGCCATCGTTGTTCTTGT	
HPRT_F	GTTGGGCTTACCTCACTGCT	125
HPRT_R	TAATCACGACGCTGGGACC	

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 ATRİYAL FİBRİLASYON MODELİ

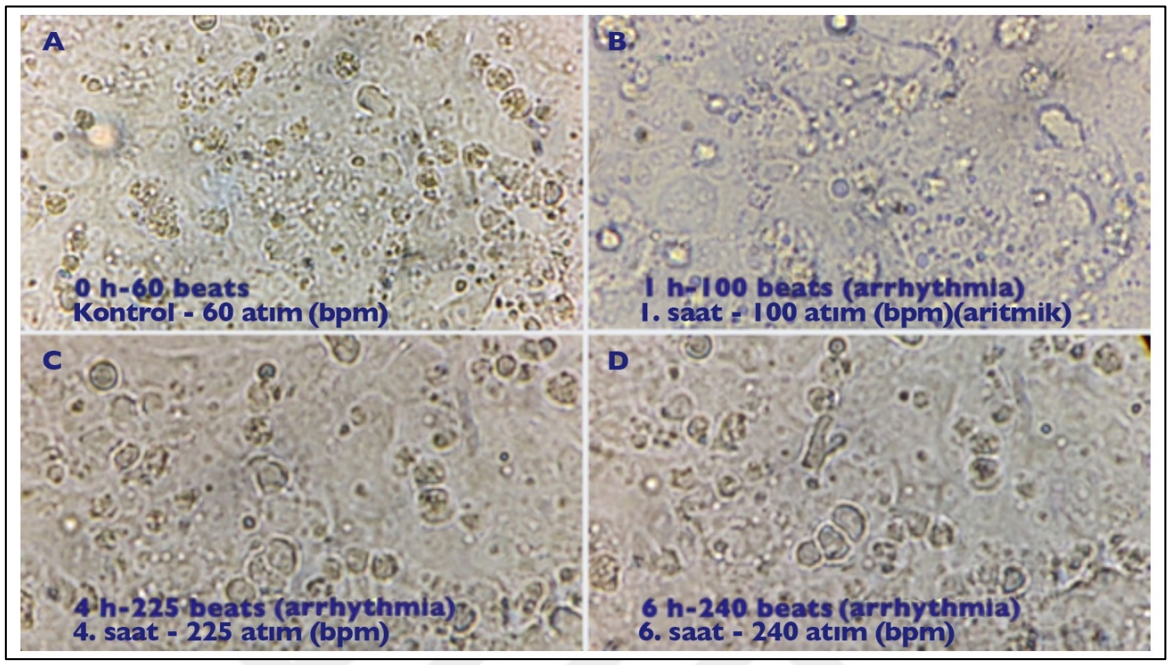
HL-1 fare atriyal miyositlerde oluşturulması amaçlanan AF modelinden önce yine fare kardiyomiyosit hücre hattı olan H9C2 hücrelerine 6. saat boyunca uygulanan elektriksel uyarım sonucunda inverted mikroskop görüntülerinde kardiyomiyositlerin kasılarak morfolojilerinde değişiklik olduğu gözlenmiştir ve uyarımın devamı boyunca araya toplanarak kümelendikleri gözlenmiştir (Şekil 5.1.)



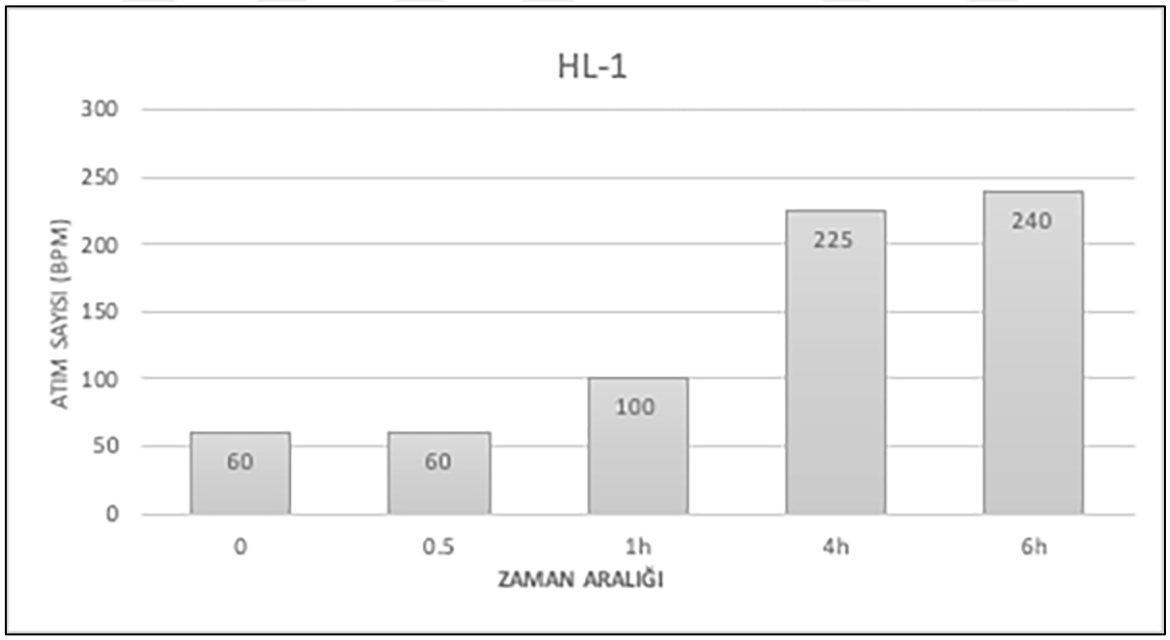
Şekil 5.1. Elektriksel akım uygulanan H9C2 hücrelerinin 6. saat sonrasındaki morfolojik görünümleri. (A. Kontrol, B. Uyarımdan sonraki 6. saat.)

H9C2 hücreleriyle yapılan denemeler sonucu gözlenen morfolojik değişim sonucunda HL-1 hücre hattında AF modellemesi amaçlanarak, aynı akım ve koşullarda 24 saat boyunca elektriksel uyarımları gözlenmiştir. Kontrol olarak HL-1 hücrelerine elektriksel uyarı verilmeden önce atım sayıları ölçülmüş ve şekilde dakika düzenli olarak 60 atım (bpm) yaptıkları gözlenmiştir. Uyarım süresince ve 30 dk sonunda yapılan ölçümde atım sayısında bir değişiklik olmadığı ancak 1. saatten itibaren hücrelerin atım sayısının 100 bpm e yükseldiği ve hücrelerin atım ritminde düzensizlik olduğu gözlenmiştir. İlerleyen zaman dilimlerinde uyarım süresince zaman dilimlerine bağlı olarak; 1 saat 30 dakika sonucunda atım sayısının 105 bpm, 4. saat sonunda ~225 bpm ve 6. saat sonunda ~240 bpm e ulaştığı görülmüştür ve mikroskop kayıtları alınmıştır (Şekil 5.2.). Bu değer atriyal fibrilasyon

hastalarında gözlenen aritmik atım sayısına (~300 pbm) paralellik göstermektedir (Şekil 5.3.)

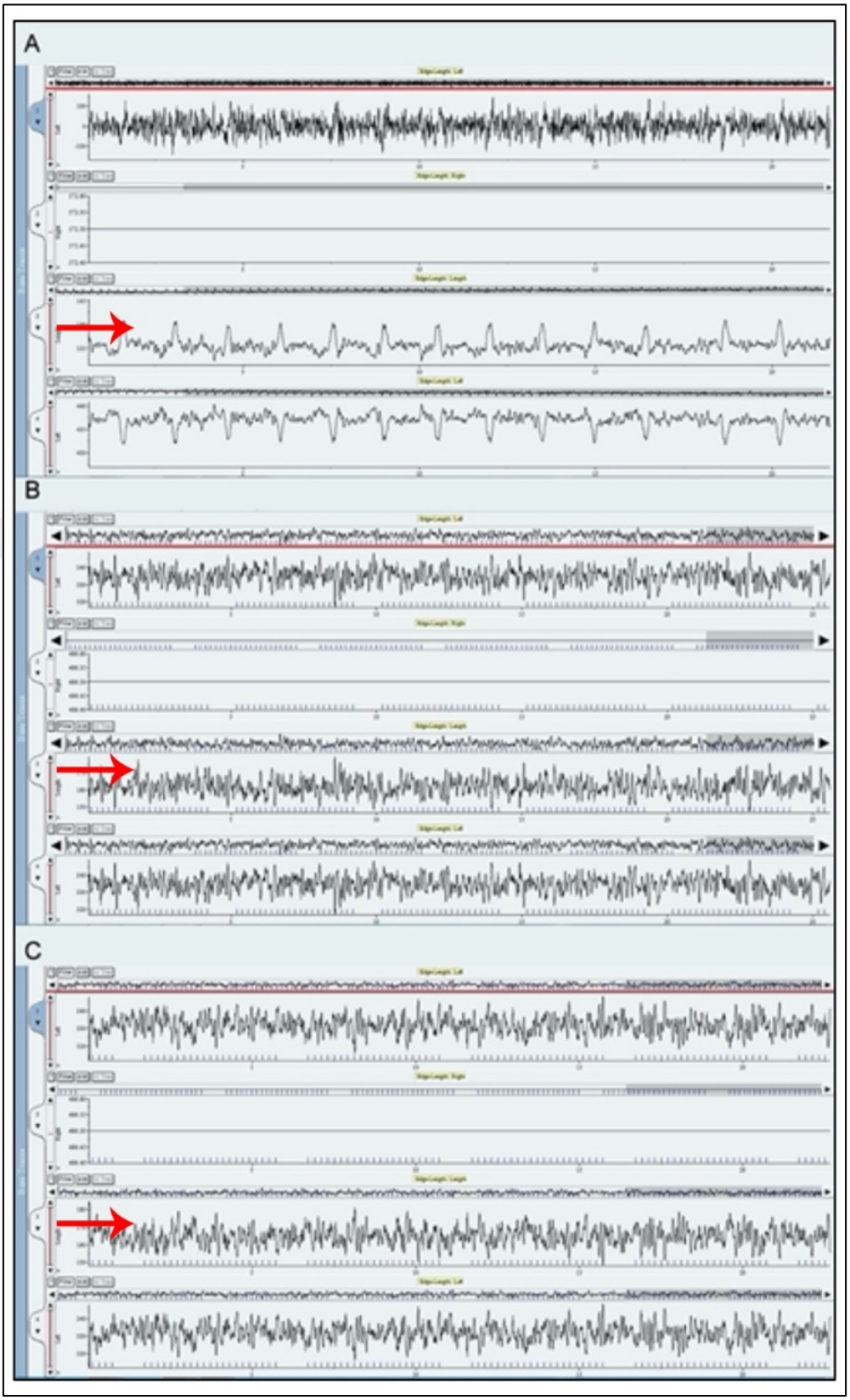


Şekil 5. 2. Elektriksel uyarım sonucu HL-1 hücrelerinin mikroskop görüntüleri. A. elektriksel uyarım öncesi kontrol grubu, B. uyarımın 1. saat süresi, C. uyarımın 4. saat süresi, D. uyarımın 6. saat süresi.



Şekil 5.3. HL-1 hücrelerinin elektriksel uyarım zamanına bağlı olarak dakikada yaptıkları atım sayısının değişimi.

HL-1 hücre hattı AF modelini doğrulamak amacıyla, IonOptix Myocyte Calcium Photometry and Contractility Systems kullanılarak hücrelerin uyarım verildiği sırada elektrokardiyogram görüntüleri kayıt edilmiştir (Şekil 5.4.). Elde edilen kayıtlara göre uyarım verilmeyen kontrol grubu hücrelerde düzenli dalgalar gözlemlenirken, uyarımın 3. ve 6. saat örneklerinde hücre atım dalgalarında düzensizlikler belirlenmiştir.

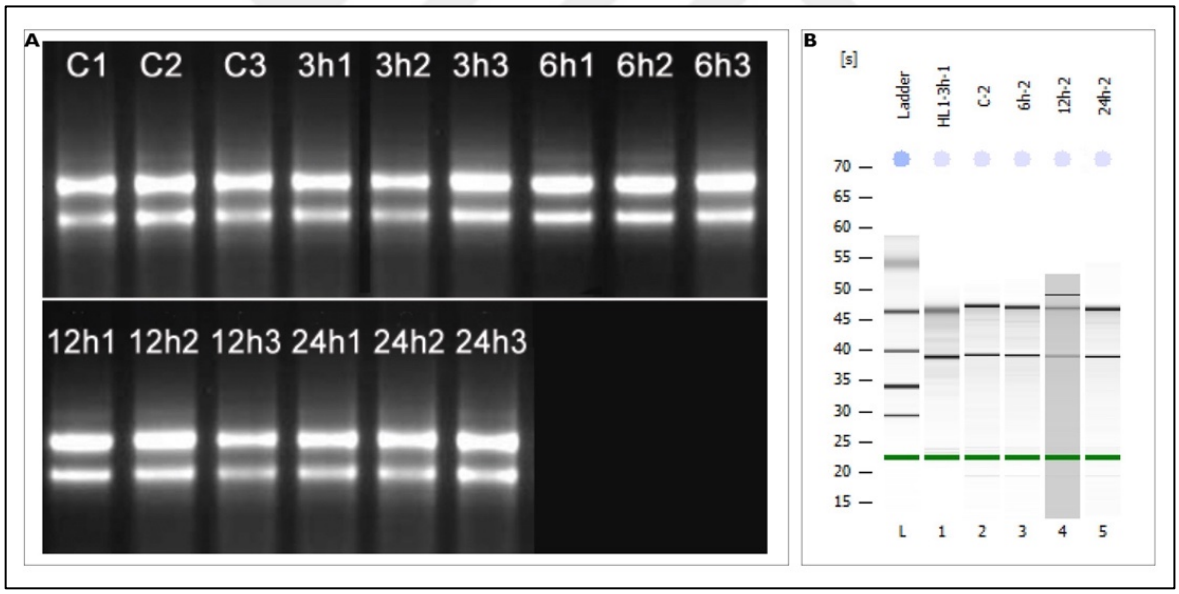


Şekil 5.4. AF modellemesinde uyarım verilen hücrelerin kardiyogram görüntüleri. A. kontrol grubu, B. 3. saat., C. 6. Saat.

5.2. RNA KANTİTASYONU VE EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR GEN İFADE ANALİZLERİ

5.2.1.RNA İZOLASYONU

HL-1 hücrelerinde AF modeli oluşturulduğu hücre hattı morfolojisinde doğrulanmıştır. Ancak bu modelin doğruluğu gen ifade değişimleri ile desteklenmesi amaçlanmıştır. Elektriksel akım uygulanmadan önce alınan örnekler kontrol grubu olarak kullanılmış, uyarım sonrasında 3., 6., 12. ve 24. saat örneklerin 3 biyolojik tekrarı alınarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde 100V'da 30 dakika yürütülerek, UV görüntüleme sistemi (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) kullanılarak intakt total RNA görüntüsünde 18S ve 28S bantları gösterilmiştir. Agaroz jel görüntülerinin yanı sıra, her örnek gurubundan bir RNA alınarak Agilent Genomics 2100 Bioanalyzer Instrument sistemiyle incelenmiş ve her iki sonuç Şekil 5.5. da sunulmuştur.



Şekil 5.5. RNA görüntüleri. A. %1 lik agaroz jel görüntüsü. B. Agilent Bioanalyser (C; kontrol grubu,3h; 3. saat, 6h; 6. saat, 12h; 12. saat ve 24h; 24. saat RNA örneklerini temsil etmektedir).

RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (NanoDrop ND 1000) kullanılarak ölçüm yapılmıştır 260 nm RNA'nın, 280 proteinin ve 230 ise fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyudur. RNA'nın saflığı değerlendirilirken A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranlarına bakılmaktadır. Saf RNA'nın

A260/A280 oranı 1,8-2 arasında olması gerekirken A260/A230 oranının 2'ye çok yakın olması gerekmektedir. Elde edilen RNA' ların istenilen miktar ve saflıkta oldukları gözlenmiştir (Çizelge 5.1.).

Çizelge 5.1. RNA miktar ve saflık değerleri C; kontrol grubu,3h; 3. saat, 6h; 6. saat, 12h; 12. saat ve 24h; 24. saat RNA örneklerini temsil etmektedir).

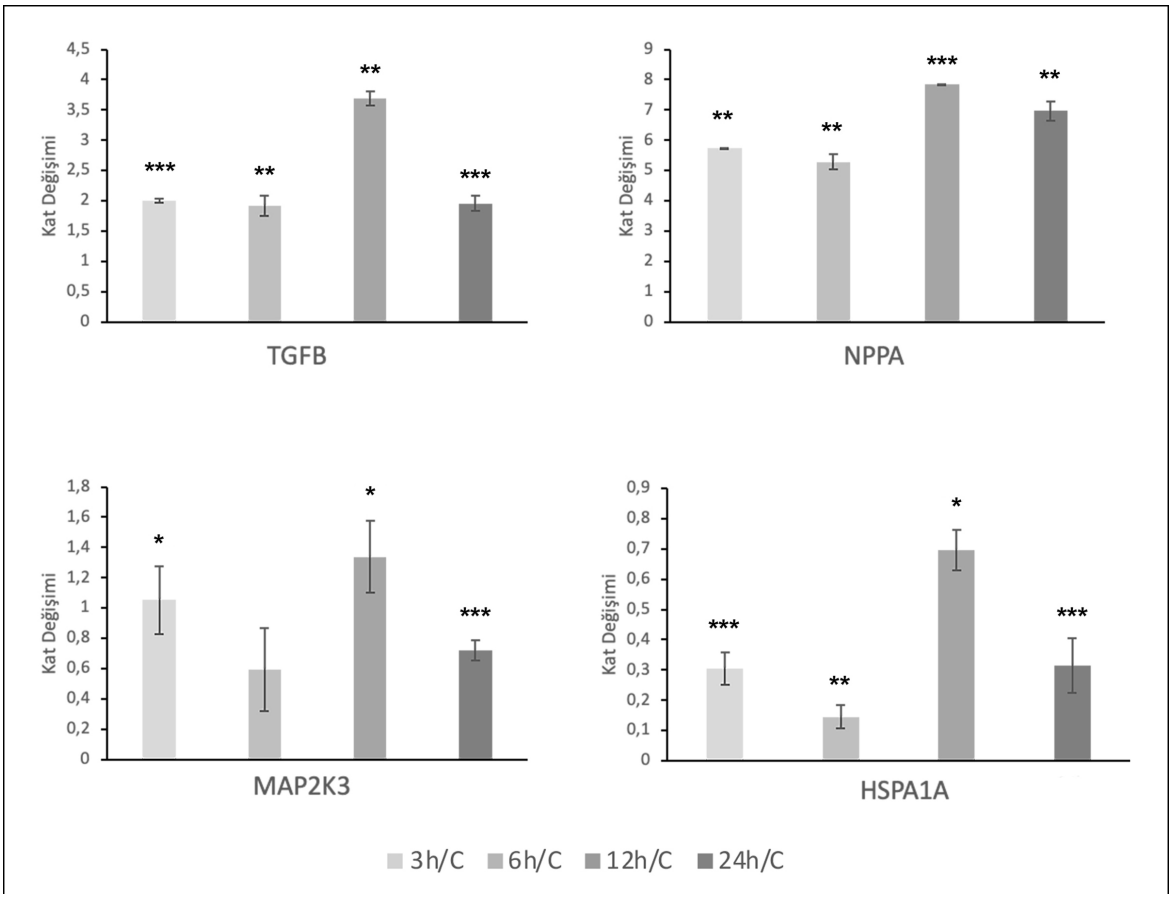
RNA kodu	**Konsantrasyon (ng/µl)**	**A_{260}/A_{280}**	**A_{260}/A_{230}**
C-1	888,00	2,01	1,80
C-2	763,00	2,00	1,99
C-3	849,00	2,01	1,96
3h-1	847,78	2,08	1,92
3h-2	704,55	2,09	2,04
3h-6	646,31	2,04	2,02
6h-1	976,23	2,06	1,91
6h-2	728,48	2,07	2,00
6h-3	524,10	2,13	1,87
12h-1	836,24	2,06	2,12
12h-2	744,97	2,08	2,12
12h-3	930,29	2,07	2,04
24h-1	851,15	2,07	2,19
24h-2	620,61	2,06	2,07
24h-3	896,05	2,07	2,04

5.2.2. EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR İLE AF MODELİ DOĞRULANMASI

İzole edilen total RNA'ların miktar, saflık ve kalitelerinin eş-zamanlı kantitatif PZR analizleri için uygun olduklarının tespit edilmesinin ardından her RNA örneğinden cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir. *HSPA1A, TGF-β1*, *NPPA* ve *MAP2K3* genleri için tasarlanan primerler öncelikle çalışma sıcaklığını belirleyebilmek amacıyla PZR ile optimize edilmiştir.

Eş-zamanlı kantitatif PZR analizleri ile her bir genin 4 farklı uyarım süresinde değişen ifade profilleri kontrol gurubuyla karşılaştırılmış ve *HPRT* geni referans olarak kullanılmıştır. Elde edilen kat değişim verileri Şekil 5.6. da gösterilmiştir. Oluşturulan hücresel AF modelinde, *HSPA1A* gen ifadesinin 3. saatten itibaren, 6.saat sonunda azaldığı belirlenirken, 12. saat sonunda ifade düzeyinin arttığı ve 24. saat sonunda azalma olduğu tespit edilmiştir. *NPPA* gen ifadesi 3. saat sonunda artış, 6. saatte azalış görülürken, 12.saatte en yüksek ifade

düzeyini göstermiş ve 24.saatte kısmi azalma göstermiştir. *NPPA* gen ifadesine benzer olarak, *TGF-βI* geninde olarak 3.saatte ifade artışı, 6.saatte ifade azalışı görülürken, 12.saat sonunda en yüksek ifade değeri ve 24. saat sonunda 3. Saat ifade değerine geldiği görülmüştür. Son olarak *MAP2K3* gen ifadesinde 3. saat sonunda aynı oranda kısmi olarak arttığı, 12. saat sonunda en yüksek seviyeye ulaştığı ve 24 saat sonrasında azaldığı görülmüştür.



Şekil 5.6. Eş-zamanlı PZR analizi sonucu değişen gen ifade profilleri (n=3 *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0001).

HL-1 hücrelerine uygulanan elektriksel akım sonucunda AF modelinin oluşturulduğu görsel olarak tespit edilirken, gen ifade analizlerinden elde edilen verilerle desteklenmiştir. Bu analizler sonucunda mikrodizin analizleri için uyarım süreleri, 3.,6.,12. ve 24. saat olarak belirlenmiştir.

5.3. MİKRODİZİN ANALİZLERİ

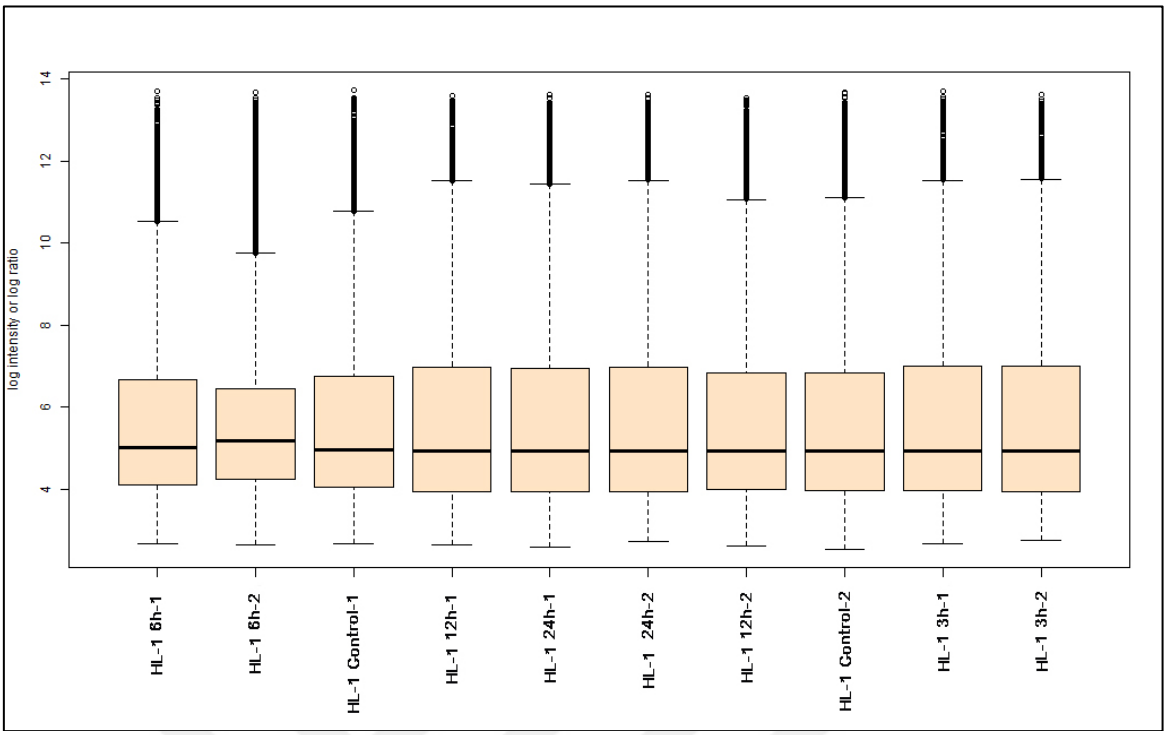
5.3.1. MİKRODİZİN ANALİZLERİ

RNA örneklerinin kullanıldığı mikrodizin analizinin ön aşamalarında gerçekleştirilen cRNA ve ss-cDNA pürifikasyonları sonucunda spetrofotometrik ölçümler yapılarak, Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST uygunlukları test edilmiştir (Çizelge 5.2.). Her örnek için 2 teknik tekrar yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.2. Mikrodizin analizinde kullanılan cRNA ve ss-cDNA kantitasyon verileri

	cRNA			**ss-cDNA**		
Örnek Kodu	**Konsantrasyon (ng/µl)**	**A260/280**	**A260/230**	**Konsantrasyon (ng/µl)**	**A260/280**	**A260/230**
C-1	4089,45	1,91	1,94	600,73	2,15	2,26
C-2	3330,9	2,12	2,18	538,45	2,17	2,26
3h-1	3158,56	2,15	2,21	488,61	2,15	2,33
3h-2	2834,48	2,16	2,24	476	2,15	2,27
6h-1	3938,26	1,99	2,06	587,67	2,18	2,32
6h-2	4110,74	1,9	1,93	630,26	2,17	2,3
12h-1	2896,06	2,14	2,22	576,25	2,14	2,28
12h-2	2746,32	2,17	2,24	534,63	2,13	2,24
24h-1	2317,15	2,18	2,26	482,53	2,13	2,26
24h-2	2478,07	2,17	2,25	549,68	2,12	2,17

Mikrodizin analizinden elde edilen ham veri RMA normalizasyon yöntemi ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi teknik farklılıkları eleyerek gerçek farkların ortaya çıkarılmasını sağlamakta ve örnekleri birbiriyle sağlıklı şekilde kıyaslanabilir kılmaktadır (Şekil 5.7.)



Şekil 5.7.RMA normalizasyon sonrası her bir örneğe ait sinyal değerlerinin kutu grafiği (boxplot).

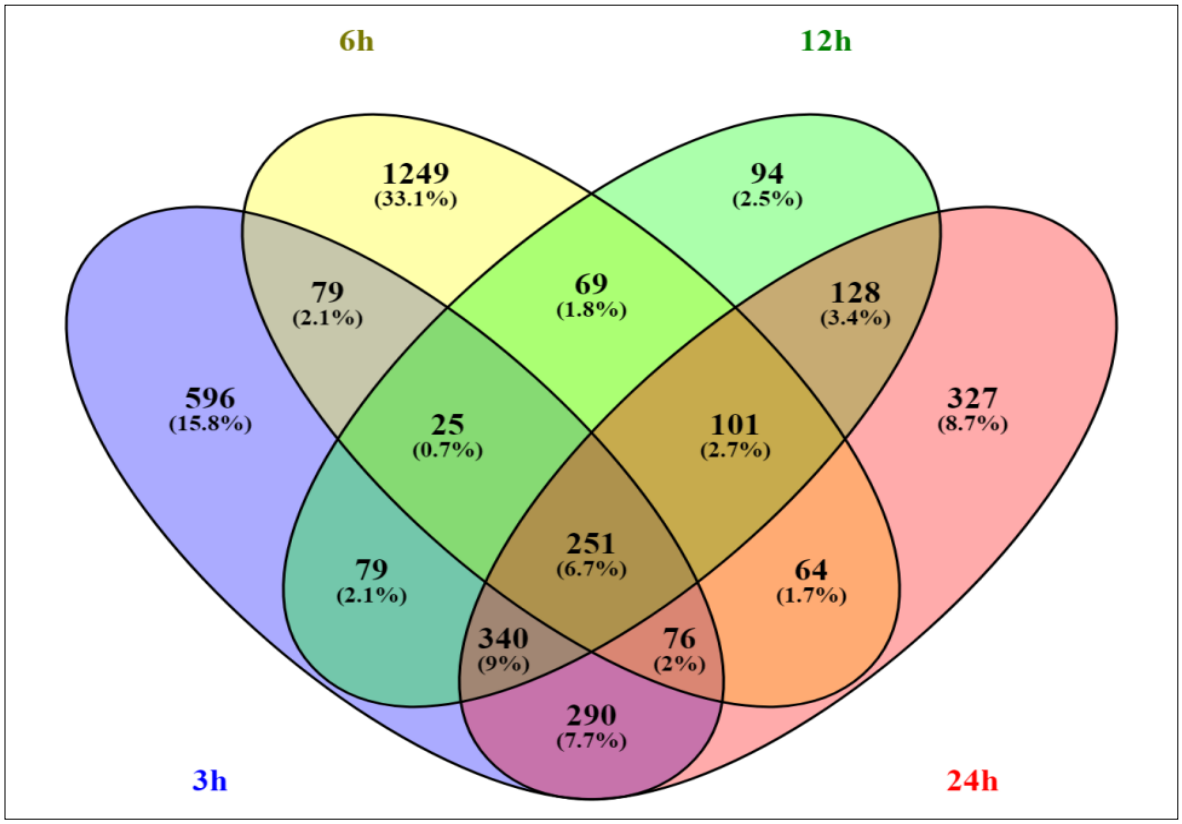
5.3.2. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER VE GEN İFADE PROFİLLERİ

HL-1 AF modelleri ile kontrol grubu arasında ilk olarak 2 kat ve üzerinde (Fold Change-F.C.>2), sonrasında 1,25 (Fold Change-F.C.>1,25) kat ve üzerinde ifade farklılığı görülen genler setleri belirlenmiş ve her uyarım süresi için gen sayıları Çizelge 5.3. te verilmiştir.

Çizelge 5.3. AF model uyarım sürelerine bağlı olarak ifadesi değişen gen sayıları kat değişimi (Fold Change-F.C.)

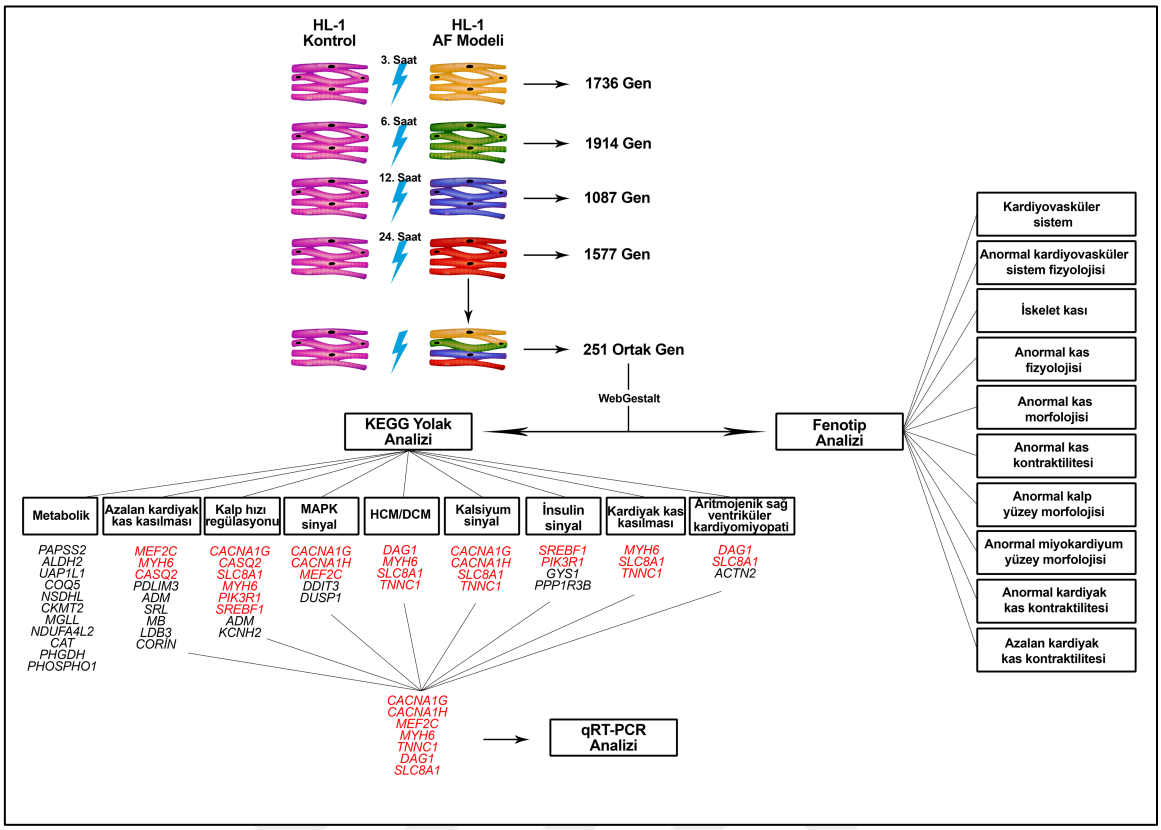
	F.C >2		**F.C >1.25**	
Uyarım süresi	**İfadesi Artan**	**İfadesi Azalan**	**İfadesi Artan**	**İfadesi Azalan**
3h (3.saat)	1253	483	3071	1758
6h (6.saat)	616	1298	1581	2017
12 (12.saat)	796	291	2248	1067
24h (24.saat)	1073	504	2829	1803

İfadesi değişen gen listeleri VENNY programı (240) (https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html) kullanılarak her elektriksel uyarım süresinde ifadesi değişen ortak genler belirlenmiştir. 4 farklı zamanda ifadesi değişen ortak gen sayısı 251 olarak tespit edilirken, 1249 genin sadece 6. saat sonunda farklı ifadelendiği dikkat çeken bir veri olarak gözlenmiştir (Şekil 5.8.)



Şekil 5.8. Uyarım zamanlarına göre ifade farklılığı gösteren genlerin VENNY şeması (F.C>2).

Yapılan mikrodizin analizleri sonucunda 2 kat ve üzeri ifade farklılığı olduğu belirlenen ortak 251 genin zenginleştiği yolaklar WebGestalt programı aracılığıyla analiz edilmiştir. Ayrıca farklılık gösteren listelerdeki genlerin fenotip analizi ve GO fonksiyon analizleri de gerçekleştirilmiş ve Şekil 5.9 da analiz akış şeması gösterilmiştir. Fenotip analizi sonucunda ifade değişimi gözlenen genleri dağılım ve sayıları Çizelge 5.4'te yer almaktadır.



Şekil 5.9. Fenotip ve yolak analizleri akış şeması.

Çizelge 5.4. AF modeliyle ilişkilendirilen fenotipler ve gen sayıları.

Fenotip	**Gen Sayısı**	***adj* P değeri**
Kardiyovasküler sistem	33	2,66e-05
Anormal kardiyovasküler sistem fizyolojisi	28	3,63e-06
İskelet kası	23	5,88e-05
Anormal kas fizyolojisi	19	2,16e-05
Anormal kas morfolojisi	19	3,45e-05
Anormal kas kontraktilitesi	13	6,94e-06
Anormal kalp yüzey morfolojisi	13	3,45e-05
Anormal miyokardiyum yüzey morfolojisi	13	3,45e-05
Anormal kardiyak kas kontraktilitesi	11	6,94e-06
Azalan kardiyak kas kontraktilitesi	9	3,45e-05

KEGG yolak analizleri sonucunda elde edilen verilere göre, 2 kat ve üzeri gen ifadesi değişen genlerin zenginleştiği dikkat çeken başlıca yolaklar; *Azalan kardiyak kas kasılması (Decreased cardiac muscle contractility)*, *Kalp hızı regülasyonu(Regulation of heart rate), Hipertrofik kardiyomiyopati (HCM-Hypertrophic Cardiomyopathy), Kalsiyum sinyal yolağı (Calcium Signaling Pathway), MAPK sinyal yolağıı, Mapk Signaling Pathway)ve Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati (ARCV - Arrythmogenic Right Ventricular*

Cardiomyopathy) olarak gözlemlenmiştir. Yukarıda belirtilen yolaklar ve diğer yolaklarda anlamlı ifade değişimi gösteren gen sayıları Çizelge 5.5. de sıralanmıştır.

Çizelge 5.5. GO analizi sonucunda belirlenen yolaklar ve gen sayıları (F.C >2)

Yolaklar	**Gen sayıları (F.C >2)**
Metabolik yolaklar	11
Azalan kardiyak kas kasılması	9
Kalp hızı regülasyonu	7
MAPK sinyal yolağı	5
Hipertrofik kardiyomiyopati (HCM)	4
Dilate kardiyomiyopati (DCM)	4
Kalsiyum sinyal yolağı	4
Kardiyak kas kasılması	3
İnsulin sinyal yolağı	3
Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati (ARCV)	3

Azalan Kardiyak Kas Kasılması Yolağı Analiz Verileri

Analizlerin sonucunda kat değişimi 2 kat ve üzerinde artış gösteren 9 farklı genin Azalan kardiyak kas kontraktilitesi yolağında yer aldığı görülmüştür. Bu genler ve kat değişimleri Çizelge 5.6. de belirtilmiştir. Bu yolak içerisine dahil olan ve en çok kat değişimi gözlenen genler *MB* (Miyoglobin) ve *ADM* (Adrenomedullin) geni olarak göze çarpmaktadır. Oluşturulan AF modelinde *MB* gen ifadesi uyarımın 3. saatinde, *ADM* gen ifadesi ise uyarımın 6. saatinde en yüksek kat değişim oranlarını göstermiştir. Bu yolak içerisinde yer alan diğer önemli genler ise *CASQ2* (calsequestrin-2), *MYH6* (Myosin, heavy polypeptide-6, cardiac muscle, alpha) ve *MEF2C* (Myocyte enhancer factor 2C) olarak göze çarpmaktadır.

Çizelge 5.6. Azalan kardiyak kas kasılması yolağında yer alan genler ve kat değişimleri.

	Kat değişimi			
Gen	**3h**	**6h**	**12h**	**24h**
PDLIM3	4.2	3.4	4.5	4.79
ADM	3.62	8.99	6.15	5.13
CASQ2	3.04	3.25	3.87	3.74
SRL	2.96	2.66	2.81	3.18
MEF2C	2.47	2.08	2.52	2.42
MYH6	2.6	2.26	2.14	2.17
MB	10.42	7.26	5.97	7.02
LDB3	2.42	2.39	3.32	2.69
CORİN	3.32	2.67	2.49	2.21

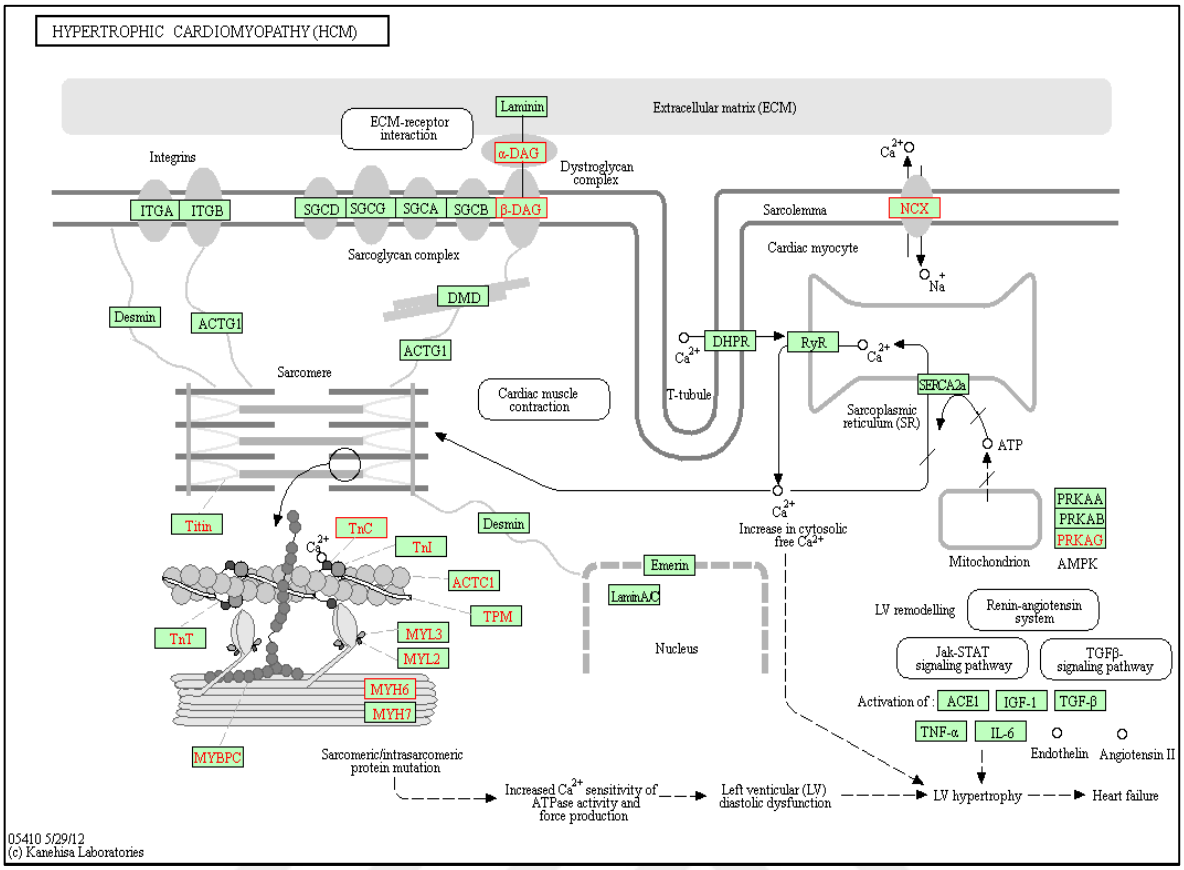
Hipertrofik Kardiyomiyopati Yolağı Analiz Verileri

Dilate kardiyomiyopati ve Hipertrofik kardiyomiyopati yolaklarında aynı 4 genin zenginleştiği belirlenmiş ve genlere ait kat değişimleri Çizelge 5.7. de sunulmuştur.

Çizelge 5.7. HCM yolağında yer alan genler ve kat değişimleri

	Kat Değişimi			
Gen	**3h**	**6h**	**12h**	**24h**
DAG1	2.07	2.14	2.31	2.25
MYH6	2.6	2.26	2.14	2.17
SLC8A1	2.82	2.17	2.91	2.85
TNNC1	2.52	3.02	3.48	3.02

Kardiyak kas kasılması yolağında yer alan *MYH6* geni bu iki yolak içerisinde de yer almıştır. Dikkat çeken bir diğer gen ise yine bu yolak içesinde yer alan ve Na^{+}/Ca^{+2} değiştirici olarak bilenen NCX proteinini kodlayan *SLC8A1* (NCX- çözünen taşıyıcı aile - 8) genidir. Mikrodizin sonuçlarından elde edilen ve bu yolakta zenginleşen genlere ait KEGG yolak analizleri Şekil 5.10 da gösterilmiştir.



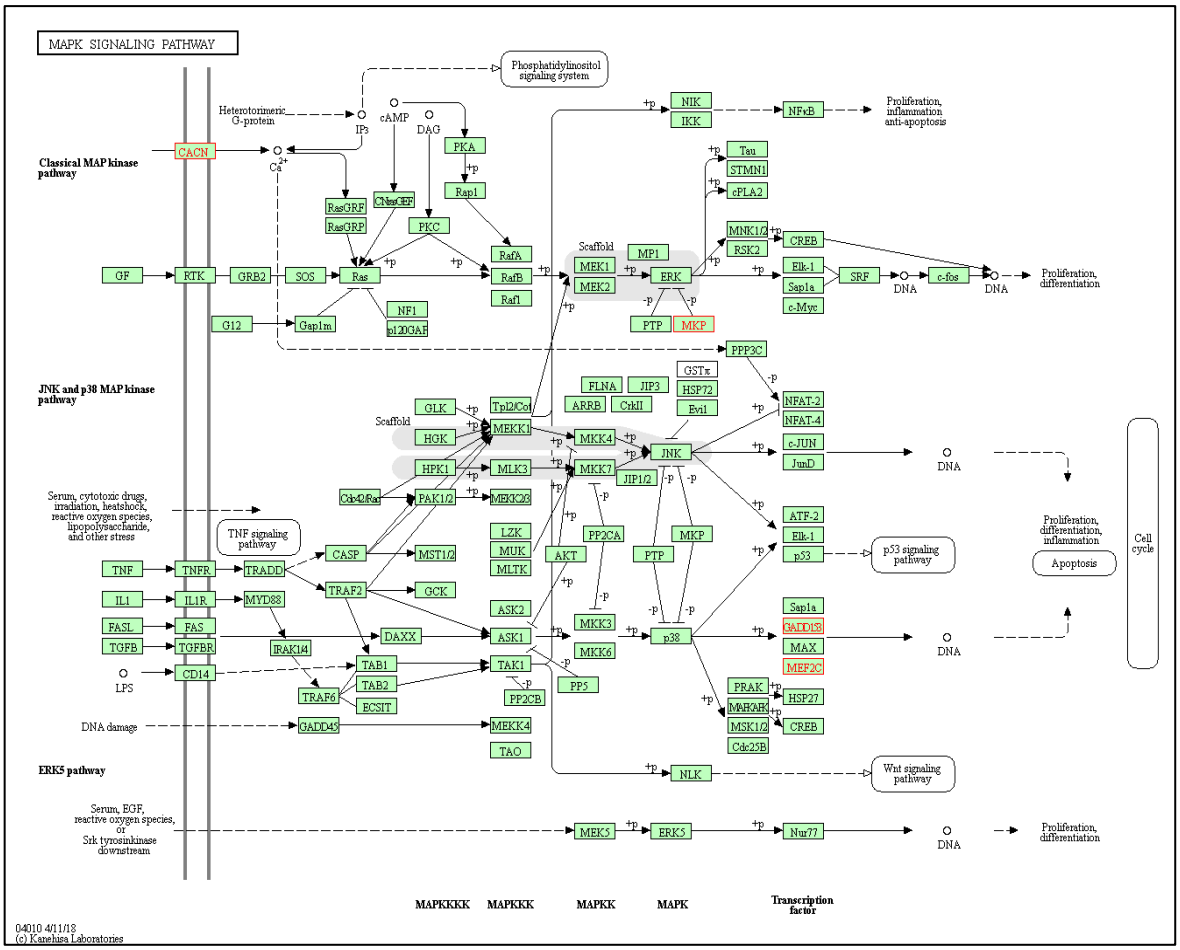
Şekil 5.10. KEGG figüründen alınmış HCM sinyal yolağı ($p<0,001$). Kırmızı ile işaretlenen genler mikrodizin analizi sonucunda elde edilen ifade farklılığı gösteren genleri temsil etmektedir.

Kalsiyum Sinyal Yolağı ve MAPK Sinyal Yolağı Analiz Verileri

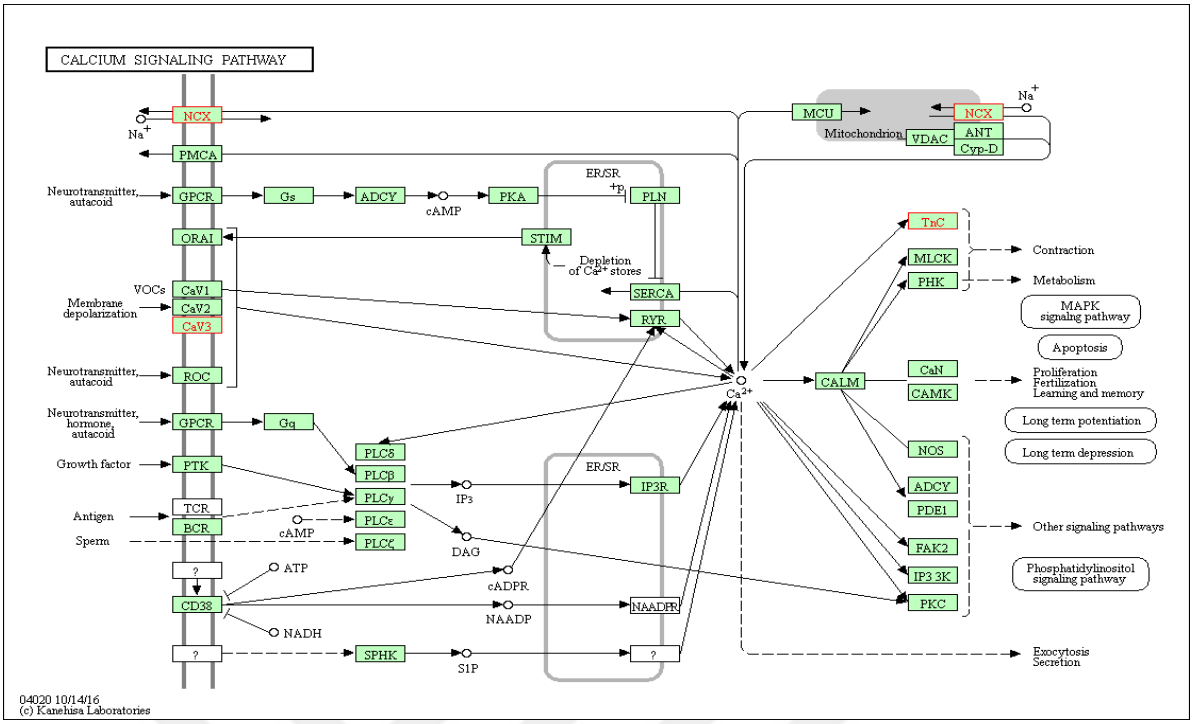
Her iki sinyal yolağında da voltaj bağımlı T-tipi kalsiyum kanal proteini alt birimlerini kodlayan genler olarak bilinen *CACNA1G* (calcium channel, voltage-dependent, T-type, alpha 1G subunit) *CACNA1H* (calcium channel, voltage-dependent, T-type, alpha 1H subunit) genlerinin 2 kat ve üzeri artış ifadesi gözlenirken, *CACNA1G* ifadesinin uyarımın 12. saatinde gösterdiği artış dikkat çeken bir veri olarak göze çarpmaktadır. Kalsiyum sinyal yolağında da HCM yolağında yer alan *MYH6* ve *SLC8A1* genleri görülmüştür. MAPK sinyal yolağında ise farklı olarak *DUSP1* ve *MEF2C* genlerinde ifade artışı görülürken; *DDIT3* (DNA-damage inducle transcritp-3) gen ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Belirtilen genlere ait ifade profilleri Çizelge 5.8 gösterilmiş ve yolaklara ait KEGG yolak analizleri Şekil 5.11 ve Şekil 5.12 da belirtilmiştir.

Çizelge 5.8. MAPK sinyal yolağında yer alan genler ve kat değişimleri

	Kat değişimi			
Gen	**3h**	**6h**	**12h**	**24h**
CACNA1G	3.59	2.73	4.44	3.41
CACNA1H	2.53	2.51	2.66	2.55
MEF2C	2.47	2.08	2.52	2.42
DDIT3	0.48	0.29	0.38	0.49
DUSP1	2.26	2.09	2.74	3.13



Şekil 5.11. KEGG figüründen alınmış MAPK sinyal yolağı ($p<0,001$). Kırmızı ile işaretlenen genler mikrodizin analizi sonucunda elde edilen ifade farklılığı gösteren genleri temsil etmektedir.



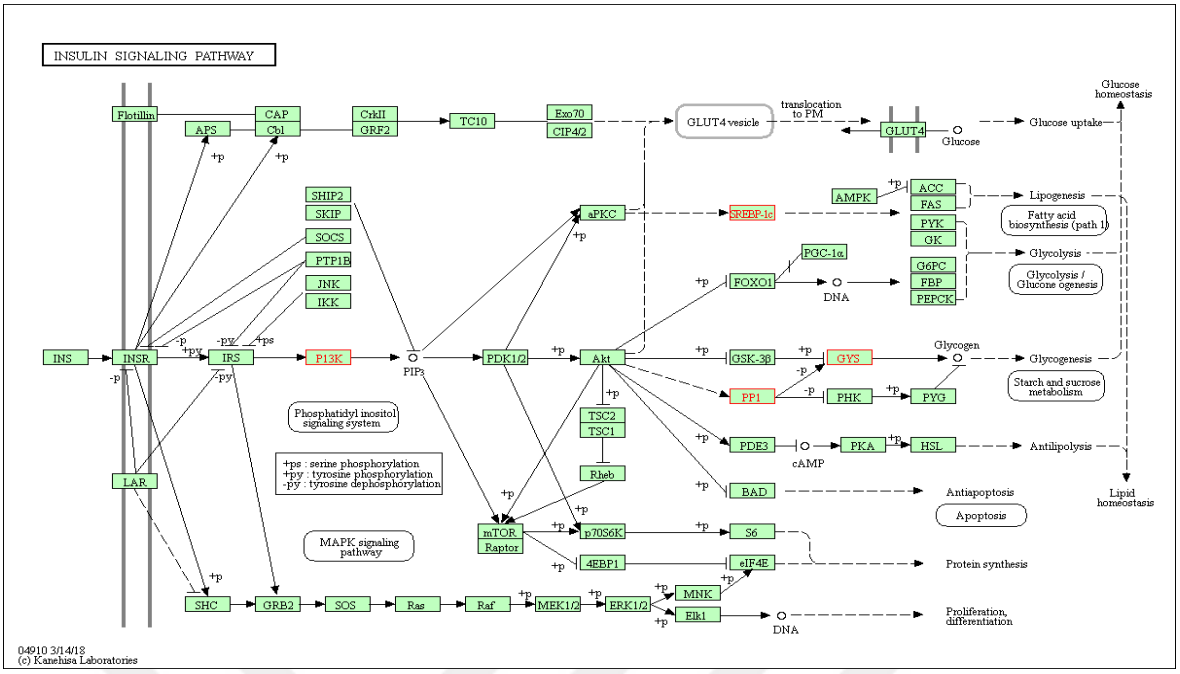
Şekil 5.12. KEGG figüründen alınmış Kalsiyum sinyal yolağı ($p<0,001$). Kırmızı ile işaretlenen genler mikrodizin analizi sonucunda elde edilen ifade farklılığı gösteren genleri temsil etmektedir.

İnsulin Sinyal Yolak Analiz Verileri

İnsulin sinyal yolağında ifadesi değişi gözlenen 4 gen yer almıştır. Bu genlerden *GYS1* (glycogen synthase 1, muscle), *PPP1R3B* (protein phosphatase 1, regulatory subunit 3B) ve *PIK3R1* (phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide) genlerinin AF süresinin tümünde ifade artışı görülürken, *SREBF1* (sterol regulatory element binding transcription factor) geminin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 5.9). Bu genlerin KEGG yolak analizi Şekil 5.13 de gösterilmiştir.

Çizelge 5.9. İnsülin sinyal yolağında yer alan genler ve kat değişimleri

	Kat değişimi			
Gen	**3h**	**6h**	**12h**	**24h**
SREBF1	0.42	0.32	0.45	0.38
GYS1	2.06	2.88	3.04	2.79
PPP1R3B	2.03	2.53	2.18	2.36
PIK3R1	2.13	2.64	2.86	2.51



Şekil 5.13. KEGG figüründen alınmış İnsulin sinyal yolağı (p<0,001). Kırmızı ile işaretlenen genler mikrodizin analizi sonucunda elde edilen ifade farklılığı gösteren genleri temsil etmektedir.

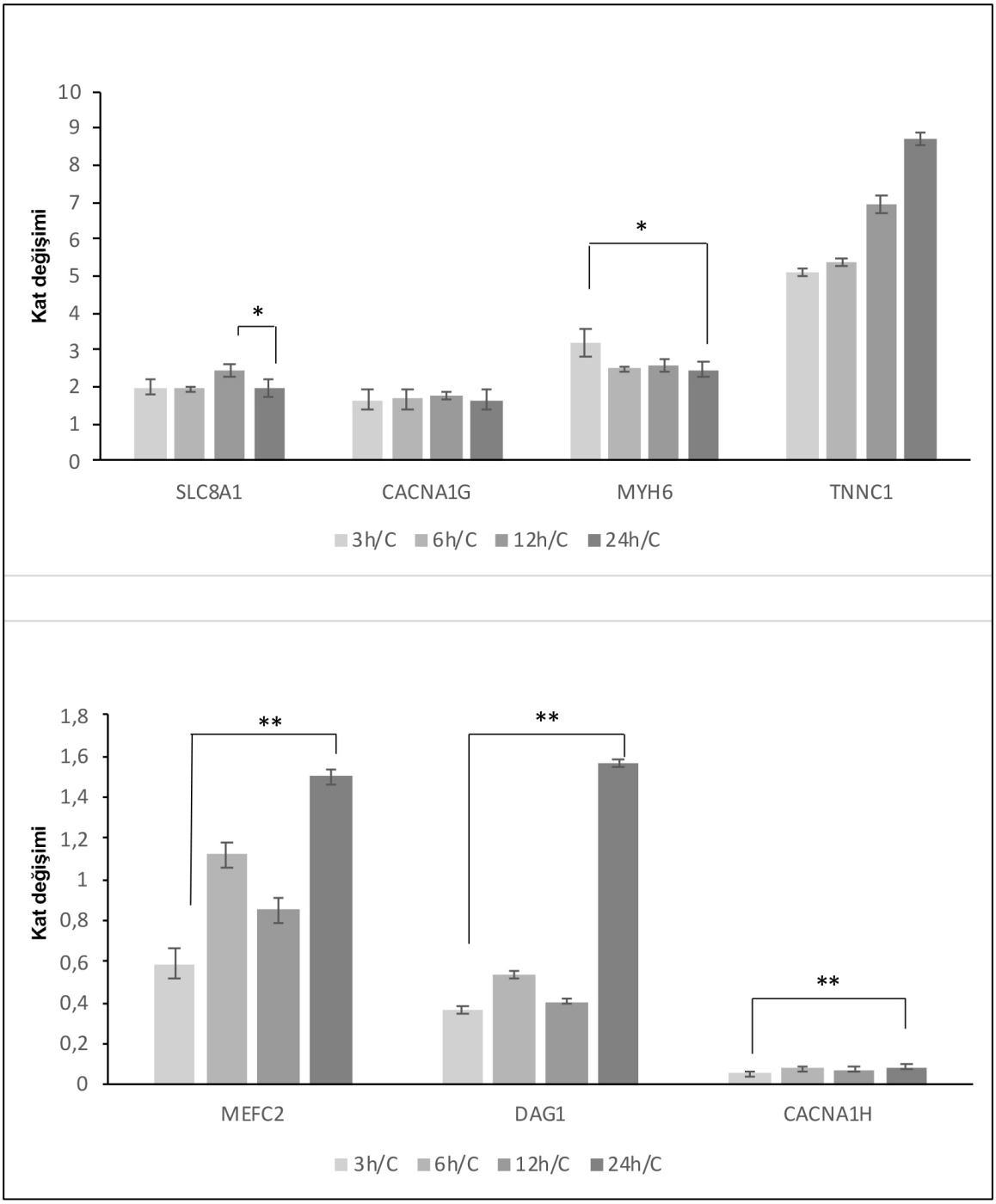
Heat-shock protein ailesinde yer alan *HSP6-HSP8-HSP40* gen ifadelerinin tüm uyarım sürelerinde azaldığı görülürken, bu protein ailesine ait diğer bir gen olan *HSPB7* geninin ifadesinde 3. saat sonunda 6,25, 6. saat sonunda 5,47, 12. saat sonunda 5,5 ve 24. saat sonunda ise 6,86 kat gibi oldukça yüksek düzeyde artışlar tespit edilmiştir.

Aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiyopatisi'nde, hücre-hücre bağlantılarında yer alan ve aktin α-alt ünitesini kodlayan *ACTN2* (Aktin-alfa) gen ifadesinin her uyarım süresince ortalama 2,5 kat sabit artışı görülürken 24. saat sonunda ifadesindeki artış 3,2 kat üzerine çıkmıştır. Kalp hızı regülasyonu yolağında yer alan ve AF ile ilişkilendirilen başka bir gen olan *KCNH2*' nin (Voltaj-geçişli potasyum kanalı h-alt birimi) tüm uyarım süresince 2 kat ve üzerinde ifade artışı görülmüştür.

4.4. RT-PCR İLE GEN İFADE PROFİLLERİNİN DOĞRULANMASI

Genom ebadında ifade analizi sonucu çalışılan iki grup arasında ifade farklılığı gösteren ve AF ile ilişkilendirilmiş *CACNA1G, CACNA1H, MYH6, MEFC2, DAG1, SLC8A1 ve TNNC*1 genlerinin ifade seviyelerinin anlamlı bulunduğu ve bu nedenle verilerin hassas bir şekilde doğrulanması amacıyla bu gen bölgeleri için primerler tasarlanmış ve SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak eş-zamanlı kantitatif PZR ile analizler gerçekleştirilmiştir. Çalışılan

hücre hattı örneklerin iki biyolojik tekrarlı alınan RNA'larından cDNA sentezlenmiş, her bir örnek iki teknik tekrar olarak çalışılarak ifade düzeyinin bağıl olarak saptanması amacıyla kullanılacak olan "housekeeping" gen olarak *HPRT* geni kullanılmıştır. Genlere ait ifade profilleri Şekil 5.14. de gösterilmiştir.



Şekil 5.14.Yapılan eş zamanlı kantitatif PZR analizi sonucunda *CACNA1G, CACNA1H, MYH6, MEFC2, DAG1, SLC8A1 ve TNNC1* genlerinin ifade seviyeleri (n=2 * p<0.0001, **p<0.00001)

DAG1-MEFC-2 genlerinin eş-zamanlı kantitatif PZR verilerinde görülen uyarımın 24. saat ifadeleri ile mikrodizin verileri arasında korelasyon görülmüş olsa da, diğer uyarım sürelerindeki ifade profillerin azalış göstermiştir.

SLC8A1 geninin elektriksel uyarım süresince değişen ifade düzeyleri mikrodizin analizlerine benzer şekilde 12. saat sonunda en yüksek ifade seviyesine ulaşmış ve uyarım sonunda yeniden 3. saat sonunda ki ifade değerine döndüğü görülmüştür. Kalsiyum kanal genleri *CACNA1G, CACNA1H* genlerinin ifade seviyelerine uyarım süresince gösterdikleri ifade profilleri ile mikrodizin analizi sonuçlarını desteklemektedir. *MYH6* gen ifadesinde 3. saat sonunda en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüş ve sonra kısmi bir azalma görülmüştür. Uyarım süresi ve kat değişimlerine bakıldığında elde edilen değerler ile mikrodizin analizlerinin benzer profilde olduğu tespit edilmiştir. İfadesinde yine artış gözlenen *TNNC1* (troponin C, cardiac/slow skeletal) geninin analizlerinde *p* değeri istenilen aralığın dışında görülmüştür.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

AF hücre modelinin oluşturulması

HL-1 fare kardiyomiyositlerinin en önemli özelliği art arda pasajlanabilmesinin yanında, kardiyak morfolojisini, biyokimyasal ve elektrofizyolojik özelliklerini kararlı bir şekilde korumalarıdır. Tipik bir embriyonik atriyal kardiyak kas hücresinin tüm yapısal özelliklerini bu hücre hattında görmek mümkündür (225). Normal hücre kültür koşullarında HL-1 miyosit hücrelerinin bazal aktivasyon frekansları ortalama 0.5 Hz'dir. Bu tez çalışması kapsamında amaçlanan AF modelinde uyarım optimizasyonu aşamasında HL-1 hücre hattıyla paralel olarak H9C2 hücreleri üzerinde farklı uyarım ve frekans değerleri denenmiştir. Hücre hatlarında frekans düzensizliği oluşturmak için 4 saniye boyunca 5 Hz (5Hz/4sn) ve 1 saniye boyunca 1Hz (1Hz/1sn) tekrarlarla 0.5V/cm ile 2.0V/cm arasında farklı uyarımlar gerçekleştirilmiş ve morfolojik gözlemler sonucunda optimum uyarım olarak literatürde de belirtildiği gibi 1.5V/cm belirlenmiştir (228). Dışarıdan elektriksel uyarım verilmeyen kontrol grubu hücrelerinin spontan atım sayısının 60 bpm olduğu kayıt edilmiştir. Uyarım verilen hücrelerin 1 saat sonunda dakikada yaptıkları atım sayısının artmaya başladığı ve 6 saat sonunda atımlarının 240 bpm e ulaştığı kaydedilmiştir (Şekil 5.3.). AF'de insan kalp atriyum hızının da ortalama 300 bpm olduğu bilinmektedir. Hücre hattına uygulanan akım sonucunda amaçlanan HL-1 AF modelinin istenilen düzeyde gerçekleştiği gözlenmesi sonucunda bu modelin doğrulanabilmesi için, hücrelerden alınan kardiyogram görüntüsüyle desteklenmesi amaçlanmıştır. Şekil 5.4. de de görüldüğü üzere, kontrol hücre hattının elektrokardiyogram dalgalarının belirli bir düzende devam ettiği, uyarım veriler hücrelerin 3. ve 6. saat sonunda dalgalarda sıklık ve düzensizlik tespit edilmesi AF modelini doğrulamıştır. İnsanda AF ile birlikte aksiyon potansiyeli ve fizyolojik uyum kaybının ilk 24 saat içinde meydana geliyor olması göz önüne alınarak, hücre HL-1 hücre hattında uyarım sonucu sürekli ve hızlı kasılma sonucunda kontraktilite kaybı ve yoğun besiyeri kullanımı nedediyle elektriksel uyarım süresi olarak 24 saat belirlenmiştir. Zaman noktaları olarak, uyarım başlangıcında elektriksel uyarıma karşı ilk yanıt olarak değişen gen profillerini belirleyebilmek amacıyla 3. saat, klinikte AF ataklarının genellikle 6 saat aralıklarla tetiklendiği verisinden yola çıkarak 6. saat ve uyarıma karşı oluşabilecek

adaptasyon süresi olarak da 12. saat seçilmiştir. Oluşturulan modelin morfolojik gözlemlerle doğrulamasının yanı sıra, gen ifade düzeyinde de doğrulanmıştır. AF ile ilişkilendirilen *HSPA1A, TGF-β1*, *NPPA* ve *MAP2K3* genlerinin AF süresinin belirlenen her bir zaman noktasındaki (3.,6.12. ve 24. saatler) ifade seviyeleri ile kontrol grubu karşılaştırılmış ve zamana bağlı olarak gen ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler HL-1 AF modelini doğrulanmasını sağlamıştır (Şekil 5.6).

AF'de değişen gen ifade profili

AF'nin atriyal doku mimarisinde ve atriyal elektrofizyolojide önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (241). İnsanda AF oluşum patogenezinin tek bir nedeni olmamakla beraber, sorumlu mekanizmalar oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu klinik durumu tetikleyen olaylar ile devam ettiren mekanizmalar da birbirlerinden farklı olabilmektedir. Otonomik düzensizlik, dejeneratif doku değişiklikleri ve fibrozis gibi önceden var olan komplikasyonlar, tetikleyici olaylara yanıt olarak meydana gelen AF olasılığını arttıran morfolojik bir substrat oluşumuna neden olabilmektedir (242). AF gelişimi için, konjestif kalp yetmezliği, aort ve mitral kapak hastalığı, sol atriyal genişlemesi, hipertansiyon, ileri yaş, obezite ve obstrüktif uyku apnesi bağımsız risk faktörleridir (243). AF' nin oluşum sürecindeki mekanizmaların aydınlatılabilmesi için diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak oluşturulan HL-1 AF modelinde ifade profili analizleri için, 4 farklı uyarım süresinde (3.,6.,12 ve 12. saat) ortak olarak 2 kat ve üzerinde değişim gösteren genler üzerinden zenginleştirme analizleriye yer aldıkları yolaklar belirlenmiştir. Bu yolaklar içinde Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati (Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-ARVC) yolağının yer alması oluşturulan modelin doğruluğuna katkı sağladığı belirlenmiştir. İfade değişimi gözlenen genlerin biyolojik süreçte Kalp hızı regülasyonu (Regulation of heart rate) ve Kalp gelişiminde yer aldığı; fenotip analizinde ise Azalan kardiyak kas kasılması (Decreased cardiac muscle contractility) ve Anormal miyokardiyum yüzey morfolojisi (Abnormal myocardium layer morphology), içerisinde zenginleştiği belirlenmiştir (Çizelge 5.4.).

AF oluşum sürecinde hücresel düzeyde patolojik hipertrofi, kardiyomiyositlerin hücresel sinyal modüllerinin içsel ağını aktive edebilen, iyonik basınç veya aşırı yüklenmesi, reaktif oksijen türleri, sitokinler ve dolaşımdaki nörohormonları içeren biyomekanik strese yanıt

olarak kabul edilmektedir (244). HL-1 AF modelinde anlamlı ifade değişimi gösteren genler arasından, daha önce yapılan çalışmalarda AF ile ilişkilendirilen ve Çizelge 2.1. de belirtilen aday genler ile örtüşen ve oluşturulan modelde birden fazla yolakta zenginleştiği belirlenen genler çalışmanın akışı belirlenmiştir. Belirlenen bu genler arasından özellikle iyon kanal proteinlerini kodlayan genlerin elektrofizyolojik aktiviteye direkt etki ederek kalp kasılması regülasyonunda rol almaları sebebiyle, ardışık biyomarker olabilme özelliği taşıdıkları düşünülmüş bunun yanısıra AF fizyopatolojisinde terapötik hedef olabilecekleri düşünülmüştür.

Bu verilerden yola çıkarak, farklı yolaklarda zenginleşen bu 10 gen üzerinden öncelikli olarak, AF patolojisinde meydana gelen atriyal yeniden biçimlenme, intraselüler sinyal ve iyon etkileşimleri ile hipertrofi ve kardiyak gelişim mekanizmalarıyla ilişkilendirilmiş olan; kalsiyum sinyal yolağı (Calcium signaling pathway), hipertrofik kardiyomiyopati (Hypertrophic cardiomyopathy-HCM), dilate kardiyomiyopati (Dilated cardiomyopathy-DCM), kardiyak kas kasılması (Cardiac muscle contraction), MAPK sinyal yolağı (MAPK signaling pathway) ve insulin sinyal yolağı (insulin signaling pathway) yolaklarına odaklanılmış ve detaylandırılmıştır.

Kalsiyum sinyal yolağı

İnsan kalbi içerisinde T-type, P-type, and L-type olmak üzere üç tip kalsiyum kanalı bulunmaktadır. T-tipi kalsiyum kanalları üç farklı homolog a1 alt birimini kapsamaktadır. Bu alt birimler; CaV3.1 (gen: *CACNA1G*), CaV3.2 (gen: *CACNA1H*) ve CaV3.3 (gen: *CACNA1L*). CaV3.1 ve CaV3.2, SA düğümde ifadelenmekte ve fetal yaşamda, aynı zamanda ventriküler miyositlerde de düzenli aktiviteye katkıda bulunmaktadır (245). Hücreler arası I_{Ca} geçişleri, AF sırasında atriyal miyositlerde büyük ölçüde değişmektedir. Yeniden biçimlenen hücre içi Ca^{+2} homeostasisi beraberinde kasılma fonksiyon bozukluğunun gelişmesini ve AF'nin karakteristiği olan atriyal elektrofizyolojide (kontraktil ve elektriksel yeniden biçimlenme) değişikliklerin meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır. Son zamanlardaki çalışmalar, stabil olmayan hücre I_{Ca} sinyallerinin, AF hastalarının atriyal miyositlerinde bulunduğunu ve aritminin devamına neden olan hücresel aritmojenik mekanizmalara katkıda bulunabileceğini göstermektedir. AF'nin tedavisinde yaşanan zorluklar, aritmojenik I_{Ca} geçişlerini önlemek için yeni hedeflerin tanımlanması AF

araştırmasının önemli bir parçası olarak ön plana çıkmaktadır (246). HL-1 AF modeli trankripsiyon verilerinde ifade artışı görülen kalsiyum kanal alt birimlerinin ifadesinde göreve alan *CACNA1G* ve *CACNA1H* genlerinin, eş-zamanlı kantitatif PZR ile doğrulanmış olması, oluşturulan modeli destekleyen başka bir sonuç olarak göze çarpmaktadır (Şekil 5.14.).

Atriyal yeniden biçimlenme süreci farklı noktalarında, Ca^{+2} tutulumu miyofibroblast aktivasyonu, oksidatif stres ve enflamasyon dahil olmak üzere çeşitli moleküler yolakların rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada sol koroner arter anevrizmasi, sol ventrikul anevrizmasi ve AF vakalardan elde edilen veriler ile yolak analizleri yapılmış ve kalsiyum sinyal yolağının AF ile anlamlı olarak ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu yolak içerisindeki 39 genin AF tip ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu genler içerisinde *CACNA1C* (calcium channel, voltage-dependent) üyeleri, *CAMK4, RYR2, SLC8A1, PRKCA* gibi genler yer almaktadır (247). Hücre-içi I_{Ca} sinyal aktivitesi, aritmi başlangıcının öncesinde ve/veya sonrasında atriyal yeniden biçimlenme sürecinin bir parçası olarak karmaşık değişikliklere uğramaktadır (248). I_{Ca} sinyalizasyon susturulması, paroksismal AF sırasında klinik olarak görüldüğü gibi, kısa süreli sürekli atriyal aktivasyon sırasında gelişmektedir. AF' nin başlangıcından sonra Ca^{2+} bazlı aritmojenin rolünü sınırlayabildiği rapor edilmiştir (249). I_{Ca} sinyal aktivitesi, AF ile ilişkili yeniden biçimlenmenin merkezi bir süreci olarak görülmekte ve kardiyak kalsiyum sinyal yolağında yer alan genlerinin mutasyonları, bir dizi aritmi sendromuna neden olabilmektedir. Kalsiyum sinyal yolağının genomik arka planının, yeniden biçimlenme ile ilişkili AF fenotipleri klinik olarak örtüşen bir durum olarak ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada oluşturulan HL-1 AF modelinde ifade artışı gözlenen ve eş-zamanlı kantitatif PZR ile doğrulanan *SLC8A1* (Solute carrier family 8 member 1) geni tarafından ifade edilen NCX'in, I_{Na}/I_{Ca} değişiminde rol aldığı ve kalpte yaygın bir şekilde ifade edildiği bilinmektedir (Şekil 5.12). Bu protein hücre zarı boyunca bulunarak, üç ila dört I_{Na} iyonuna karşı bir I_{Ca} iyonunun değişimine aracılık ederek, sitoplazmik Ca^{2+} seviyelerinin ve Ca^{2+} bağımlı hücresel işlemlerin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (250). Bu protein kalp kasındaki uyarma-kasılma eşleşmesi sırasında I_{Ca} taşınmasında görev almaktadır. SERCA tarafından I_{Ca} salınmasıyla sitoplazmik Ca^{2+} seviyelerinin hızlı bir şekilde artmasına neden olmaktadır. Bu salınımın devamında *SLC8A1*, hücreden I_{Ca} dışarı atılmasını sağlayarak sitoplazmik Ca^{2+} seviyelerini hızla başlangıç seviyesine geri dönmesini uyarmaktadır. Bu proteinin normal embriyonik kalp gelişimi için

gerekli olmasının yanı sıra, kalp kasılmalarının başlaması için gerekli olduğu vurgulanmıştır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, *SLC8A1* ifadesinin RNAi yoluyla baskılanması, aşırı Ca^{2+} basıncı yüklenmesi sonucunda oluşan kardiyak hipertrofiyi hafifletirken, dış kaynaklı *SLC8A1*'in ifadesinin arttırılmasının ise kalp yetmezliği ile sonuçlandığını rapor edilmiştir. İnsan ve fare kalbinde bulunan halkasal *SLC8A1* ifade düzeylerinin değiştirilmesinin, kalp hipertrofisi için yeni bir terapötik hedef görevi görebileceğini belirtmiştir (251).

Hipertrofik kardiyomiyopati

Hipertrofik kardiyomiyopati (HCM), otozomal dominant bir kalıtım mekanizması olan yaygın bir genetik kardiyak bozukluktur. HCM, tromboembolik olayların gelişimi ile ilgilendirildiği gibi, AF gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (244). AF'nin, HCM popülasyonlarında en yaygın görülen aritmi olduğu bildirilmiştir. Genel popülasyonda AF prevalansı yaşla birlikte giderek artmakta ve 60 yaşın üzerinde olan hastalarda baskın olarak ortaya çıkmaktadır. HCM' li hastalarda AF, genel populasyona göre 4-6 kat daha yaygın gibi görünmektedir ve bildirilen prevalansının %18 ile %28 arasında olduğu rapor edilmiştir (252). HCM ile AF arasındaki ilişki, oluşturulan HL-1 AF modelinden elde edilen mikrodizin verilerine göre, ifadelerinde artış görülen ve sonrasında Şekil 5.14' de gösterildiği üzere eş-zamanlı kantitatif PZR ile doğrulanan *SLC8A1* ve *MYH6* genlerinin, HCM yolağında yer alması önemli bir veri olarak göze çarpmaktadır. İfadesinde artış görülen bir diğer gen ise, *DAG1* (dystroglycan 1) olarak dikkat çekmiştir. Bu genin, α ve β birimlerinin laminin proteini ile birlikte hücre-içi ve hücre-dışı iskeletini mekaniksel olarak bağlayan, distrofin-glikoprotein kompleksinin merkezi bir bileşeni olan distroglikanı kodlamaktadır (Şekil 5.10). Bu gende meydana gelen bazı mutasyonların, farklı kas distrofisi formlarına neden olduğu bildirilmiştir (253). Patolojik hipertrofi sırasında gözlenen moleküler değişiklikler, fetal kardiyak gelişim reaktivasyonu sırasında gözlenen değişimlere de eşlik etmektedir (244).

Kardiyak kas kasılması ve kardiyak gelişim

Kalp gelişimi sırasında, *MYH6* (alfa miyozin ağır zinciri), *MYH7* (beta miyozin ağır zinciri), ve *NPPA* (atriyal natriüretik faktör A) genlerinin dinamik bir etkileri bulunmaktadır. *MYH6* tarafından kodlanan Myosin VI, atriyum dokusunda yaygın bir şekilde ifade edilmekte ve kas kasılmasında görev almaktadır (254). *MYH6* genindeki çeşitli mutasyonların, atriyal

septal defekt (ASD tip III), HCM ve DCM gibi kalp hastalıklarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (255)(256). Yayınlanan bir GWAS çalışmasında *MYH6* varyantlarının AF ile önemli derecede ilişkili olduğu rapor edilmiştir (196). HL-1 AF modeli mikrodizin verilerine göre, ifadesinde artış görülen *ACTN2* (actinin alfa 2) geni ile birlikte, artan ifadesi eş-zamanlı kantitatif PZR ile doğrulanan *MYH6* geninin hücre hattında myofibrillerin fonksiyonunu negatif etkileyerek, hızlı ve düzensiz kasılmalarına neden olduğu yorumuna varılmıştır (Şekil 5.10).

Kardiyak gelişimde rol oynayan bir diğer önemli mekanizma transkripsiyon faktörleridir (257). İnsanlarda, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin mutasyonları, atriyal septal defekt, ventriküler septal defekt, triküspit kapak anomalileri ve atriyoventriküler blok dahil olmak üzere çeşitli konjenital kalp hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. Konjenital kalp hastalığı (KKH) olan hastalarda en çok çalışılan kardiyak transkripsiyon faktörleri arasında NKX2-5 ve GATA4 proteinlerinin yer almaktadır. Ancak, *MEFC2* (miyosit enhancer faktör 2) geni tarafından ifadelenen MEF2 proteini ve GATA bağlayıcı proteinler gibi transkripsiyonel düzenleyiciler, yetişkin kardiyak gelişiminde doku kaybı ve hipertrofik yeniden biçimlenmesinde rol oynamaktadır. GATA transkripsiyon faktörleri, spesifik konsensüs DNA dizilerine (A/T) GATA (A/G) bağlanmak için gerekli olan korunmuş çift çinko parmaklar (zinc-finger) ile karakterize edilmektedir. MEF2 transkripsiyon faktörleri (TF) ailesi, dört gen *MEF2A*-D tarafından kodlanmaktadır. Bu TF'ler birçok hücre tipinde ifade edilmesine rağmen, spesifik işlevleri bağışıklık sistemi, nöronlar ve çizgili kaslarda transkripsiyonel düzenlemedir. Embriyonel E7.5'de (embriyonik gelişimin 7.5. gün) *MEF2B* ve *MEF2C* başlangıçta kardiyak mezodermde ifade edilmektedir. Bir gün sonra *MEF2A* ve *MEF2D* ekspresyonu takip eder. *MEF2C* transkriptleri, miyotomdaki miyosit farklılaşmasının başlangıcı ile birlikte, E8.5'te tespit edildiği rapor edilmiştir. *MEF2C'* nin hedeflenen bozulmasının, murin embriyogenezinde gözlenen kardiyak döngü ve sağ ventrikül formasyonuna bağlı olarak E9.5'te ölüm meydana getirdiği gösterilmiştir (258). Doğum sonrası kalpte, MEF2' yi ifade eden genler hipertrofik yeniden biçimlenmede rol oynamaktadırlar. MEF2 binding A/T açısından zengin DNA dizileri, kas kreatin kinaz geni (*CKM*), *MYH6*, *MYL1* (miyozin hafif zinciri), *MYL2* (miyosin hafif zincir-2), *ACTA1* (iskelet alfa-aktin-1), *ATP2A2* (sarkoplazmik retikulum Ca2+-ATPaz), *TNNT2* (kardiyak troponin T) ve *TNNC1* (kardiyak troponin C), gibi kas kasıkmasında görev alan genler, fetal ve kardiyak genlerin promoter bölgeleri içinde tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda,

transgenik farelerde *MEF2A, MEF2C* ve *MEF2D'* nin aşırı ekspresyonu, aşırı basınca, ventriküler odacık dilatasyonuna ve kontraktil disfonksiyona karşı hassasiyet nedeni olduğunu kanıtlamıştır (259)(260). *MEF2C* gen ifadesinde azalma görülen azalma transgenik farelerde hipertrofi ve miyokardiyal büyüme tespit edildiği belirtilmiştir. Ek olarak, siRNA aracılı *MEF2C* ifadesinin baskılanmasının, hem hipertrofik kardiyak büyüme, hem de aşırı basınca cevap olarak *NPPA* ifadesinin artışına engel olduğu rapor edilmiştir (261). Bu veriler göz önüne alındığında hem kardiyak gelişim hem de patolojik hipertrofide MEF2 transkripsiyon faktörlerinin önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. HL-1 AF modelinde, bu genin promoter bölgelerine bağlandığı bilinen *TNNC1*, *MYL6* ve *MEF2C* gen ifadelerinin 24 saat sonundaki artışın hücrelerin kalsiyum bağımlı protein-troponin kompleksi ile kasılmaya etki ettiği ve kardiyak hipertrofi ile kardiyak biçimlenmeye cevap olarak yorumlanmıştır. *TNNC1* geninin aynı zamanda kas dokusunda kalsiyum bağımlı protein-troponin kompleksi ile kasılmaya etki ettiği bilinmektedir (262). Ayrıca *TNNC1* gen ifadesinde meydana gelen istenmeyen değişimlerin DCM ye neden olduğu belirlenmiştir.

Transkripsiyon faktörleri olan GATA4, GATA5 ve GATA6' nın kalpte ifade edildiği ve gelişmekte olan embriyoda kardiyak etkileşimlerinde rol aldıkları bilinmektedir (257). Yetişkin kalpte GATA4'ün kardiyak spesifik aşırı ifadesi, hipertrofik yeniden biçimlenmeyi indüklemektedir (263). Ayrıca dominant negatif GATA füzyon proteini veya antisens GATA4 mRNA'nın her biri, kültür ortamında fenilefrin ve endotelin-1 tarafından indüklenen kardiyak hipertrofinin GATA4-yönelimli özelliklerini bloke ettiği de gösterilmiştir. Gen ekspresyon profili çalışmaları *NPPB, NPPA* ve *MYH7* gibi fetal genlerin yanı sıra, apoptoz ve fibrozis ile ilişkili genlerde ifade artışı olduğu belirtilmiştir (264). Bu çalışmalar, GATA4' ün fetal genlerini aktive ederek patolojik ve hatta fizyolojik stres stimülasyonuna yanıt olarak adaptif kardiyak büyümenin önemli bir düzenleyici olduğunu düşündürmektedir. HL-1 AF modelinin transkriptom verileri içerisinde miR-568 ifadesinde artış saptanmıştır. Bu mikroRNA'nın potansiyel hedefleri içerisinde GATA ailesi üyeleri (GATA1, GATA2, GATA3, GATA4, GATA5, GATA6) yer almaktadır. miRNA-mRNA ilişkisi düşünüldüğünde miRNA'nın ifadesindeki artış, bu genlerin ifadesinin azalmasına ve HL-1 hücrelerinde oluşturulan AF modelinde hipertrofik yanıta neden olarak yorumlanmıştır. Ayrıca AF modelinin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen eş-zamanlı kantitatif PZR analizlerinde *NPPA* geninin ifadesindeki anlamlı artışın sebebinin de GATA4 üzerindeki aktivasyona etkide bulunduğu görülmektedir (Şekil 5.6).

GATA4 hipertrofik gen ifadesindeki artış, ERK1/2 ve p38 mitojenle aktive protein kinaz (p38 MAPK) fosforilasyonu ile meydana gelmektedir. GATA4'ün MAPK tarafından fosforlandığı bilinen Serin 105 (S105) mutasyonu bulunan knock-in farelerin miyokard stres cevabı gösterdiği bildirilmiştir (265). İki hafta boyunca fenilefrin agonist infüzyonuna yanıt olarak kardiyak hipertrofinin, uygulanan stimülasyonun 1 ve 2 haftalıklardaki aşırı basınç yüküne karşı hipertrofik yanıt oluşturması nedeniyle GATA4-S105A farelerin de büyük ölçüde körleştiği gözlenmiştir. Ayrıca GATA4-S105A farelerinde *NPPB*, *NPPA* ve *MYH7* gibi fetal genlerin ifadesinin azaldığı gözlenmiştir (265).

MAPK sinyal yolağı

GATA4 fosforilasyonundan sorumlu olan MAPK aktivasyonun aynı zamanda PAR-1 (proteaz ile aktive edilen reseptör-1) aktivasyonu ile AF hastalarında ve hücresel hipertrofide görülen, ANF'nin (atriyal natriüretik faktör) atriyal doku ve plazmasında ifade artışı, sonucu meydana gelmektedir. PAR-2 (proteaz ile aktive edilen reseptör-2) aktivasyonun neden olduğu MAPK aktivasyonu, atriyal miyositlerin hipertrofisine, apoptoza ve interstisyel matriks kompozisyonundaki değişikliklere katkıda bulunmaktadır (145). MAPK aktivasyonunun atriyal yapısal yeniden biçimlenmede önemli bir rol oynadığını postoperatif AF gelişen hastalarda artmış MAPK'lerin aktivasyonu ile tanımlanmıştır. (216). HL1-AF modeli transkriptom verilerinde daha önce belirtilen kalsiyum kanal ve miyosin genleri bu yolak içerisinde de yer almışlardır. Hücre içi MAP kinazların, çeşitli uyaranlar vasıtasıyla (heptahelik reseptör agonistleri, büyüme faktörleri, vb.) aktivasyonu, AF oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Aktifleştirilmiş MAP kinazları AF'li hastalarda PKC'ye (protein kinaz C) bağlı yolakların aktivasyonu, atriyal potasyum ve kalsiyum akımlarını etkileyebilmektedir. Ayrıca bu çalışmada AF modelinin doğrulanması amacıyla yapılan eş-zamanlı PZR analizlerinde *MAP2K3* geninin 12. saat sonundaki artışın iyon kanalları düzensizliğine eşlik ettiği yorumuna neden olmuştur (Şekil 5.6).

İnsülin Sinyal Yolağı

Kronik kalp yetmezliği ve AF lişkilendirilen bir diğer moleküler mekanizma olarak insülin direnci yolağı ön plana çıkmaktadır (266). İnsülin direnci ile ilişkili olan metabolik sendromun (MetS) bileşenleri, AF için artmış risk ile ilişkili bulunmuştur. HL-1 AF modelinde ifadesinde artış görülen *GYS1* (kas glikojen sentaz-1), *PPP1R3B* (protein fosfataz

1 regülatörü 3b alt ünitesi) *PIK3R1* (fosfatidilinositol 3-kinaz regülatörü) ile ifadesinde azalma görülen *SREBF1* (sterol regülatörü bağlanma transkripsiyon faktörü) geni bul yolak içinde yer almıştır. Bu verilere bağlı olarak *SREBF1* ifadesindeki azalmanın lipogenez ve glikolizi önlendiği düşündürmektedir (Şekil 5.13). Genel popülasyonda AF riskinde glukoz ve insülin homeostazının önemli bir rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışmaya rağmen, altta yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Hiperinsülinemi ayrıca RAAS aktivasyonuna neden olarak, kalp fibrozu ve aritminin riskine neden olmaktadır (267).

Bu çalışma sonucunda, bahsi geçen gen ve yolaklara yönelik elde edilen verilerin AF ile doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiş ve ileride yapılacak çalışmalara öncelik edebileceği düşünüldüğünden önemli sonuçlar elde edilmiştir.

6.2. SONUÇ

Yapılan bu tez çalışmasında, HL-1 hücrelerine, literatürde yayımlanmış kaynaklar doğrultusunda elektriksel uyarımla AF modeli oluşturarak, dışarıdan bir uyarım verilmeyen kontrol grubu hücre hattı ile morfolojik ve sitokimyasal değişimlerin incelenmesi ve AF patogenezine neden olan moleküler yolakların *in vitro* koşullarda yüksek çözünürlüklü gen ifade profil analizleri yapılarak araştırılmıştır.

Kontrol grubu HL-1 hücre hattının düzenli 60 bpm olan bazal atım (beating) frekans değerlerinin elektriksel uyarımları sırasında yaklaşık 300 bpm düzensiz frekansa EKG verileri ile mikrodizin analizlerinden elde eldilen gen ifade verileri ile lüteratür verileri örtüşmektedir. Bu da, planlanan istenen *in vitro* HL-1 AF modeli başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.

AF, tek başına etki eden bir patoloji olmasının yanı sıra, diğer birçok kardiyovasküler hastalıkla beraber açığa çıkmaktadır. Dolayısıyla, literatürde yer alan AF hastaları ve gelişmiş organizmalarda oluşturulan AF modellerinden elde edilen verilerin yalnızca AF' ye yönelik yorumlanmasında zorluklar yaşanabilmektedir. Bu tez çalışmasında oluşturulan AF modelinde elektriksel uyarım dışında herhangi başka bir faktörün etkisinden bağımsız ve homojen veriler elde edilebiliyor olması, bu modelinin önemini vurgulamaktadır. HL-1 AF modelinin bir diğer önemi ise, geriye dönüşü ve tekrarlanabilirliği zor olan gelişmiş organizma modellerinin aksine, bu modelde istenilen her türlü moleküler modifikasyon ve manüplasyonların mümkün olmasına ek olarak, hızlı, tekrarlanabilir ve geliştirilebilir olmasıdır.

Transkriptom verilerine göre, AF ile ilşkilendirilen hücreler arası iyon geçişleri ve sinyal iletim mekanizmalarında önemli rol oynayan ve ifadelerinde anlamlı değişim gözlenen *SLC8A1, CACNA1G, CACNA1H, CASQ2, MYH6 ve KCNH2* genleri yer almaktadır.

HL1- AF modelinden elde edilen verilerde ifade artışı genlerin yanı sıra, ifade değişimleri gözlenen miRNA ların tahmini hedefleri arasında *CACNA1D, CACNA1E, CACNA1G, CACNA1S, CACNB1, CACNA1C, CACNA1H, CACNB2, CACNG5, CACNA1I, CACNB4, CACNA1B, KCNN1 VE KCNN*3 gibi L-tip kalsiyum ve potasyum kanalı kodlayan genler yer almaktadır. İfadesinde artış görülen miRNA'ların (miR-let-7c-1, miR-145a, miR-490, miR-

505, miR-568) tahmini hedefleri listelenip kesiştirildiğinde ortaya çıkan 492 genin Kalsiyum sinyal yolağı, HCM DCM ve İnsülin sinyal yolağı mekanizmalarında zenginleştiği görülmüştür. Bu yolakların AF'deki rolleri düşünüldüğünde miRNA aracılı regülasyonunda elektriksel yeniden biçimlendirmeye katıldığı düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasından elde edilen verilerin, ilerleyen zamanda ilgili gen ve miRNA' lara yönelik manipülasyonlar ile, ardışık biyobelirteçler ve hedef spesifik tedavi yaklaşımlarına alt yapı oluşturacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. T.C. Sağlık Bakanlığı. TÜRKİYE Kalp Ve Damar Hastaliklari Önleme Ve Kontrol Programi Eylem Plani (2015-2020). 2015; Available from: www.thsk.saglik.gov.tr

2. Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation—Executive Summary. Circulation. 2006 Aug 15;114(7):700–52.

3. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology 7th Edition. ELSEVIER SAUNDERS. 2011.

4. Klabunde RE. Cardiovascular Physiology Concepts [Internet]. Lippincott Williams & Wilkins. 2003. Available from: http://www.cvphysiology.com/index.html

5. Goldman L, Schafer AI. Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition. Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition. 2012.

6. Betts J. Anatomy and Physiology, Chapter 20 - The Cardiovascular System: Blood vessels and circulation. OpenStax College (1788), 2013. 2013.

7. Koçaklı ZG, Akıllıoğlu K, Doğan A. Miyokardın Diyastolde Kalsiyum Homeostazı. Arşiv Kaynak Tarama Derg. 2017;26(1):107–107.

8. Frank KF, Bölck B, Erdmann E, Schwinger RHG. Sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. Cardiovasc Res. 2003;57(1):20–7.

9. Chu G, Lester JW, Young KB, Luo W, Zhai J, Kranias EG. A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to β-agonists. J Biol Chem. 2000;275(49):38938–43.

10. Matthews GG. Cellular Physiology of Nerve and Muscle. Cellular Physiology of Nerve and Muscle. 2002.

11. Bootman MD, Higazi DR, Coombes S, Roderick HL. Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. J Cell Sci. 2006;

12. Boineau JP, Schuessler RB, Mooney CR, Wylds AC, Miller CB, Hudson RD, et al. Multicentric origin of the atrial depolarization wave: The pacemaker complex. Relation to dynamics of atrial conduction, P-wave changes and heart rate control. Circulation. 1978;58(6):1036–48.

13. Schuessler RB, Boineau JP, Wylds AC, Hill DA, Miller CB, Roeske WR. Effect of canine cardiac nerves on heart rate, rhythm, and pacemaker location. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 1986;250(4).

14. Lakatta EG, DiFrancesco D. What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2009.

15. Jones SB, Euler DE, Hardie E. Comparison of SA nodal and subsidiary atrial pacemaker function and location in the dog. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 1978;3(4):471–6.

16. Mashiur Rahman M. Detection of Abnormality in Electrocardiogram (ECG) Signals Based on Katz's and Higuchi's Method Under Fractal Dimensions. Comput Biol Bioinforma. 2016;

17. Ortiz-Martin L, Picazo-Sanchez P, Peris-Lopez P, Tapiador J. Heartbeats do not make good pseudo-random number generators: An analysis of the randomness of inter-pulse intervals. Entropy. 2018;20(2).

18. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of ion channels that control cardiac repolarization. In: Cardiac Safety of Noncardiac Drugs: Practical Guidelines for Clinical Research and Drug Development. 2005.

19. BIOS Instant Notes in Human Physiology. BIOS Instant Notes in Human Physiology. 2013.

20. Isom LL. Sodium channel β subunits: Anything but auxiliary. Neuroscientist. 2001;7(1):42–54.

21. Zimmer T. Effects of tetrodotoxin on the mammalian cardiovascular system. Mar Drugs. 2010;8(3):741–62.

22. Saleh S, Yeung SYM, Prestwich S, Pucovský V, Greenwood I. Electrophysiological and molecular identification of voltage-gated sodium channels in murine vascular myocytes. J Physiol. 2005;568(1):155–69.

23. Vanessa Ho WS, Davis AJ, Chadha PS, Greenwood IA. Effective contractile response to voltage-gated NA+ channels revealed by a channel activator. Am J Physiol - Cell Physiol. 2013;

24. Black JA, Waxman SG. Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels. Neuron. 2013.

25. Remme CA, Verkerk AO, Hoogaars WMH, Aanhaanen WTJ, Scicluna BP, Annink C, et al. The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural heterogeneity in the murine ventricular myocardium. Basic Res Cardiol. 2009;104(5):511–22.

26. Veeraraghavan R, Gourdie RG, Poelzing S. Mechanisms of cardiac conduction: A history of revisions. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2014;306(5).

27. Sarquella-Brugada G, Campuzano O, Arbelo E, Brugada J, Brugada R. Brugada syndrome: Clinical and genetic findings. Genetics in Medicine. 2016.

28. Ruan Y, Liu N, Priori SG. Sodium channel mutations and arrhythmias. Nature Reviews Cardiology. 2009.

29. Williams EMV. Classifying Antiarrhythmic Actions: By Facts or Speculation. J Clin Pharmacol. 1992;

30. Gintant GA, Gallacher DJ, Pugsley MK. The “overly-sensitive” heart: Sodium channel block and QRS interval prolongation. Br J Pharmacol. 2011;164(2):254–9.

31. Pfeufer A, Van Noord C, Marciante KD, Arking DE, Larson MG, Smith AV, et al. Genome-wide association study of PR interval. Nat Genet. 2010;42(2):153–9.

32. Chambers JC, Zhao J, Terracciano CMN, Bezzina CR, Zhang W, Kaba R, et al. Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. Nat Genet.

2010;42(2):149–52.

33. Facer P, Punjabi PP, Abrari A, Kaba RA, Severs NJ, Chambers J, et al. Localisation of SCN10A gene product Nav1.8 and novel pain-related ion channels in human heart. Int Heart J. 2011;52(3):146–52.

34. Yang T, Atack TC, Stroud DM, Zhang W, Hall L, Roden DM. Blocking Scn10a channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. Circ Res. 2012;111(3):322–32.

35. Verkerk AO, Remme CA, Schumacher CA, Scicluna BP, Wolswinkel R, De Jonge B, et al. Functional NaV1.8 channels in intracardiac neurons: The link between SCN10A and cardiac electrophysiology. Circ Res. 2012;111(3):333–43.

36. London B. Whither art thou, SCN10A, and what art thou doing? Circulation Research. 2012.

37. Van Den Boogaard M, Barnett P, Christoffels VM. From GWAS to function: Genetic variation in sodium channel gene enhancer influences electrical patterning. Trends in Cardiovascular Medicine. 2014.

38. Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM. Accessory Kvβ1 subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated K+ channels in mouse ventricular myocytes. Circ Res. 2005;96(4):451–8.

39. Abbott GW, Xu X, Roepke TK. Impact of ancillary subunits on ventricular repolarization. J Electrocardiol. 2007;40(6 SUPPL. 1).

40. He FZ, McLeod HL, Zhang W. Current pharmacogenomic studies on hERG potassium channels. Trends in Molecular Medicine. 2013.

41. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier K+ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. Circ Res. 1993;

42. Ford JW, Milnes JT. New drugs targeting the cardiac ultra-rapid delayed-rectifier

current (IKur): Rationale, pharmacology and evidence for potential therapeutic value. J Cardiovasc Pharmacol. 2008;52(2):105–20.

43. Pavri BB, Greenberg HE, Kraft WK, Lazarus N, Lynch JJ, Salata JJ, et al. MK-0448, a specific Kv1.5 inhibitor safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamic electrophysiology in experimental animal models and humans. Circ Arrhythmia Electrophysiol. 2012;5(6):1193–201.

44. Loose S, Mueller J, Wettwer E, Knaut M, Ford J, Milnes J, et al. Effects of IKur blocker MK-0448 on human right atrial action potentials from patients in sinus rhythm and in permanent atrial fibrillation. Front Pharmacol. 2014;

45. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. Pharmacol Rev. 2005;57(4):411–25.

46. Catterall WA. Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. Neuroscience Letters. 2010.

47. Müller CS, Haupt A, Bildl W, Schindler J, Knaus HG, Meissner M, et al. Quantitative proteomics of the Cav2 channel nanoenvironments in the mammalian brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;

48. Huang H, Pugsley MK, Fermini B, Curtis MJ, Koerner J, Accardi M, et al. Cardiac voltage-gated ion channels in safety pharmacology: Review of the landscape leading to the CiPA initiative. Vol. 87, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 2017. p. 11–23.

49. Brette F, Orchard C. Resurgence of cardiac T-tubule research. Physiology. 2007.

50. Peana D, Domeier TL. Cardiomyocyte Ca2+ homeostasis as a therapeutic target in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. Current Opinion in Pharmacology. 2017.

51. Louch WE, Stokke MK, Sjaastad I, Christensen G, Sejersted OM. No rest for the weary: Diastolic calcium homeostasis in the normal and failing myocardium.

Physiology. 2012.

52. Ranu HK, Terracciano CMN, Davia K, Bernobich E, Chaudhri B, Robinson SE, et al. Effects of Na+/Ca2+-exchanger overexpression on excitation-contraction coupling in adult rabbit ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2002;

53. Barry WH, Bridge JHB. Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes. Circulation. 1993;87(6):1806–15.

54. Treinys R, Jurevičius J. L-type Ca2+ channels in the heart: Structure and regulation. Vol. 44, Medicina. 2008. p. 491–9.

55. Greenstein JL, Foteinou PT, Hashambhoy-Ramsay YL, Winslow RL. Modeling CaMKII-mediated regulation of L-type Ca2+ channels and ryanodine receptors in the heart. Frontiers in Pharmacology. 2014.

56. Niggli E, Ullrich ND, Gutierrez D, Kyrychenko S, Poláková E, Shirokova N. Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca2+ signaling and EC-coupling. Vol. 1833, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. 2013. p. 866–75.

57. Maier LS, Bers DM. Role of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. Cardiovascular Research. 2007.

58. Zhang T, Brown JH. Role of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. Cardiovascular Research. 2004.

59. Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, Pitt GS. CaMKII tethers to L-type Ca2+ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca2+ signals for facilitation. J Cell Biol. 2005;

60. Barrett KE, Raybould HE. Berne & Levy Physiology. Mosby. 2010. 274–284 p.

61. Wong E. http://www.pathophys.org/ [Internet]. Action Potential Of Cardiac Muscles. 2013. Available from: http://www.pathophys.org/physiology-of-cardiac-conduction-and-contractility/actionpotential/

62. Verkerk AO, Geuzebroek GSC, Veldkamp MW, Wilders R. Effects of acetylcholine and noradrenalin on action potentials of isolated rabbit sinoatrial and atrial myocytes. Front Physiol. 2012;

63. Chen PS, Wolf PD, Dixon EG, Danieley ND, Frazier DW, Smith WM, et al. Mechanism of ventricular vulnerability to single premature stimuli in open-chest dogs. Circ Res. 1988;62(6):1191–209.

64. Jalife J. Rotors and spiral waves in atrial fibrillation. Vol. 14, Journal of Cardiovascular Electrophysiology. 2003. p. 776–80.

65. Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, et al. Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. Circulation. 2007;

66. Milanesi R, Baruscotti M, Gnecchi-Ruscone T, DiFrancesco D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. N Engl J Med. 2006;

67. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, et al. Mutataions in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation. 2001;

68. Postma A V., Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, et al. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circ Res. 2002;

69. Burashnikov A, Antzelevitch C. Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. Circulation. 2003;107(18):2355–60.

70. Roden DM. Drug-Induced Prolongation of the QT Interval. Vol. 350, New England Journal of Medicine. 2004. p. 1013–22.

71. Roden DM. Long QT syndrome: Reduced repolarization reserve and the genetic link.

In: Journal of Internal Medicine. 2006. p. 59–69.

72. Davidenko JM, Cohen L, Goodrow R, Antzelevitch C. Quinidine-induced action potential prolongation, early afterdepolarizations, and triggered activity in canine Purkinje fibers. Effects of stimulation rate, potassium, and magnesium. Circulation. 1989;79(3):674–86.

73. Zygmunt AC, Eddlestone GT, Thomas GP, Nesterenko V V., Antzelevitch C. Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2001;281(2 50-2).

74. Clancy CE, Rudy Y. Linking a genetic defect to its cellular phenotype in a cardiac arrhythmia. Nature. 1999;

75. Ter Keurs HEDJ, Boyden PA. Calcium and arrhythmogenesis. Physiological Reviews. 2007.

76. Maruyama M, Joung B, Tang L, Shinohara T, On YK, Han S, et al. Diastolic intracellular calcium-membrane voltage coupling gain and postshock arrhythmias: Role of purkinje fibers and triggered activity. Circ Res. 2010;

77. Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, et al. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation. 2002;

78. Song L, Alcalai R, Arad M, Wolf CM, Toka O, Conner DA, et al. Calsequestrin 2 (CASQ2) mutations increase expression of calreticulin and ryanodine receptors, causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. J Clin Invest. 2007;117(7):1814–23.

79. Janse MJ. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. Cardiovascular Research. 2004.

80. Sipido KR, Bito V, Antoons G, Volders PG, Vos MA. Na/Ca exchange and cardiac ventricular arrhythmias. In: Annals of the New York Academy of Sciences. 2007.

81. Weiss JN, Qu Z, Chen PS, Lin SF, Karagueuzian HS, Hayashi H, et al. The dynamics of cardiac fibrillation. Circulation. 2005;112(8):1232–40.

82. Weiss JN, Karma A, Shiferaw Y, Chen PS, Garfinkel A, Qu Z. From pulsus to pulseless: The saga of cardiac alternans. Circulation Research. 2006.

83. Pruvot EJ, Katra RP, Rosenbaum DS, Laurita KR. Role of Calcium Cycling Versus Restitution in the Mechanism of Repolarization Alternans. Circ Res. 2004;

84. Verrier RL, Kwaku KF. Frayed nerves in myocardial infarction: The importance of rewiring. Circulation Research. 2004.

85. Spach MS. Mounting evidence that fibrosis generates a major mechanism for atrial fibrillation. Vol. 101, Circulation Research. 2007. p. 743–5.

86. Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G. Activation and inactivation of a non-selective cation conductance by local mechanical deformation of acutely isolated cardiac fibroblasts. Cardiovasc Res. 2003;

87. Miragoli M, Salvarani N, Rohr S. Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. Circ Res. 2007;

88. Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O, Dittiè AS, Dembowsky K, Jing S, et al. Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-β1 transgene in the heart. Circ Res. 2000;86(5):571–9.

89. Verheule S, Sat T, Everett IV T, Engle SK, Otten D, Rubart-Von Der Lohe M, et al. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-β1. Circ Res. 2004;

90. Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual β-adrenergic responsiveness. Circ Res. 2001;88(11):1159–67.

91. LITWIN S, ZHANG D. Enhanced Sodium-Calcium Exchange in the Infarcted Heart:

Effects on Sarcoplasmic Reticulum Content and Cellular Contractility. Ann N Y Acad Sci. 2002;

92. Cox JL, Boineau JP, Schuessler RB, Ferguson TB, Cain ME, Lindsay BD, et al. Successful Surgical Treatment of Atrial Fibrillation: Review and Clinical Update. JAMA J Am Med Assoc. 1991;266(14):1976–80.

93. Taji B, Chan ADC, Shirmohammadi S. False Alarm Reduction in Atrial Fibrillation Detection Using Deep Belief Networks. IEEE Trans Instrum Meas. 2018;67(5):1124–31.

94. Schweitzer P, Keller S. A history of atrial fibrillation. Vnitr Lek. 2002;48(SUPPL. 1):24–6.

95. Aronson JK. One hundred years of atrial fibrillation. Br J Clin Pharmacol. 2005;60(4):345–6.

96. Silverman ME. From rebellious palpitations to the discovery of auricular fibrillation: Contributions of Mackenzie, Lewis and Einthoven. Am J Cardiol. 1994;73(5):384–9.

97. Barold SS. Willem Einthoven and the Birth of Clinical Electrocardiography a Hundred Years Ago. Card Electrophysiol Rev. 2003;7(1):99–104.

98. Falk RH. Pharmacologic control of heart rate in atrial fibrillation. Cardiol Clin. 1996 Nov;14(4):521–36.

99. Waktare, J; Camm J. Atrial Fibrillation. London: Martin Dunitz, London; 2000. 54–55 p.

100. Holm M, Pehrson S, Ingemansson M, Sörnmo L, Johansson R, Sandhall L, et al. Non-invasive assessment of the atrial cycle length during atrial fibrillation in man: Introducing, validating and illustrating a new ECG method. Cardiovasc Res. 1998;38(1):69–81.

101. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial Fibrillation: A Major Contributor to Stroke in the Elderly: The Framingham Study. Arch Intern Med. 1987;147(9):1561–4.

102. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. Eur Heart J [Internet]. 2016 Aug 27;37(38):2893–962. Available from: https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw210

103. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent Risk Factors for Atrial Fibrillation in a Population-Based Cohort: The Framingham Heart Study. JAMA J Am Med Assoc. 1994;271(11):840–4.

104. Pistoia F, Sacco S, Tiseo C, Degan D, Ornello R, Carolei A. The Epidemiology of Atrial Fibrillation and Stroke. Cardiol Clin. 2016;34(2):255–68.

105. Stefansdottir H, Aspelund T, Gudnason V, Arnar DO. Trends in the incidence and prevalence of atrial fibrillation in Iceland and future projections. Europace. 2011;13(8):1110–7.

106. Lane DA, Skjøth F, Lip GYH, Larsen TB, Kotecha D. Temporal trends in incidence, prevalence, and mortality of atrial fibrillation in primary care. J Am Heart Assoc. 2017;6(5):e005155.

107. Colilla S, Crow A, Petkun W, Singer DE, Simon T, Liu X. Estimates of current and future incidence and prevalence of atrial fibrillation in the U.S. adult population. Am J Cardiol. 2013;112(8):1142–7.

108. Rahman F, Kwan GF, Benjamin EJ. Global epidemiology of atrial fibrillation. Nat Rev Cardiol. 2014;11(11):639–54.

109. Shavadia J, Yonga G, Mwanzi S, Jinah A, Moriasi A, Otieno H. Clinical characteristics and outcomes of atrial fibrillation and flutter at the Aga Khan University Hospital, Nairobi. Cardiovasc J Afr. 2013;24(2):6–9.

110. Kang SH, Choi EK, Han K Do, Lee SR, Lim WH, Cha MJ, et al. Underweight is a risk factor for atrial fibrillation: A nationwide population-based study. Int J Cardiol. 2016;215:449–56.

111. Iguchi Y, Kimura K, Shibazaki K, Aoki J, Kobayashi K, Sakai K, et al. Annual

incidence of atrial fibrillation and related factors in adults. Am J Cardiol. 2010;106(8):1129–33.

112. A. Oto, N. Ata, B. Yavuz, E. Oto, K. Aytemir, D.K. Ozturk, B. Evranos, A. Burkan, E. Ertugay HK. Real World patients with Atrial Fibrillation: A Nationwide Cohort Study-TRAF (Turkish Atrial Fibrillation Data Base). Am J Cardiol. 2014;113(7):50–1.

113. Tse HF, Lau CP, Kou W, Pelosi F, Oral H, Kim M, et al. Prevalence and significance of exit block during arrhythmias arising in pulmonary veins. J Cardiovasc Electrophysiol. 2000;11(4):379–86.

114. Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing - Induced congestive heart failure. Circulation. 2001;104(21):2608–14.

115. Abed HS, Samuel CS, Lau DH, Kelly DJ, Royce SG, Alasady M, et al. Obesity results in progressive atrial structural and electrical remodeling: Implications for atrial fibrillation. Hear Rhythm. 2013;10(1):90–100.

116. Verheule S, Tuyls E, Gharaviri A, Hulsmans S, Van Hunnik A, Kuiper M, et al. Loss of continuity in the thin epicardial layer because of endomysial fibrosis increases the complexity of atrial fibrillatory conduction. Circ Arrhythmia Electrophysiol. 2013;6(1):202–11.

117. Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. Cardiovasc Res. 2002;54(2):361–79.

118. Anné W, Willems R, Roskams T, Sergeant P, Herijgers P, Holemans P, et al. Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation. Cardiovasc Res. 2005;67(4):655–66.

119. Mahajan R, Lau DH, Sanders P. Impact of obesity on cardiac metabolism, fibrosis, and function. Trends Cardiovasc Med. 2015;25(2):119–26.

120. Boldt A, Wetzel U, Weigl J, Garbade J, Lauschke J, Hindricks G, et al. Expression of Angiotensin II Receptors in Human Left and Right Atrial Tissue in Atrial Fibrillation with and Without Underlying Mitral Valve Disease. J Am Coll Cardiol. 2003;42(10):1785–92.

121. Karim R, Housden RJ, Balasubramaniam M, Chen Z, Perry D, Uddin A, et al. Evaluation of current algorithms for segmentation of scar tissue from late Gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance of the left atrium: An open-access grand challenge. J Cardiovasc Magn Reson. 2013;15(1):105.

122. Daccarett M, Badger TJ, Akoum N, Burgon NS, Mahnkopf C, Vergara G, et al. Association of left atrial fibrosis detected by delayed-enhancement magnetic resonance imaging and the risk of stroke in patients with atrial fibrillation. J Am Coll Cardiol. 2011;57(7):831–8.

123. Malcolme-Lawes LC, Juli C, Karim R, Bai W, Quest R, Lim PB, et al. Automated analysis of atrial late gadolinium enhancement imaging that correlates with endocardial voltage and clinical outcomes: A 2-center study. Hear Rhythm. 2013;10(8):1184–91.

124. Marrouche NF, Wilber D, Hindricks G, Jais P, Akoum N, Marchlinski F, et al. Association of atrial tissue fibrosis identified by delayed enhancement MRI and atrial fibrillation catheter ablation: The DECAAF study. JAMA - J Am Med Assoc. 2014;311(5):498–506.

125. Pathak RK, Mahajan R, Lau DH, Sanders P. The Implications of Obesity for Cardiac Arrhythmia Mechanisms and Management. Can J Cardiol. 2015;31(2):203–10.

126. Thanassoulis G, Massaro JM, O'Donnell CJ, Hoffmann U, Levy D, Ellinor PT, et al. Pericardial fat is associated with prevalent atrial fibrillation: The framingham heart study. Circ Arrhythmia Electrophysiol. 2010;3(4):345–50.

127. Sun K, Halberg N, Khan M, Magalang UJ, Scherer PE. Selective Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor 1 Ameliorates Adipose Tissue Dysfunction. Mol Cell Biol. 2013;33(5):904–17.

128. Venteclef N, Guglielmi V, Balse E, Gaborit B, Cotillard A, Atassi F, et al. Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokines. Eur Heart J. 2015;36(13):795–805.

129. Mahajan R, Lau DH, Brooks AG, Shipp NJ, Manavis J, Wood JPM, et al. Electrophysiological, Electroanatomical, and Structural Remodeling of the Atria as Consequences of Sustained Obesity. J Am Coll Cardiol. 2015;66(1):1–11.

130. Mahajan R, Kuklik P, Grover S, Brooks AG, Wong CX, Sanders P, et al. Cardiovascular magnetic resonance of total and atrial pericardial adipose tissue: A validation study and development of a 3 dimensional pericardial adipose tissue model. J Cardiovasc Magn Reson. 2013;15(1):73.

131. Chen PS, Chen LS, Fishbein MC, Lin SF, Nattel S. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: Pathophysiology and therapy. Circ Res. 2014;114(9):1500–15.

132. Fioranelli M, Piccoli M, Mileto GM, Sgreccia F, Azzolini P, Risa MP, et al. Analysis of heart rate variability five minutes before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. PACE - Pacing Clin Electrophysiol. 1999;22(5):743–9.

133. Tan AY, Zhou S, Ogawa M, Song J, Chu M, Li H, et al. Neural mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal atrial tachycardia in ambulatory canines. Circulation. 2008;118(9):916–25.

134. Jayachandran JV, Sih HJ, Winkle W, Zipes DP, Hutchins GD, Olgin JE. Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation. Circulation. 2000;101(10):1185–91.

135. Ng J, Villuendas R, Cokic I, Schliamser JE, Gordon D, Koduri H, et al. Autonomic remodeling in the left atrium and pulmonary veins in heart failure creation of a dynamic substrate for atrial fibrillation. Circ Arrhythmia Electrophysiol. 2011;4(3):388–96.

136. Linz D, Schotten U, Neuberger HR, Böhm M, Wirth K. Negative tracheal pressure

during obstructive respiratory events promotes atrial fibrillation by vagal activation. Hear Rhythm. 2011;8(9):1436–43.

137. Sheng X, Scherlag BJ, Yu L, Li S, Ali R, Zhang Y, et al. Prevention and reversal of atrial fibrillation inducibility and autonomic remodeling by low-level vagosympathetic nerve stimulation. J Am Coll Cardiol. 2011;57(5):563–71.

138. Linz D, Van Hunnik A, Hohl M, Mahfoud F, Wolf M, Neuberger HR, et al. Catheter-based renal denervation reduces atrial nerve sprouting and complexity of atrial fibrillation in goats. Circ Arrhythmia Electrophysiol. 2015;8(2):466–74.

139. Linz D, Mahfoud F, Schotten U, Ukena C, Neuberger HR, Wirth K, et al. Renal sympathetic denervation suppresses postapneic blood pressure rises and atrial fibrillation in a model for sleep apnea. Hypertension. 2012;60(1):172–8.

140. Pokushalov E, Romanov A, Katritsis DG, Artyomenko S, Bayramova S, Losik D, et al. Renal denervation for improving outcomes of catheter ablation in patients with atrial fibrillation and hypertension: Early experience. Hear Rhythm. 2014;11(7):1131–8.

141. Wang X, Zhao Q, Huang H, Tang Y, Xiao J, Dai Z, et al. Effect of Renal Sympathetic Denervation on Atrial Substrate Remodeling in Ambulatory Canines with Prolonged Atrial Pacing. PLoS One. 2013;8(5):e64611.

142. Scheffers IJM, Kroon AA, Schmidli J, Jordan J, Tordoir JJM, Mohaupt MG, et al. Novel baroreflex activation therapy in resistant hypertension: Results of a European multi-center feasibility study. J Am Coll Cardiol. 2010;56(15):1254–8.

143. Abed HS, Wittert GA, Leong DP, Shirazi MG, Bahrami B, Middeldorp ME, et al. Effect of weight reduction and cardiometabolic risk factor management on symptom burden and severity in patients with atrial fibrillation: A randomized clinical trial. JAMA - J Am Med Assoc. 2013;310(19):2050–60.

144. Borissoff JI, Spronk HMH, Cate H Ten. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. N Engl J Med. 2011;364(18):1746–60.

145. Sabri A, Muske G, Zhang HL, Pak E, Darrow A, Andrade-Gordon P, et al. Signaling properties and functions of two distinct cardiomyocyte protease-activated receptors. Circ Res. 2000;86(10):1054–61.

146. Lau DH, Schotten U, Mahajan R, Antic NA, Hatem SN, Pathak RK, et al. Novel mechanisms in the pathogenesis of atrial fibrillation: Practical applications. Eur Heart J. 2016;37(20):1573–81.

147. Chang CJ, Chen YC, Kao YH, Lin YK, Chen SA, Chen YJ. Dabigatran and thrombin modulate electrophysiological characteristics of pulmonary vein and left atrium. Circ Arrhythmia Electrophysiol. 2012;5(6):1176–83.

148. Erlich JH, Boyle EM, Labriola J, Kovacich JC, Santucci RA, Fearns C, et al. Inhibition of the tissue factor-thrombin pathway limits infarct size after myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation. Am J Pathol. 2000;157(6):1849–62.

149. Ausma J, Coumans WA, Duimel H, Van Der Vusse GJ, Allessie MA, Borgers M. Atrial high energy phosphate content and mitochondrial enzyme activity during chronic atrial fibrillation. Cardiovasc Res. 2000;47(4):788–96.

150. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: A translational appraisal. Physiol Rev. 2011;91(1):265–325.

151. Kong W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF. Isolation and characterization of the human gene encoding I(to): Further diversity by alternative mRNA splicing. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 1998;275(6 44-6):1963–70.

152. London B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, et al. Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K+ current. Circ Res. 1997;81(5):870–8.

153. Bosch RF, Nattel S. Cellular electrophysiology of atrial fibrillation. Cardiovasc Res. 2002;54(2):259–69.

154. Yue L, Melnyk P, Gaspo R, Wang Z, Nattel S. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. Circ Res. 1999;84(7):776–84.

155. Grammer JB, Bosch RF, Kühlkamp V, Seipel L. Molecular remodeling of Kv4.3 Potassium channels in human atrial fibrillation. J Cardiovasc Electrophysiol. 2000;11(6):626–33.

156. Grammer JB, Zeng X, Bosch RF, Kuhlkamp V. Atrial L-type Ca2+-channel, β-adrenoreceptor, and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor mRNAs in human atrial fibrillation. Basic Res Cardiol. 2001;96(1):82–90.

157. Brundel BJJM, Van Gelder IC, Henning RH, Tieleman RG, Tuinenburg AE, Wietses M, et al. Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. Circulation. 2001;103(5):684–90.

158. Fermini B, Wang Z, Duan D, Nattel S. Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 1992;263(6 32-6):1747–54.

159. Boyden PA, Tilley LP, Pham TD, Liu SK, Fenoglio JJ, Wit AL. Effects of left atrial enlargement on atrial transmembrane potentials and structure in dogs with mitral valve fibrosis. Am J Cardiol. 1982;49(8):1896–908.

160. Bode F, Katchman A, Woosley RL, Franz MR. Gadolinium decreases stretch-induced vulnerability to atrial fibrillation. Circulation. 2000;101(18):2200–5.

161. Satoh T, Zipes DP. Unequal atrial stretch in dogs increases dispersion of refractoriness conducive to developing atrial fibrillation. J Cardiovasc Electrophysiol. 1996;7(9):833–42.

162. Solti F, Vecsey T, Kékesi V, Juhász-Nagy A. The effect of atrial dilatation on the genesis of atrial arrhythmias. Cardiovasc Res. 1989;23(10):882–6.

163. 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;100(1):87–95.

164. Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, et al. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. Circulation. 2000;101(22):2631–8.

165. Ouadid H, Albat B, Nargeot J. Calcium currents in diseased human cardiac cells. J Cardiovasc Pharmacol. 1995;25(2):282–91.

166. Grand B Le, Hatem S, Deroubaix E, Couétil JP, Coraboeuf E. Depressed transient outward and calcium currents in dilated human atria. Cardiovasc Res. 1994;28(4):548–56.

167. Cheng TH, Lee FY, Wei J, Lin CI. Comparison of calcium-current in isolated atrial myocytes from failing and nonfailing human hearts. Mol Cell Biochem. 1996;157(1–2):157–62.

168. Schreieck J, Wang Y, Overbeck M, Schömig A, Schmitt C. Altered transient outward current in human atrial myocytes of patients with reduced left ventricular function. J Cardiovasc Electrophysiol. 2000;11(2):180–92.

169. Reddy V, Taha W, Kundumadam S, Khan M. Atrial fibrillation and hyperthyroidism: A literature review. Indian Heart J. 2017;69(4):545–50.

170. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca2+ currents and human atrial fibrillation. Circ Res. 1999;85(5):428–36.

171. Dupont E, Ko YS, Rothery S, Coppen SR, Baghai M, Haw M, et al. The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation. Circulation. 2001;

172. Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, Marian AJ, Iglesias A, Mont L, et al. Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. N Engl J Med. 1997;336(13):905–11.

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

174. Darbar D, Hardy A, Haines JL, Roden DM. Prolonged Signal-Averaged P-Wave Duration as an Intermediate Phenotype for Familial Atrial Fibrillation. J Am Coll Cardiol. 2008;51(11):1083–9.

175. Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. Science (80-). 2003;299(5604):251–4.

176. Ragab AAY, Sitorus GDS, Brundel BBJJM, Groot NMS de. The Genetic Puzzle of Familial Atrial Fibrillation. Front Cardiovasc Med. 2020 Feb 14;7:14.

177. Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman L V., Bienengraeber M, et al. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. Hum Mol Genet. 2006;15(14):2185–91.

178. Yang Y, Li J, Lin X, Yang Y, Hong K, Wang L, et al. Novel KCNA5 loss-of-function mutations responsible for atrial fibrillation. J Hum Genet. 2009;54(5):277–83.

179. Olson TM, Michels V V., Ballew JD, Reyna SP, Karst ML, Herron KJ, et al. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. J Am Med Assoc. 2005;293(4):447–54.

180. Yang T, Atack TC, Stroud DM, Zhang W, Hall L, Roden DM. Blocking Scn10a channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. Circ Res. 2012;

181. Chiang DY, Kongchan N, Beavers DL, Alsina KM, Voigt N, Neilson JR, et al. Loss of MicroRNA-106b-25 cluster promotes atrial fibrillation by enhancing ryanodine receptor type-2 expression and calcium release. Circ Arrhythmia Electrophysiol. 2014;7(6):1214–22.

182. Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong XQ, Shao Q, et al. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. N Engl J Med. 2006;354(25):2677–88.

183. Christophersen IE, Ravn LS, Budtz-Joergensen E, Skytthe A, Haunsoe S, Svendsen JH, et al. Familial aggregation of atrial fibrillation: A study in danish twins. Circ

Arrhythmia Electrophysiol. 2009;2(4):378–83.

184. Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, et al. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. Cardiovasc Res. 2012;93(4):666–73.

185. Zhao LQ, Wen ZJ, Wei Y, Xu J, Chen Z, Qi BZ, et al. Polymorphisms of renin-angiotensin-aldosterone system gene in chinese han patients with nonfamilial atrial fibrillation. PLoS One. 2015;10(2):e0117489.

186. Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadottir A, Gretarsdottir S, Holm H, Sigurdsson A, et al. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. Nature. 2007;448(7151):353–7.

187. Tessari A, Pietrobon M, Notte A, Cifelli G, Gage PJ, Schneider MD, et al. Myocardial Pitx2 differentially regulates the left atrial identity and ventricular asymmetric remodeling programs. Circ Res. 2008;102(7):813–22.

188. Herraiz-Martínez A, Llach A, Tarifa C, Gandía J, Jiménez-Sabado V, Lozano-Velasco E, et al. The 4q25 variant rs13143308T links risk of atrial fibrillation to defective calcium homoeostasis. Cardiovasc Res. 2019;115(3):578–89.

189. Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Walters GB, Thorgeirsson G, et al. A sequence variant in ZFHX3 on 16q22 associates with a trial fibrillation and ischemic stroke. Nat Genet. 2009;41(8):876–8.

190. Ellinor PT, Lunetta KL, Glazer NL, Pfeufer A, Alonso A, Chung MK, et al. Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. Nat Genet. 2010;42(3):240–4.

191. Yang MY, Camara AKS, Aldakkak M, Kwok WM, Stowe DF. Identity and function of a cardiac mitochondrial small conductance Ca2+-activated K+ channel splice variant. Biochim Biophys Acta - Bioenerg. 2017;1858(6):442–58.

192. Ellinor PT, Lunetta KL, Albert CM, Glazer NL, Ritchie MD, Smith A V., et al. Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation. Nat Genet.

2012;44(6):670–5.

193. Wang P, Qin W, Wang P, Huang Y, Liu Y, Zhang R, et al. Genomic Variants in NEURL, GJA1 and CUX2 Significantly Increase Genetic Susceptibility to Atrial Fibrillation. Sci Rep. 2018;8(1):3297.

194. Homer RJ, Herzog EL. Recent advances in pulmonary fibrosis: Implications for scleroderma. Curr Opin Rheumatol. 2010;22(6):683–9.

195. Volonte D, McTiernan CF, Drab M, Kasper M, Galbiati F. Caveolin-1 and caveolin-3 form heterooligomeric complexes in atrial cardiac myocytes that are required for doxorubicin-induced apoptosis. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2008;294(1):392–401.

196. Holm H, Gudbjartsson DF, Sulem P, Masson G, Helgadottir HT, Zanon C, et al. A rare variant in MYH6 is associated with high risk of sick sinus syndrome. Nat Genet. 2011;43(4):316–23.

197. Gudbjartsson DF, Holm H, Sulem P, Masson G, Oddsson A, Magnusson OH, et al. A frameshift deletion in the sarcomere gene MYL4 causes early-onset familial atrial fibrillation. Eur Heart J. 2017;38(1):27–34.

198. Meder B, Laufer C, Hassel D, Just S, Marquart S, Vogel B, et al. A single serine in the carboxyl terminus of cardiac essential myosin light chain-1 controls cardiomyocyte contractility in vivo. Circ Res. 2009;104(5):650–9.

199. Thorolfsdottir RB, Sveinbjornsson G, Sulem P, Helgadottir A, Gretarsdottir S, Benonisdottir S, et al. A Missense Variant in PLEC Increases Risk of Atrial Fibrillation. J Am Coll Cardiol. 2017;70(17):2157–68.

200. Nielsen JB, Thorolfsdottir RB, Fritsche LG, Zhou W, Skov MW, Graham SE, et al. Biobank-driven genomic discovery yields new insight into atrial fibrillation biology. Nat Genet. 2018;50(9):1234–9.

201. Roselli C, Chaffin MD, Weng LC, Aeschbacher S, Ahlberg G, Albert CM, et al. Multi-ethnic genome-wide association study for atrial fibrillation. Nat Genet.

2018;50(9):1225–33.

202. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. Cardiovasc Res. 2001;51(4):637–46.

203. Yang M, Tan H, Cheng L, He M, Wei Q, Tanguay RM, et al. Expression of heat shock proteins in myocardium of patients with atrial fibrillation. Cell Stress Chaperones. 2007;12(2):142–50.

204. Rammos KS, Koullias GJ, Hassan MO, Argyrakis NP, Voucharas CG, Scarupa SJ, et al. Low Preoperative HSP70 Atrial Myocardial Levels Correlate Significantly with High Incidence of Postoperative Atrial Fibrillation after Cardiac Surgery. Vascular. 2002;10(3):228–32.

205. Rammos KS, Koullias GJ, Hassan MO, Argyrakis NP, Voucharas CG, Scarupa SJ, et al. Low Preoperative HSP70 Atrial Myocardial Levels Correlate Significantly with High Incidence of Postoperative Atrial Fibrillation after Cardiac Surgery. Vascular. 2002;

206. 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. Ann Thorac Surg. 2005;

207. Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M. Natriuretic peptides: An update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. Am J Hypertens. 2008;21(7):733–41.

208. Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: Their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. Handb Exp Pharmacol. 2009;191:341–66.

209. Newton-Cheh C, Larson MG, Vasan RS, Levy D, Bloch KD, Surti A, et al. Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure. Nat Genet. 2009;41(3):348–53.

210. Pedersen EB, Pedersen HB, Jensen KT. Pulsatile secretion of atrial natriuretic peptide

and brain natriuretic peptide in healthy humans. Clin Sci. 1999;97(2):201–6.

211. Thijssen VLJL, Van Der Velden HMW, Van Ankeren EP, Ausma J, Allessie MA, Borgers M, et al. Analysis of altered gene expression during sustained atrial fibrillation in the goat. Cardiovasc Res. 2002;54(2):427–37.

212. D'Elia L, Barba G, Cappuccio FP, Strazzullo P. Potassium intake, stroke, and cardiovascular disease: A meta-analysis of prospective studies. J Am Coll Cardiol. 2011;57(10):1210–9.

213. Zhang D, Chen X, Wang Q, Wu S, Zheng Y, Liu X. Role of the MAPKs/TGF-β1/TRAF6 signaling pathway in postoperative atrial fibrillation. PLoS One. 2017;12(3):1–12.

214. Liu B, Yu J, Taylor L, Zhou X, Polgar P. Microarray and phosphokinase screenings leading to studies on ERK and JNK regulation of connective tissue growth factor expression by angiotensin II 1a and bradykinin B2 receptors in Rat1 fibroblasts. J Cell Biochem. 2006;97(5):1104–20.

215. Naito T, Masaki T, Nikolic-Paterson DJ, Tanji C, Yorioka N, Kohno N. Angiotensin II induces thrombospondin-1 production in human mesangial cells via p38 MAPK and JNK: A mechanism for activation of latent TGF-β 1. Am J Physiol - Ren Physiol. 2004;286(2 55-2):278–87.

216. Gu J, Liu X, Wang Q xing, Tan H wei, Guo M, Jiang W feng, et al. Angiotensin II increases CTGF expression via MAPKs/TGF-B1/TRAF6 pathway in atrial fibroblasts. Exp Cell Res. 2012;318(16):2105–15.

217. Kim YH, Lee JH, Lim DS, Shim WJ, Ro YM, Park GH, et al. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. Exp Mol Med. 2003;35(5):336–49.

218. Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano H, Misawa Y, Fuse K, et al. Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis. Int J Cardiol. 2005;102(2):233–8.

219. Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, et al. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. Circulation. 2005;112(4):471–81.

220. Kharlap MS, Timofeeva A V., Goryunova LE, Khaspekov GL, Dzemeshkevich SL, Ruskin V V., et al. Atrial appendage transcriptional profile in patients with atrial fibrillation with structural heart diseases. Ann N Y Acad Sci. 2006;1091:205–17.

221. Cardin S, Libby E, Pelletier P, Le Bouter S, Shiroshita-Takeshita A, Le Meur N, et al. Contrasting gene expression profiles in two canine models of atrial fibrillation. Circ Res. 2007;100(3):425–33.

222. Bond CT, Herson PS, Strassmaier T, Hammond R, Stackman R, Maylie J, et al. Small conductance Ca2+-activated K+ channel knock-out mice reveal the identity of calcium-dependent afterhyperpolarization currents. J Neurosci. 2004;24(23):5301–6.

223. Dautova Y, Zhang Y, Sabir I, Grace AA, Huang CLH. Atrial arrhythmogenesis in wild-type and Scn5a+/Δ murine hearts modelling LQT3 syndrome. Pflugers Arch Eur J Physiol. 2009;458(3):443–57.

224. Hakim P, Brice N, Thresher R, Lawrence J, Zhang Y, Jackson AP, et al. Scn3b knockout mice exhibit abnormal sino-atrial and cardiac conduction properties. Acta Physiol. 2010;198(1):47–59.

225. Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, et al. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(6):2979–84.

226. Delcarpio JB, Lanson NA, Field LJ, Claycomb WC. Morphological characterization of cardiomyocytes isolated from a transplantable cardiac tumor derived from transgenic mouse atria (AT-1 cells). Circ Res. 1991;69(6):1591–600.

227. White SM, Constantin PE, Claycomb WC. Cardiac physiology at the cellular level: Use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2004;286(3 55-3):823–9.

228. Brundel BJJM, Henning RH, Ke L, van Gelder IC, Crijns HJGM, Kampinga HH. Heat shock protein upregulation protects against pacing-induced myolysis in HL-1 atrial myocytes and in human atrial fibrillation. J Mol Cell Cardiol. 2006;41(3):555–62.

229. Rosen MR. Classification of Antiarrhythmic Drugs. Card Electrophysiol Rev. 2000;4:181–5.

230. WILLIAMS EMV. A Classification of Antiarrhythmic Actions Reassessed After a Decade of New Drugs. J Clin Pharmacol. 1984;24(4):129–47.

231. Comtois P, Sakabe M, Vigmond EJ, Munoz M, Texier A, Shiroshita-Takeshita A, et al. Mechanisms of atrial fibrillation termination by rapidly unbinding Na + channel blockers: Insights from mathematical models and experimental correlates. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2008;295(4):1317–22.

232. Murgatroyd FD, Camm AJ. Atrial arrhythmias. Lancet. 1993;341(8856):1317–22.

233. Lee S, Sahadevan J, Khrestian CM, Durand DM, Waldo AL. High density mapping of atrial fibrillation during vagal nerve stimulation in the canine heart: Restudying the Moe hypothesis. J Cardiovasc Electrophysiol. 2013;24(3):328–35.

234. Wijffels MCEF, Kirchhof CJHJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: A study in awake chronically instrumented goats. Circulation. 1995;92(7):1954–68.

235. Ames A SW. Catheter Ablation of Atrial Fibrillation. Circulation. 2006;113(13):666–8.

236. Tracy CM, Epstein AE, Darbar D, DiMarco JP, Dunbar SB, Estes NAM 3rd, et al. 2012 ACCF/AHA/HRS focused update of the 2008 guidelines for device-based therapy of cardiac rhythm abnormalities: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012 Dec;144(6):e127-45.

237. Vesentini N, Barsanti C, Martino A, Kusmic C, Ripoli A, Rossi A, et al. Selection of

reference genes in different myocardial regions of an in vivo ischemia/reperfusion rat model for normalization of antioxidant gene expression. BMC Res Notes. 2012;5(124):1–8.

238. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics. 2003;4(2):249–64.

239. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. Nucleic Acids Res. 2013;41(Web Server issue).

240. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html. bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html. 2007.

241. Goette A, Lendeckel U, Klein HU. Signal transduction systems and atrial fibrillation. Cardiovasc Res. 2002 May;54(2):247–58.

242. Chang CM, Wu TJ, Zhou S, Doshi RN, Lee MH, Ohara T, et al. Nerve sprouting and sympathetic hyperinnervation in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged right atrial pacing. Circulation. 2001 Jan;103(1):22–5.

243. Schmitz F, Mohamed S, Punjabi PP. Book Review: Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Perfusion. 2019;34(2):933–74.

244. Elliott PM. 2014 ESC guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. Russ J Cardiol. 2014;121(5):2733–79.

245. Napolitano C, Antzelevitch C. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel. Circ Res. 2011 Mar;108(5):607–18.

246. Greiser M, Schotten U. Dynamic remodeling of intracellular Ca2+ signaling during atrial fibrillation. J Mol Cell Cardiol. 2013;58(1):134–42.

247. Husser D, Ueberham L, Dinov B, Kosiuk J, Kornej J, Hindricks G, et al. Genomic

contributors to atrial electroanatomical remodeling and atrial fibrillation progression: Pathway enrichment analysis of GWAS data. Sci Rep. 2016 Nov;6:36630.

248. Greiser M, Lederer WJ, Schotten U. Alterations of atrial Ca(2+) handling as cause and consequence of atrial fibrillation. Cardiovasc Res. 2011 Mar;89(4):722–33.

249. Greiser M. Calcium signalling silencing in atrial fibrillation. J Physiol. 2017 Jun;595(12):4009–17.

250. Khananshvili D. The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX)-Structure, function, and regulation in health and disease. Mol Aspects Med. 2013;34(2–3):220–35.

251. Lim TB, Aliwarga E, Luu TDA, Li YP, Ng SL, Annadoray L, et al. Targeting the highly abundant circular RNA circSlc8a1 in cardiomyocytes attenuates pressure overload induced hypertrophy. Cardiovasc Res. 2019;115(14):1998–2007.

252. Macintyre C, Lakdawala NK. Management of atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy. Circulation. 2016;133(19):1901–5.

253. König E, Volpato CB, Motta BM, Blankenburg H, Picard A, Pramstaller P, et al. Exploring digenic inheritance in arrhythmogenic cardiomyopathy. BMC Med Genet. 2017;18(1):145.

254. Tanigawa G, Jarcho JA, Kass S, Solomon SD, Vosberg HP, Seidman JG, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: An α β cardiac myosin heavy chain hybrid gene. Cell. 1990;62(5):991–8.

255. Posch MG, Waldmuller S, Müller M, Scheffold T, Fournier D, Andrade-Navarro MA, et al. Cardiac alpha-myosin (MYH6) is the predominant sarcomeric disease gene for familial atrial septal defects. PLoS One. 2011;6(12).

256. Weismann CG, Gelb BD. The genetics of congenital heart disease: A review of recent developments. Curr Opin Cardiol. 2007;22(3):200–6.

257. Dirkx E, da Costa Martins PA, De Windt LJ. Regulation of fetal gene expression in

heart failure. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2013;1832(12):2414–24.

258. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. Science (80-). 1997;276(5317):1404–7.

259. Kim Y, Phan D, Van Rooij E, Wang DZ, McAnally J, Qi X, et al. The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. J Clin Invest. 2008;118(1):124–32.

260. Van Oort RJ, Van Rooij E, Bourajjaj M, Schimmel J, Jansen MA, Van Der Nagel R, et al. MEF2 activates a genetic program promoting chamber dilation and contractile dysfunction in calcineurin-induced heart failure. Circulation. 2006;114(4):298–308.

261. Pereira AHM, Clemente CFMZ, Cardoso AC, Theizen TH, Rocco SA, Judice CC, et al. MEF2C silencing attenuates load-induced left ventricular hypertrophy by modulating mTOR/S6K pathway in mice. PLoS One. 2009;4(12):8472.

262. Li MX, Hwang PM. Structure and function of cardiac troponin C (TNNC1): Implications for heart failure, cardiomyopathies, and troponin modulating drugs. Gene. 2015;571(2):153–66.

263. Liang Q, De Windt LJ, Witt SA, Kimball TR, Markham BE, Molkentin JD. The Transcription Factors GATA4 and GATA6 Regulate Cardiomyocyte Hypertrophy in Vitro and in Vivo. J Biol Chem. 2001;276(32):30245–53.

264. Bisping E, Ikeda S, Kong SW, Tarnavski O, Bodyak N, McMullen JR, et al. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(39):14471–6.

265. Van Berlo JH, Elrod JW, Aronow BJ, Pu WT, Molkentin JD. Serine 105 phosphorylation of transcription factor GATA4 is necessary for stress-induced cardiac hypertrophy in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(30):12331–6.

266. Shigematsu Y, Hamada M, Nagai T, Nishimura K, Inoue K, Suzuki J, et al. Risk for atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy: Association with insulin resistance. J Cardiol. 2011;58(1):18–25.

267. Cho ME, Craven TE, Cheung AK, Glasser SP, Rahman M, Soliman EZ, et al. The association between insulin resistance and atrial fibrillation: A cross-sectional analysis from SPRINT (Systolic Blood Pressure Intervention Trial). J Clin Hypertens (Greenwich). 2017 Nov;19(11):1152–61.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ali Emre AKPINAR

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi: 21/09/1983

Yabancı Dili : İngilizce, İtalyanca

Eğitim Bilgileri

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (Yüksek Lisans, 2006 - 2009)

Cumhuriyet Üniversitesi Biyoloji Bölümü (Lisans, 2001 - 2005)

Sivas Selçuk Anadolu Lisesi (1994 - 2001)

Akademik Deneyimi

- Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Görevlisi (2017 -)
- Università degli Studi di Sassari Dipartimento di Protezione delle Piante – Araştırmacı (2011)
- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü
  Araştırma Görevlisi (2007 - 2017)
- Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Görevlisi (2006 - 2007)

YAYINLAR

SCI, SCI Expanded, SSCI ve AHCI Kapsamında Taranan Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- Öz, Mehmet Hüsrev Büyük, İlker **Akpinar, A. Emre** Yüksel Özmen, Canan Kazan, Kemal Vurgun, Hüseyin Bacaksiz, Ayşegül Çukadar, Kemal Ünlü, Hakan Murat Ergül, Ali. Eastern Anatolian apples with a unique population structure are genetically different from Anatolian apples *Gene, Gene (*723) 144149, 2020
- Zonuz, N.; **Akpınar, A.E**.; Akpınar, N.; Dağ, Ş.; Akpınar, M.A., Comparison of Fatty Acids of the Seed Oils of Three *Achillea* Species From Turkey. *Chemistry of Natural Compounds,* 56(1):115-118. 2020
- Zonuz, N.; Akpınar, N.; Dönmez, E.; Zengin G.; **Akpınar, A.E.;** Akpınar, M.A., Total Lipid Content, Fatty Acid Compositions and ω-6/ω-3 Ratios of Seeds of Some Wild *Achillea* Species. *Chemistry of Natural Compounds.* (55)1127–1130.2019
- Nukhet Akpinar, Mehmet Ali Akpinar, Salih Gorgun and **Ali Emre Akpinar**. Fatty acid composition and w3/w6 ratios in the muscle of wild and reared *Oncorhynchus mykiss*. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(1), 22-25, 2015.
- Burak, Masum; Ergul, Ali; Kazan, Kemal; Akcay, Mehmet Emin; Yuksel, Canan; Bakir, Melike; Mutaf, Filiz; **Akpinar, A. Emre**; Yasasin, A. Semih; Ayanoglu, Hamit, Genetic analysis of Anatolian apples (Malus sp.) by simple sequence repeats. *Journal Of Systematics and Evolution,* 52 (5);580-588, 2014.
- Guz, Nurper; Kocak, Erhan; **Akpinar, A. Emre**; Gurkan, M. Oktay; Kilincer, A. Neset, Wolbachia infection in Trissolcus species (Hymenoptera: Scelionidae). *European Journal of Entomology,* 109; 169-174, 2012.
- Akpinar, Nukhet; Gorgun, Salih; Akpulat, Huseyin Askin; Akpinar, Mehmet Ali; Aktumsek, Abdurrahman; **Akpinar, Ali Emre**, Fatty acid composition of the seeds of some species of Peucedanum (kral otu) from Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 36,233-237, 2012
- **Akpinar, A. E**.; Kocal, H.; Ergul, A.; Kazan, K.; Selli, M. E.; Bakir, M.; Aslantas, S.; Kaymak, S.; Saribas, R., SSR-based molecular analysis of economically important Turkish apricot cultivars. 2010. *Genetics And Molecular Research,* 9(1); 324-332, 2010.

- Dumanoglu, Hatice; Gunes, Nurdan Tuna; Aygun, Ahmet; San, Bekir; **Akpinar, Ali Emre**; Bakir, Melike, Analysis of clonal variations in cultivated quince (Cydonia oblonga 'Kalecik') based on fruit characteristics and SSR markers. 2009. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science,* 37; 119-120, 2009.
- Akpinar, Mehmet Ali; Gorgun, Salih; **Akpinar, Ali Emre**, A comparative analysis of the fatty acid profiles in the liver and muscles of male and female *Salmo trutta macrostigma*. *Food Chemistry*, 112, 6-8, 2009.
- Ayanoglu, H.; Bayazit, S.; Inan, G.; Bakir, M.; **Akpinar, A. E**.; Kazan, K.; Erguel, A., AFLP analysis of genetic diversity in Turkish green plum accessions (*Prunus cerasifera* L.) adapted to the Mediterranean region. *Scientia Horticulturae,* 114; 263-267, 2007.

SCI, SCI Expanded, SSCI Ve AHCI Dışında İndekslerde Taranan Hakemlı Dergılerde Yayınlanan Makaleler

- Zonuz, N.; Akpınar, N.; **Akpınar, A.E.;** Dönmez, E.; Aktümsek, A.; Akpınar, M.A., Effect of altitude on fatty acid composition of seed of wild *Achillea wilhelmsii* C. Koch. subsp. *wilhelmsii* from Turkey. *International Journal of Current Research in Life,* **7 (6), 2285-2288, 2018.**
- **Akpınar A E,** Serdar Altıntaş S, Sümeyye Altunok S, Mehmet Emin Akçay M E Merve Dilek Karataş M D, Ali Ergül A. Bazı Elma (Malus domestica Borkh.) Genotiplerinin SSR'lara (Simple Sequence Repeats) Dayalı Genetik Karakterizasyonu (2018) 35 (3), 268-277
- Akpınar, M.A., Akpınar, N., Kılınç, S., **Akpınar, A.E**., Görgün, S, Influence of dietary fatty acids on the liver fatty acid profile of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *C.Ü. Fen-Edebiya Fak. Fen Bilimleri Dergisi*, 31(2), 73-81, 2010.
- Akpinar, M.A., Akpinar, N., Metin K., **Akpinar, A.E.**, Görgün, S, *Gryllus campestris* L.(Orthoptera:Gryllidae)nin Çeşitli Gelişim Evrelerinde Glikojen Seviyesindeki Değişimler. *C.Ü.Fen-Edebiyat Fak. Fenbilimleri Dergisi*, 31(2), 22-28, 2010.

Uluslararası Kongre, Konferans, Sempozyum veya Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

- Karadag, T. Ozkan, **A. E. Akpinar**, M. Dastouri, G. Deniz Çubukçuoglu, S. Durdu, M. M. Davidson, H. Ozdag , A. R. Akar, A. Sunguroglu.Genome-wide analysis of hypoxic stress response in human cardiomyocytes**.** *The FEBS Journal* 283 (Suppl. 1) Paris - FRANCE (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808.
- **E. Akpinar,** A. Karadag, G. Deniz Çubububukçuoglu, M. Dastouri, S. Durdu, H. Ozdağ, A. Sunguroglu, A. R. Akar Comparative genome wide gene expression analyses of primary MSC and MSC lines.*The FEBS Journal 283* (Suppl. 1) Paris - FRANCE (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808.
- G. Çubukcuoglu Deniz, **A. E. Akpinar,** A. Karadag, Y. Dogan, S. Durdu, H. Ozdag, R. Akar.A Comparative transcriptional changes in patients with chronic primary mitral regurgitation: Atrial fibrillation versus sinus rhythm.. *The FEBS Journal* 283 (Suppl. 1) Paris - FRANCE (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808
- **Emre Akpinar**, Nurper Guz, Necva Hadim, M. Oktay Gurkan, Molecular Characterization of a Sodium Channel Gene From Spodoptera littoralis, *IXth European Congress of Entomology-Budapest HUNGARY*, 2010
- Selcan Alptekin, Nurper Guz, Sibel Velioglu, Cem Erdogan, **A. Emre Akpinar** and M. Oktay Gurkan, Insecticide Resistance Status of Myzus persicae Populations from Turkey, *IXth European Congress of Entomology- Budapest HUNGARY*, 2010
- Karadağ, M.R. Dastouri, T. Özkan, **A.E. Akpınar** and et al. ‘’Cell fusion following cardiomyocyte and mesenchymal stem cell co-culture and functional evalution of cellular changes’’III. International Stem Cell Symposium. Manisa, Turkey..04-05 May 2017
- Karadağ, T. Özkan, **A.E. Akpınar**, M.R. Dastouri and et al. ’Genome-Wide Gene expression analysis of hypoxis human cardiomyocytes’’ MolBiyoKon’17, 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. 8-10 September 2017, Boğaziçi University, İstanbul.